

*UNIVERSITAT DE  
VALÈNCIA*



*FACULTAD DE  
FARMACIA*

---

# **T E S I S   D O C T O R A L**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y PARASITOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

---

**Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal**

## **FASCIOLIASIS HUMANA Y ANIMAL EN AFRICA, CON ENFASIS EN EGIPTO**

por

**VERONICA HERNANDEZ AGRAMUNT**

### **Directores**

**Prof. Dr. Dr.h.c. Santiago Mas-Coma**

Catedrático de Parasitología  
Departamento de Biología Celular y Parasitología  
Facultad de Farmacia, Universitat de València

y

**Prof. Dra. María Dolores Bargues Castelló**

Catedrática de Parasitología  
Departamento de Biología Celular y Parasitología  
Facultad de Farmacia, Universitat de València

Valencia, Marzo de 2013

---

**AREA DE PARASITOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y PARASITOLOGIA  
FACULTAT DE FARMACIA, UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Av. Vicent Andrés Estellés s/n  
46100 Burjassot, Valencia  
Tel.: 963544298  
Fax: 963544769**

---

Los abajo firmantes, el Prof. Dr. Dr.h.c. SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València y la Prof. Dra. MARIA DOLORES BARGUES CASTELLO, Catedrático de Parasitología del citado Departamento, por la presente:

**CERTIFICAN:**

Que Doña VERONICA HERNANDEZ AGRAMUNT ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado "Fascioliasis humana y animal en Africa, con énfasis en Egipto" en el laboratorio del Departamento antedicho en la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València bajo su dirección y con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente

en Valencia, a 31 de Marzo de 2013

Fdo.:  
Prof. Dr. Dr.h.c. Santiago Mas-Coma

Fdo.:  
Prof. Dra. M. Dolores Bargues Castelló



**"Si no conozco algo, lo investigaré.."**

**Louis Pasteur**

**A mi Madre**

**A Manuel**

**HERNANDEZ AGRAMUNT (VERONICA), 2013.- FASCIOLIASIS HUMANA Y ANIMAL EN AFRICA, CON ENFASIS EN EGIPTO. FACULTAT DE FARMACIA, UNIVERSITAT DE VALENCIA (DIRECTORES: S. MAS-COMA & M.D. BARGUES).**

Fasciolid flukes cause fascioliasis, an helminthic disease of humans and livestock and which is transmitted by specific freshwater snails of the family Lymnaeidae, within a frame of transmission and epidemiology pronouncedly influenced by climate factors and environmental conditions. In Africa, fascioliasis is caused by the two species *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*, giving rise to important economic losses in husbandry throughout. Research on human infection has focused on northern Maghreb countries and Egypt, whereas studies on the wide region southward from the Sahara have only been sporadic. The present Thesis includes the genetic characterisation of the lymnaeid species found in selected endemic countries: Marocco, Algeria, Egypt, Senegal, Burkina Faso, Nigeria, Tanzania, South Africa, and the islands of Madagascar and Cape Verde. Molecular markers used were the ITS-2 and the ITS-1 spacers of the nuclear ribosomal DNA. The molecular results obtained show the presence of different valid species. *Radix natalensis* appears to be the original African species showing the largest geographical distribution, with *R. n. caillaudi* as a form having spread northward up to the Nile Delta in a phenomenon which has been dated by means of a study of snails from the Old Egypt period and a molecular clock analysis. The phenotypic characteristics of adults, clusters and eggs of *R. n. caillaudi* have been studied by means of CIAS (Computer Image Analysis System). The remaining snails analysed demonstrate the poorness of the lymnaeid fauna of that continent, including but a few introduced species such as *Galba truncatula*, *Lymnaea (Stagnicola) fuscus*, *Radix auricularia*, *R. balthica*, *L. schirazensis* and *Pseudosuccinea columella*. The retrospective study shows that human fascioliasis in Maghreb countries only concern sporadic patients diagnosed in hospitals. This situation is completely opposite to that found in Egypt, where human fascioliasis proves to be a serious public health problem throughout the Nile Delta, mainly in its northern parts. Prevalences reported reach up to 19.0% in several communities, significantly higher in females and mainly affecting 5-15-year-old children. Epidemiological data from Egypt suggest a seasonal transmission interrupted by a very hot summer. Transmission and epidemiological data indicate that Maghreb countries and Egypt should not be included within the same transmission pattern and epidemiological situation. The Maghreb is characterised by the disease being caused by only *F. hepatica* transmitted by *G. truncatula*, whereas in Egypt there is local overlap of the two fasciolid species and intermediate forms transmitted by *G. truncatula*, *R. n. caillaudi* and *P. columella* in a way which also appears significantly different from the situation of the disease in the Near East.

**Key Words:** Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, humans, livestock, Maghreb, Egypt, retrospective analysis, Lymnaeidae, molecular characterisation, phylogenetic analysis, geographical distribution, Africa.



# INDICE

<b>- AGRADECIMIENTOS</b> .....	11
<b>1.- INTRODUCCION</b> .....	19
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	25
2.1.- La Fascioliasis .....	27
2.1.1.- Los agentes causales .....	27
2.1.2.- Ciclo biológico y transmisión de la enfermedad .....	28
2.1.3.- Los Lymnaeidos hospedadores intermediarios y su especificidad .....	31
2.1.4.- Distribución geográfica .....	32
2.1.5.- Epidemiología .....	34
2.1.5.1.- Situaciones epidemiológicas .....	37
2.1.5.2.- Patrones de transmisión .....	38
2.1.5.- Clinica y patología .....	39
2.1.6.- Tratamiento .....	41
2.1.7.- Profilaxis y control .....	42
2.2.- La iniciativa mundial de la Sede Central de la Organización Mundial de la Salud (OMS) .....	43
2.3.- La Fascioliasis en Africa .....	45
2.3.1.- <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola gigantica</i> .....	45
2.3.2.- Lymnaeidos en el continente africano .....	46
2.3.3.- El interés de la Fascioliasis humana en el Norte de Africa .....	47
2.4.- La Fascioliasis en Egipto .....	48
2.4.1.- La Fascioliasis humana en el Delta del Nilo .....	49
2.4.2.- La problemática de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Fasciola</i> <i>gigantica</i> en Egipto .....	50
2.4.- Caracterización molecular por haplotipaje mediante ADNr .....	51
2.4.1.- Marcadores del ADN ribosomal nuclear .....	52
2.4.1.1.- El segundo espaciador transcrito interno o ITS-2 .....	54
2.4.1.2.- El primer espaciador transcrito interno o ITS-1 .....	54

<b>3.- MATERIAL Y METODOS</b> .....	57
3.1.- Materiales .....	59
3.1.1.- Prospecciones en Egipto .....	59
3.1.1.1.- Recolección de Lymnaeidos en zonas de endemia .....	65
3.1.1.2.- Observación de objetos ornamentales en el Museo del Cairo .....	66
3.1.1.3.- Búsqueda de obras antiguas en El Cairo .....	67
3.1.2.- Prospecciones en Marruecos .....	69
3.1.3.- Obtención de ejemplares de Lymnaeidos de otros países africanos por colaboración con colegas científicos .....	70
3.1.4.- Obtención de especímenes de Lymnaeidos por cultivo en el laboratorio .....	70
3.1.4.1.- Recolección y transporte <i>in vivo</i> .....	71
3.1.4.2.- Adaptación y cultivo <i>in vivo</i> de Lymnaeidos .....	71
3.2.- Métodos moleculares de genotipaje .....	73
3.2.1.- Manejo de Lymnaeidos .....	73
3.2.1.1.- Técnicas de campo .....	74
3.2.1.2.- Recolección y fijación para fines moleculares .....	75
3.2.2.- Estudio molecular por secuenciación de marcadores de ADN .....	76
3.2.2.1.- Extracción del ADN .....	76
3.2.2.2.- Amplificación de los marcadores moleculares por PCR .....	78
3.2.2.3.- Electroforesis en gel de agarosa .....	78
3.2.2.4.- Purificación de los productos amplificados por PCR .....	79
3.2.2.5.- Cuantificación y determinación de la pureza del ADN .....	80
3.2.2.6.- Secuenciación del ADN .....	80
3.2.2.7.- Análisis de las secuencias .....	81
3.2.2.8.- Nomenclatura de los haplotipos de ADN .....	81
3.2.3.- Estudio de relaciones evolutivas mediante métodos filogenéticos ...	82
3.2.4.- Estimación cronológica de divergencias moleculares .....	83
3.2.4.1.- Fundamento de las divergencias evolutivas .....	82
3.2.4.2.- Cálculo del reloj molecular .....	83
3.3.- Métodos morfométricos de fenotipaje .....	84
3.3.1.- Medición mediante Computer Image Analysis System (CIAS) .....	85
3.3.2.- Conservación de conchas de Lymnaeidos .....	85
3.3.3.- Medición de conchas actuales mediante CIAS .....	86

3.3.4.- Medición de conchas del Antiguo Egipto .....	88
3.3.5.- Medición de clusters y huevos de Lymnaeidos obtenidos en cultivos puros .....	89
3.3.6.- Métodos estadísticos .....	89
3.4.- Métodos de análisis retrospectivos .....	89
3.4.1.- Fuentes bibliográficas utilizadas .....	89
3.4.1.1.- Bases de datos .....	89
3.4.1.2.- Webs nacionales e internacionales y colecciones libres .....	90
3.4.1.3.- Paquetes multi-títulos o plataformas web .....	90
3.4.1.4.- Librerías .....	90
3.4.1.5.- Colecciones y librerías personales.....	91
3.4.2.- Métodos de revisión .....	91
3.4.3.- Problemas encontrados en la revisión .....	93
3.4.4.- Evaluación de la calidad de la información .....	96
<b>4.- RESULTADOS</b> .....	<b>99</b>
4.1.- Genotipaje de Lymnaeidos de Africa .....	101
4.1.1.- Lymnaeidos de Marruecos .....	102
4.1.1.1.- <i>Galba truncatula</i> .....	102
4.1.1.2.- <i>Radix balthica</i> .....	102
4.1.2.- Lymnaeidos de Argelia .....	103
4.1.2.1.- <i>Lymnaea (Stagnicola) fuscus</i> .....	103
4.1.2.2.- <i>Radix auricularia</i> .....	104
4.1.3.- Lymnaeidos de Egipto .....	105
4.1.3.1.- <i>Galba truncatula</i> .....	105
4.1.3.2.- <i>Lymnaea schirazensis</i> .....	106
4.1.3.3.- <i>Radix caillaudi</i> .....	107
4.1.3.4.- <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	108
4.1.4.- Lymnaeidos de Senegal .....	108
4.1.4.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	108
4.1.5.- Lymnaeidos de Burkina Faso .....	109
4.1.5.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	109
4.1.6.- Lymnaeidos de Nigeria .....	109
4.1.6.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	109
4.1.7.- Lymnaeidos de Angola .....	110

4.1.7.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	110
4.1.8.- Lymnaeidos de Tanzania .....	111
4.1.8.1.- <i>Galba truncatula</i> .....	111
4.1.8.2.- <i>Radix natalensis</i> .....	112
4.1.9.- Lymnaeidos de Sudafrica .....	113
4.1.9.1.- <i>Galba truncatula</i> .....	113
4.1.9.2.- <i>Radix natalensis</i> .....	113
4.1.9.3.- <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	114
4.1.10.- Lymnaeidos de Madagascar .....	115
4.1.10.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	115
4.1.10.2.- <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	115
4.1.11.- Lymnaeidos de Cabo Verde .....	116
4.1.11.1.- <i>Radix natalensis</i> .....	116
4.2.- Análisis filogenético general de los Lymnaeidos de Africa .....	118
4.3.- Análisis de la distribución geográfica de las especies de Lymnaeidos en Africa.....	120
4.4.- Estudio fenotípico de <i>Radix caillaudi</i> de Egipto .....	123
4.4.1.- Variabilidad morfométrica de la concha .....	123
4.4.1.1.- En poblaciones naturales .....	123
4.4.1.2.- En cultivos .....	131
4.4.1.3.- En el Antiguo Egipto .....	136
4.4.2.- Variabilidad morfométrica de los clusters .....	140
4.4.2.1.- Estudio de los clusters .....	140
4.4.2.2.- Estudio de los huevos .....	140
4.4.3.- Análisis crono-paleobiogeográfico .....	141
4.4.3.1.- Cálculo del reloj molecular en Lymnaeidos .....	141
4.4.3.2.- Estimación de la divergencia en Egipto .....	142
4.5.- Estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana en el Maghreb .....	144
4.5.1.- Casuística en Marruecos .....	145
4.5.2.- Casuística en Argelia .....	147
4.5.3.- Casuística en Túnez .....	151
4.6.- Estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana en Egipto .....	152
4.6.1.- Distribución según fecha de los artículos .....	152
4.6.2.- Distribución según género .....	153
4.6.3.- Distribución según edad .....	156

4.6.4.- Distribución geográfica de la Fascioliasis humana .....	157
4.6.5.- Distribución de la casuística según la estación del año .....	162
4.6.6.- Distribución según el año del diagnóstico .....	164
4.6.7.- Métodos y técnicas de diagnóstico utilizadas .....	166
4.6.7.1.- Por hallazgo de huevos en exámenes coprológicos .....	167
4.6.7.2.- Por serología .....	169
4.6.7.3.- Por intervención quirúrgica .....	174
4.6.7.4.- Por técnicas no-invasivas .....	176
4.6.7.5.- Por otras técnicas .....	178
4.6.8.- Diagnóstico clínico/epidemiológico .....	178
4.6.9.- Aspectos clínicos .....	180
4.6.10.- Casos ectópicos .....	183
4.6.11.- Tratamiento .....	184
4.6.12.- Fuentes de infección humana .....	191
4.6.13.- Situaciones de endemia humana .....	193
4.6.14.- Epidemias familiares y/o locales .....	195
4.6.15.- Coinfección con otros parásitos .....	196
<b>5.- DISCUSION .....</b>	<b>199</b>
5.1.- Valor de los espaciadores del ADNr nuclear para la distinción de especies de Lymnaeidos en Africa .....	201
5.1.1.- ITS-2 .....	201
5.1.2.- ITS-1 .....	201
5.2.- Fauna y distribución de Lymnaeidos en Africa .....	202
5.2.1.- Lymnaeidos en el Norte de Africa .....	202
5.2.2.- Lymnaeidos en Africa subsahariana y occidental .....	202
5.2.3.- Lymnaeidos en Africa oriental y meridional .....	202
5.2.4.- Lymnaeidos en islas adyacentes .....	203
5.3.- Relaciones filogenéticas entre los Lymnaeidos de Africa .....	203
5.4.- Relaciones entre Lymnaeidos y Fascioliasis humana en Egipto .....	204
5.4.1.- Transmisión y epidemiología de <i>Fasciola hepatica</i> .....	205
5.4.1.1.- Introducción de <i>Galba truncatula</i> .....	205
5.4.1.2.- Introducción de <i>Lymnaea schirazensis</i> .....	205
5.4.2.- Transmisión y epidemiología de <i>Fasciola gigantica</i> .....	206
5.4.2.1.- Llegada de <i>Radix natalensis caillaudi</i> : El Nilo	



y el Antiguo Egipto .....	206
5.4.2.2.- El papel de <i>Pseudosuccinea columella</i> .....	207
5.5.- Heterogeneidad de la Fascioliasis humana en el Norte de Africa .....	207
5.5.1.- El "hot spot" del Maghreb .....	207
5.5.2.- El "hot spot" de Egipto .....	208
5.6.- La complejidad de la transmisión y epidemiología de la Fascioliasis y su impacto sobre la afección humana en Egipto .....	209
5.6.1.- Consecuencias del entorno histórico y geográfico .....	210
5.6.1.1.- El papel de Egipto en la dispersión de la Fascioliasis en tiempos predomesticación .....	210
5.6.1.2.- El papel de Egipto en la dispersión de la Fascioliasis en tiempos postdomesticación .....	210
5.6.1.3.- Comparación de resultados fenotípicos .....	211
5.6.1.4.- Adscripción fenotípica específica de los moluscos del Antiguo Egipto .....	212
5.6.2.- Distribución y expansión geográfica actuales dentro del país .....	212
5.6.3.- Epidemiologías de las Fascioliasis por <i>F. hepatica</i> y <i>F. gigantica</i> .....	213
5.6.4.- Problemas de diagnóstico diferencial .....	214
5.6.5.- La problemática del tratamiento .....	215
5.6.6.- Perspectivas de control en el futuro .....	216
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	219
6.1.- Conclusiones.....	221
<b>7.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	227
<b>8.- PUBLICACIONES POR ORDEN CRONOLOGICO</b> .....	249
8.1.- MAS-COMA (S.), <b>AGRAMUNT (V.H.)</b> , BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2009.- The global burden of foodborne fascioliasis. Internal Report. Parasitic Disease Task Force, Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group (FERG), World Health Organization, WHO Headquarters Geneva: 33 pp. ( <b>no disponible por términos de funcionamiento de FERG-WHO</b> )	

8.2.- MERA Y SIERRA (R.), **AGRAMUNT (V.H.)**, CUERVO (P.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasites & Vectors*, 4: 104 (18 pp.) (<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/104>).

8.3.- ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.), **AGRAMUNT (V.H.)** & MAS-COMA (S.), 2011.- Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*. *Acta Tropica*, 120: 245-257.

8.4.- MAS-COMA (S.), **AGRAMUNT (V.H.)** & VALERO (M.A.), 2013.- Direct and indirect affection of the central nervous system by *Fasciola* infection. In: *Handbook of Clinical Neurology*, Volume 114 (3rd Series), *Neuroparasitology and Tropical Neurology* (H. García, H.B. Tanowitz & O.H. Del Brutto edit.), Elsevier, Chapter 24: in press. **(no disponible por términos del copyright - se adjunta primera página y página de agradecimientos)**

8.5.- MAS-COMA (S.), **AGRAMUNT (V.H.)** & VALERO (M.A.), 2013.- Neurological and ocular fascioliasis in humans. *Advances in Parasitology*, Elsevier, Volume 73: in press. **(no disponible por términos del copyright - se adjunta primera página y página de agradecimientos)**



## **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Esta Memoria no hubiese nunca visto la luz sin la contribución de muchos especialistas en diferentes aspectos de las prospecciones y estudios realizados. Es un verdadero placer proceder, en las líneas que siguen, a enumerarlos a todos y cada uno de ellos.

En primer lugar tenemos que nombrar al Prof. Dr. Dr. Honoris Causa Santiago Mas-Coma, Catedrático del Departament de Parasitologia i Biologia Cel·lular, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, por haberme dado la oportunidad de aprender de su gran experiencia, participar de su entusiasmo, asignarme y dirigirme este trabajo, y en gratitud por el privilegio de haber podido conocer la problemática del estudio de la Fascioliasis in situ en una expedición realizada conjuntamente a Egipto. Fue el Prof. Mas-Coma quien además me brindó la oportunidad de trabajar en una iniciativa de la Organización Mundial de la Salud, de visitar la Sede Central de este organismo en Ginebra y conocer a diferentes especialistas de la misma. La puerta que en su día me abriera para trabajar en el "Centro Colaborador de la OMS sobre la Fascioliasis y sus Vectores" que él mismo dirige resultó crucial en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

En segundo lugar, quisiera manifestar mi agradecimiento a la Prof. Dra. María Dolores Bargues Castelló, Catedrática de Parasitologia del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, por haber aceptado la codirección de esta Tesis Doctoral en su día, incorporándome a su línea de investigación dentro de este Departamento, fundamentada en el estudio de la "Biología Molecular de Parásitos y Vectores". Se agradece muy especialmente el tiempo y la confianza dedicados durante mi entrenamiento laboratorial, complementados por una dirección científica personal y de lo más estimulante. Quiero agradecer también la cercanía y apoyo constante desplegado en todos estos años. Por todo ello, y por mucho más, confiamos en que encuentre aquí mi más sincero agradecimiento.

Quiero hacer una mención especial a la Profesora Titular de Parasitologia del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València Dra. María Adela Valero Aleixandre, por concederme parte de su tiempo, y sobre todo en la resolución de problemas y contratiempos informáticos y estadísticos.

Una referencia especial merece el Dr. Messaoud Khoubbane del mismo Equipo del Departament de Parasitologia i Biologia Cel·lular, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, porque sin su impagable ayuda, sin su dedicación en las horas del laboratorio, su amistad y apoyo en cualquier circunstancia, hubiera sido imposible

realizar este trabajo. Su colaboración en aspectos de mantenimiento de caracoles, fenotipaje y conocimientos sobre caracoles Lymnaeidae han sido decisivos en este estudio.

Es al Dr. Patricio Artigas Bascur a quien debemos agradecer su colaboración personal y participación en nuestra formación en métodos y técnicas moleculares, así como también, y muy significativamente, sus decisivas y frecuentes ayudas en cuestiones de ordenadores, software e informática en general. Su ayuda en varias de estas vicisitudes resultó fundamental para que esta Tesis Doctoal pudiera ver la luz al final.

Tampoco podemos olvidar al Dr. Mario Sendra del Departamento de Bioestadística de la Universidad de Valencia, por su asesoramiento en los tratamientos estadísticos necesarios.

Son muchas las personas sin las cuales el estudio sobre Fascioliasis en Egipto hubiese sido imposible. En este enumeración cabe destacar la ayuda recibida de parte de las siguientes personas.

Al Dr. Filippo Curtale, Directorate General for Development Cooperation (DGCS), Ministry of Foreign Affaires, Roma, Italia, por su amable asistencia, apoyo y disposición durante mi estancia en El Cairo.

Al Dr. Albis-Francesco Gabrielli, Medical Officer, Preventive Chemotherapy and Transmission Control, Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization (WHO), Geneva, Suiza, por su amistad y colaboración en los desplazamientos por El Cairo, durante la estancia en Egipto.

Al Prof. Dr. Tosson Morsy, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, por la calurosa acogida, su gran hospitalidad demostrada en Egipto, y en agradecimiento a la valiosa información que me facilitó.

A Miss Gehane Algarraya, General Library, Regional Office for the Eastern Mediterranean (EMRO), El Cairo, Egipto, World Health Organization (WHO/EMRO), por cederme parte de su tiempo en conseguir y enviar importante información desde su país.

A la Dra. Zeinab M. Youssef, Undersecretary of Endemic Diseases, Ministry of Health and Population, Egypt, por el recibimiento, hospitalidad y las facilidades que puso a nuestra disposición para aprovechar al máximo la estancia en Egipto.

Al Dr. Mohamed Mostafa Youssef, Director General for Schistosomiasis and Intestinal Parasites Control, Ministry of Health and Population, Egypt, por su acogida en El Cairo y en agradecimiento a las innumerables muestras de hospitalidad.

A Teresa Bedman, del Instituto de Estudios Egiptológicos de Madrid por compartir sus vastos conocimientos sobre la antigua cultura faraónica.

A James Hatton, Assistant Librarian, General and Zoology Library, The Natural History Museum, London, UK, por su amistad y participación en la búsqueda de documentación.

Y finalmente al personal de la Biblioteca del Campus de Ciències de Burjassot, Universitat de València, y muy especialmente a Pilar Coloma, por su enorme disposición en la búsqueda de cualquier información.

Muy numerosas son también las personas sin cuya colaboración en la recolección y envío de materiales de moluscos Lymnaeidae de diferentes países del Africa las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral hubieran sido imposibles. Su enumeración aquí sería demasiado extensa. Pero esperamos que en las publicaciones de los resultados de esta Tesis Doctoral su participación esperada como coautores de las diferentes publicaciones previstas sirva de agradecimiento a su muy valiosa colaboración científica.

Por último, cabe citar a mis compañeros del laboratorio de Parasitología i Biología Cel.lular, muy especialmente a la Dra. María Angeles Zuriaga Herrero, Ignacio Pérez Crespo, y Rosmary Flores, por su comprensión, amistad e inestimable ayuda en cualquier ocasión, en agradecimiento igualmente extensible a Melisa Higón, Claudia Patricia Herrera, María Victoria Periago, Ana Pérez y Jose Manuel de la Torre.

Para la realización de esta Tesis Doctoral he tenido la ocasión de contar con un contrato dentro del Proyecto "The Global Burden of Fascioliasis" dentro de la iniciativa de la OMS WHO para la estimación del "Global Burden of Foodborne Diseases", financiada por el Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group (FERG), Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases (FOS), Organización Mundial de la Salud, Sede Central, Ginebra, Suiza.

Tanto los trabajos de campo efectuados formando parte de expediciones a los países africanos endémicos, como los estudios y análisis efectuados en el laboratorio, fueron llevados a cabo con el financiamiento obtenido por parte de diferentes proyectos de investigación. Siguiendo un orden cronológico, los proyectos de que se ha beneficiado la realización de la presente Tesis Doctoral, son los siguientes:

1) Proyecto SAF2006-09278 titulado "Estudios estratégicos para la lucha contra la fascioliasis humana a nivel mundial", financiado por la Dirección General de



Investigación, Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN), Madrid, España (2006-2009)

2) Proyecto ISCIII-RETIC RD06/0021/0017 titulado "Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales (RICET)", financiado por el Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad, Madrid, España (2007-2012)

3) Proyecto S/N titulado "Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group (FERG)", financiado por Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases (FOS), Organización Mundial de la Salud (OMS), Headquarters Geneva, Suiza (2008-2009)

4) Proyecto SAF2010-20805 titulado "Epidemiología molecular y cambios climático y global en el impacto emergente de la fascioliasis humana a nivel mundial", financiado por la Dirección General de Investigación, Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN), Madrid, España (2011-2013)

5) Proyecto ISCIII-RETIC RD12/0018/0013 titulado "Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales (RICET)", financiado por el Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RETICS/FEDER, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España (2013-2016)

6) Proyecto PROMETEO/2012/042, del programa de Ayudas para Grupos de Investigación de Excelencia, Generalitat Valenciana, Valencia, Spain (2012-2015).

Finalmente, cabe citar que las investigaciones realizadas dentro de la presente Tesis Doctoral forman parte de la Activity 1 (Studies on the disease epidemiology in human fascioliasis endemic areas of Latin America, Europe, Africa and Asia), Activity 2 (Molecular, Genetic and Malacological Characterization of Lymnaeid Snails), y Activity 3 (Studies on pathology, immunology and community impact of human fascioliasis), dentro del Work Plan 2011-2015 del "WHO Collaborating Centre on Fascioliasis and Its Snail Vectors" (Ref. SPA-37, WHO Headquarters Geneva, Suiza) de la Unidad de Parasitología del Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Universidad de Valencia.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCION**



## 1.- INTRODUCCION

La Fascioliasis humana es una enfermedad que fue considerada rara o esporádica durante muchísimo tiempo, tal y como lo demuestra la revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizada en 1990 (CHEN & MOTT, 1990), en la cual se hace referencia a únicamente un total de 2500 casos reportados en las dos décadas que van del 1970 al 1990 en todos los países de los cinco continentes.

Este panorama empezó a cambiar radicalmente a partir del año 1990, esencialmente tras el encargo de la Sede Central de la OMS en Ginebra, Suiza, al Equipo de parasitólogos de la Universidad de Valencia liderados por el Prof. S. Mas-Coma, de llevar a cabo primero un estudio de la situación de la Fascioliasis humana en la isla francesa de Córcega, en el Mediterráneo occidental, y posteriormente de ocuparse de la problemática de la Fascioliasis humana en el Altiplano Norte de Bolivia, junto a la capital de este país, La Paz. Los éxitos cosechados en las investigaciones de ambas situaciones, con la correspondiente y subsiguiente publicación de numerosos artículos científicos, incluyendo la dilucidación de fenómenos de la Fascioliasis nunca antes analizados, como el impacto de la adaptación de *Fasciola hepatica* a roedores silvestres y de la ampliación del nicho ecológico de la especie de Lymnaeido más importante en la transmisión, *Galba truncatula*, en la difusión geográfica y temporal de la incidencia en humanos en Córcega, y los numerosos aspectos inesperados relacionados con la adaptación a la gran altitud de 4000 m tanto del parásito como del caracol transmisor antes aludidos en Bolivia, entre ellos el incremento de la transmisión de la enfermedad y la capacidad de difusión geográfica de la misma hasta en lugares inusualmente inhóspitos, constituyeron los primeros pasos de un muy largo camino de cambios en los conocimientos sobre la afección humana por *Fasciola* de más de dos décadas y que aún sigue hoy en día.

El antes mencionado camino, lleno de investigaciones en numerosos países de todos los continentes, ha conducido a un panorama actual de la Fascioliasis humana completamente diferente, con estimaciones cifrando hasta más de 17 millones de personas infectadas en el mundo, y ello a pesar del desconocimiento profundo del que se dispone de vastas regiones tanto de Africa como de Asia. En estos últimos años se ha demostrado que existen áreas de endemia humana en las cuales llegan a detectarse prevalencias de hasta el 100% por serología y más del 70% por coprología en niños, con afección sobre todo en la infancia y en el sexo femenino (MAS-COMA et al., 2005).

Ante todo ello, se han descrito ya varios tipos de situaciones epidemiológicas de la Fascioliasis humana, que van desde zonas de hiperendemia hasta de hipoendemia, pasando por mesoendemias, así como también áreas con epidemias humanas en zonas de endemia animal y áreas de epidemias humanas en zonas de endemia humana, con características muy diferentes las unas de las otras (MAS-COMA et al., 1999a, b). Estas diferentes situaciones epidemiológicas han demostrado, además, encontrarse relacionadas con diferentes patrones de transmisión, comprendiendo (i) patrón de gran altitud típico de Países Andinos y dentro del cual cabe distinguir los dos subpatrones de altiplano (transmisión permanente) y valle (transmisión estacional), (ii) patrón caribeño caracterizado por sus repetidas epidemias y típicamente representado por Cuba, (iii) patrón norteafricano mediterráneo oriental de baja altitud caracterizado por solapación de *F. hepatica* y *F. gigantica* y representado por Egipto, (iv) patrón del Próximo Oriente caracterizado por grandes epidemias sobre hipoendemia humana constante y representado por Irán, y (v) patrón del Sud-Este de Asia, con esencialmente *F. gigantica* a lo largo de llanuras costeras en actual situación de epidemia en expansión geográfica, bien representado por el país de Vietnam (MAS-COMA, 2005; MAS-COMA et al., 2009a). A estos patrones se les ha adicionado dos patrones más, (vi) uno de tierras bajas representado por zonas de Chile y Perú y (vii) otro de mediana altitud en tierras altiplánicas norteamericanas representado por México, ambos hoy en día en fase aún de caracterización.

La problemática clínica y de patogenicidad que representan todas estas situaciones epidemiológicas y patrones de transmisión de la Fascioliasis humana es amplísima, habida cuenta ya no sólo la bien reconocida problemática planteada por la fase aguda de la enfermedad, sino por el hecho de que estudios de los últimos años han venido a demostrar que la Fascioliasis plantea también serios problemas clínicos y patogénicos durante la muy prolongada fase de cronicidad, que en humanos se estima del orden de 13,5 años (VALERO et al., 2003, 2006, 2008). A todo ello cabe añadir la problemática de la inmunosupresión que es capaz de originar la Fascioliasis en su hospedador definitivo, tanto en su fase aguda (O'NEILL et al., 2000) como en su fase crónica (GIRONES et al., 2007). Es precisamente esta capacidad inmunosupresora que muestra *Fasciola* a la cual se adscribe en parte la enorme morbilidad y también mortalidad que es capaz de dar lugar. Así, estas morbilidad y mortalidad estarán relacionadas con la alta carga parasitaria consecuente de la inmunosupresión, con coinfecciones habituales de *Fasciola* con numerosas especies de protozoos y helmintos, muchos de ellos de alta patogenicidad bien reconocida. En Países Andinos,

se han citado coinfecciones de *Fasciola* con hasta 8 parásitos concomitantes en un mismo niño (ESTEBAN et al., 1997a, b, 2002; GONZALEZ et al., 2009).

Esta problemática clínica y epidemiológica se amplía más aún si cabe como consecuencia del altísimo riesgo de reinfección por la misma Fascioliasis en dichas áreas de endemia, y sobre todo en áreas de hiperendemia humana como sucede en los Altiplanos Boliviano (ESTEBAN et al., 1999; MAS-COMA et al., 1999) y Peruano (ESTEBAN et al., 2000) y valles andinos del Perú (GONZALEZ et al., 2011). Dichas situaciones pasan a ser realmente serias, debido a que en estos lugares los más afectados son esencialmente niños de 4 a 15 años de edad, con un pico de prevalencias e intensidades en la franja de los 9 a 11 años de edad (ESTEBAN et al., 1999). Estas continuas reinfecciones están muy probablemente en el trasfondo de sorprendentes cargas parasitarias en niños, de hasta más de 5000 huevos por gramo de heces (epg = eggs per gram of faeces) (ESTEBAN et al., 1999) o incluso de más de 8000 epg en algunos niños (MAS-COMA et al., 2009a).

Situaciones altamente problemáticas de Fascioliasis humana han sido ya descritas en varios continentes, esencialmente América del Sur y Caribe, Egipto, Próximo Oriente incluyendo esencialmente Irán, y últimamente también Vietnam en el Sud-Este de Asia (MAS-COMA et al., 2009a). Estas situaciones, adscritas en parte a emergencias y re-emergencias consecuencias del cambio climático (MAS-COMA et al., 2008, 2009b), muestran en cambio un notable y destacable vacío de conocimientos en el continente africano.

África es sin duda el gran desconocido en lo que se refiere a Fascioliasis humana. Este hecho sorprende cuando se tiene en cuenta que este continente es el considerado como centro origen evolutivo de *F. gigantica*, concretamente hace más de 19 millones de años en el África oriental en caracoles de la especie *Radix natalensis* y hospedadores rumiantes de diferentes grupos (Reduncinae, Alcelaphinae y Giraffidae) que poblaban esas llanuras africanas en dicho periodo geológico (MAS-COMA et al., 2009a). En África se presentan las dos especies *F. hepatica* y *F. gigantica*. La especie original *F. gigantica* está distribuida por todo el continente al Sur del vasto desierto del Sahara, extendiéndose en el Este hasta el Mediterráneo por la franja del cauce del río Nilo. En cambio, *F. hepatica* se restringe a los países nórdicos del Maghreb de Marruecos, Argelia y Túnez y fue introducida también a lo largo del Este de África desde Egipto hasta Sudan, Etiopía, Kenia, Tanzania y hasta África del Sur y Madagascar (MAS-COMA et al., 2009a).

Los estudios sobre Fascioliasis en África, relativamente poco numerosos si se comparan con los efectuados por ejemplo en Europa, se han restringido casi por

completo al ganado y muy esporádicamente animales silvestres, como consecuencia de la importancia de esta enfermedad en rumiantes domésticos (TORGERSON & CLAXTON, 1999), sobre todo *F. gigantica* (SPITHILL et al., 1999) en el caso del continente africano.

La Fascioliasis humana en Africa ha sido objeto de estudios únicamente esporádicos, lo cual sorprende habida cuenta los numerosísimos estudios llevados a cabo en este continente sobre otra enfermedad parasitaria causada por trematodos como es la Schistosomiasis (DOUMENGE et al., 1987). Solamente en Africa del Norte se han dedicado estudios al análisis de la situación de la Fascioliasis humana, esencialmente en Egipto donde la literatura al respecto es muy numerosa. Secundariamente, también se han llevado a cabo varios trabajos sobre Fascioliasis humana en los Países del Maghreb, si bien en Marruecos, Argelia y Túnez se trata de estudios clínicos de pacientes aparentemente diagnosticados en hospitales.

La presente Tesis Doctoral tiene por objetivos generales en primer lugar un amplio estudio de los Lymnaeidos presentes en varios países cubriendo gran parte de Africa y en segundo lugar analizar la situación de la Fascioliasis humana en el Norte del mismo continente.

El primer aspecto se focaliza en el aspecto crucial de la determinación de las especies de Lymnaeidos, dada la marcada especificidad de las especies respecto de la transmisión de una u otra especie de Fasciólido, *F. hepatica* o *F. gigantica* (BARGUES et al., 2001) y sobre todo al papel ya no sólo relevante sino totalmente decisivo que los Lymnaeidos desarrollan en el establecimiento de una u otra situación epidemiológica y uno u otro patrón de transmisión (BARGUES & MAS-COMA, 2005; MAS-COMA et al., 2009a), tal y como ya se ha visto recientemente en diferentes países como Bolivia (MAS-COMA et al., 2001), Venezuela (BARGUES et al., 2011c), Chile (ARTIGAS et al., 2011), Colombia y Ecuador (BARGUES et al., 2011a) y también Perú (BARGUES et al., 2012).

El segundo aspecto se centra en el análisis retrospectivo de la situación de la Fascioliasis humana, esencialmente en Egipto como país con varias áreas de hiperendemia y mesoendemia humanas en toda la franja del Delta del Nilo, pero también en los países del Maghreb para dilucidar si Marruecos, Argelia y Tunez deben ser considerados dentro del conjunto de la misma o parecida situación epidemiológica y patrón de transmisión que Egipto. La focalización de este segundo aspecto únicamente en el norte de Africa se debe a su importancia estratégica por su proximidad geográfica al Sur de Europa y el riesgo que ello entraña cara a una potencial expansión de la situación de la Fascioliasis humana desde el norte del Africa

al Sur de Europa como consecuencia del cambio climático (esencialmente el calentamiento global, en este caso) y del cambio global (esencialmente los intercambios comerciales y turísticos entre ambas regiones de Africa y Europa).

Egipto juega un papel primordial en el nexo de unión entre ambos aspectos generales de la Tesis Doctoral, dada la importancia del papel de este país tanto en la antigüedad como en la actualidad en la evolución y dispersión de la Fascioliasis ya no solamente entre los tres continentes de Africa, Europa y Asia, sino incluso del mundo entero (MAS-COMA et al., 2009a; BARGUES et al., 2011b).

Para los objetivos generales antes citados, hemos organizado la exposición de la presente Memoria en 8 diferentes capítulos. Después de un corto Primer Capítulo de la Introducción, se expone un Segundo Capítulo para incluir una amplia y suficiente base de Antecedentes, comprendiendo (i) para comenzar una descripción detallada de la enfermedad de la Fascioliasis con especial hincapié en su impacto en humanos y la iniciativa mundial liderada por la OMS, (ii) después una exposición de la problemática de la Fascioliasis en Africa, (iii) con especial hincapié en Egipto, y por último (iv) un análisis de la caracterización molecular de organismos mediante haplotipaje por marcadores del ADN ribosomal nuclear, focalizándose en las ventajas y desventajas de los dos espaciadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2 y su utilidad para la distinción y diferenciación de especies de moluscos Lymnaeidae.

El Tercer Capítulo incluye los aspectos de Material y Métodos. En este capítulo se aborda, dentro del apartado de Materiales, las prospecciones realizadas en Egipto y en Marruecos para la recolección de especímenes de Lymnaeidos en zonas de endemia de Fascioliasis, la obtención de materiales a partir de los demás países del mismo continente, así como también las observaciones efectuadas sobre objetos ornamentales en el Museo de Egiptología del Cairo en el cual se tuvo la suerte de encontrar una pieza de enorme valor histórico pero también científico que permanecía sin ser determinada. La obtención de especímenes de Lymnaeidos por cultivo en el laboratorio forma la parte final de este subcapítulo.

Los métodos moleculares de genotipaje son el objeto de los siguientes apartados, incluyendo desde el manejo de los Lymnaeidos, el estudio molecular por secuenciación de marcadores de ADN, el estudio de relaciones evolutivas mediante métodos filogenéticos, y la estimación cronológica de divergencias moleculares mediante determinación por reloj molecular, además de los métodos morfométricos de fenotipaje mediante CIAS (Computer Image Analysis System). La parte final de este Capítulo Tercero está destinada a la exposición de los varios métodos de análisis retrospectivos utilizados, sus problemas y la evaluación de la calidad de los mismos.



El Cuarto Capítulo se destina a la exposición de los Resultados, distinguiendo según resultados pormenorizados obtenidos para cada uno de los países objeto de estudio de Marruecos, Argelia, Egipto, Senegal, Burkina Faso, Nigeria, Tanzania, Sudafrica y territorios insulares. El análisis filogenético general y subsiguiente análisis de la distribución geográfica general de los Lymnaeidos en todo Africa es el objetivo del siguiente apartado de este capítulo.

El análisis fenotípico constituye la continuación de este Capítulo 3, restringiéndose a la especie *Radix caillaudi* debido a su interés tanto crono-paleobiogeográfico como histórico como para la transmisión de la enfermedad, incluyendo un estudio pormenorizado de la variabilidad intraespecífica de la concha, de los clusters y de los huevos y finalmente también de la información evolutiva que suministra a través de la aplicación del reloj molecular.

El estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana da lugar a la última y extensa parte de este Capítulo de Resultados, diferenciándose entre los países del Maghreb por un lado y un extensísimo análisis pormenorizado de la situación de la enfermedad en Egipto por otro lado. Este último análisis reviste especial importancia, dada ya no solo la enorme dificultad y tiempo que ha requerido su realización, sino por tratarse de la primera vez que se intenta y por la crucial información que demuestra suministrar.

El Capítulo Quinto se dedica a la Discusión, comprendiendo los apartados de análisis del valor de los espaciadores del ADN ribosomal nuclear para la distinción de especies de Lymnaeidos en Africa, las relaciones filogenéticas entre los Lymnaeidos de Africa, las relaciones entre Lymnaeidos y Fascioliasis humana en Egipto, un crucial estudio comparado de la heterogeneidad de la Fascioliasis humana en el Norte del Africa, y finalmente el análisis detallado de la complejidad de la transmisión y epidemiología de la Fascioliasis y su impacto sobre la afección humana en Egipto, incluyendo distintos apartados con el fin de obtener una figura completa de la enfermedad en este país donde muestra tan alta endemidad.

Un Resumen total y la enumeración de las Conclusiones comprenden el Sexto Capítulo. El Séptimo Capítulo abarca las referencias citadas en el texto formando parte de la Bibliografía. Y por último, se procede a incluir un Octavo Capítulo para adjuntar las publicaciones efectuadas por la Doctoranda de la presente Memoria durante su período de formación en Doctorado y de investigación en el campo de la Fascioliasis y sus Lymnaeidos transmisores, aunque desgraciadamente cuestiones de reglas muy estrictas de copyright no permiten la adjunción de tres del total de las cinco publicaciones en cuestión.

## **CAPITULO II**

### **ANTECEDENTES**



## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- LA FASCIOLIASIS

#### 2.1.1.- LOS AGENTES CAUSALES

*Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) y *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855) causan la enfermedad de la fascioliasis. El adulto de *F. hepatica* tiene un cuerpo aplanado y foliáceo y el de *F. gigantica* es más largo y ligeramente más estrecho. Ambas especies presentan una morfología interna muy semejante. Estos Digénidos presentan en el extremo anterior de su cuerpo una prolongación cónica, bien visible en *F. hepatica* e inexistente o poco perceptible en *F. gigantica*, en cuyo ápice se localiza la ventosa oral. La ventosa ventral o acetábulo, que le sirve para fijarse, se sitúa en el tercio anterior del cuerpo. Presentan tegumentos con una cubierta de espinas dirigidas hacia atrás, si bien en algunos ejemplares no se encuentran en el extremo posterior.

El aparato digestivo comienza en la boca que está en la ventosa oral, se prolonga con una faringe muscular que llega hasta un esófago corto, el cual se bifurca en dos ramas ciegas a lo largo del cuerpo, y éstas se ramifican dendríticamente numerosas veces. En el caso de *F. gigantica* los ciegos intestinales son más afinados y ramificados (YAMAGUTI, 1958; PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965; ODENING, 1971; BORCHERT, 1981; BORAY, 1982; BOCH & SUPPERER, 1982; EUZEBY, 1984; URQUHART *et al.*, 1987).

El sistema excretor situado en el extremo posterior del cuerpo, está formado por una vesícula sacciforme de la cual parten unos tubos ramificados que entran en el parénquima para contactar con las células flamíferas de cilios largos que provocan una corriente en los tubos para impulsar los desechos hacia la vesícula excretora.

El sistema nervioso se compone de un anillo periesofágico de fibras y ganglios pares, del cual salen tres pares de nervios que recorren todo el cuerpo.

Como los adultos de *F. hepatica* y *F. gigantica* son hermafroditas, poseen aparato reproductor masculino y femenino. El aparato reproductor femenino es un ovario dendrítico, localizado en la parte derecha del parásito, ligeramente detrás del acetábulo y seguido del oviducto. En *F. gigantica* este órgano es más ramificado y afinado. Dos testículos muy ramificados y dispuestos en tándem forman el aparato reproductor masculino. Los espermatozoides pasan de los testículos a dos vasos eferentes que, uniéndose, forman un vaso deferente que desemboca en la vesícula seminal interna, seguida por la región prostática, el conducto eyaculador y el cirro, el cual puede estar

retraído en su bolsa. Este cirro, de morfología musculosa, se abre por un conducto precirral en el atrio genital común, situado por delante de la ventosa ventral.

En el lateral del cuerpo, se sitúan dos glándulas vitelógenas, muy ramificadas, con folículos vitelinos que llenan la mayor parte de las porciones laterales del cuerpo y se hacen concluyentes por debajo de los testículos. Estos vitelógenos están conectados por los viteloductos, los cuales desembocan en el oviducto común y el reservorio vitelino, conectados a su vez con el ootipo. El útero es corto y acetabular, y describe una trayectoria tortuosa hasta abrirse, al lado del conducto precirral, en el poro genital común (SOULSBY, 1988).

El estadio adulto es relativamente grande en ambas especies, de hasta 29/14 mm en *F. hepatica*, y de 52/12 mm en *F. gigantica* (PERIAGO et al., 2006). Los huevos son operculados, ovoides, amarillentos, no embrionados en el momento de la puesta y morfológicamente similares en las dos especies. Las dimensiones de los huevos son las siguientes (VALERO et al., 2009):

- áreas en las que *F. gigantica* está ausente (como en América y Europa): *F. hepatica* muestra huevos de 100.6-162.2/65.9-104.6  $\mu\text{m}$  en humanos y de 73.8-156.8/58.1-98.1  $\mu\text{m}$  en animales;
- áreas en las que ambas especies coexisten (como en partes de África y Asia): *F. hepatica* muestra huevos de 106.5-171.5/63.9-95.4  $\mu\text{m}$  en humanos y de 120.6-163.9/69.2-93.8  $\mu\text{m}$  en animales, y *F. gigantica* los muestra de 150.9-182.2/85.1-106.2  $\mu\text{m}$  en humanos y de 130.3-182.8/74.0-123.6  $\mu\text{m}$  en animales. El tamaño de los huevos emitidos por humanos puede ser intermedio entre los rangos antes citados para *F. hepatica* y *F. gigantica* en humanos y en estos casos cabe interpretar que se trata de infestaciones por formas intermedias o híbridas;
- áreas donde *F. hepatica* está ausente (como en partes de África): *F. gigantica* muestra huevos que pueden alcanzar tamaños de hasta 129.6-204.5/61.6-112.5  $\mu\text{m}$  en animales.

### **2.1.2.- CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD**

Debido a la gran importancia a nivel sanitario, veterinario y económico que *F. hepatica* representa, su ciclo biológico fue uno de los primeros en ser dilucidado entre los trematodos y ha sido objeto de varias revisiones extensas (Fig. 1) (DAWES & HUGHES, 1964, 1970; TAYLOR, 1965; PANTELOURIS, 1965; KENDALL, 1965; BORAY, 1969; ODENING, 1971; MAS-COMA & BARGUES, 1997; MAS-COMA, 2004a;

MAS-COMA *et al.*, 1999a, 2003, 2005). El ciclo biológico de *F. hepatica* y *F. gigantica* es esencialmente similar y se caracteriza por ser diheteroxeno, es decir transcurre por un hospedador definitivo, un mamífero vertebrado, y un hospedador intermediario que es un invertebrado molusco gasterópodo. Como hospedadores definitivos hay una gran variedad: ganado ovino, caprino, bovino, porcino, búfalo, equino, y otros rumiantes domésticos y silvestres, y también el hombre. Sin embargo, el hospedador intermediario de *Fasciola* se limita a caracoles dulceaquícolas de la familia Lymnaeidae, que son moluscos de la Clase Gasteropoda, de manera que la transmisión del parásito resulta depender de este relativamente reducido número de especies de caracoles.

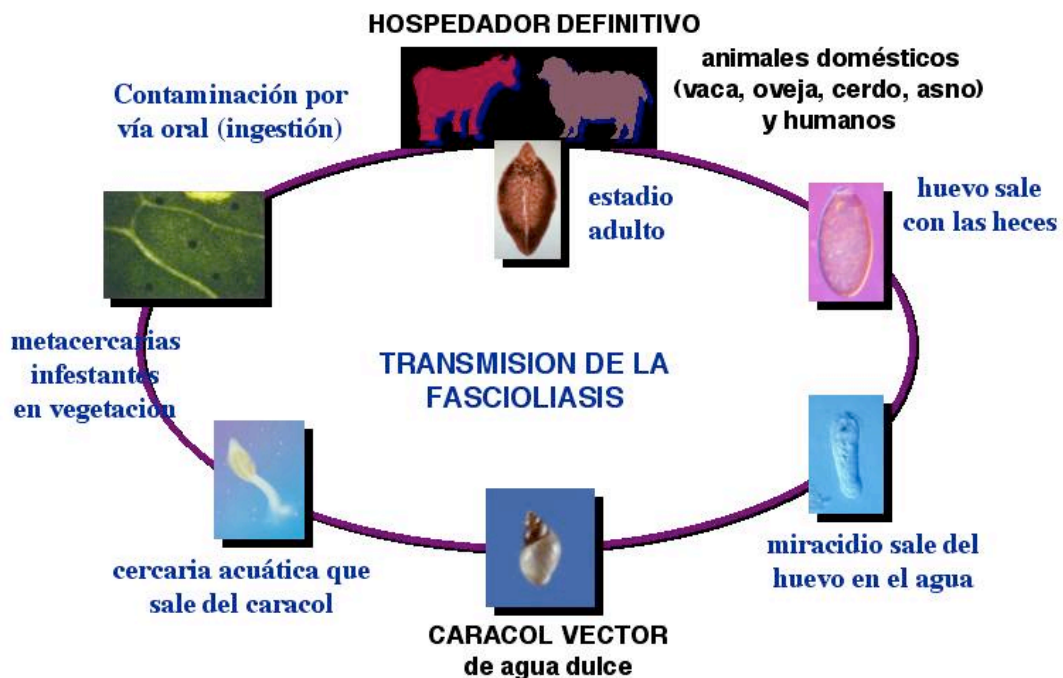


Figura 1.- Ciclo biológico de los Trematodos del género *Fasciola*.

Los huevos son producidos por los parásitos adultos que viven en los conductos biliares del hospedador definitivo y excretados con las heces. El parásito sigue un ciclo de vida acuático.

Los huevos maduran en el agua, y si las condiciones climáticas son apropiadas (15-25° C), los huevos eclosionan, cuando el miracidio está completamente desarrollado en su interior, a los nueve días hasta los veintún días (BORAY, 1969). Si las condiciones son desfavorables, los huevos no maduran pero pueden permanecer viables varios meses. El miracidio liberado posee una vida de 6 a 8 horas a 30° C, y de 20 horas a 10°

C, de forma ciliada, posee un tropismo positivo hacia la luz, y por tanto, hacia la interfase agua-tierra donde tiene su hábitat el hospedador intermediario (NEUHAUS, 1953; PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965; YAMAGUTI, 1975; URQUHART *et al.*, 1987). Penetra en el caracol preferentemente por los bordes del manto mediante fenómenos mecánicos o enzimáticos, y allí se transforma en esporocisto. En su interior, hay bolas germinales que originan redias, que cuando maduran poseen un rudimentario aparato digestivo (PANTELOURIS, 1965; TAYLOR, 1965). Las redias salen del esporocisto y se dirigen al hepatopáncreas del caracol, en el tejido conjuntivo interlobular. En el interior de las redias se forman nuevas bolas germinales que darán lugar a otras redias o cercarias, llegando a producir hasta cuatro generaciones de redias. Las tres primeras generaciones pueden desarrollar tanto redias como cercarias, pero la cuarta solo produce cercarias (RONDELAUD & BARTHE, 1978, 1981, 1986).

La producción de cercarias se prolonga entre cinco y ocho semanas, saliendo al agua pasivamente entre la quinta y la doceava semana siguientes a la parasitación (KENDALL & Mc CULLOUGH, 1951; BOIX-BUSSON *et al.*, 1985a). Las cercarias, de cuerpo casi redondo con una larga cola móvil, nadan un corto período de tiempo (una hora), hasta contactar con una superficie sólida, mayoritariamente vegetación acuática. Pierden su cola, y rápidamente se enquistan, transformándose en metacercarias. Algunas cercarias pueden fijarse formando quistes por debajo o en la misma superficie del agua, denominándose metacercarias flotantes (FUNATSU, 1998).

Los quistes de metacercarias son resistentes y permanecen viables por mucho tiempo, pero mueren rápidamente por el calor excesivo y la desecación. Las metacercarias infectan al hospedador definitivo después de la ingestión. Una proporción de metacercarias muere en el tracto gastrointestinal, y relativamente pocas se desarrollan en adultos. Una hora después de la ingestión, la metacercaria se desenquista en el intestino delgado, en el yeyuno (DAWES & HUGHES, 1964), siguiendo dos fases: activación, regulada por la temperatura, potencial redox y dióxido de carbono, y emergencia, regulada por la bilis. Los jóvenes adultos penetran a través de la pared del intestino a la cavidad abdominal dos horas después de la ingestión. Alcanzan la cavidad peritoneal, perforan la cápsula de Glisson, y llegan al hígado seis días después del desenquistamiento. Migran en el hígado durante cinco o seis semanas, alimentándose de tejido hepático y sangre, hasta que finalmente penetran en los conductos biliares donde alcanzan la madurez sexual y se alimentan de epitelio, tejido conectivo, fibras musculares. Aunque el microhábitat definitivo de *F. hepatica* son los canales biliares del hígado, también pueden darse localizaciones ectópicas, como en pulmón, páncreas, riñón, corazón, etc. El digénido adulto se fecunda y pone huevos

que saldrán al exterior vía bilis y heces. El período prepatente, desde la ingestión de metacercarias a la primera aparición de huevos en heces, varía según el hospedador, y también del número de adultos en el hígado. Se estima que el ciclo de vida del parásito adulto en el hombre puede llegar a durar hasta entre nueve y 13 años y medio (MAS-COMA & BARGUES, 1997).

### **2.1.3.- LOS LYMNAEIDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS Y SU ESPECIFICIDAD**

La clasificación taxonómica de los caracoles de la familia de los Lymnaeidae es la siguiente:

Phyllum Mollusca  
Clase Gastropoda  
Subclase Euthyneura  
Orden Pulmonada  
División Basommatophora  
Familia Lymnaeidae

Los miembros de la Clase Gastropoda se caracterizan por presentar asimetría superficial y una concha de espiral piramidal que se arrolla formando una especie de cono. La división Basommatophora incluye la mayoría de los caracoles de agua dulce (WEISZ, 1987). Los miembros de la familia *Lymnaeidae* son descritos (MALEK, 1962) como caracoles de apertura dextrógira, con una concha ovalada, ligeramente oblonga, de espiras más o menos atenuadas y que varían considerablemente en longitud o altura. El axis o eje de la columela gira típicamente haciendo un espiral. La concha varía en espesor y número de espiras. El género *Lymnaea*, según MALEK (1962) y continuando con la modificación de BAKER (1928), se caracteriza porque la concha tiene una forma alargada, de color hueso y da vueltas amplias, muy infladas y en espiral agudo.

Aunque los malacólogos no suelen estar de acuerdo con el status taxonómico de los miembros de la familia Lymnaeidae (HUBENDICK, 1951), las últimas tendencias observadas en publicaciones recientes (OVIEDO *et al.*, 1995; BARGUES *et al.*, 1997; BURTON, 1998) consideran dentro de la familia, además del género *Lymnaea*, a otros géneros y subgéneros como *Pseudosuccinea*, *Galba*, *Fossaria*, *Stagnicola* y *Radix*.

*Fasciola hepatica* muestra una preferencia por los Lymnaeidos del grupo *Galba/Fossaria*, el cual está presente y ampliamente distribuido en los cinco



continentes (MAS-COMA & BARGUES, 1997, BARGUES et al., 2001). Los caracoles del grupo *Stagnicola* (Stagnicolinos) pueden ser vectores alternativos y transmitir secundariamente *F. hepatica*. *Fasciola gigantica* presenta una marcada especificidad por las especies que pertenecen al grupo *Radix*. Otra especie de Lymnaeido, *Pseudosuccinea columella* es susceptible de ser infectado por ambas *F. hepatica* y *F. gigantica*. Existen diferencias en la especificidad de *F. hepatica* y *F. gigantica* a causa de los diferentes requerimientos ecológicos de las respectivas especies vectores *Galba/Fossaria* y *Radix*. *Fasciola hepatica* infecta Lymnaeidos que muestran una marcada tendencia anfibia y que normalmente habitan pequeñas o muy pequeñas superficies flotantes, rodeadas de lodo, sobretodo aquellas dependientes de las lluvias estacionales. Los caracoles responsables de la transmisión de *F. gigantica*, son completamente acuáticos (KENDALL, 1965) y prefieren anchas y más profundas zonas de agua donde la vegetación es abundante y suelen permanecer durante todo el año.

*Lymnaea caillaudi* prefiere la claridad, aguas con corrientes lentas, salinidad baja y vegetación. La población de caracoles es más baja en los meses de verano debido a las altas temperaturas, y aumenta gradualmente hasta alcanzar su máximo en primavera cuando la temperatura es más suave y la vegetación florece. En general, las tasas de infección de los caracoles varían entre un 10% y 40%, y la tasa más elevada se detectó en verano, lo cual puede ser un factor responsable de la baja densidad de población de caracoles en esta estación, pero no quiere decir que la infección de la enfermedad pueda producirse todo el año.

#### **2.1.4.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA**

La esperada correlación que debería existir respecto a la distribución geográfica de la fascioliasis humana y animal tan solo aparece en un nivel básico (MAS-COMA et al., 1999a). A pesar de que la mayor parte de las fuentes de infección, mamíferos herbívoros domésticos, están ampliamente distribuidas en el mundo (CHEN & MOTT, 1990), la alta/baja prevalencia humana no está relacionada con la alta/baja prevalencia animal, respectivamente. Por lo tanto, las altas prevalencias en humanos no parecen estar necesariamente relacionadas a áreas donde la fascioliasis representa un gran problema veterinario (MAS-COMA, 2005).

En la parte oeste de Europa, en países como Francia, España y Portugal, se han registrado numerosos casos humanos. Sin embargo, la fascioliasis animal es más frecuente en los países del norte de Europa, donde los casos humanos son

esporádicos. De forma similar ocurre en Suramérica, donde en países como Bolivia y Perú existen verdaderas hiperendemias y mesoendemias de fascioliasis humana, mientras que el problema a nivel veterinario ocurre principalmente en países como Uruguay, Argentina y Chile, que registran solo casos esporádicos de hipoendemia. En Australia, la fascioliasis en el ganado es bien conocida, pero los casos humanos informados son esporádicos. Estas diferencias geográficas entre fascioliasis humana y animal están relacionadas con los distintos hábitos dietarios del hombre, así como también las condiciones económicas e higiénico-sanitarias de cada región.

En la actualidad, los más importantes problemas de salud en todo el mundo con verdaderas zonas de endemia humana, se registran en los Países Andinos de Bolivia, Perú, Chile y Ecuador, en la zona del Caribe como Cuba, en el norte de África como Egipto, en la parte oeste de Europa incluyendo Portugal, Francia y España, y finalmente, en la zona del Mar Caspio con Irán y países limítrofes.

En los Países Andinos, las áreas de hiperendemia humana se dan en el Altiplano Norte de Bolivia (MAS-COMA et al., 1995, 1999c), y en tres áreas de Perú: el Altiplano de Puno (ESTEBAN et al., 2002), el valle de Cajamarca (KNOBLOCK, 1985; KNOBLOCK et al., 1985; GONZALEZ et al., 2011 ), y el valle de Mantaro (BENDEZU, 1969). En la zona del Caribe, en Cuba, la Provincia de Pinar del Río, registró más de 10,000 personas infectadas entre 1947 y 1948 (MITTERPAK, 1968), y en la Provincia de Villa Clara se declaró una epidemia que afectó a más de 1000 sujetos en 1983 (GONZALEZ et al., 1987), y continúan diagnosticándose pacientes (MILLAN et al., 2000).

En Europa, Francia es considerada una importante área de endemia humana (ANONYMOUS, 1988), llevan registrándose casos y epidemias de fascioliasis humana desde 1950 (GAILLET et al., 1983), en áreas de Lyon, Bretaña Norte-Paso de Calais y Suroeste (DANIS et al., 1985). Cabe destacar la baja hipoendemicidad de la isla mediterránea de Córcega (GIL-BENITO et al., 1991). La zona norte de Portugal es una importante área endémica (CHEN & MOTT, 1990). En España, la enfermedad está subestimada (SORRIBES et al., 1990) y principalmente distribuida por las comunidades autónomas del norte, País Vasco, Castilla-León, Cantabria, Navarra y La Rioja. Recientemente, se han dado casos importados añadidos a los autóctonos (TURRIENTES et al., 2004).

En Africa, los problemas más importantes ocurren en Egipto, especialmente en las provincias del Delta del Nilo (CURTALE et al., 2000, 2003a, b; ESTEBAN et al., 2003, HASEEB et al., 2002), y aunque las estimaciones iniciales son de 830,000 personas afectadas (WHO, 1995b), probablemente la situación real es más elevada a juzgar por

las altas prevalencias de hasta 18-19% reportadas recientemente en pequeñas poblaciones (ESTEBAN et al., 2003).

En Asia, cabe mencionar Irán, donde se han registrado casos desde hace tiempo (SAHBA et al., 1972), mayoritariamente en la provincia de Gilán, junto al Mar Caspio, con altas prevalencias en el ganado y a nivel humano (SABOKBAR, 1960). Hubieron grandes epidemias de casos humanos al final de los ochenta y durante los años noventa (MASSOUD, 1990, 1993; POURTAGHVA et al., 1990; YADEGARI et al., 1990, 1999; ASMAR et al., 1991, FORGHANPARAST, 1993; YADEGARI & TALAIE, 1996, TALAIE et al., 2004, ASHRAFI et al., 2005). También en la provincia de Mazandaran la Fascioliasis ha demostrado ser un gran problema de salud humano (MOGHADDAM et al., 2004a, b). En el este de Asia, aparecieron casos esporádicos en Japón y Corea. Sin embargo, la situación puede ser diferente en el sureste del continente (MAS-COMA, 2004b). En Tailandia se han registrado pocos casos (TESANA et al., 1989), pero en Vietnam los casos humanos han aumentado desde los años noventa (DE et al., 2003; HIEN et al., 2001b; CONG et al., 2001; XUAN et al., 2001), y la emergencia de la fascioliasis se considera un enigma (DE et al., 2003; HIEN et al., 2001a).

*Fasciola gigantica* no es tan cosmopolita como *F. hepatica*. Su distribución está restringida al continente africano, India, Paquistán, Sur-Este asiático, Filipinas y Hawai.

### 2.1.5.- EPIDEMIOLOGIA

La distribución de la Fascioliasis es irregular, ya que la infección está determinada por la presencia del molusco que actúa como hospedador intermediario en las colecciones de agua dulce, de la presencia de animales herbívoros, de las condiciones fisiográficas y climáticas y de los hábitos dietarios humanos (MAS-COMA & BARGUES, 1997).

Respecto a las características ecológicas del caracol, bajo especiales circunstancias, los Lymnaeidos son capaces de adaptarse a las condiciones más extremas. En la isla de Córcega, donde el nivel de endemidad de la fascioliasis humana es bajo, los hábitats de *Galba truncatula* pueden clasificarse en zonas de presencia permanente y renovación de agua, y otras donde el agua es estacional. De este modo, se distribuye por toda la periferia insular (zonas costeras) y por las áreas interiores de la isla, alcanzando hasta los 1500 m de altitud, hecho que favorece la extraordinaria distribución de la enfermedad en la isla. En el Altiplano Norte de Bolivia que presenta una hiperendemia humana (MAS-COMA et al., 1995, 1999c), el caracol

hospedador intermediario está perfectamente adaptado a las condiciones climáticas extremas de 4000 m de altitud. En el sur de Europa, el Lymnaeido se ha adaptado a lugares donde las actividades humanas incluyen frecuentes cambios drásticos en el medio ambiente y tratamientos con insecticidas, como los campos de arroz (VALERO et al., 1998a).

El desarrollo de los estados larvarios del parásito en el caracol, es inversamente proporcional a la temperatura ambiente (BORAY, 1969) que oscila entre 10° C y 30° C, aunque experimentalmente se observó como una variedad de *F. hepatica* del Altiplano Norte de Bolivia (a 4000 m de altitud) continuaba su desarrollo aún cuando la temperatura ambiente nocturna descendía a 0° C y la del agua a 5° C (MAS-COMA et al., 1999). Los caracoles Lymnaeidos son más resistentes a las bajas temperaturas que a las altas. Las metacercarias son susceptibles a la desecación a temperaturas por encima de los 25° C, pero pueden sobrevivir a las bajas temperaturas durante tiempo con el suficiente nivel de humedad. Una alta humedad asociada con abundantes lluvias suelen ser precursoras de hiperendemia en animales herbívoros, tal y como se ha observado la infección humana más frecuente en años de abundantes lluvia en Francia (RIPERT et al., 1988). El método por ordenador llamado Geographical Information System (GIS), puede ser usado para caracterizar la epidemiología de la enfermedad mediante análisis y predicciones (MALONE, 1994), pero no resulta suficientemente sensible para detectar la desigual distribución de poblaciones respecto a pequeñas diferencias en la concentración salina, aunque es capaz de detectar caracoles infectados inmediatamente después de ser expuestos a miracidios y durante todo el período larvario del parásito (RONGLIE et al., 1994), teniendo en cuenta que pueden ser causadas por otros digénidos.

Los principales animales que actúan como reservorios hospedadores en relación al hombre son las oveja, la cabra y los bovinos. Estos últimos han demostrado resistencia después de infecciones iniciales. La oveja es el mamífero reservorio que juega un papel más importante en la contaminación de los pastos y por tanto, en la transmisión humana. Según BORAY (1969), en la oveja, la puesta de huevos diaria es relativamente más alta (4000-5000 huevos por parásito adulto y 8800-25100 por hospedador) y tiene lugar en un mayor período de tiempo que en bovinos, donde los trematodos son eliminados a los 9-12 meses (BORAY, 1969; DAWES & HUGHES, 1964; SMITHERS, 1982). Entre los animales silvestres, la rata *Rattus rattus* puede jugar un papel importante en la dispersión y transmisión de la enfermedad, experimentalmente y en la naturaleza, al menos en la isla de Córcega (MAS-COMA et al., 1987, 1988, 1990, VALERO et al., 1992, 1998a). Los cerdos y los burros también

son reservorios de la fascioliasis a considerar debido a su participación en la transmisión en áreas endémicas como en el Altiplano Norte de Bolivia (MAS-COMA et al., 1997).

La viabilidad del ser humano como hospedador definitivo fue demostrada por BARGUES et al. (1996a) cuando a partir de huevos excretados e infectados de personas del Altiplano boliviano consiguió empezar el ciclo de vida del parásito varias generaciones en el laboratorio. Los hábitos de defecación de los niños infectados en ciertas poblaciones del Altiplano de Bolivia indudablemente contribuirán pues a la diseminación de la enfermedad.

Los hábitos alimenticios del ser humano son muy importantes en la Fascioliasis. Comer berro crudo, además de otras verduras acuáticas con metacercarias adheridas, puede ser vehículo de la transmisión, así como beber agua contaminada con metacercarias flotantes (BARGUES et al., 1996b). En algunos países como China, la infección puede ocurrir por las metacercarias pegadas en utensilios de cocina y tablas de cortar (CHEN & MOTT, 1990).

Las mujeres presentan prevalencias y/o intensidades relativamente más altas en zonas de hiperendemia humana tal y como se observó en Egipto (ESTEBAN et al., 2003). En los Países Andinos, donde las mujeres producían más huevos (ESTEBAN et al., 1999, 2002) no se diferenciaron prevalencias entre sexos (ESTEBAN et al., 1999, 2002). Los niños entre 5 y 15 años constituyen el grupo de edad más infectado en el Altiplano Norte boliviano (ESTEBAN et al, 1997a, b), hecho que también se observó en Egipto.

La Fascioliasis es predominante en las zonas rurales, y los ganaderos son más a menudo infectados que otros profesionales (STORK et al., 1973).

Respecto a la epidemiología y los factores que afectan al ciclo de vida de ambas especies, existen algunas diferencias. Los caracoles hospedadores intermedios de *F. gigantica* no son tan resistentes a la sequía como los moluscos de *F. hepatica* y la tasa de desarrollo de varias etapas de *F. gigantica* es más lenta. Además, las metacercarias de *F. gigantica* resisten más tiempo las altas temperaturas pero son más susceptibles a la desecación que las de *F. hepatica*. Estos hechos sugieren que *F. gigantica* está adaptada a climas tropicales, a caracoles acuáticos y a un ambiente acuático para poder transmitirse, y por lo tanto, *F. hepatica* prevalece en zonas de clima templado (OVER, 1982).

Los trabajos publicados de Fascioliasis en la literatura, permiten distinguir varias categorías (CHEN & MOTT, 1990; ESTEBAN et al., 1998): (i) la mayoría de artículos se refieren a notificaciones de casos individuales, (ii) otros informan de varios

miembros de grupos familiares que compartieron alimentos contaminados, (iii) varios artículos que comunican brotes que no necesariamente afectan a miembros de la misma familia, y (iv) artículos de estudios epidemiológicos que se refieren a un gran número de personas.

#### **2.1.5.1.- SITUACIONES EPIDEMIOLOGICAS**

Esta parasitosis es una enfermedad predominantemente rural, si bien las infecciones en zonas urbanas de grandes ciudades cada vez son más habituales como consecuencia de la venta ambulante incontrolada de vegetales dulceacuícolas procedentes de zonas endémicas aledañas. En estos últimos años se ha visto, además, que en las zonas de endemia humana las prevalencias pueden llegar a ser muy altas, como en el Altiplano Norte Boliviano donde más del 70% de la gente de una comunidad excreta huevos y hasta el 100% llega a veces a mostrar positividad serológica, o en la provincia peruana de Cajamarca donde más del 40% de los niños escolares resultan copropositivos en determinados pueblos, o en localidades del Delta del Nilo en Egipto donde se han detectado prevalencias de hasta el 19% de afección en población total.

Si antiguamente lo conocido eran intensidades en humanos que casi nunca eran superiores a 1-2 huevos por gramo de heces, hoy en día se ha confirmado como las intensidades pueden llegar a ser altísimas, de varios miles de huevos por gramo de heces (hgh) tanto en niños como en adultos. El record ha sido recientemente detectado en un niño boliviano que emitía más de 8000 hgh (MAS-COMA et al., 2009a).

Si bien la Fascioliasis puede afectar a todas las edades, en las zonas de endemia humana como en Bolivia, Perú, Ecuador, Venezuela o Egipto, las mayores prevalencias e intensidades se dan en niños de 5 a 15 años de edad, con un pico usualmente entre los 9 y los 11 años de edad. En cambio, en los lugares en los que la Fascioliasis humana es poco frecuente, suelen ser adultos los más afectados, como en Francia. En lo referente al sexo, en las zonas de endemia humana suelen ser las féminas, tanto niñas como mujeres adultas, las más afectadas, bien en prevalencias como en Egipto, bien en intensidades como en Bolivia (MAS-COMA et al., 2005). Profesiones de campo ligadas al pastoreo o cuidado del ganado constituyen grupos de riesgo y la enfermedad tiende también a mostrarse en agregados familiares, tanto en zonas de alta endemia como en Bolivia, como en reducidas epidemias tal y como sucede en Córcega (MAS-COMA & BARGUES, 1997).

A finales del siglo pasado, MAS-COMA et al. (1999a) propusieron una clasificación de situaciones epidemiológicas para la OMS que sigue siendo hoy en día totalmente válida, distinguiéndose:

- A) Casos importados, diagnosticados en zonas sin fascioliasis ni humana ni animal y contraídos en alguna zona de transmisión;
- B) Casos autóctonos, aislados e inconstantes, de pacientes esporádicamente infectados en la zona donde viven y en la que se da Fascioliasis animal;
- C) Endemias, diferenciándose 3 situaciones según prevalencias estimadas por coprología:
  - a) Hipoendemia: prevalencia inferior al 1%; intensidad media inferior a 50 huevos por gramo de heces (hgh);
  - b) Mesoendemia: prevalencia de 1-10%, aunque los niños de 5-15 años puedan presentar prevalencias algo superiores (holoendemia); intensidad media usualmente entre 50 y 300 hgh;
  - c) Hiperendemia: prevalencia superior al 10%, con niños de 5-15 años usualmente presentando prevalencias superiores (holoendemia); intensidad media pudiendo superar los 300 hgh;
- D) Epidemias, diferenciándose 2 situaciones:
  - a) Epidemias en áreas de endemia animal pero no humana: se dan en zonas que suelen presentar reportes humanos previos aislados y esporádicos; conciernen a pocas personas contaminadas a partir de la misma fuente (familias o pequeños grupos infectados a partir de la misma comida incluyendo vegetales contaminados);
  - b) Epidemias en áreas de endemia humana: se dan en zonas que presentan hipo-, meso- o hiperendemia humana y en los que tienen lugar brotes que afectan a un número mayor de hasta varios miles de personas en un periodo concreto; suelen estar relacionadas con condiciones climáticas previas habiendo favorecido la transmisión (lluvias cuantiosas).

#### **2.1.5.2.- PATRONES DE TRANSMISION**

En los últimos años se han realizado estudios que han permitido distinguir los siguientes patrones de transmisión (MAS-COMA, 2005):

- A) Patrón de elevada altitud en Países Andinos, relacionado con *F. hepatica* y *G. truncatula* e incluyendo dos subpatrones:
  - a) Subpatrón altiplánico, con transmisión durante todo el año, como en los Altiplanos boliviano y peruano;
  - b) Subpatrón valle, con transmisión estacional como en los Valles peruanos de Cajamarca y Mantaro;
- B) Patrón caribeño, con hipoendemia humana permanente y epidemias más o menos periódicas e involucrando a un número no muy elevado de decenas o pocas centenas de personas, relacionado con *F. hepatica* y *L. cubensis*, como en Pinar del Río en Cuba;
- C) Patrón afro-mediterráneo, con solapamiento de ambos fasciólidos transmitidos por *G. truncatula* y *R. natalensis* y secundariamente *P. columella*, con típica estacionalidad, como en el Delta del Nilo en Egipto;
- D) Patrón de las zonas del Mar Caspio, incluyendo hipoendemias permanentes y epidemias involucrando a varios miles de personas, con solapamiento de ambos fasciólidos transmitidos por *G. truncatula* y formas de *R. auricularia*, además de Stagnicolinos, como en la provincia de Gilán en Irán;
- E) Patrón del Sud Este de Asia, en tierras bajas con solapamiento de ambos fasciólidos pero esencialmente ligado a *F. gigantica* y especies de *Radix* y con amplias epidemias, como en Vietnam.

Cabe destacar la gran capacidad de colonización y expansión de esta enfermedad a partir de los orígenes euroasiático de *F. hepatica* y africano de *F. gigantica*, relacionadas con la gran adaptabilidad tanto de los fasciólidos como de los Lymnaeidos vectores a medios muy diversos. En el caso de *F. hepatica* resalta su capacidad de incluso adaptarse y dar lugar a grandes endemias en lugares tan extremos e inhóspitos como los de la gran altitud, como los 4000 m de los Altiplanos boliviano y peruano donde tanto parásito como vector han desarrollado estrategias especiales de adaptación que funcionan en el sentido de favorecer la transmisión de la enfermedad (MAS-COMA et al., 2001).

### **2.1.5.- CLINICA Y PATOLOGIA**

La patogenia de la Fascioliasis depende del número de trematodos que penetran en la pared intestinal e invaden el hígado. Esta penetración puede causar hemorragia



focal e inflamación. Los efectos patológicos más importantes corresponden a la migración del parásito en el hígado que cursan con una extensa destrucción del parénquima, intensas hemorragias e inflamación, y necrosis. La presencia de los parásitos en los conductos biliares causa fiebre, y aunque aparece inflamación que deriva en fibrosis, también ocurren una dilatación y aumento del grosor de los canales y de la pared de la vesícula biliar.

Se distinguen los siguientes períodos clínicos (FACEY & MARSDEN, 1960; MANGOS & MENZIES, 1973): (i) período de incubación (desde la ingestión de la metacercaria a la aparición de los primeros síntomas), (ii) fase aguda o de invasión (corresponde a la migración del parásito hasta los conductos biliares), (iii) fase latente (maduración del parásito y producción de huevos), y (iv) fase obstructiva o crónica. El período de incubación varía considerablemente dependiendo del número de metacercarias ingeridas y de la respuesta del hospedador, y cuya duración se especula que son “pocos días” (RAGAB & FARAG, 1978).

En la fase aguda, se produce una destrucción mecánica del tejido hepático y del peritoneo abdominal, causando reacciones tóxicas y alérgicas a nivel general y local durante 2-4 meses. En zonas endémicas, la fase aguda se puede prolongar y solaparse con el período latente o la fase obstructiva. La sintomatología de la fase aguda cursa con: fiebre, remitente, intermitente o irregular, dolor abdominal generalmente localizado en el hipocondrio derecho, trastornos gastrointestinales como pérdida de apetito, flatulencia abdominal y diarrea (menos frecuentes vómitos y estreñimiento), urticaria, típica del inicio de la invasión del parásito y que puede estar acompañada de ataques de asma, y síntomas respiratorios entre los que es común la tos no productiva, y ocasionalmente dolor en el pecho. En la fase aguda, pueden aparecer los siguientes signos en el examen físico: hepatomegalia y esplenomegalia, ascitis, anemia, dolores en el pecho e ictericia (CHEN & MOTT, 1990).

Respecto a la fase latente, que puede durar meses o años, se desconoce la proporción de personas asintomáticas, aunque una elevada eosinofilia puede ser sospechosa de la infección helmíntica, así como trastornos gastrointestinales o una o más recaídas de los síntomas agudos (FACEY & MARSDEN, 1960; MANGOS & MENZIES, 1973).

La fase obstructiva o crónica que puede desarrollarse desde meses a años de infección, presenta varias manifestaciones clínicas: cólicos biliares, dolor epigástrico, intolerancia a la comida grasa, náuseas, ictericia, prurito, dolor en el hipocondrio derecho, colangitis, colecistitis y colelitiasis.

Los conductos biliares aparecen dilatados, la vesícula biliar tiene su espesor aumentado y con edema. Todas las capas de la pared contienen desiguales cavidades con restos de linfocitos, células del plasma y eosinófilos. Al microscopio, pueden observarse las huellas de la migración en el hígado, cristales de Charcot-Leyden y eosinófilos, cavidades de las huellas con necrosis de restos celulares incluyendo hepatocitos, fibra y glóbulos rojos.

Durante la migración en el hígado, algunos parásitos jóvenes pueden entrar en otros órganos, y causar fascioliasis ectópica, normalmente del tracto gastrointestinal, aunque también en tejido subcutáneo, el corazón, vasos sanguíneos, los pulmones y cavidad pleural, ojos, pared abdominal, apéndice, páncreas, bazo, nodos inguinales, nodo cervical, músculo esquelético y epididimitis (MAS-COMA et al., 1997, 2004a). Los parásitos pueden calcificarse o incorporarse en un granuloma (FACEY & MARSDEN, 1960).

Los estudios del suero sanguíneo muestran que los niveles de IgG, IgM e IgE normalmente son elevados, y éstos últimos se detectaron en el 48% de los pacientes. Los niveles totales y específicos de IgE están correlacionados con la carga de huevos, edad, características clínicas y grado de eosinofilia. Los niveles de IgA suelen ser normales (MAS-COMA & BARGUES, 1997). En el hombre, las complicaciones que pueden desencadenar la muerte son hemorragia y cirrosis biliar, aunque es rara ya que la infección es esporádica y la prevalencia total es baja.

#### **2.1.6.- TRATAMIENTO**

Muchos han sido los medicamentos que se han usado para tratar la Fascioliasis en el hombre. Emetina y dehidroemetina fueron consideradas las terapias de elección hasta hace unas décadas, pero su toxicidad permitió al Bitionol convertirse en el medicamento de elección, hasta que se demostró la alta eficacia del triclabendazol en humanos (ESTEBAN et al., 1998; MAS-COMA et al., 1999a). En animales, compuestos como rafoxanida, oxiclozanida, briotianida, niclofolan, niclosamida, hexaclorofeno, albendazol, triclabendazol, etc., han sido utilizados, y algunos de ellos se siguen usando actualmente en el tratamiento veterinario (MAS-COMA et al., 1997).

El triclabendazol es el medicamento de elección y el único disponible hoy día para tratar la Fascioliasis humana causada por *F. hepatica* y *F. gigantica*. Para uso humano, el triclabendazol está registrado con el nombre Egaten®, y la dosis recomendada consiste en dos tomas separadas de 10 mg/kg, administradas después de las comidas

para que sea más efectiva (LECAILLON et al., 1998). Su eficacia se mantiene incluso en áreas endémicas humanas durante años (TALAI AE et al., 2004), y solo en algún caso, es necesaria una tercera dosis definitiva (MILLAN et al., 2000). Sin embargo, existen importantes factores a tener en cuenta ante el riesgo de una posible aparición de resistencias al triclabendazol (MAS-COMA et al., 2005): (i), el uso del triclabendazol, cuyo nombre comercial para uso veterinario se denomina Fasinex®, en el tratamiento de la fascioliasis del ganado durante largo tiempo en zonas endémicas, (ii), la tendencia de las personas a automedicarse con Fasinex® por la amplia disponibilidad general de este medicamento y (iii), la reciente aparición en animales de resistencias al triclabendazol en Europa, aunque hasta la fecha, no se han detectado resistencias en humanos en áreas endémicas (TALAI AE et al., 2004). La primera resistencia al triclabendazol en animales se produjo en Australia (OVEREND & BOWEN, 1995), más tarde en Irlanda (LANE, 1998; O'BRIEN, 1998) y Escocia (MITCHELL et al., 1998) y más recientemente en Holanda (MOLL et al., 2000; GAASENBEEK et al., 2001).

Entre las estrategias para minimizar el desarrollo de la resistencia se ha probado el uso sinérgico de medicamentos combinados (FAIRWEATHER & BORAY, 1999), pero conlleva el riesgo de fomentar una múltiple resistencia de los compuestos (GAASENBEEK et al., 2001). Además, el bitionol y otros han dejado de comercializarse (MILLAN et al., 2000). Muy recientemente, nitazoxanida ha sido puesta en el mercado en México y ha resultado efectiva en pacientes humanos durante siete días de tratamiento (ROSSIGNOL et al., 1998), y el myrr (Mirazid®), registrado en Egipto (MASSOUD et al., 2001), aún requiere de más estudios de eficacia y tolerancia. Por tanto, en la actualidad no existen tratamientos alternativos al triclabendazole contra la Fascioliasis humana (MAS-COMA et al., 2004a).

### **2.1.7.- PROFILAXIS Y CONTROL**

Las medidas de control deben considerar los resultados de previos estudios ecoepidemiológicos realizados en una zona concreta, ya que la adaptación a nuevas condiciones ambientales pueden cambiar las características de la transmisión de la fascioliasis (MAS-COMA et al., 1999a, 2005). Así pues, las comunidades de áreas endémicas deberían ser adecuadamente informadas sobre la Fascioliasis, su transmisión y su riesgo (MAS-COMA et al., 2005).

La prevención de la enfermedad en el hombre se puede conseguir con un estricto control del berro y otras plantas acuáticas para el consumo humano que puedan llevar

metacercarias pegadas, especialmente en áreas endémicas. También a través del agua existe riesgo de infección, ya sea por la ingesta directa de agua o indirectamente por la contaminación de hortalizas o utensilios de cocina. Esto concuerda con lo que ya se sabía acerca de la infección humana en las Américas en zonas donde la población no tiene antecedentes de consumo de berros (MAS-COMA et al., 1999b). En la zona del Delta del Nilo, la gente que vive en casas con agua canalizada, presentan un mayor riesgo a la infección (CURTALE et al., 2003b), y en Tiba, Egipto, han visto disminuir de manera importante la prevalencia inicial después de la construcción y uso de las “unidades de lavado”, dotadas de agua filtrada (MAS-COMA, 2004a). Además, estudios recientes informaron de algunos casos de infección por parásitos jóvenes al consumir alimentos crudos preparados a partir de hígado fresco infectado (TAIRA et al., 1997; CHO et al., 1999).

En cualquier caso, las recomendaciones sobre las medidas deberían ser con base en la prevención en lugar de la curación, y tales medidas deben ser consideradas desde el punto de vista de la economía y evaluación de la topografía local y condiciones meteorológicas (MAS-COMA & BARGUES, 1997).

## **2.2.- LA INICIATIVA MUNDIAL DE LA SEDE CENTRAL DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)**

La OMS recomienda la inclusión de la Fascioliasis, entre otras trematodiasis, en el grupo de enfermedades helmínticas cuyo control depende en base al concepto de una quimioterapia preventiva. Su objetivo persigue la temprana administración de los medicamentos antihelmínticos, solos o combinados, a individuos infectados, para prevenir de la patente morbilidad en etapas posteriores.

En vista de la esperada disponibilidad de una importante cantidad de triclabendazol, entre el 17 y 18 de Octubre de 2006, tuvo lugar en la sede central de la OMS en Ginebra una reunión informal de expertos con el fin de suministrar una gran cantidad de triclabendazol, a través de la OMS, para el tratamiento de la Fascioliasis en países con una alta carga de la enfermedad, y de ese modo, ampliar el tratamiento a la comunidad. En esta reunión se analizó cómo tal ampliación del control de la Fascioliasis a nivel de la comunidad, podía ser implementado, monitorizado e informado.

Los objetivos del encuentro fueron: (i) determinar como el triclabendazol podía usarse en base a comunidades de Bolivia, Egipto, Perú y Vietnam, (ii) discutir y acordar un protocolo para la vigilancia de las reacciones adversas que pudieran surgir en tales

comunidades por el uso del triclabendazol, y (iii) analizar la monitorización u observación del impacto del tratamiento con triclabendazol sobre la morbilidad.



Figura 2.- Expertos asistentes a la Reunión monográfica sobre Fascioliasis tenida lugar en la Sede Central de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) en Ginebra, Suiza.

La operación de implementación de quimioterapia preventiva supone la distribución de los antihelmínticos al máximo número de personas en riesgo de desarrollar morbilidad, y facilitar su disponibilidad a los niveles secundarios del sistema de salud, sin necesidad de un diagnóstico individual. En zonas con pocos recursos económicos, la remisión a un centro de tratamiento no es una opción, y además, los efectos secundarios del medicamento son escasos y son principalmente atribuibles a las muertes de los parásitos. Por tanto, las precauciones son necesarias en las primeras fases de la distribución y en áreas de alta prevalencia (WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1).

## **2.3.- LA FASCIOLIASIS EN AFRICA**

El interés de la Fascioliasis en el continente africano estriba en dos aspectos bien diferentes.

En primer lugar, cabe destacar que Africa constituye, según todos los indicios paleontológicos, evolutivos, biogeográficos, históricos, genéticos e incluso climáticos, el continente en donde el género *Fasciola* debió de originarse, muy probablemente en el periodo del Mioceno. Una proto-*Fasciola* existente hace unos 30-20 millones de años debió ser la que dió origen a especies como *Fasciola nyanzae* parásita de hipopótamos y *Tenuifasciola tragelaphi* parásita del sitatunga *Tragelaphus spekei* en Zimbabwe y que también ha sido hallada en bovinos (MAS-COMA et al., 2009a). A partir de dicha proto-*Fasciola* debió originarse probablemente también *F. gigantica* en rumiantes arcaicos de diferentes grupos como Reduncinae, Alcelaphinae y Giraffidae y en la especie de Lymnaeido de tierras bajas y cálidas *Radix natalensis*, en las llanuras del este del continente, muy probablemente en zonas de Uganda, Tanzania y zonas aledañas. Cambios climáticos posteriores permitirían la ulterior expansión de esta especie con rumiantes grandes migratorios como los gnus y así alcanzar el Próximo Oriente a través del larguísimo cauce del Rio Nilo y de Egipto, dando lugar a la posibilidad de aparición de *F. hepatica* en las tierras más nórdicas y frías del Próximo Oriente por adaptación a ovicaprinos y *Galba truncatula* (MAS-COMA et al., 2009a).

En segundo lugar, Africa muestra el gran interés de ser, junto con Asia, el continente en que se da un mayor desconocimiento de la situación de la Fascioliasis humana. Así, mientras en el norte de dicho continente existe numerosa bibliografía indicando la trascendencia de dicha enfermedad en Egipto y secundariamente en los tres países del Maghreb, Marruecos, Argelia y Túnez, en el resto del continente los estudios brillan por su ausencia. De ello y del análisis de las características de esa amplia región del continente africano, cabe concluir que la Fascioliasis humana pueda estar muy probablemente subestimada de manera muy pronunciada.

### **2.3.1.- FASCIOLA HEPATICA Y FASCIOLA GIGANTICA**

Africa es, junto con Asia, el único continente en el que las dos especies de *Fasciola*, *F. hepatica* y *F. gigantica* coexisten (MAS-COMA et al., 2009a). Sus respectivas distribuciones geográficas difieren sin embargo muy claramente.

*Fasciola hepatica* se encuentra distribuida por el norte del continente, desde Marruecos, Argelia y Túnez hasta Egipto. Sin embargo, esta especie no se presenta en las regiones del sur del gran desierto del Sahara (una reciente descripción molecular indicando la presencia de esta especie en el Níger indudablemente fue un error de confusión en un animal importado, ya que no se vislumbra la posibilidad de que esta especie pueda sobrevivir en lugares en que se alcanzan temperaturas superiores a los 50° C incluso a la sombra - véase discusión de dicha cita en MAS-COMA et al., 2009a).

Curiosamente, empero, *F. hepatica* muestra una presencia discontinua a lo largo de la franja oriental del continente africano, con existencia demostrada en países como Etiopía, Kenia, Tanzania o incluso tan al sur como Africa del Sur. Los análisis palaeobiogeográficos sugieren claramente que la presencia de esta especie en estos países debió ser consecuencia de introducciones fortuitas en el pasado (MAS-COMA et al., 2009a).

*Fasciola gigantica*, en cambio, demuestra ser la especie perfectamente adaptada a todas las regiones cálidas de este continente, distribuyéndose a lo largo y ancho del sur del Sahara, desde Senegal hasta las costas orientales del continente y cubriendo todo el extremo meridional del mismo. Esta distribución homogénea de *F. gigantica* solamente se rompe con una expansión localizada hacia el norte a lo largo del cauce del Río Nilo que le permitió llegar en su día hasta el Delta del Nilo en Egipto y así hasta los mismos márgenes del Mar Mediterráneo (MAS-COMA et al., 2009a).

Cabe destacar el hecho de que sea en regiones cálidas al sur del Sahara donde esta especie muestra su morfología típica, caracterizada por la ausencia de cono cefálico y el paralelismo de los márgenes bilaterales del cuerpo, como se ha demostrado recientemente mediante CIAS en Burkina Faso (PERIAGO et al., 2006).

### **2.3.2.- LYMNAEIDOS EN EL CONTINENTE AFRICANO**

Los Lymnaeidos del continente africano muestran una distribución geográfica peculiar que corre paralela a la de las dos especies de *Fasciola* y permite observar la crucial trascendencia de la especificidad parasitaria a nivel de molusco hospedador intermediario.

Así, en toda la vasta región al sur del Sahara, desde los mismos márgenes del Oceano Atlántico en Senegal hasta el Africa ecuatorial en las zonas de Camerún y Angola hasta la misma Africa del Sur y también expansionándose por las zonas de baja altitud del este del continente, se encuentra una única especie que es *Radix*

*natalensis* (HUBENDICK, 1951; BROWN, 1994), precisamente la especie que constituye el hospedador intermediario específico por excelencia de *F. gigantica* (MASCOMA et al., 2009a). La especie *R. natalensis* es asimismo la descrita como colonizadora de islas circumafricanas, como Cabo Verde y Madagascar.

Especies diferentes de Lymnaeidae han sido citadas solamente en el norte de Africa, a lo largo de toda la franja mediterránea desde el Maghreb hasta Egipto, comprendiendo desde representantes del grupo de los Stagnicolinos y de *Radix* de talla mediana (HUBENDICK, 1951; BROWN, 1994), como también representantes del grupo *Galba/Fossaria* como *G. truncatula* (HUBENDICK, 1951; BROWN, 1994) y *Lymnaea schirazensis* (BARGUES et al., 2011b).

*Galba truncatula* es conocida también en tierras altas de países del Africa oriental, transmitiendo a *F. hepatica*, así como también extendiéndose hasta Africa del Sur. Y por fin, cabe mencionar la existencia de otra especie introducida como es *Pseudosuccinea columella*, una especie que muestra una distribución en islotes bien separados como pueden ser el Delta del Nilo en Egipto y Africa del Sur en lo más meridional del continente (HUBENDICK, 1951; BROWN, 1994).

### **2.3.3.-EL INTERES DE LA FASCIOLIASIS HUMANA EN EL NORTE DE AFRICA**

La Fascioliasis humana a lo largo y ancho de la franja mediterránea del norte de Africa constituye un foco de interés indudable. Ello resulta bien evidente habida cuenta las numerosas citas de afección humana en los países de Marruecos, Argelia, Túnez y Egipto.

Sin embargo, a pesar de dicho interés, resulta evidente lo mucho que queda por estudiar sobre esta importante enfermedad a lo largo de la zona geográfica en cuestión. Así, por ejemplo, la diferencia de problemática en salud pública en Libia sugiere que el Maghreb y Egipto podrían pertenecer a focos diferentes, lo que se contrapone a las características más o menos homogéneas de climatología y medio ambiente y terreno de toda dicha zona mediterránea, sin olvidar la similitud de comportamiento y tradiciones humanas relacionada con las etnias musulmanas, esencialmente en lo referente a dieta alimenticia, manejo del ganado y ausencia del ganado porcino.

Pero hay también otra vertiente de interés adicional, cual es la proximidad al sur de Europa y el riesgo que ello comporta de exportación al continente europeo de cepas de *Fasciola* potencialmente más antropófilas que las presentes al norte del Mar



Mediterráneo. Así, dentro del cambio climático el factor crucial en este caso es el calentamiento global, con evidentes incrementos de temperaturas medias en el sur de Europa que pueden llegar a implicar la posibilidad de introducción de *F. gigantica* en el continente europeo, especie de fasciólido más patógena hasta el presente y inexistente en Europa. A ello podría añadirse el riesgo de aspectos del cambio global, como son factores relacionados con el intercambio comercial a través del Mediterráneo, así como también la atracción turística del norte de Africa para Europa y la atracción de Europa para los emigrantes norteafricanos en busca de mejorar sus situaciones personales de carestía en dichos países norteafricanos.

## 2.4.- LA FASCIOLIASIS EN EGIPTO

Trematodos pertenecientes al género *Fasciola* han estado presentes en Egipto desde tiempos antiguos. Sus efectos pueden ser vistos en el ganado representado en las tumbas egipcias, y el parásito fue encontrado en secciones histológicas del hígado de una momia (CURRY et al., 1979). En 1895 y 1896, un científico inglés, Looss, descubrió el primer caso de animales infectados en Egipto por lo que él consideró una variedad de *F. hepatica*, y la denominó *Fasciola hepatica aegyptica* (LOOSS, 1896). Sin embargo, JACKSON (1921) demostró que el trematodo encontrado por Looss en Egipto era diferente en talla, composición y figura del encontrado en Europa, y lo sinonimizó con *F. gigantica* (COBBOLD, 1855). En el valle del Nilo, la Fascioliasis animal era debida a *F. gigantica* (GOHAR, 1934-35; SOLIMAN & ZAKI, 1964; KENDALL, 1974). WAHBY (1943) notificó la presencia del parásito en cerdos en un matadero de El Cairo. Sin embargo, EL-RIFAI (pers. comm.) informó que algunos de los animales de las granjas del área de Abis habían sido recientemente importados de Europa, y estaban posiblemente infestados de *F. hepatica* y por lo tanto, ambas especies podían continuar su ciclo biológico en el valle del Nilo, ya que *Lymnaea caillaudi*, principal hospedador intermediario de *F. gigantica* en Egipto, y otras especies de Lymnaeidae presentes también en las zonas de endemia egipcias pueden transmitir ambas especies (REFAI et al., 1972; MAS-COMA, pers. comm.).

SOLIMAN (1998), informó que la escasez de proteína animal en Egipto, obligó al Ministerio de Agricultura a importar animales vivos de Europa y otros países, donde *F. hepatica* es común. Más recientemente, se encontraron trematodos de *F. hepatica* en animales importados (NAGATY, 1942; SOLIMAN & FARID 1960; SELIM et al., 1970), pero EL-AZAZY & SCHILLHORN (1983) afirmaron no haber hasta la fecha, ningún

caso de *F. hepatica* en animales nativos de Egipto. FARAG (1998), informó que ambas especies de *Fasciola* coexistían en animales domésticos con diferentes tasas de infección. Sin embargo, con el tiempo parece que la infección por *F. hepatica* se ha convertido incluso en más habitual que la de *F. gigantica* (SOLIMAN, 1998; HARIDY et al., 1999).

En Egipto, la Fascioliasis es más común en la parte baja del país que en el Alto Egipto. Las infecciones en animales se observaron en el Delta del Nilo (DRAZ, 1949; RAHMAN et al., 1976), a lo largo de las vías fluviales y proyectos de irrigación cerca de Giza y El-Faiyum (EDDIN, 1955), y también en los oasis del desierto de Libia (EZZAT, 1950; EDDIN, 1955). La tasa de infección era más baja en animales del área costera noroeste (TAWFIK & HASSAN, 1979), y son más prevalentes entre los 2.1 millones de búfalos de agua que en el ganado bovino o pequeños rumiantes (EL-AZAZY & SCHILLHORN, 1983).

Indudablemente, la Fascioliasis en Egipto es un serio problema entre el ganado doméstico. DRAZ (1949) mencionó que un rebaño de 600 cabezas de ovejas se redujo a 96 en tan solo dos años debido a la Fascioliasis. También SOLIMAN & ZAKI (1964) estimaron que la media de pérdidas de entre 100 y 150 litros de leche/año/cabeza de ganado, era ocasionada por la Fascioliasis.

#### **2.4.1.- LA FASCIOLIASIS HUMANA EN EL DELTA DEL NILO**

La zona del Delta del Nilo se considera una de las mayores áreas endémicas en el mundo de Fascioliasis humana (FARAG et al., 1979; EL SHAZLY et al., 1991; CURTALE et al., 1998). Cerca de El Cairo, el Nilo se divide en dos ramas, Rashid y Dumyat, que con sus afluentes forman el Delta del Nilo, la región más fértil del país. La temperatura media anual es relativamente alta (20° C), y el total de lluvias anuales es de 99 mm, resultando un período seco todo el año. La gran área del Delta ha sido transformada, dentro de un plan agrícola, en un gran sistema de irrigación consistente en numerosos canales, desde canales principales a pequeños secundarios (ESTEBAN et al., 2003). En esta parte de Egipto, se detectaron en 1928 los dos primeros casos de fascioliasis en el hombre, y en 1958, once casos más fueron encontrados (KUNTZ et al., 1958; FARAG, 1998).

En 1974, ocho casos más fueron informados en la provincia de Dakahlia (ALI et al., 1974). De hecho, hasta 1978 solo casos esporádicos de Fascioliasis humana se conocían y algunos de ellos se consideraban generalmente casos falsos porque

procedían de personas que habían ingerido hígados de bovino infestados (HILLYER, 1998; FARAG, 1998). En 1978, se diagnosticaron cinco “verdaderos” casos de Fascioliasis humana en un pueblo llamado Abis, cerca de Alejandría, y el cual fué declarado foco humano (RAGAB & FARAG, 1978).

Numerosos han sido los casos humanos informados desde entonces en Egipto (ARAFI & LASHEN, 1993; EL-SHAZLY et al., 1991; FARAG et al., 1979, 1986, 1988; FARID et al., 1986, 1988, 1990, 1993; MANSOUR et al., 1983; OSMAN et al., 1995; RAGAB & FARAG, 1978; SALEM et al., 1987; HAMMOUDA et al., 1995, 1997). RAGAB & FARAG (1978) afirmaron que probablemente los huevos de *Fasciola* fueron detectados más veces de lo que en la literatura se pueda encontrar. En 1979, en el estudio epidemiológico en Abis II, se obtuvo una prevalencia humana del 7.3% y concluyeron que el problema de la Fascioliasis humana en Egipto necesitaba de más esfuerzos para evaluar su magnitud y evitar la dispersión (FARAG et al., 1979).

Desde 1980, los casos de Fascioliasis humana han aumentado drásticamente en diferentes provincias de Egipto, tales como Behera, Cairo, Dakahlia, Kafr El-Sheikh, Qalyoubia, Menoufia y Sharkia. Principalmente, la Fascioliasis se ha detectado en casi todas las provincias del Delta del Nilo, en algunas del Alto Egipto y en la ciudad de Alejandria. En la provincia de Behera la infección es común en seis distritos agrícolas y de alta irrigación localizados en la parte central de la provincia (CURTALE et al., 2000). La situación es consistente con la impresión general de que la Fascioliasis humana es un problema de salud emergente en la región del Delta del Nilo, donde las tasas de prevalencia varían entre el 2% y 17% en algunas áreas rurales, hecho que ha sido relacionado con la introducción de *F. hepatica* a través del ganado importado desde Europa durante el siglo XX (ESTEBAN et al., 2003).

#### **2.4.2.- LA PROBLEMÁTICA DE *FASCIOLA HEPATICA* Y *FASCIOLA GIGANTICA* EN EGIPTO**

*Fasciola hepatica* y *F. gigantica* han sido ambas detectadas en Egipto. Desde que en 1896 Looss informó del primer caso de Fascioliasis, cuya especie se confirmó años después era en realidad *F. gigantica*, todos los trabajos posteriores informaban de *F. gigantica* como única especie existente y causante de la enfermedad en Egipto. Los primeros casos que describen *F. hepatica* como el agente causal de la fascioliasis (EL-AZAZY & SCHILLHORN, 1983), especificaban que se trataba de animales importados de Europa y de otros países, y en ningún caso en nativos egipcios. Esta importación de

ganado en los años setenta en Egipto, es sospechosa de ser la introductoria de *F. hepatica* en el Delta del Nilo (SOLIMAN, 1998).

En Egipto, ambas especies de fasciólidos coexisten en animales domésticos con tasas de infección que llegan hasta el 90% (FARAG, 1998). *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* se superponen en Egipto y al evidenciarse formas intermedias en áreas de solapamiento (PERIAGO et al., 2008) son nombradas como *Fasciola sp.*, ante la imposibilidad de identificarlas como una u otra especie. Se han identificado infecciones mayormente ocasionadas por *F. gigantica*, aunque en algunos casos la especie no ha podido ser determinada, en otros se ha especificado la infección por *F. hepatica* (ESTEBAN et al., 1998).

El diagnóstico diferencial entre *F. hepatica* y *F. gigantica* en humanos no se puede conseguir por métodos clínicos, patológicos, coprológicos o inmunológicos (MASCOMA et al., 2005), lo cual supone un problema en lugares como Egipto, donde ambas especies se superponen y el diagnóstico diferencial es muy importante debido a las diferentes características patológicas, de transmisión y epidemiológicas de ambos fasciólidos. Un simple y rápido ensayo de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), usando los enzimas de restricción común *Avall* y *Drall*, se ha usado para distinguir entre ambas especies de fasciólidos. Se basa en una secuencia larga de 618-bp del gen 28S rRNA obtenido recientemente de poblaciones de trematodos de SurAmérica, Europa y África, y puede ser una herramienta muy útil para el diagnóstico individual en estudios epidemiológicos humanos y veterinarios (MARCILLA et al., 2002).

#### **2.4.- CARACTERIZACION MOLECULAR POR HAPLOTIPAJE MEDIANTE ADNr**

En los caracoles dulceacuícolas Lymnaeidos hospedadores intermediarios de la Fascioliasis, la gran variabilidad intraespecífica de la concha y la escasez de características de valor sistemático-taxonómico en la morfoanatomía interna son un gran problema, por cuanto la clasificación de individuos se hace muy dificultosa y a veces imposible. Así, se confunden unas especies con otras, donde se cree tener una sola especie en realidad se tienen varias especies crípticas o gemelas y otras veces, donde se cree tener varias especies, en realidad se está manejando una sola pero con gran variabilidad intraespecífica. Todo ello se extrapola además al gran confusionismo taxonómico en el que se encuentra sumida esta familia de moluscos, con determinados especialistas aceptando un solo género *Lymnaea sensu lato* y otros aceptando un

sinfín de géneros, sin contar ya el enorme listado de sinonimias en especies y géneros. Es por lo tanto muy frecuente que los conocimientos sobre las especies de Lymnaeidos presentes en una zona de endemia sean erróneos. Sin embargo, poder alcanzar una sistemática y taxonomía correctas y apropiadas es imprescindible habida cuenta la trascendencia de conocer el molusco o moluscos hospedadores intermediarios para poder comprender los patrones de transmisión y situaciones epidemiológicas de la Fascioliasis en los distintos lugares.

Una ciencia como la Biología Molecular cuenta con herramientas muy eficaces para la caracterización y diferenciación genéticas. La utilización de unos marcadores moleculares bien seleccionados permite el establecimiento, mediante “haplotipaje multigénico combinado”, de qué cepas de los caracoles transmisores son las causantes de cada patrón de transmisión y cada situación epidemiológica singular. En el caso de los Lymnaeidae, los marcadores más utilizados han sido los dos ITSs del ADNr para clasificación sistemática de especies, subespecies y poblaciones, el gen 18S ARNr para taxonomía molecular supraespecífica y un fragmento de la subunidad 1 del gen de la citocromo oxidasa, *cox1* y del gen 16S ribosomal del ADNmt para la obtención de información sobre vías de expansión geográfica.

#### **2.4.1.- MARCADORES DEL ADN RIBOSOMAL NUCLEAR**

El ADN ribosomal (ADNr) nuclear eucariota está constituido por unidades de transcripción u operones localizados en los cromosomas nucleares y que se encuentran en forma de repeticiones en tándem. Cada repetición contiene los genes codificantes de los ARN ribosomales (18S, 5.8S y 28S), además de tres tipos de fragmentos espaciadores: los espaciadores internos transcritos que se intercalan entre los genes (ITS-1 e ITS-2, del inglés *Internal Transcribed Spacer*), los espaciadores externos transcritos que flanquean a los genes (ETS, del inglés *External Transcribed Spacer*) y los espaciadores intergénicos o espaciadores no transcritos que separan una repetición de la siguiente (NTS, del inglés *Non-Transcribed Spacer*). El conjunto de genes, ITSs y ETSs es transcrito por la ARN polimerasa I de forma ininterrumpida. Tras la transcripción tiene lugar un proceso de maduración en el que se separan los ARN producto de los genes de los espaciadores (GERBI, 1985). No se conoce mucho sobre la función de estos espaciadores; generalmente muestran una divergencia evolutiva rápida, por lo que no se consideraba probable que tuviesen una función concreta. Sin embargo, estudios en levaduras han demostrado que los ITSs poseen un papel

importante en el proceso de maduración de los ARNr (MUSTERS et al., 1990; Van Der SANDE et al., 1992).

Las características que presentan los genes y espaciadores del ADNr los han convertido en marcadores moleculares muy utilizados en estudios sistemáticos y filogenéticos, debido a la gran información que se extrae tanto de sus secuencias nucleotídicas como de su estructura secundaria (WHEELER & HONEYCUTT, 1988; HILLIS & DIXON, 1991). Cada gen del ADNr presenta una velocidad de sustitución diferente, con regiones conservadas y variables incluidas dentro de la secuencia de los genes 18S y 28S y del mismo modo, cada espaciador evoluciona a una velocidad diferente (JORGENSEN & CLUSTER, 1988). En general, los genes ribosomales presentan una variabilidad muy baja, están altamente conservados y por ello son útiles para establecer relaciones filogenéticas antiguas, mientras que los ITSs evolucionan mucho más rápido, por lo que son útiles para estimar relaciones evolutivas más recientes. En cualquier caso, el nivel taxonómico en el que es útil cada marcador varía de forma importante entre los diferentes grupos de organismos (BARGUES & MAS-COMA, 1977; BARGUES et al., 2000; MAS-COMA & BARGUES, 2009).

Más allá de las características mencionadas, el ADN ribosomal se transmite por herencia mendeliana, evoluciona en general mas lentamente que el ADNmt y presenta una evolución concertada. La evolución concertada implica que el ADN ribosomal nuclear de una población, con el tiempo suficiente, homogeniza todas sus copias, eliminando las diferencias, tanto entre cromosomas homólogos como entre cromosomas no homólogos del genoma. El resultado es la uniformidad en todos los individuos de la población (HILLIS & DIXON, 1991), por lo que los cientos de copias en tandem pueden ser tratadas como un solo locus comparable entre distintas especies.

Debe asimismo destacarse la presencia en los espaciadores internos de microsatélites y minisatélites. Ambos son secuencias repetidas en tándem cuya unidad de repetición contiene un número variable de nucleótidos, hasta cinco en el caso de los microsatélites y hasta cien en el caso de los minisatélites. Sin embargo, la presencia de microsatélites y minisatélites hace variar mucho la longitud de las secuencias, lo que puede llevar a interpretaciones erróneas de resultados obtenidos por métodos basados en la longitud de secuencia como RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*) y PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa- Restricción de polimorfismos de longitud de fragmento, del inglés *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) (MAS-COMA & BARGUES, 2009).

#### **2.4.1.1.- EL SEGUNDO ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO O ITS-2**

La amplia experiencia disponible sobre la utilidad de las secuencias de los ITS como excelentes marcadores para estudios de diferenciación específica y de hibridación, han permitido a los científicos el considerar a ambos espaciadores, pero principalmente al ITS-2, como la mejor herramienta para análisis sistemáticos a nivel de taxones inferiores, tales como los de especie y subespecie.

El ITS-2 es considerado el marcador clave para la diferenciación entre taxones problemáticos, tales como especies crípticas o especies hermanas en diferentes organismos (COLLINS & PASKEWITZ, 1996; PROFT et al., 1999; BARGUES et al., 2006d, 2008). En Lymnaeidos, el ITS-2 es general más corto que el ITS-1, aunque su longitud es muy variable en función de si presenta o no microsatélites y su composición nucleotídica también esta ligeramente sesgada hacia el contenido de GC (56-58%). Ha sido el marcador molecular más utilizado en Lymnaeidos de diferentes países del mundo (REMIGIO & BLAIR, 1997; BARGUES et al., 2001, 2003, 2007a,b, 2011a,b,c, 2012a,b; MAS-COMA et al., 2001, 2005, 2009a; BARGUES & MAS-COMA, 2005; ASHRAFI et al., 2007; JOUET et al., 2008; MERA Y SIERRA et al., 2009; PUSLEDNICK et al., 2009; ARTIGAS et al., 2011; etc.). Las secuencias completas de este marcador, conjuntamente con el ITS-1 de un mismo espécimen, cabe considerarlos como los marcadores de excelencia para estudios de índole sistemático-taxonomía tanto a nivel específico como supraespecífico en Lymnaeidos (BARGUES et al., 2011a).

La presencia de microsatélites detectados tanto el ITS-1 como en el ITS-2 en Lymnaeidos, aportan información filogenética muy útil para la diferenciación entre poblaciones, subespecies y especies, como se ha podido comprobar en diversos estudios (VIGO et al., 2000; MEIER-BROOK & BARGUES, 2002; BARGUES et al., 2007a, 2011a,b,c, 2012a,b).

#### **2.4.1.2.- EL PRIMER ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO O ITS-1**

Tanto el ITS-1 como el ITS-2 presentan las características comunes de ser las moléculas más variables de los operones del ADNr (aparte del IGS). Se pueden amplificar fácilmente por PCR, aprovechando las secuencias conservadas de los genes ARNr que los flanquean para diseñar cebadores. Por sus características, son

marcadores moleculares adecuados para inferir relaciones evolutivas entre taxones muy relacionados, es decir, que se hayan separado en los últimos 50 millones de años. Por las variaciones que presentan entre organismos muy próximos, han sido ampliamente utilizados en estudios taxonómicos o filogenéticos tanto de los parásitos como de sus vectores.

En Lymnaeidos, el ITS-1 es de mayor longitud que el ITS-2, (superior a las 500 pb), suele presentar una composición nucleotídica ligeramente sesgada hacia GC (54%-57%) y se han descrito microsatélites en su secuencia. En base a las secuencias del ITS-1, se han analizado filogenéticamente las relaciones entre los Stagnicolinos europeos (BARGUES et al., 2006a), así como también se han descrito por primera vez las secuencias completas de este marcador para Lymnaeidos europeos y americanos (REMIGIO & BLAIR, 1997; GUTIERREZ et al., 2003; MAS-COMA et al., 2001; BARGUES et al., 2006a,b, 2007a,b, 2011a,b,c, 2012a,b; ARTIGAS et al., 2011).





## **CAPITULO III**

### **MATERIAL Y METODOS**



### **3.- MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1.- MATERIALES**

Los materiales utilizados en nuestro trabajo son de tres tipos: (i) caracoles Lymnaeidae, (ii) un objeto ornamental del Museo de Egiptología de El Cairo, y (iii) una amplia bibliografía dentro de la cual se incluye el hallazgo de alguna obra muy antigua de valor indudable.

Los moluscos pertenecientes a la familia Lymnaeidae y utilizados en nuestros estudios proceden de 10 países africanos diferentes. En dos de ellos, Egipto y Marruecos, los Lymnaeidos fueron recolectados por miembros del Equipo de Valencia de manera personal en varias expediciones. En lo referente a los demás países, se tuvo la suerte de contar con la colaboración internacional disponible por el Equipo de Valencia y su Centro Colaborador de la OMS. Finalmente, también se dispuso de materiales a partir de cepas vivas permanentemente cultivadas en el laboratorio del Equipo de Valencia.

El material egiptológico fue detectado en el Museo de la Plaza central Tahir de El Cairo, y aunque evidentemente nunca se pudo obtener el permiso para su estudio directo, si que la búsqueda en librerías especializadas de El Cairo tuvo la suerte de dar sus frutos al encontrarse una obra en la cual se incluía toda la información necesaria para poder realizar el estudio oportuno.

Finalmente, es de destacar el hallazgo, asimismo en una librería especializada en obras antiguas producidas en Egipto, de un par de obras arcaicas, entre las cuales un original de la obra de LOOSS (1896) donde se describe por primera vez la presencia de *Fasciola* en este país, incluyendo descripción y dibujos detallados completos.

El presente trabajo demuestra la sorprendente información útil que se obtuvo de estos dos últimos tipos de materiales, objeto ornamental del Antiguo Egipto y publicaciones de hace dos siglos, en un proceso que indudablemente nada tiene de habitual en estudios de investigación parasitológica.

##### **3.1.1.- PROSPECCIONES EN EGIPTO**

Egipto es el país africano al que se ha dedicado un mayor número de expediciones con distintas finalidades, habida cuenta la importancia de la Fascioliasis humana en este país. En casi todas ellas se dedicaron esfuerzos a la recolección de especies de

Lymnaeidae en zonas de endemia humana de Fascioliasis. De entre las diferentes especies de Lymnaeidae encontradas, se prestó especial atención a la especie *Lymnaea caillaudi* por tratarse de la única realmente autóctona del continente africano. Este es el motivo de que, dentro de la presente Tesis Doctoral, se haya seleccionado esta especie para estudios fenotípicos y genotípicos pormenorizados, ya que las demás especies de Lymnaeidos de Egipto en cuestión demostraron ser todas introducidas y consecuentemente se contaba pues ya con estudios detallados previos sobre las mismas en otros continentes.

Para el estudio fenotípico de *L. caillaudi*, se seleccionaron, al azar de cada una de las tres poblaciones, individuos que representaran la mayor diversidad de tamaño, siendo tomados los individuos extremos representativos para poder registrar la máxima variabilidad intraespecífica posible y seguir su crecimiento y ontogenia en cada población escogida. La ubicación geográfica de las poblaciones silvestres corresponden a zonas donde la Fascioliasis es endémica en el Delta del Nilo.

Las poblaciones seleccionadas fueron las siguientes:

- Se muestreó en un ecótopo natural de *L. caillaudi* un total de 100 individuos, que fueron encontrados en la localidad de Faraoun-Prince-Avenue, Almontadah en la provincia de Alejandría (Al Iskandariyah) con coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator), latitud 31. 2515278 y longitud 30. 0262778. En las Figuras 3 y 4 se observan ejemplares en posición dorsal y ventral respectivamente.
- También se muestreó en otro ecótopo natural 100 coquillas seleccionadas, cuyas imágenes se corresponden con las Figuras 5 y 6, pertenecientes a una población originaria de El Kazza (Ecotopo 3), Hosh Isa, Behera (Al Buhayrah), cuyas coordenadas UTM correspondían a latitud 30. 8405000 y longitud 30. 2688333.
- Se muestrearon en una población de laboratorio, mantenidas en un ambiente uniforme, estándar y controlado, 100 conchas de caracoles que habían sido cultivados en nuestro laboratorio y cuyo origen también procedía de zonas endémicas de Fascioliasis en Egipto. Las Figuras 7 y 8 representan especímenes de esta población experimental en dos visiones.

En el mapa de Egipto que corresponde a la Figura 9, se indican las localizaciones donde fueron halladas las poblaciones naturales en el provincia de Behera en el Bajo Egipto y junto a éste, más hacia el norte, se sitúa el provincia de Alejandría.

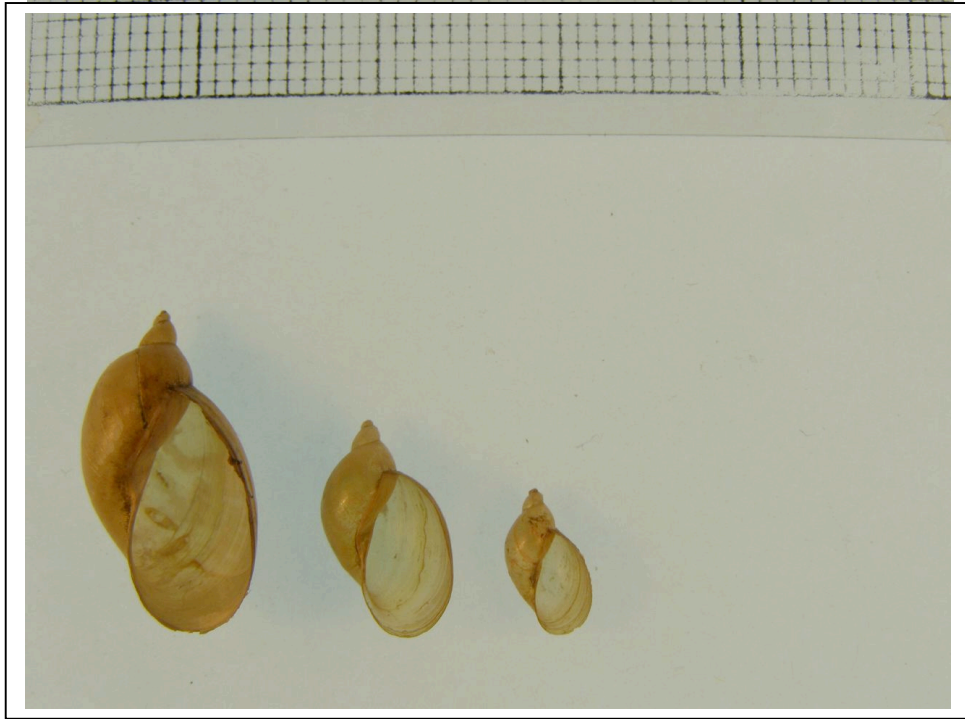


Figura 3.- *Lymnaea caillaudi* de El Faraoun, Alexandria, en visión ventral.



Figura 4.- *Lymnaea caillaudi* de El Faraoun, Alexandria, en visión dorsal

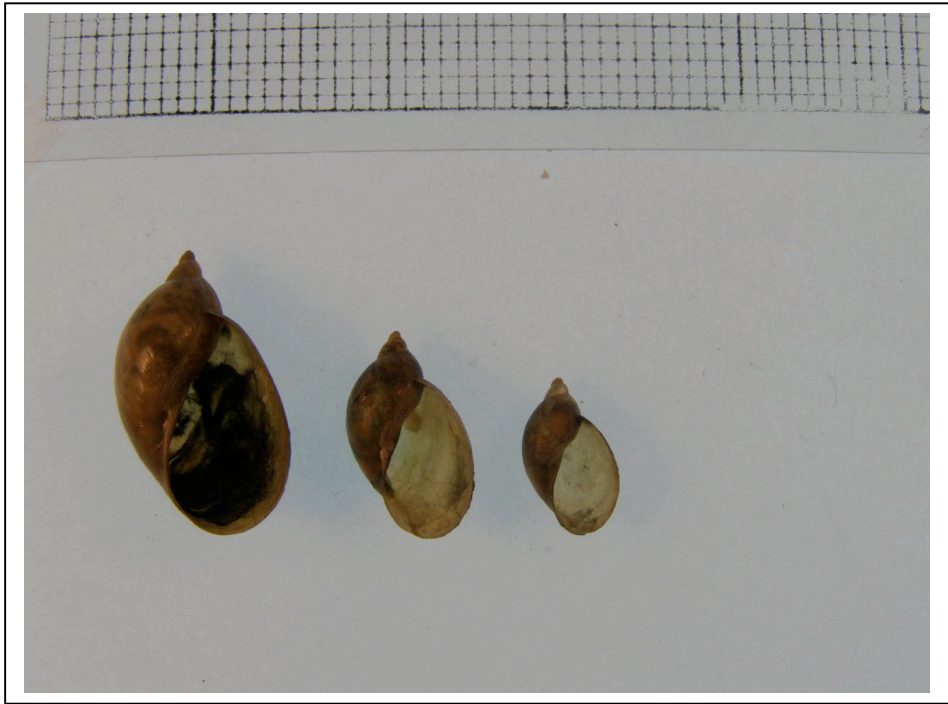


Figura 5.- *Lymnaea caillaudi* de El Kazza, Behera, en visión ventral



Figura 6.- *Lymnaea caillaudi* de El Kazza, Behera, en visión dorsal





Figura 7.- *Lymnaea caillaudi* procedentes de cultivo, en visión ventral.

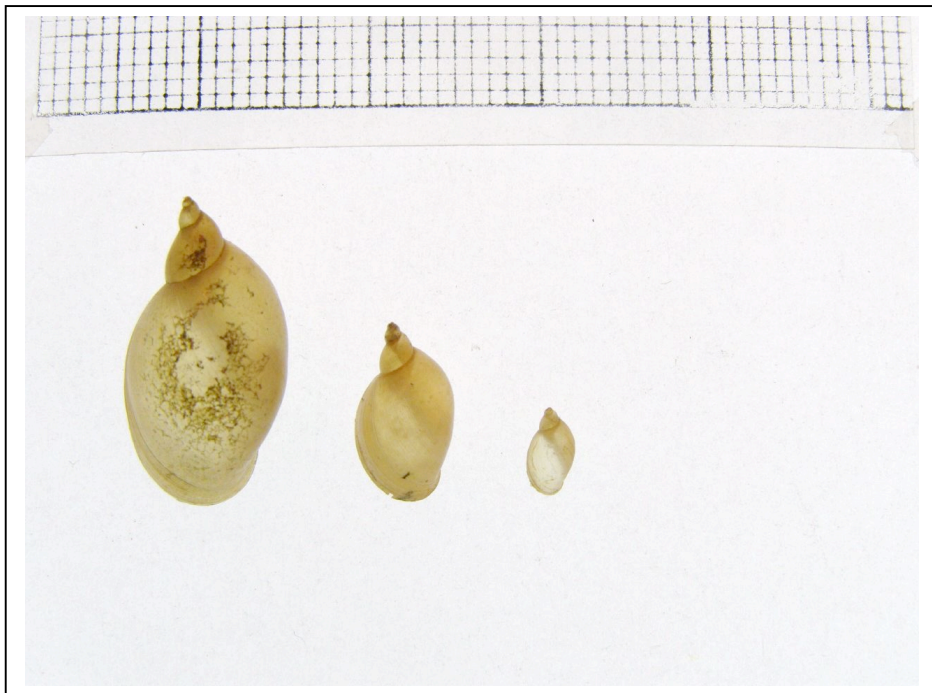


Figura 8.- *Lymnaea caillaudi* procedentes de cultivo, en visión dorsal.



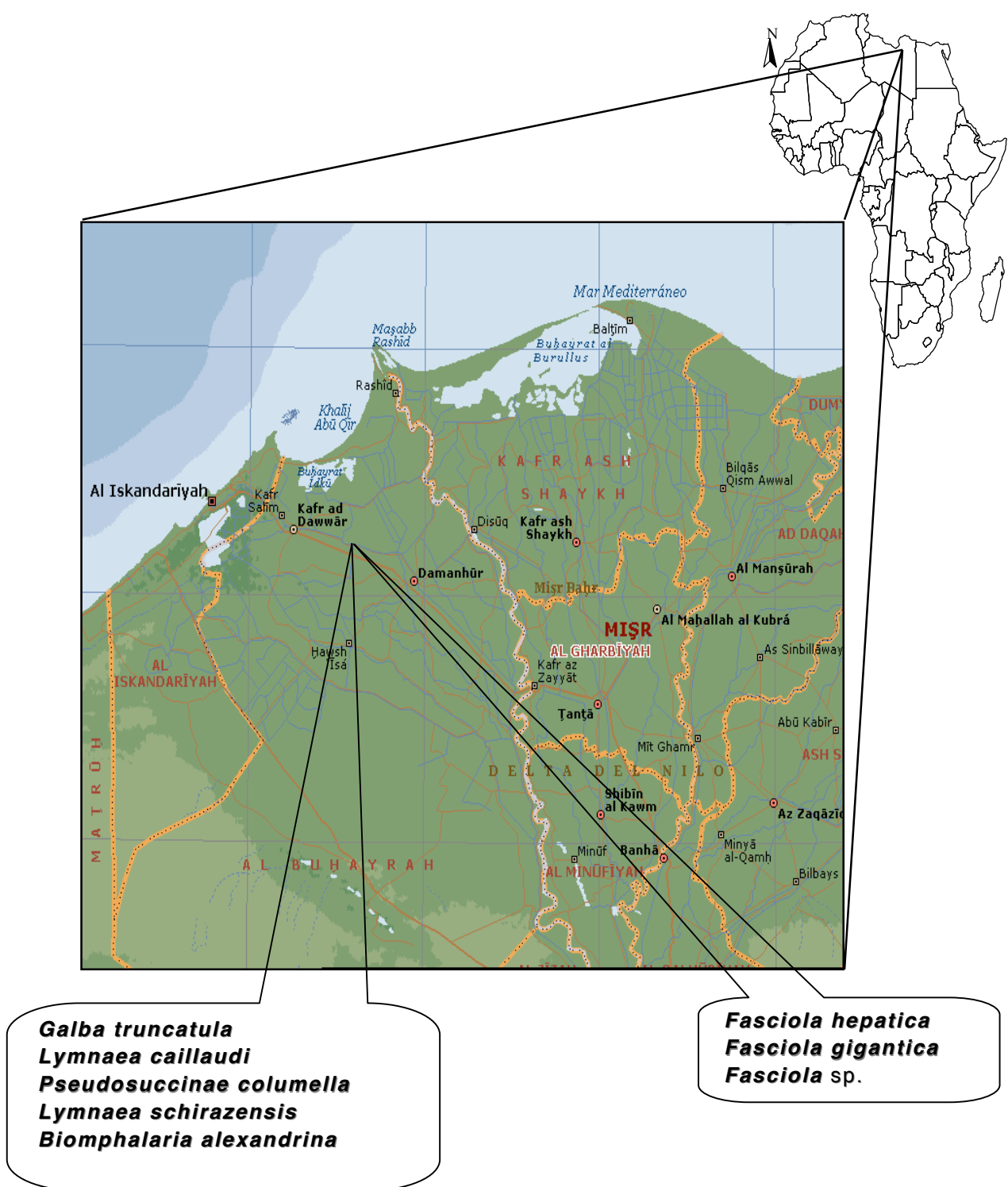


Figura 9.- Ubicación geográfica de la provincia de Behera, entre Alejandria y Damanhour, de donde procedían los caracoles Lymnaeidae estudiados .

### 3.1.1.1.- RECOLECCION DE LYMNAEIDOS EN ZONAS DE ENDEMIAS

Los métodos malacológicos corresponden a los básicos normalmente utilizados en malacología y que comprenden la recolección de los moluscos en la naturaleza, su transporte hasta el laboratorio, y la posterior aclimatación de los mismos en condiciones de laboratorio (ROBERTS, 1950; KENDALL, 1953; ADAM, 1960; MALEK, 1962, 1980, 1985; ROSS & O'HAGAN, 1968; SIMON-VICENTE, 1968; WILSON & SAMSON, 1971; UENO *et al.*, 1975; BISHOP, 1977; RONDELAUD, 1983; BOUIX-BUSSON & RONDELAUD, 1984; MALONE *et al.*, 1984; MENDOCA, 1987, 1992; CHARTIER *et al.*, 1990; PRASERTPHON, 1990; MOUKRIM & RONDELAUD, 1992).

El material malacológico utilizado en el presente trabajo proviene de poblaciones naturales recolectadas en la zona de endemia del Delta del Nilo en Egipto. Las expediciones para la recolección de los moluscos se realizaron en el mes de Enero del 2002 donde se recogieron poblaciones de caracoles de El Kazza, Hosh Isa, Behera y en Marzo del 2005, fueron recolectados los caracoles procedentes de Pharaon Prince-Avenue, Almontadah, Alejandría. De cada una de las áreas de recolección se tuvieron en cuenta una serie de características bióticas y abióticas tales como: la presencia de otras especies de moluscos presentes y sus respectivas densidades poblacionales, otras especies de invertebrados presentes, presencia/ausencia de vertebrados como potenciales hospedadores definitivos, tipo de vegetación de la zona, etc.; características del agua y tipos de colección de agua, tipo de sustrato, pH, contenido mineral, en particular dentro de éstos últimos la presencia de carbonatos, cloruros, amonios, fosfatos, características de conductividad del agua, fuente y cantidad de iluminación, temperatura, etc.

En cada uno de los biotopos estudiados, la recolección de los moluscos se realizó mediante la búsqueda visual sobre el sustrato fijo o flotante, sobre la vegetación o desplazándose libremente en la superficie del agua. El área de muestreo era determinada con el fin de recolectar el mayor número de ejemplares posibles (usándose habitualmente un metro cuadrado). Los moluscos se recolectaban de sus diferentes hábitats mediante unas pinzas suaves de estaño para no dañar al caracol y reduciendo el impacto sobre el biotopo. Tras una primera clasificación, mediante mediciones y comparaciones morfológicas, algunos ejemplares de moluscos de cada zona de muestreo se conservaron en alcohol 70%, y el resto de moluscos se depositaron en recipientes con agua mineral y oxigenación artificial para su posterior

transporte al laboratorio. En la provincia de Behera, se realizaron varias prospecciones para la recolección de moluscos Lymnaeidos.

Estos lugares fueron escogidos teniendo en cuenta las primeras estimaciones sobre la Fascioliasis humana detectadas en la zona y también sobre los casos registrados en el marco veterinario (CURTALE et al., 2000). Los biotopos prospectados fueron El Kazza y Pharaon Prince. El transporte de los moluscos se llevó a cabo en pequeñas cajas de plástico debidamente preparadas para este fin.

### **3.1.1.2.- OBSERVACION DE OBJETOS ORNAMETALES EN EL MUSEO DEL CAIRO**

En Marzo de 2005, y como parte de una expedición científica a Egipto, un grupo de miembros del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, realizando una visita al Museo de Egiptología de El Cairo, observaron que entre las numerosas vitrinas de joyas egipcias, se exponía un collar formado por conchas recubiertas de oro, y cuya similitud con las conchas de los caracoles de la familia Lymnaeidae era tan sorprendente que logró llamar la atención del equipo.

El collar (Figura 10) estaba ubicado en la Sala No. 2, conocida como Sala del Oro, en la parte noreste de la Planta Superior del Museo, en la cual se expone una colección de piezas de oro, y junto a la Sala No. 4 donde se halla expuesta la famosa máscara de Tutankamon. Portaba una etiqueta con el siguiente código de identificación: CG 53802. El collar estaba formado por 24 piezas de conchas de caracol cuya especie y familia es desconocida. Al tratarse de una pieza realizada en oro, se hace obligatorio por parte del Museo su presencia en la exclusiva Sala del Oro de dicho Museo, además de la lógica custodia en vitrinas cerradas bajo llave, ignorándose, por otro lado, la importancia epidemiológica y la relevante información científica que podría llegar a proporcionar, claves para las hipótesis que existen actualmente sobre la transmisión de la enfermedad de la Fascioliasis.

Por las dimensiones del collar, caben las posibilidades que se tratara de un brazalete destinado para el tobillo o el brazo, o un collar para el cuello de una persona menuda. Se trata de una pieza contemporánea de las Primera Dinastías cuyo hallazgo se produjo en el curso de unas excavaciones arqueológicas en el cementerio devastado de Naga ed Deir, en el Alto Egipto llevadas a cabo por el arqueólogo americano George A. Reisner. El collar apareció junto a una momia y el derrumbe de la

tumba donde fué enterrada lo salvaguardó del expolio de los ladrones. Para obtener una fotografía directa del collar, tras las conversaciones mantenidas, y con la aceptación de la Vice-Directora del Museo de El Cairo, fuimos remitidos al Consejo Supremo de Antigüedades, que forma parte del Ministerio de Cultura Egipcio, y es el órgano responsable de la conservación, protección y regulación de todas las antigüedades y excavaciones arqueológicas de Egipto.

Debido a la ausencia del Secretario General del Consejo Supremo de Antigüedades, el Dr. Zahi Hawass, no fue posible obtener el permiso oportuno para abrir la vitrina y así poder realizar la fotografía. Ante esta imposibilidad, el material para estudio fue obtenido a partir de una fotografía digitalizada del libro *L'Or de l'Égypte Ancienne. Sélection du Reader's Digest, S.A., París, 256 pp., de MÜLLER & THIEM (2000).*

### **3.1.1.3.- BUSQUEDA DE OBRAS ANTIGUAS EN EL CAIRO**

La dilucidación de los primeros pasos de la evolución de la Fascioliasis en Egipto implicó la necesidad de llevar a cabo una búsqueda de documentos y publicaciones muy antiguas, no disponibles ni en internet ni en otros lugares. Esta árdua labor tuvo no obstante frutos positivos en la visita a una librería antigua de El Cairo llamada L'Orientaliste, ubicada en la Rue Kasr El Nil No. 15 de El Cairo (Figura 10).

En esta peculiar librería se localizaron tres obras antiguas de gran valor:

A) LOOSS (A.), 1896.- Recherches sur la faune parasitaire de l'Égypte. Première Partie. *Mémoires de l'Institut Egyptien*, 3: 1-252 + pl. I-XVI.

En esta obra, Arthur Looss, Privatdozent de la Facultad de Filosofía de la Universidad de Leipzig, Alemania, hace la primera observación de la presencia de *Fasciola* en Egipto, mencionando a *Distomum hepaticum* en la zona de Alejandría, en frecuencia extrema en búfalos y bovinos y menos común en ovinos, y describiendo una forma y anatomía que, al diferenciarse de *D. hepaticum* de Europa, propone adscribir a una nueva variedad *D. hepaticum* var. *aegyptiaca* en las páginas 33 a 36 y en la figura 16 de la plancha iii de su obra, variedad que de todos modos más adelante iba a ser sinonimizada con la especie *F. gigantica* ya descrita con anterioridad.

B) PALLARY (P.), 1909.- Catalogue de la faune malacologique de l'Égypte. *Mémoires de l'Institut Egyptien*, 6 (1): 1-92 + pl. I-V.

En esta obra, Paul Pallary enumera la presencia de las siguientes especies de Lymnaeidos en Egipto en las paginas 46-49 de su obra:

- *Limnaea cailliaudi* en el curso del Nilo Azul y del Gran Nilo, sobre los bordes de la isla de Choubrah, especie previamente descrita en las paginas 89-90 y figuras 100-101 de la obra de Bourguignat (J.R.), 1883.- Histoire malacologique de l'Abyssinie. Ann. Sci. Nat. Zool. Paris 15.
- *Limnaea cailliaudi* var. *minor*, en Alejandria, Gabbari, Ramleh, Matarich y canales cerca de El Cairo, que el autor asemeja con la especie *Limnaea acroxa* descrita en la antedicha obra de Bourguignat.
- *Limnaea raffraya*, en Alejandria, que el autor asemeja a una variedad de *cailliaudi*.
- *Limnaea alexandrina*, también en Alejandria y otras localidades antes mencionadas, que el autor iguala a *Limnaea natalensis* y que cita ser muy frecuente en el Nilo y sus afluentes.
- *Limnaea alexandrina* var *gracilis* B, que el autor diferencia de las demás.
- *Limnaea (Gulnaria) sickenbergeri*, en Ain Rizaa, en el oasis de Khargheh.
- *Limnaea (Fossaria) truncatula* a lo largo de todo el curso del Nilo.
- *Limnaea pharaonum*, en Alejandria y Damiette.

En la plancha III, el autor incluye a *Lymnaea truncatula* en la figura 31, a *L. cailliaudi* en las figuras 36-37, a *L. laurenti* en la figura 38, y a *L. truncatula* en la figura 43. Las figuras de las dos últimas recuerdan a *P. columella* y a *L. schirazensis*, respectivamente.

Al final, Pallary concluye en que de las 15 especies citadas por Bourguignat solo cabe considerar válidas unas pocas. Además de esto, debe resaltarse que por aquel entonces el género era *Limnaea* en vez de *Lymnaea* y que la especie *cailliaudi* era deletreada con una "i" adicional: *cailliaudi*. Sea como sea, para nuestro trabajo lo importante es que ya se citaba tanto *L. cailliaudi* como *G. truncatula* en Egipto ya no sólo a principios del siglo pasado, sino incluso a finales del siglo XIX.

C) PALLARY (P.), 1924.- Supplément à la faune malacologique terrestre et fluviatile de L'Égypte. *Memoires présentées à l'Institut Egyptien et publiés sous les auspices de Sa Majesté Fouad 1er, Roi d'Égypte*, Imprimerie de l'Institut Français d'Archéologie Orientale, Le Caire, 7 (1): 1-61 + pl. I-IV.

El mismo autor anterior, Pallary, vuelve sobre los Lymnaeidae de Egipto en esta obra, refiriéndose en las páginas 23 y 24 únicamente a 4 especies presentes en el país que anota bajo los nombres de *Limnaea (Radix) cailliaudi*, *Limnaea (Radix)*

*alexandrinensis* (de la cual cita a *L. laurenti* como sinónimo), *Limnaea (Radix) acroxa* y finalmente *Limnaea (Galba) truncatula*., a la que cita como hospedador intermediario conocido de la duela de la oveja y otros herbívoros domésticos. De interés para nuestro trabajo es el que dicho autor, ya hace tanto tiempo, se apercibió de que era necesario reducir el número de especies presentes en Egipto.



Figura 10.- Rótulo callejero de la librería antigua L'Orientaliste de El Cairo.

### 3.1.2.- PROSPECCIONES EN MARRUECOS

Los materiales procedentes de Marruecos fueron también fruto de expediciones del Equipo de Valencia, y más concretamente de su miembro el Dr. Messaoud Khoubbane.

La mayoría de especímenes de caracoles dulceacuícolas de la familia Lymnaeidae fueron recolectados en zonas próximas a la ciudad de Marrakesh. Los caracoles en cuestión fueron bien fijados en alcohol 96%, bien guardados y transportados *in vivo*

hasta las dependencias del Equipo de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, en Burjassot.

### **3.1.3.- OBTENCION DE EJEMPLARES DE LYMNAEIDOS DE OTROS PAISES AFRICANOS POR COLABORACION CON COLEGAS CIENTIFICOS**

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se precisó, no obstante, de materiales de moluscos Lymnaeidae de otras partes del vasto continente de Africa. Así, hoy podemos contar aquí con los resultados obtenidos en Lymnaeidos procedentes de diferentes países a lo largo y ancho de dicho continente:

- Argelia
- Senegal
- Burkina Faso
- Nigeria
- Angola
- Tanzania
- Africa del Sur
- Madagascar
- Cabo Verde

La obtención de estos materiales de valor inestimable fue fruto de las numerosas relaciones y colaboraciones científicas con las que el Centro Colaborador de la OMS del Equipo de Valencia cuenta en dicho continente.

El aspecto más importante a resaltar es la distribución adecuada de estos países para poder dar una imagen global correcta de la situación de los Lymnaeidae en el continente de Africa sin incluir a todos los numerosos países que lo íntegran, tarea que por ser tan amplia resultaría inviable para poder ser incluida en una sola Tesis Doctoral.

Es de destacar que también se obtuvieron materiales de otros lugares de Angola, pero desgraciadamente los especímenes procedentes de dichos lugares no fueron correctamente fijados (formalina) en origen y en consecuencia los procedimientos de secuenciación resultaron infructuosos a pesar de intentarse repetidamente.

### **3.1.4.- OBTENCION DE ESPECIMENES DE LYMNAEIDOS POR CULTIVO EN EL LABORATORIO**

#### **3.1.4.1.- RECOLECCION Y TRANSPORTE *IN VIVO***

La recolección de moluscos en el terreno se hizo siguiendo las instrucciones generales que cabe encontrar en cualquier libro de Malacología que se refiera a moluscos Gasterópodos de agua dulce. En todo caso, siempre se trataba de hacer recolecciones lo más numerosas posibles, dada la habitual gran mortalidad de cestos caracoles en situaciones experimentales.

Para el transporte de estos caracoles en condiciones *in vivo*, se utilizó containers de plástico de dimensiones adecuadas según el tamaño de los Lymnaeidos en cuestión, más grandes cuanto de mayor tamaño eran los especímenes a transportar.

Durante el transporte se hacía especial hincapié en la temperatura, para evitar la contaminación del agua que podía conllevar la mortalidad de los especímenes recolectados. Como procedimiento de transporte, los miembros del Equipo de Valencia recurrieron a los métodos y técnicas desarrollados para la obtención de materiales malacológicos de otros países y continentes, bien conocidos y desarrollados para Planorbidae en centros especializados como el Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne de la Universidad de Perpignan, en el país vecino.

#### **3.1.4.2.- ADAPTACION Y CULTIVO *IN VIVO* DE LYMNAEIDOS**

Teniendo en cuenta que los moluscos fueron recolectados en zonas de endemia, se consideró necesaria la comprobación de una posible parasitación. Inicialmente, el total de los ejemplares recolectados fueron aislados en placas de Petri individuales y se comprobó en éstos la emisión cercariana durante 60 días consecutivos, al cabo de los cuales, si ninguno resultaba positivo, se consideraba la población negativa y volvían a las cajas de cultivo. Si algún ejemplar resultaba positivo, todos los ejemplares recolectados eran verificados de la misma manera por una segunda vez. Además, las cajas de cultivo eran revisadas una vez a la semana, en busca de la posible presencia de metacercarias enquistadas en las paredes de la caja o en la lechuga que servía de alimento, por si algún caso hubiese pasado desapercibido por encontrarse aún en el periodo prepatente y por tanto antes de llegar a la fase de emisión cercariana.

El primer paso que se realiza en el laboratorio a la llegada de la zona de muestreo es la aclimatación de los moluscos recolectados tratando de simular las condiciones



que presentaban en la naturaleza. Esta fase dura aproximadamente 48 horas (RONDELAUD & BARTHE, 1987; AUDOUSSET et al., 1989). Los ejemplares durante este período se colocan, minimizando la manipulación, en cajas con agua mineral y un suministro de lechuga en el interior de unas cámaras climáticas (Heraeus Vötshc® modelo VB714) bajo temperaturas standard de recepción de una temperatura de 25° C, 90% de humedad relativa (HR) y un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Una vez finalizada la fase de aclimatación, los moluscos eran separados por especies y en función de su origen geográfico, colocándolos en recipientes de plástico transparentes y cerrados herméticamente con una adecuada oxigenación. Cada uno de los recipientes fue debidamente etiquetado, indicando el número de ejemplares existentes, su biotopo o lugar de origen y la fecha de recolección.

Para conseguir un correcto mantenimiento y reproducción del ciclo biológico de cada especie, se dispuso en el fondo de los recipientes anteriormente descritos, una capa fina y continua de sedimentos de grava (RONDELAUD & BARTHE, 1978; BOUIX-BUSSON et al., 1985a, b; AUDOUSSET et al., 1989) recubierta por una capa de agua de manera que ocupara un volumen total adecuado del recipiente. Los recipientes de cultivo fueron mantenidos en las cámaras climáticas según las experiencias programadas, a diferentes temperaturas según los casos, oxigenación artificial permanente, y una intensidad de iluminación de 3500lux. Cada 3-4 días se añadían hojas de lechuga como base de alimentación y se procedía al cambio de agua del recipiente (BOUIX-BUSSON et al., 1985a, b).

Para algunos ejemplares la lechuga fue sustituida por una alimentación basada en algas cultivadas en serie a partir de cepas de *Oscillatoria formosa*. La utilización de estas algas obligaba a un cambio y limpieza de los recipientes con frecuencia, pero la brevedad del procedimiento, la eliminación prácticamente completa de los residuos en cada limpieza y el mayor acceso que presentan las formas inmaduras de los moluscos o recién nacidos a los nutrientes demuestran que estas algas son más ventajosas. El sedimento era cambiado cada 2 o 3 meses, a medida que se iba deteriorando por la erosión y presencia de detritus que no se eliminan en el lavado habitual. El sedimento deshechado se recicla para posteriores usos mediante el empleo de un autoclave. Por otro lado, para cada recipiente y especie de molusco se llevó a cabo un seguimiento quincenal, teniendo en cuenta el tamaño de los ejemplares, número de puestas y de recién nacidos, número de individuos muertos, etc. Todo ello, con el fin de estudiar la dinámica poblacional de los moluscos.

Estos cultivos llevados a cabo en el Centro Colaborador de la OMS del Equipo de Valencia incluyen varias cepas de Lymnaeidos procedentes de Egipto y también de

Marruecos, y hubieron de ser trascendentales, esencialmente para la realización de estudios de fenotipaje de coquilla, clusters y huevos que de otra manera hubieran sido imposibles, pero en su momento también resultaron muy importantes para la obtención de especímenes frescos adicionales con los que realizar estudios de genotipaje.

## **3.2.- METODOS MOLECULARES DE GENOTIPAJE**

### **3.2.1.- MANEJO DE LYMNAEIDOS**

En las áreas de endemia de Fascioliasis humana y animal, se procedió a la búsqueda de Lymnaeidos teniendo en cuenta sus características ecológicas y preferencias de hábitat. Las búsquedas se efectuaron esencialmente en lugares con presencia de ganado y en zonas próximas a comunidades humanas.

Una vez localizada una población de Lymnaeidos, la recolección de ejemplares se efectuaba según procedimientos diferentes de acuerdo con dos fines: (i) recolección para transporte de ejemplares vivos hasta el laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, en España, y (ii) recolección para fijación destinada a la obtención de ejemplares para los procesos ulteriores de secuenciación de los marcadores de ADN. Los dos procedimientos se llevaban a cabo simultáneamente, a pesar de que las técnicas son bien diferentes.

Es de destacar el hecho de que la inmensa mayoría de los Lymnaeidos analizados fueron recolectados por miembros del Centro Colaborador de la OMS en Fascioliasis y sus Vectores (la Unidad de Parasitología de la Universidad de Valencia) en expediciones efectuadas a las zonas de endemia de Egipto y Marruecos objeto de estudio en este trabajo. En otros casos, los especímenes fueron enviados y donados por diferentes científicos y colegas. Este hecho resulta ser de gran trascendencia en el momento del análisis de la implicación de los Lymnaeidos estudiados sobre las situaciones de endemia, transmisión y epidemiología de la Fascioliasis humana y animal en cada lugar, por cuanto en dichas expediciones los trabajos de campo efectuados por los investigadores de Valencia incluían también estudios sobre la enfermedad tanto en humanos como en diferentes especies de ganado, aspecto trascendental que desgraciadamente no hubo lugar en los países a los cuales no se pudieron organizar expediciones con este fin. Sea como sea, en el caso de otros países siempre se intentó conseguir el máximo de información sobre los lugares y biotopos de procedencia de los especímenes recibidos.

### 3.2.1.1.- TECNICAS DE CAMPO

Cuando en un lugar concreto se hallaba un espécimen de Lymnaeido, se procedía a extender la búsqueda en tiempo y en espacio alrededor de dicho lugar y en las proximidades del mismo. En el caso de que la población fuese lo suficientemente numerosa en miembros integrantes, se llevaba a cabo un análisis de densidad poblacional contando el número de especímenes presentes en 1 m<sup>2</sup>, así como también de los tamaños de dichos especímenes como estimación de la edad de los ejemplares.

Todos estos detalles y cuantos otros adicionales se estimaban oportunos sobre la población se anotaban *in situ* en un protocolo bajo la introducción de fecha, hora y lugar concreto de recolección, además de los datos de latitud, longitud y altitud obtenidos mediante un aparato portátil de GPS. Para cada expedición se dedicó un librito de protocolo independiente.

Siempre que el transporte del laboratorio portátil de análisis de aguas había sido posible en la expedición en cuestión, se procedía además como mínimo al análisis de la temperatura y pH del agua, además de conductividad y contenido total en sales.

Simultáneamente, se procedía a la toma de fotografías del lugar del hallazgo, incluyendo desde tomas de la colección de agua en concreto desde diferentes ángulos, como también de los alrededores de dicha colección de agua con el fin de disponer de una información lo más completa posible para análisis futuros sobre la transmisión y epidemiología de la enfermedad.

Los moluscos se recolectaban vivos y se colocaban dentro de tubos de plástico especiales con agua y algo de vegetación procedentes de exactamente la misma colección de agua en que habían sido encontrados. El tubo era etiquetado externamente mediante los datos necesarios de identificación.

Estos tubos eran posteriormente transportados al centro base de expedición, donde los caracoles eran ubicados en contenedores de mayor tamaño de manera independiente para cada una de las poblaciones y localidades. La finalidad de este cambio era facilitar la supervivencia de los especímenes vivos recolectados hasta el día de su viaje hasta el laboratorio de la Unidad de Parasitología de Valencia, en España, traslado que se realizaba de modo similar.

Tan pronto se llegaba a Valencia, el primer paso era el análisis individualizado de cada uno de los Lymnaeidos recolectados con el fin de verificar su parasitación o no por fasciólidos, tal y como se ha detallado con antelación.

Aunque los resultados de todas estas recolecciones, traslados y cultivos no forman parte del estudio de la presente Tesis Doctoral, van a ser cruciales en el momento ulterior de la caracterización de la transmisión y epidemiología de la Fascioliasis humana y animal en cada uno de los lugares prospectados en los países objeto de estudio, finalidad a la que también contribuye este trabajo.

Sea como sea, la disponibilidad de cultivos puros de cada especie de cada lugar en el laboratorio permitió a veces la obtención fácil de especímenes adicionales cuando se estimó conveniente, sobre todo en casos de insuficiencia de material para extracciones de ADN, preferentemente en casos de contaminación inesperada conducente a problemas en los procesos de secuenciación, lo cual desgraciadamente suele ser, en los Lymnaeidos procedentes directamente del medio natural, más frecuente de lo deseable. En algún caso como lo fue el de *L. schirazensis*, el disponer de una fuente inagotable de especímenes resultó crucial en la dilucidación de un problema inesperado originado por la existencia de una especie críptica totalmente indiferenciable y que siempre había sido confundida con *G. truncatula* y otras especies del grupo *Galba/Fossaria* (BARGUES et al., 2011b).

### **3.2.1.2.- RECOLECCION Y FIJACION PARA FINES MOLECULARES**

Siempre de cada una de las poblaciones de Lymnaeidos encontradas, se procedió a fijar siempre un número mínimo de especímenes con el fin de su utilización ulterior en los procesos de secuenciación para la clasificación específica y caracterización genética de cada población mediante haplotipaje combinado por detección de diferencias nucleotídicas puntuales ("single nucleotide polymorphisms - SNPs") en más de un marcador de ADN siempre que fuese posible y como mínimo mediante un marcador del ADN nuclear ribosomal.

En los casos en los que los especímenes recolectados eran escasos en número, de manera que su cantidad se consideraba insuficiente para un lanzamiento de un cultivo experimental con mínimas garantías de éxito, todos los especímenes de moluscos vivos eran directamente fijados en alcohol, a ser posible en alcohol 70% a partir de alcohol 100% puro, y si no en alcohol de 80-85% cuando no alcohol 96% simple obtenible en cualquier farmacia. La fijación se efectuaba siempre dentro de un tubo tratando de que la proporción de volúmenes caracol/alcohol fuese como mínimo la apropiada, con el fin de asegurar una fijación en óptimas condiciones.

Cada uno de los tubos era destinado a albergar únicamente ejemplares recolectados a partir de una misma población de Lymnaeidos. Cada tubo era etiquetado mediante los datos de lugar, fecha y hora de recolección. Los datos eran pasados a fichas incluyendo coordenadas y altitud obtenidas por GPS, así como todos los detalles tanto de la población de Lymnaeidos como de la colección de agua, del lugar y de su entorno. Si además se contaba con el laboratorio portátil de análisis de aguas, se añadían los resultados sobre temperatura, pH, conductividad, concentración total en sales, y otros parámetros de interés.

Para su mantenimiento en el laboratorio de Valencia en caso de tenerse que almacenar por largo tiempo antes de iniciar su procesamiento, se llevaban a cabo cambios del alcohol en cada tubo, hasta que llegaba el momento de proceder a la extracción de ADN de cada espécimen de caracol.

### **3.2.2.- ESTUDIO MOLECULAR POR SECUENCIACION DE MARCADORES DE ADN**

De acuerdo con las tendencias actuales, entre los marcadores moleculares utilizados en la identificación y clasificación de los Lymnaeidos destacan los marcadores del ADN ribosomal nuclear y los marcadores del ADN mitocondrial. La elección de uno u otro tipo de marcadores se justifica por las características diferenciales de cada tipo de marcadores, que aportan diferente información. En función del objetivo del estudio serán más adecuados los marcadores ribosomales, los marcadores mitocondriales o la combinación de ambos.

En la presente Tesis Doctoral se seleccionaron dos marcadores del ADN ribosomal nuclear, los dos espaciadores internos transcritos, el ITS-1 y el ITS-2. La combinación de ambos tipos de marcadores ha proporcionado información complementaria que permitió el desarrollo de los objetivos del trabajo. En el caso de los Lymnaeidae, los dos ITSs del ADNr han demostrado su utilidad para la clasificación sistemática de especies, subespecies y poblaciones. Con este amplio estudio molecular se pretende conseguir un código de identificación genética para cada espécimen de Lymnaeido analizado y establecer una base de datos genética de gran utilidad en futuros estudios comparativos, en lo que a los Lymnaeidos de Africa y otros continentes se refiere.

#### **3.2.2.1.- EXTRACCION DE ADN**

Una pequeña porción de la región cefalopédea de cada Lymnaeido es lo que se utilizó como material de partida para la extracción bajo lupa binocular, evitando de este modo la región del manto para evitar contaminación por pigmentos melánicos o por sustancias tales como polisacáridos que podrían interferir en los procesos de centrifugación y posterior precipitación de algunos protocolos de extracción de ADN. Todo el material empleado en la extracción fue previamente esterilizado.

El método fenol-cloroformo fue el que se siguió para la extracción de ADN (SAMBROOK et al., 1989) y alternativamente también mediante el kit comercial InstaGene™ Matrix de Bio-Rad. Este último proceso de extracción se basa en el empleo de una matriz que retiene los productos de la lisis celular y permite la obtención de un extracto de ADN de un modo más sencillo y rápido.

Cada espécimen de Lymnaeido se introduce en un tubo eppendorf que contiene: 380 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, y dodecil sulfato sódico SDS 1%) y 20 µl de Proteinasa K (SIGMA). La mezcla se tritura minuciosamente bien con ayuda de un taladro y unas brocas de plástico especiales, o bien con unas tijeras, hasta conseguir una suspensión homogénea. Posteriormente se incuba durante dos horas en un baño de agua a 55 °C. Para la extracción completa de ADN, son necesarias tres etapas en las que se utiliza fenol y cloroformo/alcohol isoamílico (49/1) para desnaturalizar y precipitar las proteínas.

En la primera etapa se añaden 400 µl de fenol; en la segunda etapa se añaden 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo/alcohol isoamílico; y en la tercera etapa se añaden 400 µl de cloroformo/alcohol isoamílico. Tras cada una de las etapas la mezcla se separa en dos fases mediante centrifugación en microcentrífuga a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos y la fase acuosa (en la parte superior) que contiene el ADN, se recupera cuidadosamente y se coloca en un tubo nuevo. La fase acuosa recuperada se precipita con 0,1 volúmenes de acetato potásico 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se congela a -20 °C durante al menos dos horas.

Transcurrido este tiempo, se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 12.000 r.p.m. a una temperatura de 4 °C, para concentrar el ADN en el fondo del tubo. Se descarta todo el sobrenadante sin alterar el sedimento (*pellet*) de ácidos nucleicos (a menudo invisible). Luego se añaden 400 µl de etanol al 70%, se centrifuga a 13.000 r.p.m. a 4 °C durante 5 o 10 minutos y se descarta el sobrenadante, dejando el sedimento secar a temperatura ambiente. El ADN precipitado se resuspende en un volumen de 30 µl de buffer TE estéril (Tris-HCl 10mM, pH 7,6, EDTA 1mM) y se conserva a -20 °C hasta su utilización ulterior.

Para la extracción mediante el kit comercial InstaGene Matrix de Bio-Rad, la muestra de la región cefalopédea de cada espécimen de Lymnaeido se introduce en un tubo eppendorf y se añaden 200 µl de la matriz del kit InstaGene Matrix. Es importante que previamente la matriz sea agitada durante unos minutos en un agitador magnético para resuspenderla correctamente y tomarla en la concentración adecuada. La muestra se tritura dentro del tubo conteniendo la matriz del kit con la ayuda de unas tijeras de punta fina y aguda y una vez bien triturada se lleva a incubación a 56 °C, con agitación de 800 r.p.m. durante 30 minutos. A continuación se agita vigorosamente en un vórtex durante 10 segundos y se incuba nuevamente durante 8 minutos en un baño de agua a 100 °C, se vuelve a agitar con el vórtex y se centrifuga después en una microcentrifuga a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos. El sobrenadante (contiene el ADN) se recupera y se conserva a -20 °C.

### **3.2.2.2.- AMPLIFICACION DE LOS MARCADORES MOLECULARES POR PCR**

Las secuencias de los marcadores moleculares de cada muestra fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*, PCR).

Los cebadores utilizados para la amplificación de los dos ITSs han sido los descritos en la bibliografía (BARGUES et al., 1997, 2001, 2006a,c, 2007; 2011a,b,c,; 2012a,b; BARGUES & MAS-COMA, 1997, 2005).

La mezcla de reacción utilizada tiene un volumen total de 25 µl y una composición constante, con la única excepción del volumen de ADN que puede variar en función de la concentración del extracto. Esta concentración se determina espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia a 260 nm de longitud de onda.

La reacción se realizó indistintamente en los termocicladores MiniCycler™ PT-150 (MJ Research, USA) y Mastercycler Eppgradient (Eppendorf, USA). El programa utilizado para los espaciadores ITS-2 e ITS-2 fue el siguiente:

1) 30 segundos a 94 °C; 2) 30 segundos a 94 °C; 3) 30 segundos a 50 °C; 4) 1 minuto a 72 °C; 30 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 7 minutos a 72 °C; 6) descenso y mantenimiento a 4 °C.

### **3.2.2.3.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

El proceso de la electroforesis en gel de agarosa tiene como finalidad verificar el éxito de la PCR, comparando la movilidad del fragmento amplificado con un control positivo y un patrón de fragmentos de peso molecular conocido. Además este método también permite, en función de la intensidad de la banda, estimar la cantidad aproximada de amplificado obtenido en la reacción.

La preparación del gel de agarosa se efectuó disolviendo una solución de agarosa al 1% en tampón TAE, y añadiendo 1,5 µl de una solución de bromuro de etidio de concentración 10 mg/ml. La mezcla se vertió sobre los moldes de las cubetas de electroforesis, se colocaron los peines adecuados para originar los pocillos de carga y se dejó solidificar. Tras retirar los peines, se cargó en cada pocillo del gel 5 µl de muestra previamente mezclados con 2 µl de un tampón de carga a base de glicerina, azul de bromofenol y EDTA. La electroforesis se realizó a 60 voltios y 400 miliamperios constantes durante 45 minutos. Por último se observó el resultado en un iluminador ultravioleta; el bromuro de etidio es un agente intercalante que se une a los fragmentos de ADN y al exponerlo a luz ultravioleta emite fluorescencia.

#### **3.2.2.4.- PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR**

Este paso tiene la finalidad de obtener una solución concentrada y de alta pureza del fragmento amplificado, eliminando los restos de cebadores, nucleótidos, sales, etc.

Para la purificación, se utilizó el kit comercial Ultra Clean (MoBio Laboratories, USA), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El fundamento de este método de purificación es retener el ADN en una membrana de sílice y arrastrar el resto de sustancias presentes en la PCR. Para ello, en primer lugar se adiciona al producto de PCR una solución de sales de pH adecuado (6-7,5) para retener solamente los fragmentos de ADN mayores a 60 pares de bases, con lo que se eliminan los cebadores, además de los dNTPs, la enzima y los constituyentes del tampón de reacción. A continuación se hace pasar por la membrana una solución de lavado que contiene etanol para eliminar las trazas de sustancias no deseadas o contaminantes que puedan quedar. Por último el ADN es liberado de la membrana añadiendo tampón Tris 10 mM y aplicando una temperatura de -20 °C para su conservación.



### 3.2.2.5.- CUANTIFICACION Y DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ADN

La concentración de ADN así como su pureza fueron calculadas espectrofotométricamente en una dilución de la muestra al 5 % en tampón Tris 10 mM. A partir de la absorbancia a 260 nm de longitud de onda se calculó la concentración de ADN en µg/ml. La concentración requerida para poder posteriormente secuenciar las muestras debe ser siempre superior a 10 ng/µl.

También se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la pureza de la muestra. La relación  $A_{260}/A_{280}$  se encuentra en torno a 1,8 cuando el ADN es puro. Valores por debajo de 1,6 indican contaminación por proteínas y no es aconsejable la secuenciación en este caso, ya que los resultados no son buenos.

### 3.2.2.6.- SECUENCIACION DEL ADN

Para la obtención de las secuencias correspondientes a los distintos marcadores de ADN amplificados se aplicó el método de secuenciación automática. Esta metodología consiste en realizar una PCR con un único cebador, añadiendo a la mezcla de reacción didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con distintos fluoróforos para cada base nitrogenada; al ser incorporados por la polimerasa, estos ddNTPs detienen la síntesis de la cadena en crecimiento, puesto que impiden la adición del siguiente nucleótido. El resultado de la PCR será una colección de fragmentos de diferente longitud terminados en un ddNTP fluorescente. Al someter esta mezcla a una electroforesis capaz de discriminar diferencias de tamaño de un solo nucleótido, es posible detectar mediante un lector de fluorescencia la secuencia de señales fluorescentes, que se corresponderá con la secuencia de bases nitrogenadas.

Para el marcaje de los productos purificados y cuantificados se utilizó el kit comercial Big Dye<sup>®</sup> Terminator v. 1.3, utilizando el siguiente programa para todos los marcadores utilizados: 1) 95 °C durante 1 minuto; 2) 95 °C durante 10 segundos; 3) 50 °C durante 5 segundos; 4) 60 °C durante 4 minutos; 5) 49 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 6) 4 °C de forma permanente. El producto obtenido fue trasladado en frío al Servicio Central de Soporte a la Investigación (SCSIE) de la Universitat de València, donde el ADN marcado fue purificado a través del uso de placas de filtrado MultiScreen de Millipore utilizando Sephadex<sup>™</sup> G-50 Superfine como resina de filtración. La secuenciación se llevó a cabo en los secuenciadores automáticos ABI Prism 3700 y ABI 3730 de Applied

Biosystems del SCSIE. Por cada muestra se obtuvieron dos secuencias de bases, una correspondiente a la cadena directa y otra a la inversa, estos resultados fueron representados como texto y como representación gráfica (cromatograma) por los equipos ABI Prism 3700 y ABI 3730 disponibles.

### **3.2.2.7.- ANALISIS DE LAS SECUENCIAS**

A partir del proceso de secuenciación se obtuvo una sucesión de bases, leídas (A, T, G, C) y no leídas (N) por el secuenciador, organizadas en una secuencia de tamaño variable, que por lo general abarca el fragmento de interés junto a las bases que lo flanquean. Por estos motivos era necesario delimitar la secuencia de interés, marcando un inicio y un final, así como realizar una corrección de sus bases en el caso de que fuera necesario.

Las secuencias directa e inversa correspondientes a cada muestra fueron alineadas entre sí utilizando el programa Staden Package versión 1.7 (STADEN et al., 2001).

Llegado el momento de que las secuencias individuales fueron alineadas entre sí, y corregidas adecuadamente, se procedió al análisis de las diferentes muestras y a su alineación para determinar las diferencias, utilizando tanto el programa Clustal W versión 1.8 (THOMPSON et al., 1994), como el programa MEGA versión 5.0 (TAMURA et al., 2011). Ambos tiene ventajas diferentes y según el interés en cada caso conviene utilizar uno u otro programa.

### **3.2.2.8.- NOMENCLATURA DE LOS HAPLOTIPOS DE ADN**

En lo referente a la nomenclatura, los códigos utilizados para la definición de los haplotipos siguen la nomenclatura propuesta para los Lymnaeidos por BARGUES & MAS-COMA (2005), BARGUES et al. (2006a) y MAS-COMA et al. (2009a). Es importante puntualizar que los códigos de haplotipos son definitivos sólo cuando se trata de secuencias completas del marcador utilizado para haplotipar. Sin embargo, se consideran códigos preliminares cuando la secuencias utilizadas corresponden a fragmentos o secuencias incompletas, como suele ser el caso de los marcadores del ADN mitocondrial obtenidos, los fragmentos del gen 16S y de la *cox1*.

En el caso de la presente Tesis Doctoral, los códigos adscritos cabe considerarlos definitivos, habida cuenta del hecho de que las secuencias de los dos espaciadores ribosomales ITS-2 e ITS-1 hayan sido obtenidas en su total longitud.

### **3.2.3.- ESTUDIO DE LAS RELACIONES EVOLUTIVAS MEDIANTE METODOS FILOGENETICOS**

Con el fin de efectuar el estudio de las relaciones evolutivas mediante métodos filogenéticos se han utilizado los siguientes programas: jModeltest versión 0.1.1 (POSADA, 2008) para seleccionar el modelo evolutivo más adecuado al paquete de secuencias a analizar, llevándose a cabo la selección de un modelo mediante el *hierarchical likelihood ratio test* (hLRTs), el Criterio de Información AIC (*Akaike Information Criterion*) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (AKAIKE, 1974; POSADA & BUCKLEY, 2004); PAUP v.4.0b10 (SWOFFORD, 2002) como software para análisis y reconstrucciones filogenéticas y comparación de filogenias; PHYML 2.4 (GUINDON & GASCUEL, 2003) y Mr Bayes v3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) para filogenias y análisis del soporte de los nodos de los árboles.

El PAUP se ha utilizado para los análisis filogenéticos de (i) Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood - ML) incluyendo diferentes parámetros según el modelo evolutivo seleccionado que permite considerar las distintas frecuencias de los nucleótidos, la proporción de sitios invariables, la distribución gamma del parámetro alfa y el ratio de transiciones/transversiones; (ii) distancias por Neighbor-Joining (NJ) incluyendo cálculos de matrices de distancias según distintos estimadores de distancias genéticas, seleccionados en función del grado de divergencia entre las secuencias a analizar (Kimura 2-parámetros, K 3-p, Tamura-Nei, Log-Det, máxima verosimilitud, etc.); (iii) Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony – MP) incluyendo los modelos de búsqueda heurística, branch-and-bound y exhaustiva.

Para la obtención de una valoración de la fiabilidad de los nodos de los árboles filogenéticos se realizó un muestreo repetitivo con 1000 replicas (bootstrap) y cálculo de la probabilidad posterior con Inferencia Bayesiana (BPP), considerando un soporte superior o igual al 70% como valor significativo.

### **3.2.4.- ESTIMACION CRONOLOGICA DE DIVERGENCIAS MOLECULARES**

### **3.2.4.1.- FUNDAMENTO DE LAS DIVERGENCIAS EVOLUTIVAS**

Los conocimientos sobre la evolución de los diferentes marcadores indican que cada uno de ellos evoluciona a velocidades diferentes. Dicho de otra manera, la tasa de mutación por unidad de tiempo difiere de un gen a otro y de una secuencia a otra. En algunos casos de genes con secuencias largas, se sabe que determinadas partes, correspondientes a diferentes hélices en su estructura secundaria, evolucionan más rápidas que otras, como es bien conocido dentro de la subunidad pequeña del operon ribosomal o gen 18S (MAS-COMA & BARGUES, 2009).

Dentro del ADN ribosomal nuclear se sabe perfectamente que partes del operón evolucionan más rápidas, esto es, muestran tasas de mutación superiores. Así el gen 5S es el gen que muestra una evolución más lenta, que es en general útil para la diferenciación de taxones que divergieron en épocas geológicas muy arcaicas. En cambio, el gen 18S, de unos 1850 nucleótidos de longitud, varía un poco más, y a pesar de tratarse también de un gen muy conservado, en general resulta útil para diferenciar taxones que divergieron hace más de 40 millones de años.

Por su parte, el gen 28S ribosomal es el más largo, habitualmente de unas 2800 nucleótidos, presentando diferentes "dominios" que muestran tasas evolutivas más rápidas unos que otros (MAS-COMA & BARGUES, 2009).

Por último, los espaciadores ITS-2 e ITS-1 evolucionan más rápidamente y en general el ITS-2 muestra una tasa de mutación algo inferior a la del ITS-1 (MAS-COMA & BARGUES, 2009). Así es como ambos resultan útiles para taxones que han divergido en épocas más recientes, en general hace menos de los antedichos 40 millones de años. Es por este motivo que los dos ITSs suelen utilizarse como marcadores para la diferenciación de especies, sobre todo el ITS-2 que es el marcador de excelencia para este menester.

### **3.2.4.2.- CALCULO DEL RELOJ MOLECULAR**

Desgraciadamente, sólo se dispone de un fósil antiguo que es el hallazgo de *Galba* en el Periodo Jurásico, esto es, hace entre 208 y 146 millones de años, lo que es una datación demasiado alejada en el tiempo como para poder ser utilizada como referencia para la datación de *L. caillaudi* de Egipto y que no es más que una subespecie, tal y como se alude posteriormente en esta misma Memoria.

Ante esta situación, se decidió partir de la tasa estandar de evolución para un gen ribosomal del ADN bien conocido por su utilidad en dataciones a través de reloj molecular y que es la subunidad pequeña o gen 18S. La tasa evolutiva de este gen es de 1,8% de mutación por cada 100 millones de años (OCHMAN & WILSON, 1987), lo que se ajusta en principio bien a los moluscos en general, que se caracterizan por una evolución lenta en comparación con otros invertebrados como los insectos.

Al tratarse de una datación reciente, que el gen 18S no resulta útil. Para solucionar este problema, se ha procedido a extrapolar la tasa de evolución de los Lymnaeidos desde el gen 18S al segundo espaciador transcrito interno ITS-2 que evoluciona mucho más rápidamente y permite dataciones desde hace unos 40 millones de años y hasta la actualidad. Ello se realiza basándonos en el árbol filogenético de los Lymnaeidae europeos, estimando las divergencias entre especies estratégicamente seleccionadas según su ubicación en una u otra rama evolutiva de dicho árbol general.

El conjunto de las divergencias entre cada una de las especies, según los nodos de los árboles filogenéticos obtenidos, ofrece una estimación general apropiada de la tasa de evolución de los Lymnaeidae en general, al incluir especies de grupos taxonómicos muy dispares dentro de la familia. La comparación entre dos especies de un mismo género tiene la finalidad de estimar la tasa de evolución dentro de la línea evolutiva del mismo de manera concreta, y eso tiene su trascendencia dado que *Lymnaea caillaudi*, tal y como se destaca posteriormente dentro de esta Memoria.

Las secuencias de las especies de Lymnaeidae antes citadas y aquí utilizadas para los cálculos fueron obtenidas en el Departamento de Parasitología de Valencia.

### **3.3.- METODOS MORFOMETRICOS DE FENOTIPAJE**

Numerosos estudios desarrollados por el Equipo de Valencia han demostrado en estos últimos años como resulta plausible efectuar análisis de variabilidad morfométrica a lo largo de la evolución y vida de un organismo y su crecimiento, de manera que la aplicación de parámetros previamente definidos tras detallados estudios permite una caracterización fenotípica extremadamente útil (VALERO et al., 1996, 1998, 1999, 2001).

Esta metodología descansa sobre métodos matemáticos complejos pero finalmente proporciona elementos de una utilidad que corre paralela al genotipado y que posibilita incluso análisis de expresión génica cuando fenotipaje y genotipaje se aplican paralelamente a los mismos especímenes. Esta metodología tiene la ventaja, además,

de no requerir de laboratorios superdotados de aparataje costoso para la obtención de secuencias para genotipado, sino que pueden incluso aplicarse contando únicamente con un microscopio oportunamente calibrado (ASHSRAFI et al., 2006).

### **3.3.1.- MEDIANTE COMPUTER IMAGE ANALYSIS SYSTEM (CIAS)**

En nuestro caso, sin embargo, para el estudio del fenotipaje de coquillas de los Lymnaeidos hemos aplicado el método de Computer Image Analysis System (CIAS)., basado en un aparataje compuesto de un estereomicroscopio calibrado y un ordenador (computer work station) asociado a cámara microscópica de video en color (DX 20, Kappa). El ordenador debe comprender un software especializado en análisis de imagen. De entre los varios disponibles, nosotros utilizamos preferentemente, aunque no únicamente, el ImagePro (USA).

La descripción y aplicación de esta metodología a la Fascioliasis fue debidamente publicada ya por VALERO et al. (2005). Su aplicación a Fasciola ha dado lugar a varias publicaciones (PERIAGO et al., 2006, 2008; AHSRAFI et al., 2006).

Su aplicación a Lymnaeidae ha demostrado recientemente su utilidad en otro estudio también realizado en Valencia (BARGUES et al., 2012b). Nosotros hemos seguido las mismas directrices para el estudio de coquillas, clusters y huevos de *Lymnaea caillaudi* dentro de la presente Tesis Doctoral.

### **3.3.2.- CONSERVACION DE CONCHAS DE LYMNAEIDOS**

Las coquillas de Lymnaeidos a conservar proceden de los caracoles muertos durante las muchas expediciones que realizan los miembros del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, así como de los muertos naturalmente, y también del material malacológico de cultivo muerto. Previamente a la conservación de las conchas, se dejan en cajas de Petri con agua mineral que suele ser cambiada hasta lograr mas o menos unas conchas limpias, de modo que se evite cualquier daño a la hora de emplearlas para su estudio. Después del lavado, se dejan secar sobre papel de filtro y pasan a conservarse en cajas de Petri con tapas y bien identificadas con etiquetas con el nombre de la especie, procedencia y fecha.

Las conchas ya usadas en estudios de conquiología vuelven a ser conservadas en placas de Petri añadiendo en el etiquetado el nombre del estudio en el que han sido utilizadas y la fecha en que se efectuó.

### **3.3.3.- MEDICION DE CONCHAS ACTUALES MEDIANTE CIAS**

Para realizar el análisis morfométrico de las conchas de las poblaciones de caracoles recolectados en Egipto y los cultivados en el laboratorio se utilizó un sistema de análisis de imagen computerizado (CIAS, Computer Image Analysis System ). Para la obtención de las imágenes digitales se utilizaron el programa Pinnacle Systems GMBH- Studio Plus 700-PCI versión 10 utilizado para la captura y la transferencia de imágenes de las conchas, y el Image-Pro® Plus, versión 5.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) para las medidas de varias dimensiones sobre la imagen de los especímenes.

Los caracoles fueron medidos utilizando un microscopio estereoscópico marca NIKON, modelo SMZ 1500, lupa binocular, con gama de aumento zoom de 0.75x a 11.25x dotado con un sistema de televisión y una videocámara a color ExaveHAD (SONY). En la base de la lupa se fijó una base de papel milimetrado para garantizar el paralelismo o perpendicularidad de las líneas de medición.

Los caracoles se fijaron para su medición sobre un trozo de acetato transparente de 2x6 centímetros aproximadamente, utilizando una pequeña porción de plastilina, de modo que la concha queda en paralelo al plano horizontal. Sobre el acetato se había previamente trazado una línea, y en el momento de fijar el caracol se hacía coincidir esa línea con la de la columela (eje del caracol), y con la concha en posición ventral y la apertura orientada hacia abajo. La fijación del caracol sobre la pieza transparente de acetato permitía en todo momento chequear la posición de las líneas de medición. Fijado el caracol y colocado de forma que coincidiera con una de las líneas del papel milimetrado, se posicionaba entonces el ocular sobre el mismo, haciéndolo coincidir con las líneas del papel milimetrado, y procediendo a realizar la medición.

Las medidas fueron tomadas de acuerdo a los trabajos de HUBENDICK (1951) y OVIEDO et al. (1995) y según se muestra en la Figura 11. La longitud de la concha (SL) se mide desde el ápex siguiendo una línea recta que recorre la columela y termine en la proyección del margen anterior de la concha. Las otras mediciones, anchura de la concha (AC), longitud de la apertura (LA), anchura de la apertura (AA), y la longitud de

anchura de la concha del caracol. Después la concha fue puesta dentro del ángulo medidor tanto como fue posible, alcanzándose el límite cuando la última espira contacta con la rama medidora en la parte de la apertura. En este momento, hay tres puntos de contacto de la concha con las ramas del ángulo medidor, que inmobiliza la concha permitiendo una medida estandarizada del ángulo.

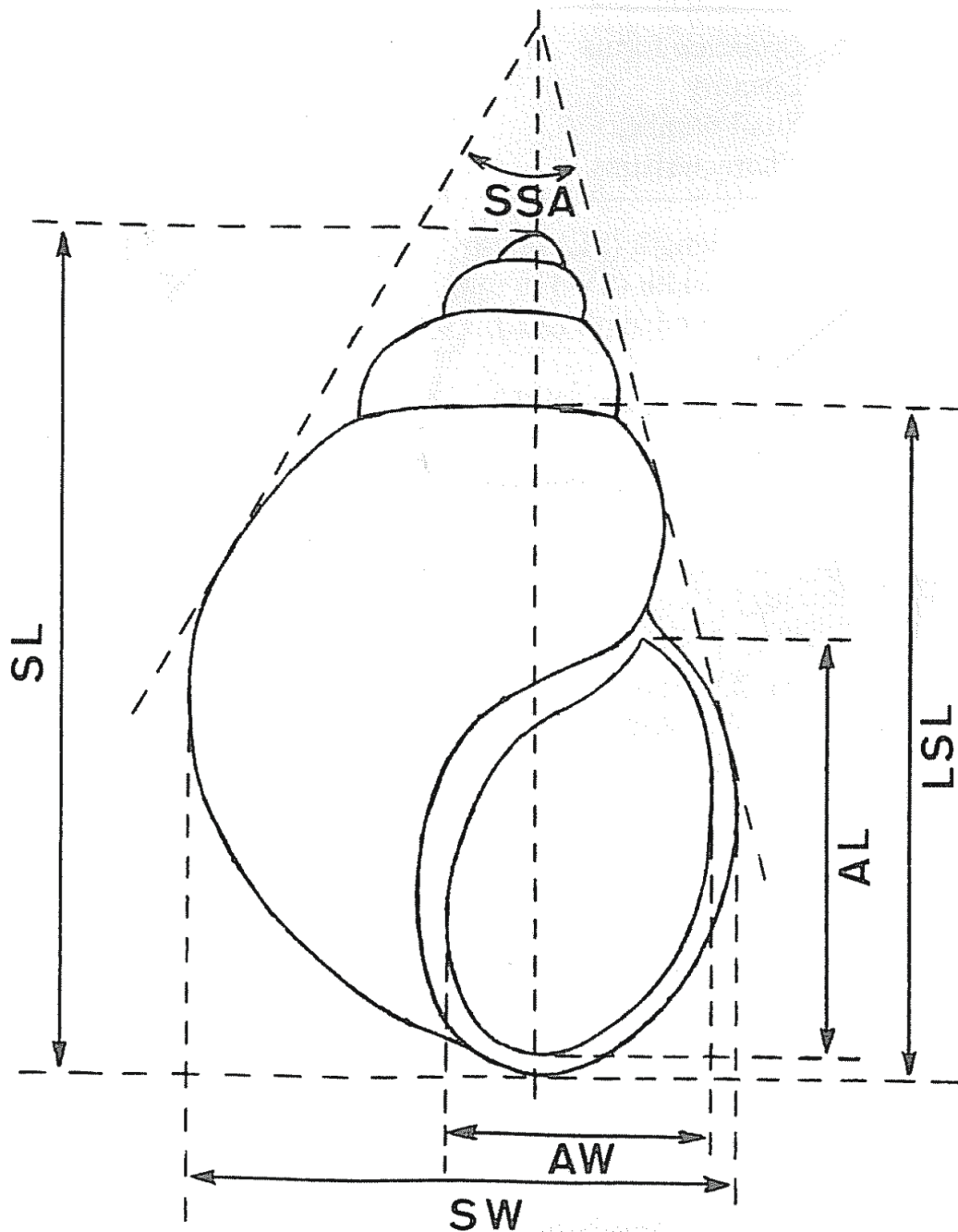


Figura 11.- Esquema de las medidas de la concha de los Lymnaeidos realizadas para el análisis de la variabilidad. SL (LC) = longitud de la concha; SW (AC) = anchura de la concha; AL (LA) = longitud de la apertura; AW (AA) = anchura de la apertura; LSL (LUE) = longitud de la última espira; SSA (AEC) = ángulo de la concha.



Los ratios de la longitud de la concha/anchura de la concha (LC/AC), longitud de la concha/longitud de la apertura (LC/LA) y longitud de la concha/longitud de la última espira (LC/LUE) también fueron calculados. Todas las medidas fueron realizadas por la misma persona.

### **3.3.4.- MEDICION DE CONCHAS DEL ANTIGUO EGIPTO**

La medición se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el apartado de medición de coquillas actuales mediante CIAS para Lymnaeidos de la naturaleza y de cultivos, y con la ayuda del programa informático Image-Pro®.

Comenzando de izquierda a derecha, se enumeraron los caracoles del número 1 al 24, y se calibraron las medidas en base la escala de 15 mm indicada por el autor (MÜLLER & THIEM, 2000). En primer lugar, se procedió a la medición del tamaño del brazalete, tomándose la medida desde un extremo al otro del brazalete, desde el punto exacto del nudo de cada uno de los extremos, resultando una longitud total de 242,39 mm.

La imagen digitalizada de las conchas del collar realizada sobre el fondo oscuro hacía resaltar el perfil de cada una de las piezas de oro, lo cual permitió con más precisión si cabe la toma de las medidas. El objetivo de realizar una fotografía por nuestros propios medios nos hubiera permitido visualizar cada una de las conchas en sus posiciones idóneas para obtener todas las medidas morfométricas necesarias y pudieron ser medidos los siguientes parámetros:

- Se realizaron las medidas de las 24 piezas para la longitud de la concha (LC) cogiendo la medida desde el extremo anterior de la coquilla hasta el extremo posterior de la misma, teniendo en cuenta que la longitud de la coquilla es la longitud máxima de la pieza siguiendo el eje columelar de la misma.
- Se calculó la anchura de la coquilla (AC), perpendicularmente al eje columelar y teniendo en cuenta que la anchura de la coquilla corresponde al ancho máximo de la misma. Estos valores permitieron calcular el ratio de la longitud de la concha/anchura de la concha (LC/AC).
- La longitud de la última espira (LUE) se midió desde detrás de la apertura y en un ángulo recto a la dirección longitudinal. Con estos valores se obtuvo el ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la última espira (LC/LUE).

### **3.3.5.- MEDICION DE CLUSTERS Y HUEVOS DE LYMNAEIDOS OBTENIDOS EN CULTIVOS PUROS**

Los estuches (clusters) de huevos depositados por los Lymnaeidos fueron obtenidos a partir de los cultivos in vivo y estudiados in vivo directamente bajo estereoscopio y de manera a poder recuperarlos para los cultivos sin que murieran. Para ello, lo que se hacía es seguir un procedimiento rápido mediante digitalización oportuna en placa de Petri sobre fondo calibrado que sirviera de escala.

Las medidas estudiadas fueron las mismas aplicadas en estudios previos semejantes (BARGUES et al., 2012b) y fueron concretamente las siguientes:

- A) Medidas de los clusters: 1) área; 2) redondidad (roundness); 3) longitud; 4) anchura máxima; 5) ratio longitud/anchura máxima. En los casos en que el cluster mostraba una segunda capa envolvente de los huevos interna, ésta también fue debidamente medida en longitud y anchura máxima.
- B) Medidas de los huevos: 1) número de huevos por cluster; 2) ratio número de huevos/área del cluster; 3) longitud; 4) anchura; 5) ratio longitud/anchura.

### **3.3.6.- METODOS ESTADISTICOS**

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de Image-Pro® Plus se exportaron para el análisis y cálculo estadístico. Se utilizaron los siguientes métodos:

- Se hicieron correlaciones bivariantes (correlación de Spearman) mediante Microsoft Excel 2003 de las variables morfométricas obtenidas de cada una de las poblaciones.
- Para el estudio de las poblaciones naturales, del laboratorio y del collar se realizó un análisis multivariable de componentes principales (ACP) utilizando los programas BAC v.4 y el PAD v. 0.82 (DUJARDIN, 2002).

## **3.4.- METODOS DE ANALISIS RETROSPECTIVOS**

### **3.4.1.- FUENTES BIBLIOGRAFICAS UTILIZADAS**

#### **3.4.1.1.- BASES DE DATOS**

Se utilizaron las siguientes bases de datos disponibles en Internet: Wholis (The WHO Headquarters library database), PubMed/Medline, Popline, CABI, Google Scholar, ISI – Web of Knowledge, Scopus de Elsevier, Embase también de Elsevier, y WorldCat.

#### **3.4.1.2.- WEBS NACIONALES E INTERNACIONALES Y COLECCIONES LIBRES**

Las siguientes páginas web de Internet fueron utilizadas para la entrada directa en varias revistas y acceso directo a artículos publicados: entradas individuales suministradas por cada revista en su web respectiva, entradas nacionales (Indian Journals, African Journals Online, Australian Journals Online – AJOL), Scielo, Directory of Open Access Journals (DOAJ), HighWire Press, LRS Search, Free medical journals, y HINARI (WHO).

#### **3.4.1.3.- PAQUETES MULTI-TITULOS O PLATAFORMAS WEB**

Las páginas web de las más importantes editoriales, en relación a revistas científicas en las cuales suelen aparecer artículos sobre Fascioliasis, también han representado unas fuentes excelentes para la obtención de literatura, entre las cuales deben ser resaltadas las de la siguiente enumeración: Science Direct, Wiley-Blackwell, Springerlink y Oxford University Press.

#### **3.4.1.4.- LIBRERIAS**

Algunas librerías concretas, bien conocidas internacionalmente y muy completas así como también otras librerías locales útiles, fueron contactadas directamente, esencialmente para la obtención de fotocopias o versiones digitalizadas en PDF de literatura antigua y artículos completos (no abstracts) no disponibles en Internet: WHO (Headquarters y Regional Offices, sobre todo EMRO), British Library, Librería de Ciencias de la Universitat de València, y Librería de Ciencias de la Salud de nuestra misma Universidad.

### **3.4.1.5.- COLECCIONES Y LIBRERIAS PERSONALES**

Muchas publicaciones no se encuentran disponibles in Internet, ni tampoco en grandes librerías, como sucede en el caso de artículos antiguos publicados en revistas local y/o secundarias, sobre todo en países en vías de desarrollo y que con frecuencia resultan necesarios para estimar la situación en una determinada zona o país.

Para este tipo de casos, se procedió al envío de cartas o emails a los autores de los artículos, o a colegas del mismo país con la esperanza de obtener fotocopias de los artículos y publicaciones varias.

La biblioteca del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, y muy especialmente el Helminthological Abstracts en versión papel, así como también la biblioteca personal del Prof. S. Mas-Coma, resultaron ser también de mucha utilidad en otras situaciones.

### **3.4.2.- METODOS DE REVISION**

Las siguientes palabras clave fueron utilizadas individualmente: *Fasciola*, fascioliasis, fasciolosis, liver fluke, distomatosis, helminths, trematodes, gastrointestinal parasites, intestinal parasites, y zoonoses. Teniendo en cuenta el muy amplio abanico de posibilidades, se efectuó una segunda exploración combinando cada uno de los términos antes citados con los nombres de los países. Los nombres de las palabras clave y de los países se introdujeron en diferentes idiomas, aunque esencialmente en inglés.

Para procesar todas las referencias bibliográficas obtenidas, se utilizó un programa de software especializado: EndNote version 9.0 para Macintosh OS. Este programa permite la importación desde todas las bases de datos de Internet antes enumeradas, incluyendo la herramienta muy útil de evitar directamente la duplicidad de una referencia.

De entre la gran cantidad de referencias obtenidas, se procedió a leer todas las referencias y a seleccionarlas de acuerdo con el tipo de información que suministraba cada una de ellas. Inicialmente sólo se mantuvieron aquellas referencias que aludían a aspectos de interés para la presente Tesis Doctoral. Subsiguientemente, se observó la conveniencia de pasar también a considerar aquellos artículos cuyos títulos estuvieran ligados a la Fascioliasis de uno u otro modo, como por ejemplo estudios sobre caracoles Lymnaeidae, trabajos experimentales, estudios climáticos, etc. La

justificación para ello es la citación frecuente de referencias publicadas en revistas locales o muy secundarias, revistas no digitalizadas, reportes no publicados, tesis de Maestría o de PhD, etc., en los textos de capítulos como la Introducción o la Discusión de tales obras.

De una manera similar, resultó también necesario ampliar la búsqueda para entrar documentos de índole veterinaria o meramente biológica, o incluso diferentes campos en los cuales muchos de sus artículos relacionados con la Fascioliasis no suelen estar disponibles en Internet, como es el caso por ejemplo del campo habitualmente amateur tal y como era la malacología tiempo atrás, y en los cuales se encuentran con frecuencia referencias a estudios sobre Fascioliasis en humanos.

Todas estas decisiones demostraron ser muy provechosas y son una clara evidencia del carácter postergado, menosprecio o falta de suficiente importancia que han concedido los científicos y responsables en salud a la enfermedad de la Fascioliasis durante muchas décadas.

Durante el proceso de la obtención de artículos (o abstracts) a través de Internet, se constató que a veces ello resultaba gratuito. Los artículos que resultaban obtenibles en texto completo, se bajaron preferentemente en formato PDF (raras veces en formato JPG), o cuando no disponible entonces en formato HTML o Word.doc. Aquellos documentos de los cuales sólo se encontraba el Abstract disponible también fueron bajados con el fin de por lo menos almacenar su información por si se daba el caso de que los textos completos de dichos artículos no fueran a ser obtenibles con posterioridad.

Para la localización del mayor número de artículos, muy especialmente los más antiguos, se dió la necesidad de requerir, y en varios casos adquirirlos a través de servicios prestados por diferentes bibliotecas de las antes enumeradas. En este sentido, cabe resaltar que la British Libray no proporciona artículos en formato electrónico, sino únicamente en formato fotocopia papel, de acuerdo con sus normas estrictas. Ello ha implicado un gran esfuerzo y consecuencias económicas, sin olvidar el enorme tiempo que se ha necesitado para tales procesos de requerimiento hasta llegado el momento de recibir las fotocopias.

Con el fin de ahorrar tiempo, los artículos obtenidos, tanto a través de Internet como a partir de librerías o bibliotecas, fueron sometidos a revisión bibliográfica para verificar si en sus secciones de References cabía obtener referencias aún no encontradas con anterioridad. Este método manual de trabajo, según la "forma antigua de hacer las cosas" demostró una gran utilidad en lo que se refiere a la obtención de literatura

antigua y artículos locales o publicados en revistas muy minoritarias en los países africanos en vías de desarrollo objeto de la presente Tesis Doctoral.

Un último método empleado ha sido recurrir al contacto personal con autores de artículos a través de direcciones personales, ya de email ya postales, para solicitarles que tuvieran la amabilidad de enviarnos separatas o fotocopias de sus artículos antiguos, cuando no incluso fotocopias de publicaciones de otros autores de su mismo país.

### **3.4.3.- PROBLEMAS ENCONTRADOS EN LA REVISION**

En la revisión retrospectiva efectuada nos hemos tropezado con numerosos problemas en la revisión de la literatura alcanzada, muchos de ellos de manera repetitiva.

En primer lugar cabe citar que la bibliografía resultó ser muchísimo más extensa de lo a priori esperado, sobre todo en el caso de Egipto. En los casos de los países del Maghreb, muchos de los artículos se remontaban incluso a décadas del principio y primera mitad del siglo pasado. Si bien en principio uno podría pensar que tales trabajos tan antiguos no son ya de interés para una revisión actual de la situación hoy en día, nuestra experiencia demuestra todo lo contrario. Si en una zona se detectaron casos humanos de infección por *Fasciola*, ello indica que en esa zona existe el riesgo de adquirir la enfermedad, que esa enfermedad existía allí ya hace mucho tiempo y consecuentemente esta información debe ser incluida en la distribución de la enfermedad. Los países del norte de África se caracterizan en muchos aspectos por su conservacionismo en tradiciones y características del medio, por lo que estas informaciones antiguas resultan de valiosísimo valor en el momento de tratar de evaluar y comprender la evolución de la transmisión y de la epidemiología de la enfermedad en el país en cuestión.

Todo este proceso resultó también ser de gran interés en el caso de países en los que, por diferentes motivos, la Fascioliasis ha sido objeto de absolutamente ningún estudio o de muy pocas excepciones durante muchos, muchos años, como sucede con algunos países del Maghreb. Cabe aquí considerar que no es lo mismo un área en que la enfermedad muestra una nueva emergencia que un área en la cual ya fueron diagnosticados casos humanos tiempo atrás o en la que la literatura demuestra que la detección de casos ha sido una más o menos pronunciada constante y en la cual consiguientemente podría pensarse en una mayor adaptación del parásito al

hospedador humano. Todo ello tiene evidentemente sus repercusiones en clínica y patología, por cuanto cabe esperar que un parásito más adaptado al hombre pueda mostrar menos patogenicidad que un parásito no adaptado. En consecuencia, esta información resulta trascendental para la comprensión de las secuelas de la enfermedad en los pacientes.

Muchos artículos sobre infección en humanos fueron publicados en revistas de índole veterinaria durante décadas, debido a que esta enfermedad era tan menospreciada en el campo médico que conseguir la aceptación de publicación en una revista médica resultaba muy difícil. Este fue el motivo de la necesidad de ampliar la búsqueda de artículos también a revistas de índole veterinaria.

Otra problema lo supuso el hallazgo de publicaciones en revistas muy secundarias o locales. Dichos artículos resultan muy difíciles de acceso. Así, en Egipto, varios artículos sobre Fascioliasis fueron publicados en revistas de universidades, revistas que en muchos casos no tenían siquiera difusión extramuros. Varios de estos artículos han resultado imposibles de encontrar hasta la fecha.

Otro problema lo plantea el hecho de que casos humanos de infección por *Fasciola* fueron a veces incluidos (antiguamente a veces con frecuencia) en escritos destinados al estudio de parásitos intestinales, gastrointestinales o del tracto digestivo en general. En estos casos, ningún término que aluda a la Fascioliasis aparece ni en el título ni a veces siquiera en el Abstract o en las palabras clave (caso de haberlas), pero en cambio sí en el texto de la publicación.

Como la importancia de las áreas de endemia humana de Fascioliasis no ha sido demostrada más que recientemente, trabajos de tipo encuestas de población resultan muy raros en la bibliografía anterior al año 1990. Así, la mayoría de casos previos a dicha fecha suelen referirse únicamente a pacientes diagnosticados en hospitales. En estos casos, incluso si se trata de series de casos reportados, no hay manera alguna de deducir cual era la prevalencia de la enfermedad en el área de procedencia de los pacientes en cuestión.

El problema de tratarse de una enfermedad olvidada, desatendida o menospreciada y sobre todo de declaración no obligatoria explica también el porqué muchos casos humanos detectados por los médicos en consultas privadas, por los hospitales o centros de salud, no son a veces publicados ni siquiera notificados a las autoridades sanitarias de la zona, provincia o país, ni reportados en ninguna parte. Una consecuencia de ello es el hecho de que en algunos lugares la Fascioliasis sea causa real de un serio problema de salud en un área y las autoridades responsables en salud del país lo desconozcan.

En varios países del mundo, la Fascioliasis humana y animal ha demostrado ser una herramienta muy útil para la realización de tesis de Maestría, tesis de Licenciatura y de PhD, etc., en universidades y que posteriormente en muchas ocasiones luego nunca son publicadas. Esta situación la hemos detectado también en Africa, con frecuencia en Egipto, pero también en países del Maghreb en el siglo pasado. Otras veces las consecuencias son aún peores, porque los datos de estas tesis son luego utilizados por otros autores en sus artículos sin siquiera hacer una evaluación previa del valor y certeza de los estudios llevados a cabo por estudiantes sin experiencia personal. Sea como sea, a pesar de que todo este tipo de información debe ser considerada con mucha preocupación, no es bien cierto tampoco que a veces alguna información de tipo cualitativo pueda ser de interés. Un ejemplo ilustrativo de cómo realizar un análisis de este tipo de literatura sobre Fascioliasis y sus diferentes aspectos lo encontramos en la revisión efectuada dentro del artículo de MAS-COMA et al. (1995).

En los países en vías de desarrollo, a veces se almacena información muy valiosa en ministerios, agencias nacionales e internacionales y ONGs, pero desgraciadamente resulta obvio que la obtención de dicha información es muy difícil de conseguir. La revisión antedicha de MAS-COMA et al. (1995) sobre Bolivia resulta un excelente ejemplo de esta problemática. Además, desgraciadamente muchas veces las informaciones de estos reportes pueden ser erróneamente interpretados (esto es, pensar que incluyen información con resultados exactos) y así es como uno luego encuentra conclusiones erróneas en artículos publicados incluso en revistas internacionales de impacto. Muchos autores utilizan las mismas muestras humanas para efectuar diferentes publicaciones. El problema se origina porque la información suministrada sobre esas muestras no es lo suficientemente detallada como para poder concluir si se trataba o no de las mismas muestras y pacientes. Consecuentemente, un error frecuente es la duplicación de muestras y pacientes en análisis de revisiones posteriores por otros autores. En el caso de la Fascioliasis, esta problemática es bien conocida en por ejemplo áreas donde los habitantes autóctonos no se dejan extraer sangre por cuestiones étnicas y/o religiosas. A pesar de ello, autores anglosajones en sus revisiones, desconociendo todo esta cuestión, no dudan en citar en sus revisiones conclusiones a partir del análisis de miles (sic!) de muestras sanguíneas en personas del lugar. Evidentemente, todos estos resultados son falsos, como consecuencia de considerar las mismas pocas muestras conseguidas una sola vez y cuyos resultados fueron utilizados por diferentes autores en diferentes trabajos. La acumulación de muestras y pacientes repetidos acaba dando cifras altas de muestras y pacientes en lugares en que es imposible. Dificultades de interpretación lingüística añaden



problemas a toda esta problemática más aún si cabe. Existen realmente algunas publicaciones muy recientes de revisiones sobre Fascioliasis humana efectuadas por autores inexpertos, y a veces incluso expertos, que resultan inaceptables a pesar de haber sido publicadas en revistas anglosajonas de altísimo impacto. Desgraciadamente, además, este tipo de revisiones poco rigurosas con el tiempo conllevan un incremento de confusión y malinterpretaciones por autores no expertos en la enfermedad.

Otro tipo de problemas encontrados en una revisión de este tipo consiste en la necesidad de cubrir costes económicos, a veces considerables, para la obtención de separatas o fotocopias en diferentes fuentes de las antes enumeradas, tanto artículos recientes en páginas web de revistas como por fotocopias o PDFs de artículos antiguos de librerías o bibliotecas. Aunque se comprende que deban remunerarse dichos servicios, en algunos casos demuestran ser un poco excesivos en cuantía.

Y finalmente cabe mencionar el problema planteado por idiomas o dialectos nacionales derivados del árabe y su escritura bien diferente de nuestra lengua occidental. Estos artículos en dichas lenguas, frecuentes tiempo atrás, no queda otro remedio que traducirlos. Y ello representa mucho tiempo y un gran coste económico.

#### **3.4.4.- EVALUACION DE LA CALIDAD DE LA INFORMACION**

En los casos de enfermedades olvidadas, desatendidas o menospreciadas durante décadas como es el caso de la Fascioliasis, la realización de una evaluación de la calidad de los datos se convierte en crucial. En el caso de la revisión retrospectiva efectuada en la presente Tesis Doctoral, la verificación de la calidad de las informaciones en las diferentes publicaciones no ha resultado fácil en absoluto.

Sobre todo en el caso de artículos publicados en revistas de los países africanos de origen que no cuentan con evaluadores expertos externos y efectuados por autores autóctonos, hemos observado con mucha frecuencia la inexactitud de los escritos. Una manera rápida y efectiva para evaluar este aspecto resultó ser la verificación de la exactitud de las referencias bibliográficas por comparación de las citas en los artículos con las separatas por nosotros obtenidas. En muchos casos, las conclusiones resultaron sorprendentes por no decir decepcionantes.

A veces los errores llegan incluso al contenido científico del artículo, con referencias a conocimientos concretos según determinadas publicaciones citadas, que cuando se procede a verificar se observa que las publicaciones citadas en realidad ni siquiera aluden al tema en cuestión. Un buen ejemplo es el artículo de HASEEB et al. (2002),

que consiste en una revisión muy superficial de la Fascioliasis en Egipto. De difícil obtención para científicos que no hayan estado previamente en ese país para conseguirla, este artículo fue utilizado correctamente por primera vez como referencia en el artículo de ESTEBAN et al. (2003). Una suponemos que equivocación o lapsus efectuado en una subsiguiente revisión sobre la Fascioliasis humana por autores peruanos publicada en Estados Unidos utilizó a HASEEB et al. (2002) como única referencia base sobre el estado de la Fascioliasis humana en el mundo. Y es así como subsiguientemente muchas revisiones aparecidas sobre el mismo tema en las mejores revistas de alto impacto, enciclopedias y libros de grandes editoriales siguen pasándose dicha cita de HASEEB et al. (2002) como aquella de cita obligada al referirse al estado de la Fascioliasis en el mundo, cuando dicho artículo de HASEEB et al. (2002) en absoluto versa sobre esta cuestión. Este caso es un buen ejemplo de la problemática a la que da origen la vorágine actual de artículos rápidos y revisiones que se publican en revistas de impacto por doquier, en las cuales los autores ni siquiera leen las referencias que ellos mismos citan y en las cuales ni a los evaluadores (referees) ni tampoco a los editores les da tiempo de detectar dichos errores en muchos casos.



## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**



## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- GENOTIPAJE DE LYMNEIDOS DE AFRICA

Los resultados de los estudios de secuenciación se exponen a continuación según los distintos diez países africanos origen de los materiales malacológicos: Marruecos, Argelia, Egipto, Senegal, Burkina Faso, Nigeria, Angola, Tanzania, Africa del Sur, Madagascar y Cabo Verde.

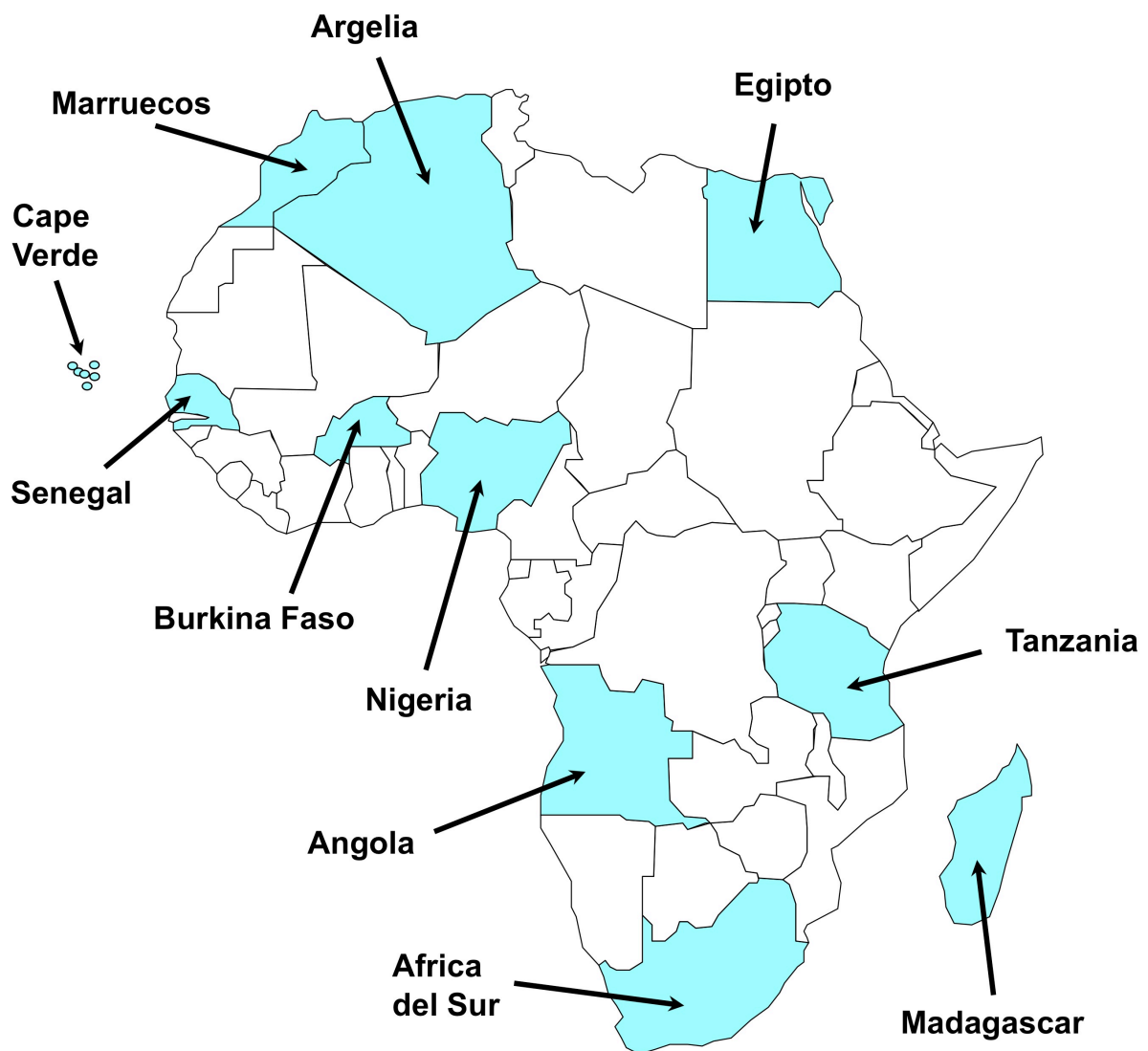


Figura 12.- Distribución geográfica de los países de Africa de los cuales se han estudiado especies de Lymnaeidae mediante secuenciación de ITS-2 e ITS-1.

#### 4.1.1.- LYMNAEIDOS DE MARRUECOS

##### 4.1.1.1.- GALBA TRUNCATULA

Los especímenes de Marruecos de la localidad Site Essaouia, clasificados como *G. truncatula* o *Lymnaea* sp., demostraron pertenecer en realidad a *G. truncatula*.

**A) ITS-2:** Todos los ejemplares fueron idénticos entre sí presentando un único haplotipo para el ITS-2, de 401 pb y 58.85% de GC. En el alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *G. truncatula*, haplotipos H1 (AJ296271), H2 (AJ243017) y H3 (AJ272051), se observó que todas las muestras de esta localidad de Marruecos eran idénticas al hapotipo G.tru.-H1 ya descrito anteriormente en Marruecos y diferente de los otros dos haplotipos, presentes en Europa (H2) y en Bolivia, Argentina y Chile (H3).

**B) ITS-1:** Todos los caracoles analizados de esta localidad mostraron una secuencia idéntica, de 504 pb y 57,73% de GC. Al compararla con los haplotipos de esta especie disponibles en el Genbank, *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), HC (AJ272052), HD (JF514090) y HE (HE610430), mostraron ser idénticos al haplotipo HA presente en Europa, el cual difiere en una única mutación del haplotipo HB, previamente descrito en Marruecos.

##### 4.1.1.2.- RADIX BALTHICA

Los especímenes de Marruecos, de la localidad Sidi Rabii (ain) / Tiout (oud), Essaouira (fuente Sidi Rabii-río Tiout) preliminarmente clasificados como *Lymnaea peregra*, fueron analizados molecularmente mediante el ITS-1 y el ITS-2 y demostraron ser *Radix balthica*.

**A) ITS-2:** Las muestras analizadas presentaron un solo haplotipo de 380 pb y 61,3% en GC. El alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *R. balthica* de Francia (AJ319633-AJ319635 y HQ003234), Islandia (HQ003227, HQ003228, HQ003229, HQ003230, HQ003231, HQ003233, HQ003235) y Bulgaria (HE577649, HE577650), fue de 380 pb de longitud, incluyendo 372 posiciones conservadas y 8 variables de las cuales, 5 fueron parsimónicamente informativas (p-info) y 3 fueron

sitios únicos polimórficos (singleton sites). Varias de estas secuencias del GenBank incluían el ITS-2 incompleto, aunque se procedió a incluirlas en el alineamiento, observándose que muchas de ellas pertenecían a un mismo haplotipo al no haber ninguna diferencia nucleotídica entre sus secuencias e incluso presentaban posiciones indeterminadas. Como consecuencia de ello, pudimos observar que la secuencia de *R. balthica* de Marruecos no se correspondía con ninguno de los haplotipos, genotipos o aislados descritos previamente, por lo que le adjudicamos el código de haplotipo 4, en correlación con los 3 únicos haplotipos completos del ITS-2 descritos previamente para esta especie (GT1, GT2, GT3). El haplotipo de Marruecos solo difiere en dos mutaciones del haplotipo de GT3 de Francia.

**B) ITS-1:** Las muestras de Sidi Rabii en Essaouira presentaron dos haplotipos para el ITS-1 de 593 y 594 pb de longitud y de 54,47% y 54,38% de contenido en GC, respectivamente. Estas secuencias difieren entre sí en tan solo una inserción/delección (indel), presente en una región de poli-A. En la comparación de estos dos haplotipos con la secuencia de *R. balthica* de Francia (JF922879)s de 593 pb de longitud y 54,81 % de GC, tres indels aparecen en las posiciones 50, 158 y 493 y 4 mutaciones en las posiciones 154-157 del alineamiento obtenido. En base a estas diferencias, se describen dos nuevos haplotipos para *R. balthica* de Marruecos: R.bal-ITS1-B y R.bal-ITS1-C, en correlación con el haplotipo A depositado en el GenBank.

#### **4.1.2.- LYMNAEIDOS DE ARGELIA**

##### **4.1.2.1.- LYMNAEA (STAGNICOLA) FUSCUS**

Los especímenes de Argelia, de la localidad Canal Messidsa, El Kala (El Tarf), fueron analizados molecularmente mediante el ITS-1 y el ITS-2 y demostraron ser *Lymnaea (Stagnicola) fuscus*.

**A) ITS-2:** Las muestras analizadas presentaron dos haplotipos de 468 pb y 58.97% y 58.76% en GC, respectivamente. El alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *L. (S.) fuscus* de Francia, Alemania, Austria y España (AJ319621-AJ319624, y Bulgaria (HE613327 y HE577633-HE577637), fue de 487 pb de longitud, incluyendo 460 posiciones conservadas y 13 variables de las cuales, 6 fueron parsimónicamente informativas (p-info) y 7 fueron sitios únicos polimórficos (singleton



sites). Varias de estas secuencias del GenBank incluían el ITS-2 incompleto, aunque se procedió a incluirlas en el alineamiento, observándose, que faltaban los extremos 3' y 5' del ITS-2, así como también presentaban algunas posiciones indeterminadas (N). Como consecuencia de ello, pudimos observar que las secuencias de *L. (S.) fuscus* de Argelia no se correspondían con ninguno de los haplotipos, genotipos o aislados descritos previamente, por lo que les adjudicamos los códigos de haplotipos 5 y 6, en correlación con los 4 únicos haplotipos completos del ITS-2 descritos previamente para esta especie (GT1, GT2, GT3 y GT4). Los haplotipos de Argelia, solo difieren entre sí en una mutación en la posición 268 y se muestran muy próximos al haplotipo GT3 de Austria, del que solo difieren en 1-2 mutaciones en los respectivos alineamientos par a par de sus secuencias.

**B) ITS-1:** Las muestras de Canal Messidsa en El Kala (El Tarf) presentaron dos haplotipos para el ITS-1 de 535 pb de longitud y de 58,88% y 59,07% de contenido en GC, respectivamente. Estas secuencias difieren entre sí en tan solo dos mutaciones en las posiciones 185 y 478 del alineamiento. En la comparación de estos dos haplotipos con las secuencias de *L. (S.) fuscus* de Alemania (haplotipos GT2A y GT4A: AJ626855, AJ626856) y de España (GT4A: AJ626857), el alineamiento resultante fue de 546 pb de longitud, incluyendo 528 posiciones conservadas y 7 variables de las cuales, 5 fueron parsimónicamente informativas (p-info) y 2 fueron sitios únicos polimórficos (singleton sites). En base a estas diferencias, se describen dos nuevos haplotipos para *L. (S.) fuscus* de Argelia: S.fus-ITS1-C y S.fus-ITS1-D, en correlación con los haplotipos A y B ya depositados en el GenBank para esta especie.

#### **4.1.2.2.- RADIX AURICULARIA**

Los especímenes de Argelia, de las localidades de Lac Tonga (1), El Kala (El Tarf) y Dissia, fueron analizados molecularmente mediante el ITS-1 y el ITS-2 y demostraron ser *Radix auricularia*.

**A) ITS-2:** Las muestras analizadas presentaron un haplotipo de 401 pb y 56,11% en GC. El alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *R. auricularia* de Francia y República Checa (haplotipos GT1 a GT5: AJ319628-AJ319632) fue de 408 pb de longitud, observándose gran homología con el haplotipo GT5 de Francia, del que solo se diferencia en una mutación (A/T) en la posición 219 y en un indel en la

posición 314 de su respectivo alineamiento. Incluyendo otras secuencias del ITS-2 de diferentes aislados geográficos de *R. auricularia* de la República Checa (GU574295, GU574297, GU574299, GU574301, GU574303, GU574305, GU574307, GU574309, GU574311, GU574313, GU574315, GU574317, GU574319, GU574321, GU574323), se obtuvo un alineamiento de 408 pb de longitud, incluyendo 398 posiciones conservadas y 8 variables de las cuales, 2 fueron parsimónicamente informativas (p-info) y 6 fueron sitios únicos polimórficos (singleton sites). En todas las secuencias la presencia de microsatélites del tipo (GT)<sub>n</sub> es frecuente, permitiendo distinguir entre algunas de las poblaciones analizadas. Como consecuencia de ello, pudimos observar que las secuencias de *R. auricularia* de Argelia no se correspondían con ninguno de los haplotipos o aislados descritos previamente, por lo que le adjudicamos el código de haplotipo 6, en correlación con los 5 haplotipos completos del ITS-2 descritos previamente para esta especie.

**B) ITS-1:** Las muestras analizadas de ambas poblaciones presentaron dos haplotipos para el ITS-1 de 585 y 584 pb de longitud y de 53,68% y 53,76% de contenido en GC, respectivamente. Estas secuencias difieren entre sí en tan solo una mutación en la posición 498 del alineamiento y en el diferente número de repeticiones de A y T en una región de poli-A y poli-T presente en el extremo final del ITS-1. En la comparación de estos dos haplotipos con la única secuencia del ITS-1 completo de *R. auricularia* de la República Checa (JF922878), el alineamiento resultante fue de 587 pb de longitud, y solo se observaron diferencias consistentes en 10 indels, presentes en los extremos 5' y 3' del ITS-1 de esta especie, además de la ya mencionada mutación en la posición 498. En base a estas diferencias, se describen dos nuevos haplotipos para *R. auricularia* de Argelia, S.aur-ITS1-B y R.aur-ITS1-C, en correlación con el único haplotipo A ya depositado en el GenBank para esta especie.

#### **4.1.3.- LYMNAEIDOS DE EGIPTO**

##### **4.1.3.1.- GALBA TRUNCATULA**

Los Lymnaeidos analizados proceden de las siguientes poblaciones: Bolin El Ali, Kafr El Dawar (LTBUL, E50, E51, E120); El Kazza (pueblo), Kafr El Dawar (E20, E21); Bulin, Kafr El Dawar (E60, E61); Zuhra (colegio), Kafr El Dawar (E111); Village 11 (ecotopo 2) / Abis 8 / Al Iskandariya (ETV11A8); Al Misayri, Raqm Wahid / Haris/ Al

Iskandariyah (Al Buhayra) (ETMH); Ola Gharbia/Eaquad, Ambria / Al Iskandariyah (Al Gharbiyah) (ETOE, ETOEb); El Kazza (ecotopo 2)/Hosh 'Isa/Al Buhayrah (ETKH).

**A) ITS-2:** Todos los ejemplares fueron idénticos entre sí presentando un único haplotipo para el ITS-2, de 401 pb y 59,10% de GC. En el alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *G. truncatula*, haplotipos H1 (AJ296271), H2 (AJ243017) y H3 (AJ272051), se observó que todas las muestras de las diferentes localidades de Egipto analizadas eran iguales entre sí, e idénticas a su vez al haplotipo G.tru.-H2 (AJ243017) ya descrito anteriormente en Europa y diferente de los otros dos haplotipos, presentes en Europa y Marruecos (H1) y en Bolivia, Argentina y Chile (H3). Las diferencias observadas fueron dos mutaciones en las posiciones 55 y 149 del alineamiento, siendo T / G / G y T / C / T para los haplotipos H3 / H2/ H1, respectivamente.

**B) ITS-1:** Todos los caracoles analizados presentaron una secuencia idéntica, de 504 pb y 57,74% de GC. Al compararla con los haplotipos de esta especie disponibles en el Genbank, *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), HC (AJ272052), HD (JF514090) y HE (HE610430), mostró ser idéntica al haplotipo HD presente en América del Sur (Venezuela), presentando la típica mutación (C en lugar de T) en la posición 449 del alineamiento, que distingue a este haplotipo de todos los demás.

#### **4.1.3.2.- LYMNAEA SCHIRAZENSIS**

El estudio molecular mediante secuenciación de los espaciadores ITS-2 e ITS-2 demostró que los Lymnaeidos de las 6 poblaciones de Abis 8 de Alejandría, Zhura de Kafr El Dawar, El Kazza, Tiba Delengate, Boulín y El Aly, en la amplia región del Delta del Nilo, pertenecían a la especie *Lymnaea schirazensis*, una especie morfológica, fenotípica y taxonómicamente confundida con *G. truncatula* desde hace dos siglos hasta que recientemente su validez sistemática ha sido revalidada.

**A) ITS-2:** Las secuencias de este marcador resultaron ser idénticas en todas las poblaciones encontradas, con una longitud total de 436 nucleótidos y un contenido en GC de 53,9%. El alineamiento correspondiente con las secuencias depositadas en el GenBank mostró que se trataba en todos los casos de la misma secuencia JF272601,

que se corresponde con el haplotipo L.schir-H1, también detectado con anterioridad ya en Irán, España, República Dominicana, Venezuela y Perú.

**B) ITS-1:** Este espaciador mostró una longitud de 531 pares de bases y un contenido en GC algo sesgado de 56,1%. Su comparación mediante alineamiento por Clustal con las secuencias del ITS-1 depositadas en el GenBank hubo de demostrarnos que se trataba del haplotipo L.schir-HA que se corresponde al número de acceso JF272603 y que también se ha hallado ya en otros países e otros continentes como Irán, España, República Dominicana y Venezuela.

#### **4.1.3.3.- RADIX CAILLAUDI**

Los moluscos de esta especie que sometimos a secuenciación procedían de la localidad de El Kazza, en el provincia de Behera, en el Delta del Nilo. Los resultados de esta secuenciación demostraron que este caracol no es sino una forma, variedad, raza geográfica o subespecie de la especie *R. natalensis* distribuida ampliamente por gran parte del continente africano y, consiguientemente, se procedió a adscribirle códigos de haplotipos referentes a esta última.

**A) ITS-2:** La secuencia de este segundo espaciador en los caracoles procedentes de El Kazza demostraron tener una secuencia de 351 nucleótidos y un contenido en GC del 61,25%. En la comparación mediante CLUSTAL-W pudimos observar la originalidad de esta secuencia, a la que consiguientemente adscribimos el código de R.nat-H3 en base a sus mutaciones puntuales esencialmente en la primera parte de su secuencia.

**B) ITS-1:** La secuencia del ITS-1 demostró ser completamente única cuando se comparó con todas las demás secuencias de este marcador en la especie *R. natalensis* de todo Africa, por lo cual se procedió a adjudicarle el haplotipo propio R.nat-HE. La secuencia en cuestión demostró tener una longitud de 552 pares de bases y un contenido en GC del 55,25%. La longitud antedicha de 552 nucleótidos debe ser resaltada, habida cuenta que demuestra ser la más larga de todas las detectadas en la especie *R. natalensis*.

#### **4.1.3.4.- PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA**

Los especímenes de Egipto (Tiba, Delengate y Zhura-El Massuory, Kafr el Dawar) preliminarmente clasificados como *P. columella* o *Lymnaea* sp., demostraron pertenecer en realidad al haplotipo *P. columella* 1A.

**A) ITS-2:** En todas las muestras analizadas se detectó un solo haplotipo de 470 pb y 57,0% en GC. En su comparación con otras secuencias disponibles en el GenBank, *P. columella* H1 de Puerto Rico y Venezuela (FN598155) y H2 de Venezuela (FN598156) y con *P. columella* de Cuba (AY186751), se obtuvo una homología del 100% con P.col-H1. Sin embargo, en la comparación con *P. columella* de Cuba aparecen 2 mutaciones y 9 indels, lo que sugiere errores de secuenciación en la secuencia de Cuba disponible en las bases de datos.

**B) ITS-1:** Todos los especímenes analizados presentaron la misma secuencia, de 536 pb y con un sesgo ligero del 58,2% en AT. Esta secuencia es la misma que la del haplotipo P.col-HA de Puerto Rico y Venezuela (FN598160). En la comparación con la secuencia de *P. columella* de Cuba (AY186751), de 527 pb de longitud y 58.44 % de GC, tres indels aparecen en las posiciones 262, 270 y 276. Cabe resaltar la presencia de A en la posición 510, en la cual una A o una G diferencian susceptibilidad y resistencia en la población de este Lymnaeido en Cuba, respectivamente.

#### **4.1.4.- LYMNAEIDOS DE SENEGAL**

##### **4.1.4.1.- RADIX NATALENSIS**

En este país únicamente se detectó la presencia de una especie de Lymnaeido. Su caracterización molecular la hemos efectuado en base a la secuenciación de especímenes procedentes de Lam Sar, a 25 km de distancia de Saint Louis, y de la localidad de Mbodjen, a 35 km al NE de Saint Louis.

**A) ITS-2:** La secuencia del segundo espaciador interno del ADN ribosomal nuclear demostró tener una longitud de 360 nucleótidos y un contenido en GC del 60,55%. Su composición nucleotídica demostró ser idéntica a la del mismo espaciador encontrada

en otros países como Tanzania y Madagascar y en consecuencia se le adscribió el código de R.nat-H7.

**B) ITS-1:** En Senegal pudimos encontrar dos secuencias diferentes de este espaciador ribosomal interno. Así, en la localidad de Lam Sar, dicha secuencia demostró ser de una longitud de 544 pares de bases y un contenido en GC del 55,51%, adscribiéndosele el halotipo R.nat-HD que también se ha hallado en Nigeria. Por otro lado, en la localidad de Mbodjen, a 35 km al NE de Saint Louis, se detectó la presencia de otra secuencia que tenía una longitud de 549 nucleótidos y un contenido en GC del 56,10% y a la que procedimos a designar con el haplotipo R.nat-HN al resultar ser única en el correspondiente alineamiento con todas las demás secuencias del ITS-1 de todo Africa.

#### **4.1.5.- LYMNAEIDOS DE BURKINA FASO**

##### **4.1.5.1.- *RADIX NATALENSIS***

Ejemplares pertenecientes a esta especie de Lymnaeido fueron recolectados en las localidades de Bobo Barma y de Banfora, ambas al Oeste del país, en la zona de Bobo Dioulasso.

**A) ITS-2:** El ITS-2 de estos especímenes demostró tener idéntica secuencia en ambas localidades, con una longitud de 350 pares de bases y un contenido en GC del 61,42%. Esta secuencia demostró ser igual que la del mismo marcador encontrada en otros países como Nigeria y Tanzania, adscribiéndoseles el haplotipo R.nat-H2.

**B) ITS-1:** Los especímenes de ambas procedencias, las localidades de Bobo Barma y de Banfora, mostraron idéntica secuencia nucleotídica a nivel de este segundo espaciador ribosomal interno, con una longitud de 544 pares de bases y un contenido en GC del 55,33%. A esta secuencia se le adjudicó el haplotipo R.nat-HC.

#### **4.1.6.- LYMNAEIDOS DE NIGERIA**

##### **4.1.6.1.- *RADIX NATALENSIS***

La caracterización de esta especie de hospedador intermediario de la Fascioliasis en el continente africano en lo que se refiere al país de Nigeria se realizó en base a caracoles recolectados en Dam Zaria y Kasmali Dam.

**A) ITS-2:** El ITS-2 de los especímenes procedentes de Dam Zaria en este país demostró tener idéntica secuencia en ambas localidades, con una longitud de 350 pares de bases y un contenido en GC del 61,42%. Esta secuencia demostró ser igual que la del mismo marcador encontrada en otros países como Burkina Faso y Tanzania, adscribiéndoseles el haplotipo R.nat-H2.

**B) ITS-1:** La secuencia de este segundo espaciador pudo obtenerse a partir de los ejemplares de la localidad de Kasmali Dam. La secuencia en cuestión demostró ser de una longitud de 544 nucleótidos y con un contenido en GC el 55,51%. A esta secuencia se le ha adjudicado el haplotipo R.nat-HD.

#### **4.1.7.- LYMNAEIDOS DE ANGOLA**

##### **4.1.7.1.- RADIX NATALENSIS**

Se tuvo la suerte de recibir ejemplares de esta especie africana de Lymnaeido recolectados a partir de una población en este país occidental del Africa que es Angola y que fueron correctamente fijados en alcohol. Desgraciadamente, otros ejemplares muestras de otras poblaciones diferentes no pudieron ser secuenciados debido a haber sido fijados erróneamente con formalina *in situ*, por lo que la extracción de ADN resultó imposible a pesar de los numerosos intentos realizados.

**A) ITS-2:** La secuencia de este espaciador ITS-2 resultó ser de una longitud de 350 pares de bases y una composición nucleotídica en GC del 61,71%. Oportunamente comparada con las secuencias del mismo marcador obtenidas en los diferentes países africanos objetos de la presente Memoria, se pudo constatar que la secuencia de este país resultaba singular y consecuentemente se le asignó el haplotipo R.nat-H5.

**B) ITS-1:** Los especímenes de esta especie de Lymnaeido procedentes del país de Angola mostraron una secuencia del ITS-1 de una longitud de 543 pares de bases y un

contenido en GC del 55,99%, adscribiéndosele a la misma el haplotipo R.nat-HJ tras comprobar su singularidad por alineamiento oportuno comparándola con las demás secuencias de este mismo marcador en todo el Africa.

#### **4.1.8.- LYMNAEIDOS DE TANZANIA**

##### **4.1.8.1.- GALBA TRUNCATULA**

Las muestras analizadas de Tanzania provienen de la localidad geográfica de Kitulo Plateau. El análisis de las secuencias de los marcadores ITS-1 e ITS-2 y las respectivas comparaciones efectuadas en el GenBank y en el BLAST, indican que se trata de *G. truncatula*, si bien las muestras de Tanzania presentan diferencias en longitud y en sitios polimórficos en ambos marcadores en comparación con otros haplotipos de esta especie depositados en las bases de datos.

**A) ITS-2:** Todos los ejemplares fueron idénticos entre sí presentando un único haplotipo para el ITS-2, de 418 pb y 58.85% de GC. En el alineamiento con otras secuencias disponibles en el GenBank de *G. truncatula*, haplotipos H1 (AJ296271), H2 (AJ243017) y H3 (AJ272051), se observó que todas las muestras de esta localidad de Tanzania eran completamente diferentes (especialmente en longitud, siendo más largo en pb) de los otros tres haplotipos, presentes en Europa y Marruecos (H1 y H2) y en Bolivia, Argentina y Chile (H3), cuya longitud es de tan solo 401 pb. A la secuencia de Tanzania se le adjudicó el código de *G. truncatula* haplotipo H4 en correlación con los descritos previamente. Cabe destacar las diferencias totales (mutaciones + inserciones/delecciones) entre todos los haplotipos de *G. truncatula*, incluyendo las muestras de Tanzania) que se observan en la comparación. El alineamiento de los cuatro haplotipos de esta especie resultó ser de 425 pb de longitud, incluyendo 409 posiciones conservadas y 16 variables, de las cuales, 15 fueron posiciones parsimónicamente informativas (p-info) y 1 fue único sitio polimórfico (singleton site).

**B) ITS-1:** De todos los caracoles analizados de esta localidad solo un ejemplar permitió el análisis del ITS-1, ya que los demás ejemplares resultaron estar parasitados y la secuencia del ITS-1 mostró homologías muy altas con varias especies de Trematodos de los géneros *Gastrodiscoides* y *Fasciola*, principalmente, según el BLAST. Al igual que en el ITS-2, la secuencia del ITS-1, aún siendo de *G. truncatula*, según el BLAST y



los correspondientes análisis comparados efectuados con todos los haplotipos disponibles de esta especie en el GenBank, resultó ser de mayor longitud (516 pb) y con un contenido en GC del 57,74%. Al compararla con los haplotipos de *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), HC (AJ272052), HD (JF514090) y HE (HE610430), la secuencia de Tanzania fue diferente, por lo que se le adjudicó el código de *G. truncatula* haplotipo F. El alineamiento total de estos seis haplotipos resultó ser de 555 pb de longitud, incluyendo 498 posiciones conservadas y 55 variables, de las cuales, 50 fueron posiciones parsimónicamente informativas (p-info) y 5 fueron sitios únicos polimórficos (singleton sites). Al efectuar el análisis comparado de la región del alineamiento del ITS-1 entre el haplotipo de Tanzania y los haplotipos de otros países, quedan patente las regiones conteniendo inserciones/delecciones, responsables de las diferencias en longitud.

#### **4.1.8.2.- RADIX NATALENSIS**

Los especímenes de esta especie estudiados a partir de muestras de esta especie procedían de las localidades de Iringa y Ukerene, en las tierras bajas.

**A) ITS-2:** Sorprendentemente, se detectaron 3 secuencias diferentes del ITS-2 en las localidades antedichas. Así, en Iringa se detectó una secuencia de 350 nucleótidos de longitud y un contenido en GC del 61,42%, idéntica a la encontrada en Burkina Faso y Nigeria, y a la que se adscribió el haplotipo R.nat-H2. También en Iringa se encontró otra secuencia diferente, de 334 nucleótidos de longitud y un contenido en GC del 60,48%, totalmente singular debido a variadas delecciones, y a la que se adscribió el haplotipo R.nat-H4. Finalmente, en Ukerene se detectó una secuencia de 360 pares de bases en longitud y una composición nucleotídica en GC del 60,55% que, comparada mediante CLUSTAL-W, resultó ser idéntica a la encontrada en otros países como Senegal y Madagascar, que se distingue por variadas inserciones y a la que le hemos adscrito el haplotipo R.nat-H7.

**B) ITS-1:** Tanzania ha sido el país en el cual la secuencia del ITS-2 de *R. natalensis* ha mostrado mayor variabilidad, habiéndose detectado hasta cuatro tipos diferentes de secuencias de este marcador. En la localidad de Iringa se detectó dos secuencias diferentes, una con una longitud de 545 pares de bases y un contenido en GC del 55,78% que se distinguió con el haplotipo R.nat-HF, y otra secuencia de una longitud

de 545 pares de bases pero con un contenido en GC del 55,60% y a la que catalogamos con el haplotipo R.nat-HI. En la otra localidad de Ukerene Island también detectamos dos secuencias distintas, adjudicando el haplotipo R.nat-HG a la secuencia de 535 nucleótidos de longitud y un contenido en GC del 56,45%, y el haplotipo R.nat-HH a la otra secuencia del mismo lugar pero con una longitud de 543 pares de bases y un contenido en GC del 56,10%.

#### **4.1.9.- LYMNAEIDOS DE SUDAFRICA**

##### **4.1.9.1.- GALBA TRUNCATULA**

Las muestras analizadas provienen de la localidad de Lesotho, Sudáfrica y tanto ITS-1 como ITS-2 confirman que se trata de la especie *G. truncatula*, tal y como había sido ya previamente identificada.

**A) ITS-2:** Dicha secuencia incluía un total de 401 nucleótidos con una composición en GC del 59,1%. Su comparación adicional con los haplotipos disponibles de este marcador en la especie en cuestión demostraron que se trataba del haplotipo G.tru-ITS2 H1 (AJ296271) ya depositado en el GenBank y también presente en Europa.

**B) ITS-1:** La secuencia obtenida resultó ser de 504 pb y 57,73% de GC. Al compararla con los haplotipos de esta especie disponibles en el Genbank, *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), HC (AJ272052), HD (JF514090) y HE (HE610430), demostró ser idéntica al haplotipo HA presente en Europa, el cual difiere en una única mutación del haplotipo HB, previamente descrito en Marruecos.

##### **4.1.9.2.- RADIX NATALENSIS**

Se ha tenido la oportunidad de analizar especímenes procedentes de la localidad tipo en Natal, que permiten por tanto adscribir los haplotipos base de ambos espaciadores ITSs para esta especie. Además, se ha procedido también a la secuenciación de ejemplares procedentes de Stellenbosch cerca de Ciudad de El Cabo, y de Lake Labane en la costa al norte del país.

**A) ITS-2:** Los especímenes de la localidad tipo mostraron un ITS-2 de una longitud de 350 pares de bases y un contenido en GC del 61,42%. Los ejemplares recolectados en Stellenbosch demostraron tener idéntica secuencia a la de la localidad tipo. A este haplotipo se le ha adjudicado pues el código R.nat-H1. En cambio, los ejemplares procedentes de Lake Labane mostraron una secuencia algo diferente, con una longitud de 361 nucleótidos y un contenido en GC de 60,38%. A esta secuencia, diferente a todas las demás encontradas en África, le adjudicamos el haplotipo R.nat-H8.

**B) ITS-1:** Tres secuencias diferentes de este marcador es el resultado que se obtuvo en los análisis efectuados con material de este país. Así, en la localidad tipo de la especie, Natal, la secuencia del ITS-1 demostró ser de 536 pares de bases y el contenido en GC resultó ser del 56,16%. A esta secuencia se le ha adscrito el código inicial por ser la localidad tipo que queda pues con el haplotipo R.nat-HA. Además, en la localidad de Stellenbosch se ha detectado la presencia de una secuencia del ITS-1 diferente, con una longitud de 542 nucleótidos y una composición en pares de bases del 56,09% en GC, a la cual le hemos adscrito el haplotipo R.nat-HB. Por último, en Lake Labane se encontró otra secuencia diferente del ITS-1 que presentaba 538 nucleótidos de longitud y un contenido en GC del 55,58% y a la que se adjudicó el haplotipo R.nat-HO tras verificar su singularidad con todas las demás secuencias de este marcador en todo el continente africano mediante adecuado alineamiento previo por CLUSTAL-W.

#### **4.1.9.3.- PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA**

Los especímenes de Sudáfrica (Sydenham Pond y Botanical Garden) preliminarmente clasificados como *P. columella* demostraron pertenecer en realidad al haplotipo *P. columella* 1A.

**A) ITS-2:** Todas las muestras analizadas de las dos poblaciones presentaron idéntico haplotipo de ITS-2 de 470 pb y 57,0% en GC. En su comparación con otras secuencias disponibles en el GenBank, *P. columella* H1 de Puerto Rico y Venezuela (FN598155) y H2 de Venezuela (FN598156) y con *P. columella* de Cuba (AY186751), se obtuvo una homología del 100% con P.col-H1. Sin embargo, en la comparación con *P. columella* de Cuba, aparecen 2 mutaciones y 9 indels, lo que sugiere errores de secuenciación en la secuencia de Cuba disponible en las bases de datos.

**B) ITS-1:** Las muestras secuenciadas de ambas poblaciones presentaron la misma secuencia, de 536 pb y con un sesgo ligero del 58,2% en AT. Esta secuencia es la misma que la del haplotipo *P.col-HA* de Puerto Rico y Venezuela (FN598160). En la comparación con la secuencia de *P. columella* de Cuba (AY186751), de 527 pb de longitud y 58.44 % de GC, tres indels aparecen en las posiciones 262, 270 y 276. Cabe resaltar la presencia de A en la posición 510, en la cual una A o una G diferencian susceptibilidad y resistencia en la población de este Lymnaeido en Cuba, respectivamente.

#### **4.1.10.- LYMNAEIDOS DE MADAGASCAR**

##### **4.1.10.1.- RADIX NATALENSIS**

Todas las poblaciones de esta especie recolectadas en la gran isla de Madagascar, exceptuando la de la localidad anotada como "Ferme Caméléons" preliminarmente clasificados como *R. natalensis* pero cuya secuenciación demostró después que en realidad se trataba de *P. columella*, resultaron haber sido correctamente clasificados a nivel de género y especie.

**A) ITS-2:** Este marcador demostró tener una longitud de 360 nucleótidos y un contenido en GC del 60,55%, con una secuencia que al ser comparada por alineamiento mostró ser idéntica a la también hallada en Senegal y Tanzania, por lo que cabe adscribirle el haplotipo de R.nat-H7.

**B) ITS-1:** En Madagascar, esta especie de Lymnaeido mostró dos secuencias del ITS-1 diferentes. En las localidades de Ampandratokona, Kianjavato y Sanrojano se encontró una secuencia de 540 nucleótidos y un contenido en GC del 55,37% a la que le adjudicamos el haplotipo R.nat-HL, mientras que en Sanrojano se detectó la existencia adicional de una segunda secuencia de 539 pares de bases en longitud y un contenido en GC del 55,47% a la que se le asignó el haplotipo R.nat-HM.

##### **4.1.10.2.- PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA**

Los especímenes de Madagascar, concretamente de la localidad anotada como "Ferme Caméléons" preliminarmente clasificados como *R. natalensis*, demostraron pertenecer en realidad al haplotipo 1A de *P. columella*.

**A) ITS-2:** En todas los ejemplares estudiados de dicha localidad se detectó siempre la misma secuencia correspondiente a un solo haplotipo de 470 pb y 57,0% en GC. En su comparación con otras secuencias disponibles en el GenBank, *P. columella* H1 de Puerto Rico y Venezuela (FN598155) y H2 de Venezuela (FN598156) y con *P. columella* de Cuba (AY186751), se obtuvo una homología del 100% con P.col-H1. Sin embargo, en la comparación con *P. columella* de Cuba aparecen 2 mutaciones y 9 indels, lo que sugiere errores de secuenciación en la secuencia de Cuba disponible en las bases de datos.

**B) ITS-1:** Todos los especímenes estudiados presentaron la misma secuencia, de 536 pb y con un sesgo ligero del 58,2% en AT. Esta secuencia es la misma que la del haplotipo P.col-HA de Puerto Rico y Venezuela (FN598160). En la comparación con la secuencia de *P. columella* de Cuba (AY186751), de 527 pb de longitud y 58.44 % de GC, tres indels aparecen en las posiciones 262, 270 y 276. Es de destacar la presencia de A en la posición 510, en la cual una A o una G diferencian susceptibilidad y resistencia en la población de este Lymnaeido en Cuba, respectivamente.

#### **4.1.11.- LYMNAEIDOS DE CABO VERDE**

##### **4.1.11.1.- RADIX NATALENSIS**

En el Archipiélago de Cabo Verde se tuvo la suerte de obtener ejemplares de *R. natalensis* que habían sido recolectados en la mayor de las islas que lo componen, la Isla de Santiago, concretamente en la localidad de Ribeira de Barca.

**A) ITS-2:** El análisis del ADN ribosomal nuclear de esta población insular demostró que el ITS-2 era totalmente singular y diferente de todas las otras poblaciones de *R. natalensis* que hemos podido estudiar del continente africano. Su longitud resultó ser de 350 pares de bases y con una composición nucleotídica del 62,00% en GC. Consecuentemente, a esta secuencia le hemos adscrito un código propio con el haplotipo de R.nat-H6.

**B) ITS-1:** Los especímenes disponibles de Ribeira da Barca en la Isla de Santiago en el Archipiélago de Cabo Verde mostraron una secuencia del ITS-1 con unas características totalmente singulares, de una longitud de 544 pares de bases y un contenido en GC del 55,51% a la que procedimos a adjudicar el haplotipo R.nat-HK tras verificación de su singularidad por alineamiento mediante CLUSTAL-W.

## 4.2.- ANALISIS FILOGENETICO GENERAL DE LOS LYMNAEIDOS DE AFRICA

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las especies encontradas en Africa y oportunamente secuenciadas en esta Memoria se ha realizado por diferentes métodos filogenéticos y mediante comparación con las especies de Lymnaeidos ya previamente secuenciadas de la Región Paleártica.

El marcador seleccionado para dichos análisis ha sido el segundo espaciador transcrito interno del ITS-2 del ADN ribosomal nuclear o ITS-2, como marcador de excelencia en la diferenciación de especies en invertebrados en general y en Lymnaeidae en particular. Todos los árboles obtenidos muestra una topología similar, en la cual cabe distinguir cuatro grandes grupos taxonómicos:

- El primer gran grupo de especies es el que incluye todas las especies del género *Radix*. En esta gran rama cabe distinguir de manera inmediata la agrupación conjunta de las especies de gran tamaño *R. auricularia* con *R. natalensis*, esta última incluyendo la forma *R. natalensis caillaudi* de Egipto. Dentro de *R. natalensis*, resulta interesante destacar la presencia del haplotipo R.nat-H4 de Tanzania como basal al resto de secuencias, lo que unido a la mayor diversidad de secuencias detectada en este país sugiere la posibilidad de que dicha región africana fuese la zona origen de la especie *R. natalensis* hace varios millones de años. En lo que se refiere a *R. auricularia*, es de destacar la relación que muestra la secuencia de Argelia respecto de las secuencias de esta misma especie en Francia, recordando los vínculos históricos tradicionales y muy prolongados en el tiempo entre dichas dos naciones. Finalmente, es de resaltar la ubicación de *R. balthica* de Marruecos dentro del grupo de las especies de *Radix* menores y más concretamente próxima a las secuencias de la misma especie en Francia pero también de España.
- El segundo gran grupo reúne las especies de *Galba/Fossaria*, y concretamente dentro del mismo a *G. truncatula* y a *L. schirazensis*. La secuencia de Tanzania se muestra ubicada entre las de Egipto y Marruecos, estas dos últimas superponiéndose con las mismas secuencias en Europa y también Sudáfrica. Este nodo resulta pues fácilmente interpretable como consecuencia de introducciones en el continente africano. La mayor longitud de la rama de la secuencia de Tanzania evidencia su mayor divergencia respecto de los otros haplotipos de *G. truncatula*.

- En tercer lugar aparece un grupo monoespecífico, constituido únicamente por la especie *P. columella*, de características singulares bien conocidas, ya no únicamente morfoanatómicas sino también evolutivas, dado el origen norteamericano-centroamericano de esta especie de Lymnaeido.
- Finalmente surge un último cuarto grupo numeroso incluyendo todas las especies de Stagnicolinos, numerosos en la Región Paleártica, con diferentes especies, pero aparentemente restringidos a *L. (S.) fuscus* en el Maghreb, y más concretamente en Argelia, en lo que se refiere al continente africano. De nuevo aparece aquí la secuencia africana directamente relacionada con la secuencia de la misma especie en Francia, evocando su muy prolongado período histórico conjunto.

Es de destacar muy especialmente las relaciones que muestra dicha topología del árbol filogenético obtenido con la especificidad de las diferentes especies y grupos de Lymnaeidae respecto de la transmisión de una u otra especie de fasciólido, *F. hepatica* o *F. gigantica*. Así, todas las especies que únicamente transmiten a *F. gigantica* se reúnen bajo la misma rama filogenética del género *Radix*. En cambio, aquellas que son conocidas por únicamente ser capaces de transmitir a *F. hepatica* se localizan dentro de la rama del grupo Galba/Fossaria.

El grupo monoespecífico de *Pseudosuccinea*, con únicamente la especie *P. columella*, se ubica a parte, lo que se ajusta a su bien conocida capacidad de transmitir a ambas especies de fasciólidos parásitos, como caso excepcional dentro de la familia de los Lymnaeidae.

Y finalmente, el grupo de los Stagnicolinos, que engloba numerosas especies que en general no son transmisoras ni de *F. hepatica* ni de *F. gigantica*, pero que en circunstancias muy especiales y en ausencia de los hospedadores intermediarios preferentes, pueden actuar como hospedadores intermediarios vicariantes, aunque hasta la fecha ello sólo se ha demostrado con *F. hepatica* y nunca con *F. gigantica*, lo que no deja de resultar lógico tratándose de unos Lymnaeidos con preferencias por hábitats más bien fríos mientras que *F. gigantica* es bien conocida por sus requerimientos de relativamente altas temperaturas para el desarrollo de sus fases larvarias intramoluscales.



#### 4.3.- ANALISIS DE LA DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE LYMNAEIDOS EN AFRICA

El estudio molecular realizado mediante la selección de las secuencias del ITS-1 y del ITS-2 del ADN ribosomal nuclear como marcadores de especie en moluscos Lymnaeidae demuestra que en Africa existe una única especie autóctona de esta familia, concretamente *R. natalensis*. Esta especie se muestra distribuida por todo el Africa al sur del desierto del Sahara, por el Africa sudoccidental, el Africa meridional y el Africa oriental, mostrando una única expansión hacia el Norte hasta el mismo Mar Mediterráneo siguiendo el cauce del Río Nilo y hasta la misma desembocadura en el amplio Delta del Nilo. Nuestros resultados de secuenciación así lo argumentan, al demostrar su existencia en Egipto, Senegal, Burkina Faso, Nigeria, Tanzania, Angola y Sudafrica en lo que se refiere a tierras continentales, y su presencia adicional en Madagascar y Cabo Verde como tierras insulares africanas adyacentes.

Las características de las secuencias de ambos espaciadores demuestran de manera indudable que nos encontramos con una especie antigua, con amplia distribución en zonas cálidas y esencialmente de baja altitud, en las que se encuentra ya siguiendo procesos evolutivos de diferenciación y divergencia por fenómenos de aislamiento geográfico desde mucho tiempo atrás. Así es como se comprenden las diferencias nucleotídicas notables en el ITS-2 pero sobre todo en el ITS-1, con sobresalientes inserciones y deleciones según las diferentes regiones del Africa. Es precisamente dentro de estos procesos evolutivos de divergencia en los que cabe encuadrar su expansión hasta Egipto donde cabe encontrar la forma, variedad, raza geográfica o subespecie *R. natalensis caillaudi*. El status taxonómico definitivo de esta forma "caillaudi" no puede desgraciadamente aún ser dilucidado de manera definitiva, ante la ausencia de materiales de comparación con especímenes de la misma especie recolectados Nilo arriba, en zonas de países como Sudán o Etiopía.

Después de *R. natalensis*, la especie de Lymnaeido más extendida en Africa resulta ser *G. truncatula*, si bien más circunscrita a la región mediterránea del Maghreb y a las regiones orientales del continente africano donde, excepto en Egipto en donde se encuentra en las tierras bajas el Delta del Nilo, se muestra como un elemento faunístico típico de tierras altas y frías o templadas. Así, nuestros estudios de secuenciación demuestran su presencia en Marruecos, Egipto, Tanzania y Sudáfrica. Su presencia en el Maghreb está evidentemente relacionada con la proximidad al Oeste de Europa y a los intercambios históricos prolongados bien conocidos a través del Estrecho de Gibraltar. En cambio, su presencia en la franja oriental del Africa

responde a vías históricas de introducción diferentes, relacionadas más que probablemente con la antigua Mesopotamia y el Antiguo Egipto, en el Neolítico y Mesolítico. Ello sugiere una probable introducción anterior a la acaecida en el Maghreb y explicaría las peculiaridades detectadas en las secuencias tanto del ITS-2 como del ITS-1 en el país de Tanzania.

La presencia de un solo Stagnicolino como *Lymnaea (Stagnicola) fuscus* y de dos radicosos como *Radix balthica* y *Radix auricularia* en el Maghreb indican en el mismo sentido que las poblaciones de *G. truncatula* en esta región del norte de Africa. La existencia del Stagnicolino y de los dos Radicosos cabe adjudicarla indudablemente a introducciones desde la Europa occidental, bien a través del Estrecho de Gibraltar, bien por vía marítima por el hombre gracias a intercambios entre países del Maghreb y países europeos como España o Francia esencialmente, quizás también Italia. En resumidas cuentas, se trata indudablemente de elementos faunísticos introducidos y no autóctonos africanos.

Queda finalmente una sola especie por analizar, que es *Lymnaea schirazensis*. Esta especie, siempre confundida con *G. truncatula* con anterioridad, únicamente ha sido detectada en Egipto. Resulta prematuro aún aventurar conclusiones acerca de si esta especie se encuentra realmente restringida a Egipto o si en realidad pudiese estar presente también en otras regiones o países de Africa. En un principio, países del Maghreb como Marruecos, Argelia y Túnez presentan características latitudinales y climáticas que no tienen en absoluto ningún impedimento para la presencia de esta especie tan singular por sus marcadas características de extremo anfibio. Incluso en la franja occidental del Africa podría también haber sido introducida tiempo atrás y haberse mantenido sin ser detectada al ser confundida con *G. truncatula*. sea como sea, su presencia en Egipto cabe estimarla como una introducción muy antigua, probablemente en épocas del Neolítico y Mesolítico gracias a los intercambios que se daban entre el Antiguo Egipto y la Antigua Mesopotamia.

Como conclusión final cabe destacar que la fauna de Lymnaeidos del continente africano se muestra realmente pobre si se compara con la marcada riqueza que muestra esta familia de gasterópodos dulceacuícolas en otras partes del Viejo Mundo, como en Europa o en Asia (Hubendick, 1951). Cabe presuponer que las características climáticas del continente africano no lo hacen idóneo para la presencia de estos peculiares moluscos en muchas de sus regiones. Sin embargo, hay que aceptar otros motivos de tipo evolutivo para poder asimilar el cuadro tan pobre con una única especie autóctona, aceptando una expansión paleártica de los Lymnaeidos que por diferentes razones nunca tuvieron la ocasión de expansionarse por el continente

africano, fenómeno evolutivo en el cual la existencia del vasto desierto del Sahara debió jugar un papel sin duda fundamental.

#### **4.4.- ESTUDIO FENOTIPICO DE *RADIX CAILLAUDI* DE EGIPTO**

En Egipto, el país sobre el que se focaliza esencialmente la presente Tesis Doctoral, ya no únicamente por ser el país de Africa en el que la problemática de la Fascioliasis humana es mayor, sino también debido al papel crucial que dicho país jugó en la evolución de la Fascioliasis en el Viejo Mundo, tanto en el largo período evolutivo predomesticación (unos 20 millones de años como mínimo) como el ya evolutivamente más reciente periodo postdomesticación (últimos 12.000 años), se ha detectado y molecularmente verificado la presencia de cuatro especies de la familia Lymnaeidae: dos especies del grupo *Galba/Fossaria* que son *G. truncatula* y *L. schirazensis*, una especie de *Radix* que es *R. caillaudi* y otra del género *Pseudosuccinea*, *P. columella*.

De estas cuatro especies, *G. truncatula*, *L. schirazensis* y *P. columella* son tres especies introducidas en Egipto y todas ellas han sido ya objeto de amplísimos estudios en otros países. Únicamente *R. caillaudi* cabe considerarla una especie autóctona africana y por su proximidad filogenética con *R. natalensis* cabe considerarla el Lymnaeido transmisor preferente de *F. gigantica* y consecuentemente el transmisor original de la enfermedad en el país desde sus inicios. Es por todo ello que en la presente Tesis Doctoral hemos decidido dedicar un estudio fenotípico exhaustivo solamente a esta especie, estudio que posteriormente veremos aporta un sinfín de datos informativos de gran valor multidisciplinar.

##### **4.4.1.- VARIABILIDAD MORFOMETRICA DE LA CONCHA**

###### **4.4.1.1.- EN POBLACIONES NATURALES**

La morfología de las conchas de las poblaciones naturales de Faraoun-Prince (Alejandría) y de El-Kazza (Behera) era dextral, ligeramente marrón en color, algo transparentes, aunque cabe destacar que la población de El-Kazza (Behera) presentó una coloración marronácea bastante más oscura respecto de la otra población natural. Las conchas eran finas, algo frágiles, de forma ovoide alargada y con el ápex puntiagudo. Tenían las espiras firmemente arrolladas en espiral y aumentaban rápidamente en altura su aspecto externo. Eran convexas mostrando sus caras una forma no allanada y estaban separadas por unas suturas profundas. La primera y más menuda espira o ápex representaba aproximadamente una novena parte de la longitud total de la concha. La última espira o el cuerpo de la espira era ancha y oval. El perfil

de la apertura era oval, el labio externo, que estaba más o menos arqueado, y el margen basal eran claramente convexos. El labio externo era fino y el interno presentaba un color más claro tendiendo hacia blanquecino en la población de Faraoun-Prince (Alejandría), que se reflejaba en cubrir el umbilicus el cual no se distinguía claramente. La región columelar presentaba una forma más o menos arqueada en ambas poblaciones.

Los valores morfométricos para las dos poblaciones de la naturaleza, Faraoun-Prince (Alejandría) y El-Kazza (Behera) y cada parámetro relativo (ratios) contemplado fueron debidamente obtenidos. Igualmente se señalan los valores mínimos, máximos y desviación estándar de los promedios. Todas las medidas se hicieron en mm excepto el ángulo de la concha (AEC) cuyos valores se expresan en grados (sistema sexagesimal). La longitud de la concha (LC) en la población de Faraoun-Prince (Alejandría) presentó unos valores desde 5,65 a 17,98 mm con una media de  $12,72 \pm 2,20$  mm, y la anchura de la concha (AC) varió entre 2,69 y 9,98 mm (media  $6,92 \pm 1,38$ ). El número de espiras (NºE) de los caracoles medidos fué entre 3 y 4 con una media de  $3,77 \pm 0,42$  habiendo una mayoría de la población con cuatro espiras, de hecho solo cinco especímenes estaban formados por tres espiras. Los valores de la longitud de la apertura (LA) que se obtuvieron fueron entre 3,59-13,39 mm con una media de  $8,96 \pm 1,71$  mm. El ratio entre la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) varió de 1,50 a 2,11. El ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la apertura (LC/LA) con un rango entre 1,23-1,58 resultó ser el que menos varió con respecto a los otros dos ratios.

Se realizaron rectas de regresión. Los resultados de las Figuras 1 y 2 muestran una fuerte relación positiva entre la longitud de la concha (LC) y la anchura de la concha (AC), y también entre la primera (LC) y la longitud de la apertura (LA). En la Figura 3 entre el ratio de la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) respecto del número de espiras (NºE) no es significativo. Las Figuras 5 y 5 muestran que el número de espiras (NºE) respecto de la longitud de concha (LC) y la anchura de la concha (AC), respectivamente permanecen algo constantes. En las figuras 6 y 7, la longitud de la concha (LC) y la anchura de la concha (AC) se incrementan a medida que la longitud de la última espira aumenta (LUE).

La población natural procedente de El-Kazza (Behera) obtuvo unos valores de la longitud de concha (LC) entre 6,89 y 17,73 mm (media  $12,30 \pm 1,89$ ). La anchura de las conchas (AC) varió entre 3,64 y 9,71 mm presentando una media de  $6,64 \pm 1,12$  mm. La mayoría de la población estaba formada por conchas de cuatro espiras con una media de  $3,62 \pm 0,49$  mm. La longitud de la apertura (LA) varió entre valores de 4,99 y

12,04 mm y la media de  $8,77 \pm 1,40$ , así como la anchura de la apertura (AA) entre 2,74-7,78 mm ( $5,00 \pm 0,87$ ). Los valores del ángulo (AEC) de la población se comprendían entre  $50,01$  y  $79,64^\circ$  con una media de  $65,12 \pm 5,53^\circ$ . El ratio entre la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) varió desde 1,59 a 2,09 (media  $1,86 \pm 0,09$ ). El ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la última espira (LC/LUE) resultó ser casi constante con un rango entre 1,05 a 1,16 y media  $1,10 \pm 0,02$ .

La longitud (LC) y la anchura de la concha (AC) muestran una significativa relación positiva como puede observarse en la Figura 8. También existe esta relación entre la longitud de la concha (LC) y la longitud de la apertura (LA), y entre la anchura de la concha (AC) y la longitud de la apertura (LA) tal y como puede apreciarse en las Figuras 9 y 10 respectivamente. En las Figuras 11 y 12, donde se observa la relación entre el número de espiras (NºE) y los ratios entre la longitud y la anchura de la concha (LC/AC) y entre la misma longitud de la concha y la longitud de la apertura (LC/LA) la relación no resulta significativa. Las Figuras 13 y 14 muestran algo más de intensidad en la relación entre el número de espiras (NºE) y la anchura de la concha (AC) y la longitud de la concha (LC) respectivamente. En las Figuras 15 y 16 la longitud de la última espira (LUE) muestra una importante relación con la longitud (LC) y anchura de concha (AC).

En la Tabla 1 se recogen los Coeficientes de Correlación  $r^2$  de las diferentes relaciones de las poblaciones naturales Faraoun-Prince (Alejandría) y El-Kazza (Behera).

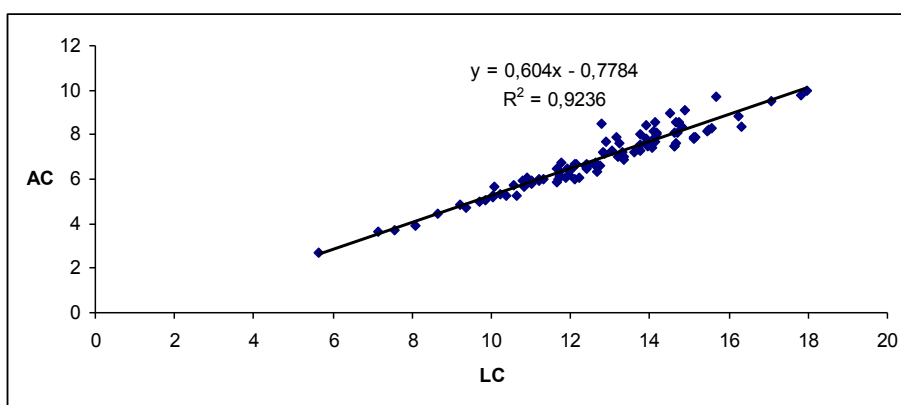


Figura 1.- Relación entre longitud (LC) y anchura de concha (AC) de la población de Faraoun (Alejandría).

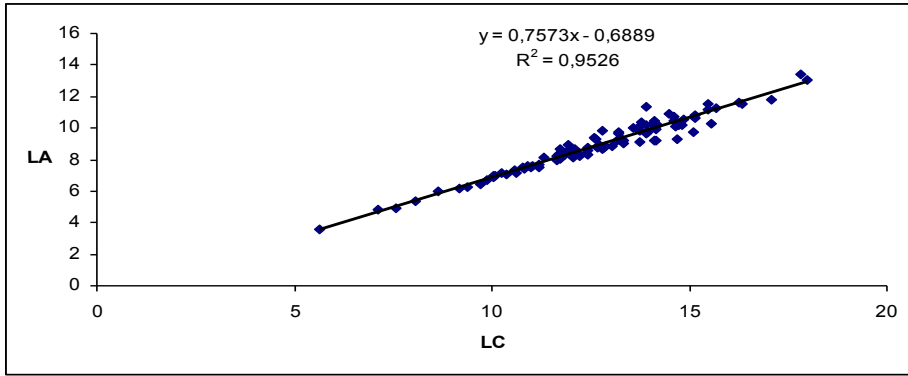


Figura 2.- Relación entre longitud de concha (LC) y longitud de apertura (LA) de la población de Faraoun (Alejandría).

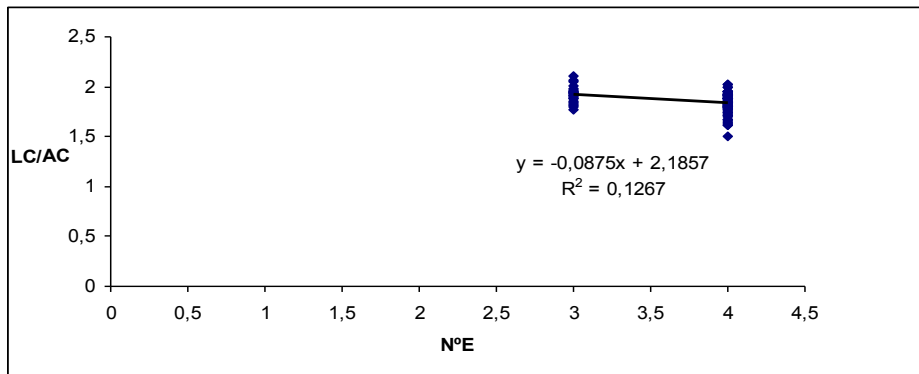


Figura 3.- Relación entre el número de espiras (NºE) y el ratio LC/AC de la población de Faraoun (Alejandría).

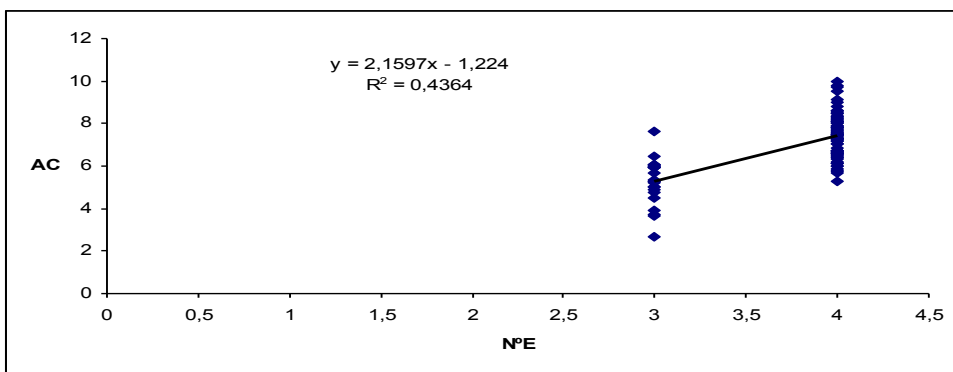


Figura 4.- Relación entre el número de espiras (NºE) y la anchura de concha (AC) de la población de Faraoun-Prince (Alejandría).

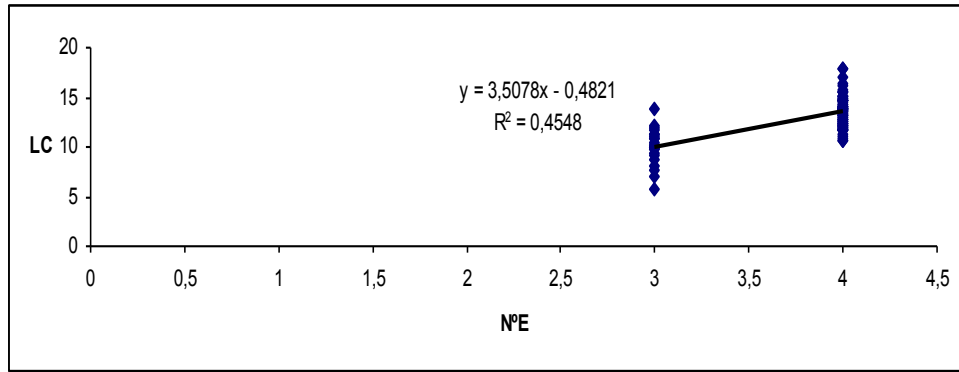


Figura 5.- Relación entre el número de espiras (NºE) y la longitud de la concha (LC) de la población de Faraoun-Prince (Alejandría).

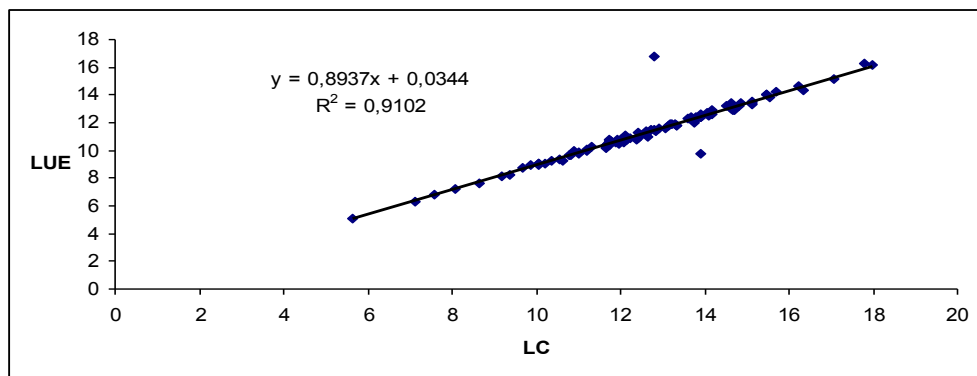


Figura 6.- Relación entre la longitud de concha (LC) y la longitud de la última espira (LUE) de la población de Faraoun-Prince (Alejandría).

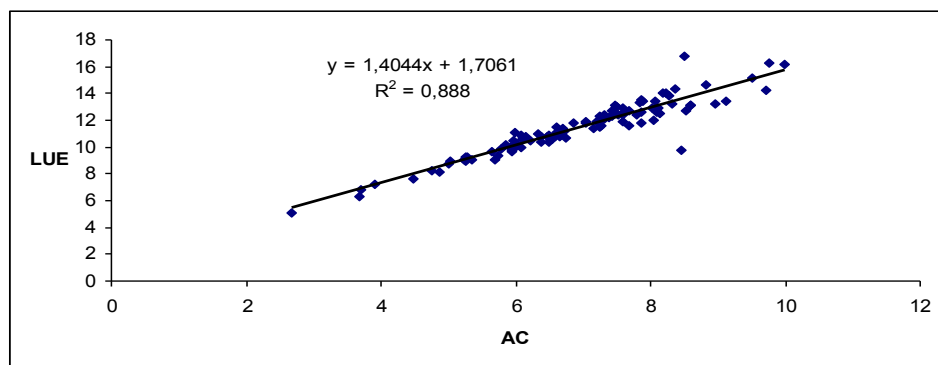


Figura 7.- Relación entre la anchura de concha (AC) y la longitud de la última espira (LUE) de la población de Faraoun-Prince (Alejandría).



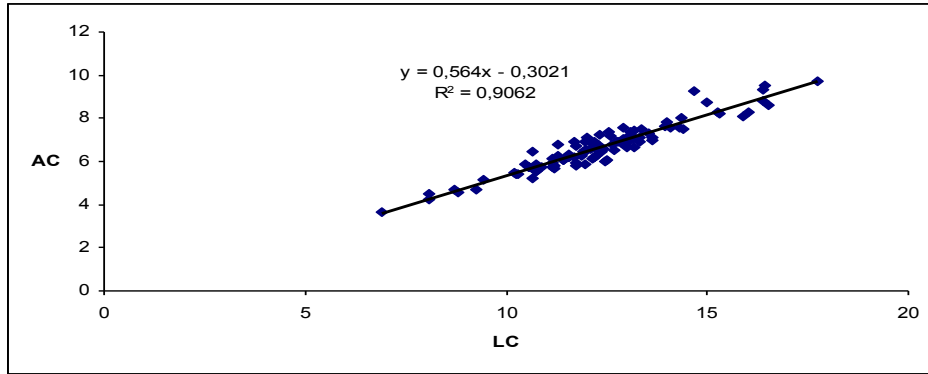


Figura 8.- Relación entre la longitud (LC) y la anchura de concha (AC) de la población de El-Kazza (Behera).

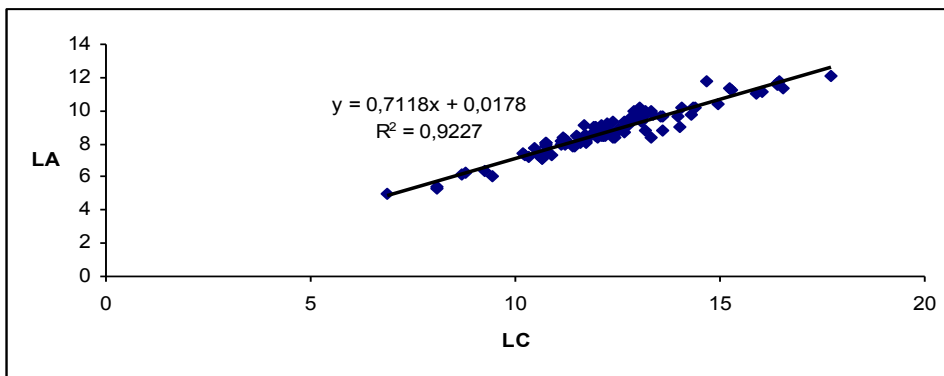


Figura 9.- Relación entre la longitud de concha (LC) y longitud de apertura (LA) de la población de El-Kazza (Behera).

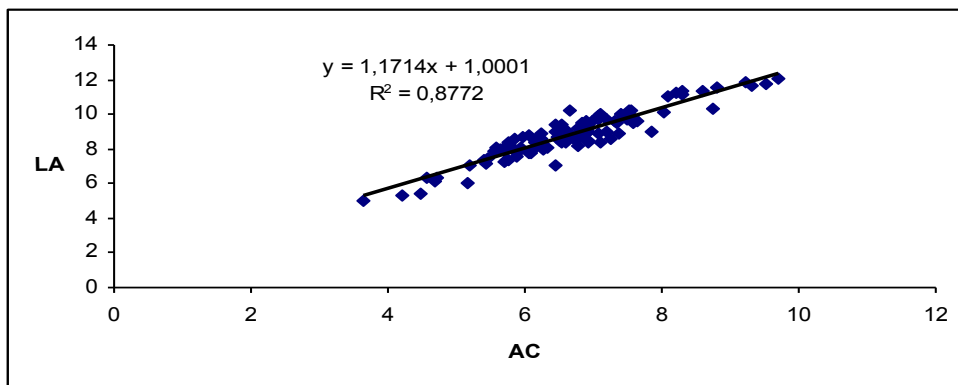


Figura 10.- Relación entre la anchura de concha (AC) y longitud de la apertura (LA) de la población de El-Kazza (Behera).

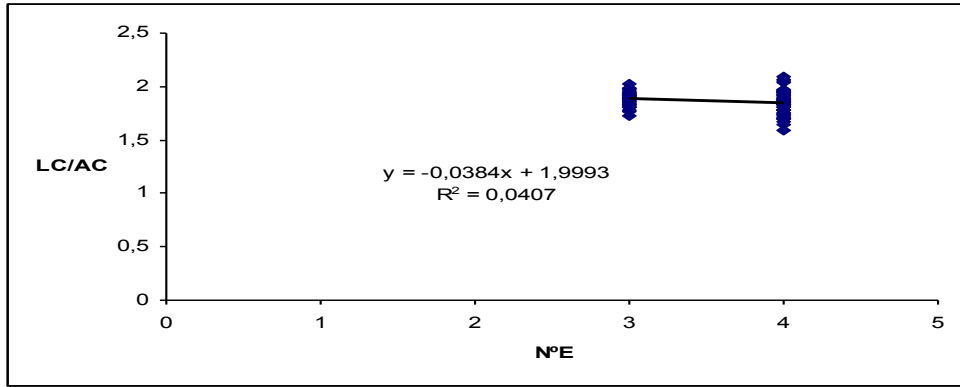


Figura 11.- Relación entre el número de espiras (NºE) y el ratio de la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) de la población de El-Kazza (Behera).

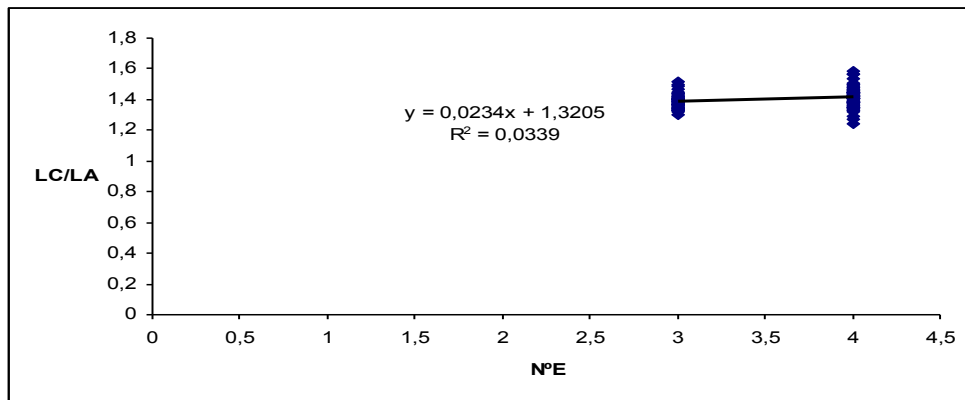


Figura 12.- Relación entre el número de espiras (NºE) y el ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la apertura (LC/LA) de la población de El-Kazza (Behera).

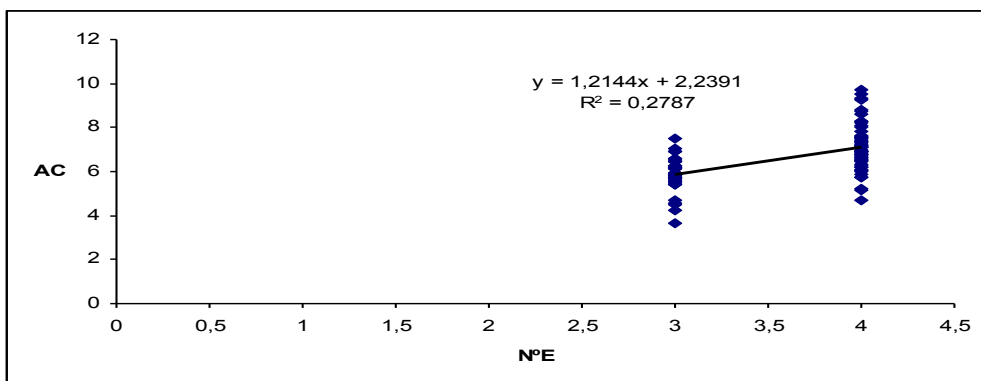


Figura 13.- Relación entre el número de espiras (NºE) y anchura de concha (AC) de la población de El-Kazza (Behera).

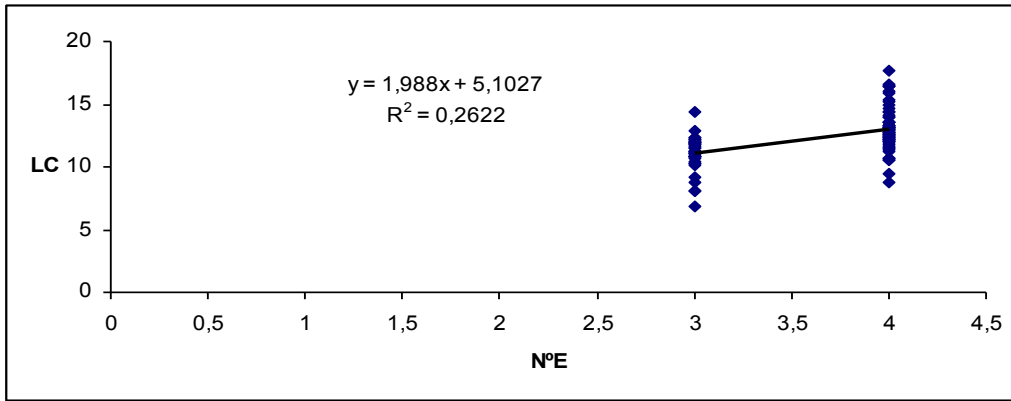


Figura 14.- Relación entre el número de espiras (NºE) y la longitud de concha (LC) de la población de El-Kazza (Behera).

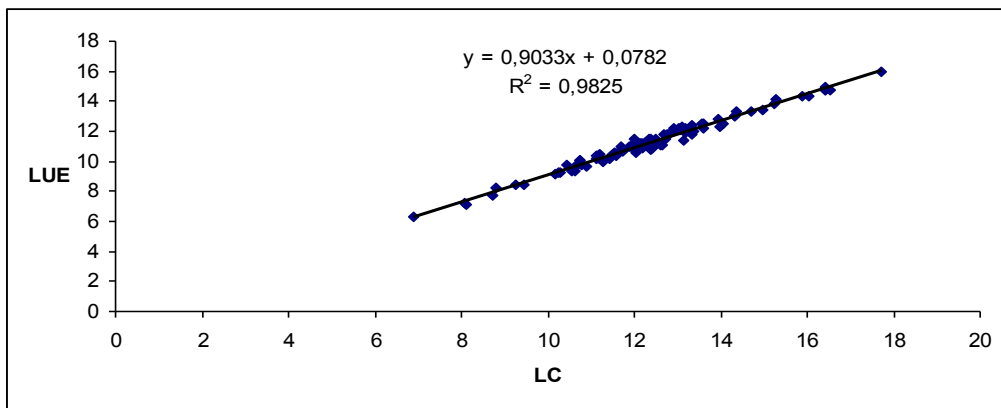


Figura 15.- Relación entre la longitud de concha (LC) y longitud de la última espira (LUE) de la población de El-Kazza (Behera).

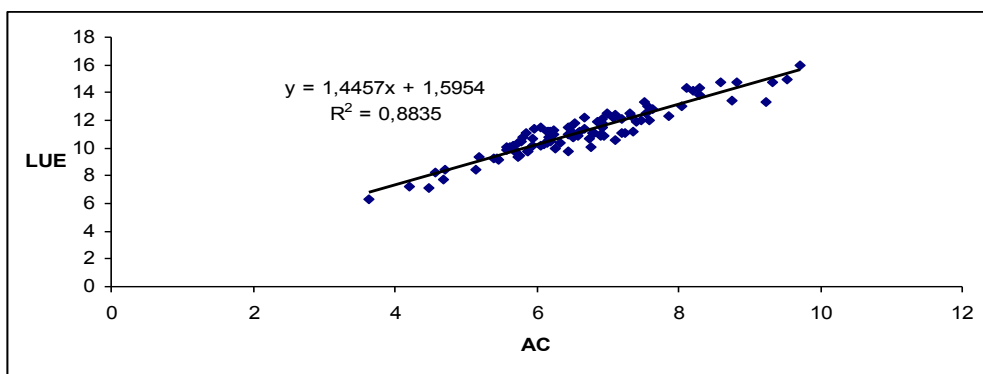


Figura 16.- Relación entre la anchura de concha (AC) y la longitud de la última espira (LUE) de la población de El-Kazza (Behera).

Parámetros	Población	Coefficiente de Correlación $r^2$
LC-AC	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,9476
LC-LA	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,9526
LC-LUE	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,9102
AC-LUE	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,888
AC-LA	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,9031
NºE-LC/AC	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,1267
NºE-LC/LA	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,094
NºE-AC	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,4364
NºE-LC	Faraoun-Prince (Alejandría)	0,4548
LC-AC	El-Kazza (Behera)	0,9062
LC-LA	El-Kazza (Behera)	0,9227
LC-LUE	El-Kazza (Behera)	0,9825
AC-LUE	El-Kazza (Behera)	0,8835
AC-LA	El-Kazza (Behera)	0,8772
NºE-LC/AC	El-Kazza (Behera)	0,0407
NºE-LC/LA	El-Kazza (Behera)	0,0339
NºE-AC	El-Kazza (Behera)	0,2787
NºE-LC	El-Kazza (Behera)	0,2622

Tabla 2.- Resultados de los coeficientes de correlación  $r^2$  de las poblaciones de Faraoun-Prince (Alejandría) y de El-Kazza (Behera), en Egipto.

#### 4.4.1.2.- EN CULTIVOS

La descripción de la morfología de las conchas de los 100 especímenes seleccionados al azar para seguir su crecimiento y ontogenia procedentes de una población cultivada en el laboratorio, correspondió a la misma que se describe en el apartado 4.4.1.1.- Descripción de coquillas de la naturaleza en referencia a las poblaciones naturales. Solamente se observó una diferencia en la coloración de las conchas del laboratorio que era más clara en alguno, casi transparente al trasluz, contrastando sobretodo con las procedentes de El-Kazza (Behera), así como también se encontraron restos calcáreos blanquecinos sedimentados en la superficies de la mayoría de ejemplares.

Las medidas morfométricas fueron oportunamente obtenidas. La longitud de la concha (LC) presentó valores entre 3,35 y 18,22 mm con una media de  $9,58 \pm 2,18$ , y

la anchura de la concha (AC) varió desde 1,73 mm a 9,79 mm y  $5,08 \pm 1,22$  de media. La longitud de la apertura (LA) osciló entre 2,31 y 12,55 mm (media  $7,03 \pm 1,58$ ) y la anchura de la apertura (AA) presentó valores entre 1,37 y 7,71 mm y  $3,95 \pm 0,94$  fué la media que resultó. El número de espiras (NºE) varió entre 2 y 4 presentando una media de  $3,15 \pm 0,39$ . Se encontró solo una concha con 2 espiras y correspondía a la de tamaño más pequeño, cinco mostraron 3 espiras y cuatro presentaron 4 espiras. La longitud de la última espira (LUE) se midió entre 3,09 y 16,33 mm y con  $8,68 \pm 1,95$  mm de media. El ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la última espira (LC/LUE) era casi constante con un rango de valores entre 1,07 y 1,14 (media  $1,10 \pm 0,01$ ). Entre  $77$  y  $39,52^\circ$  se calcularon los valores del ángulo de la espira (AEC), presentando una media de  $61,93 \pm 6,16$ .

Se realizaron análisis de correlaciones observando que existe una evidente relación entre la longitud de la concha (LC) y la anchura (AC) como se puede observar en la Figura 17. También en las Figuras 18 y 19 en la cuales se representan longitud (LC) y anchura de concha (AC) respecto a la longitud de la apertura (LA) se aprecia la misma relación. La relación entre el número de espiras (NºE) y el ratio de la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) (Figuras 20 y 21) prácticamente permaneció constante, y también con respecto al ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la apertura (LC/LA). Con respecto a las poblaciones naturales, la relación resultó ser algo más significativa entre el número de espiras (NºE) con la longitud de la concha (LC) y la anchura (AC) de la población del laboratorio (Figuras 22 y 23). En las Figuras 24 y 25 también existe una importante relación entre los parámetros representados.

En la Tabla 2 se muestran los Coeficientes de Correlación  $r^2$  calculados en la población cultivada en el laboratorio.

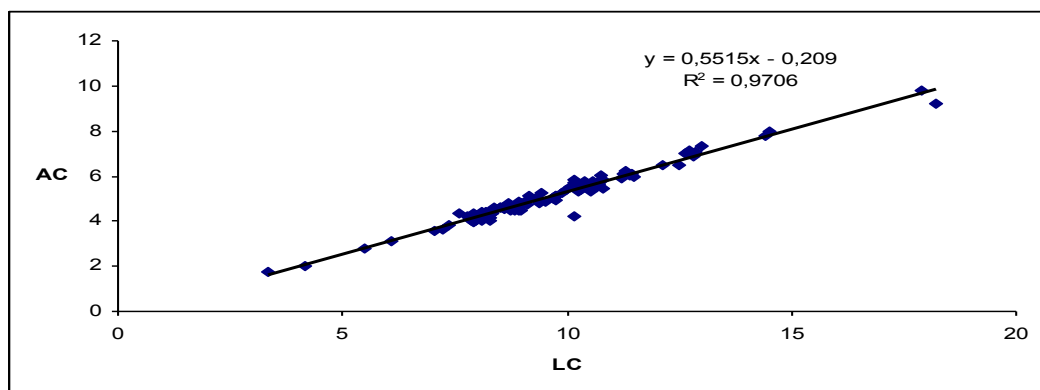


Figura 17.- Relación entre la longitud de concha (LC) y anchura (AC) de la población cultivada en el laboratorio.

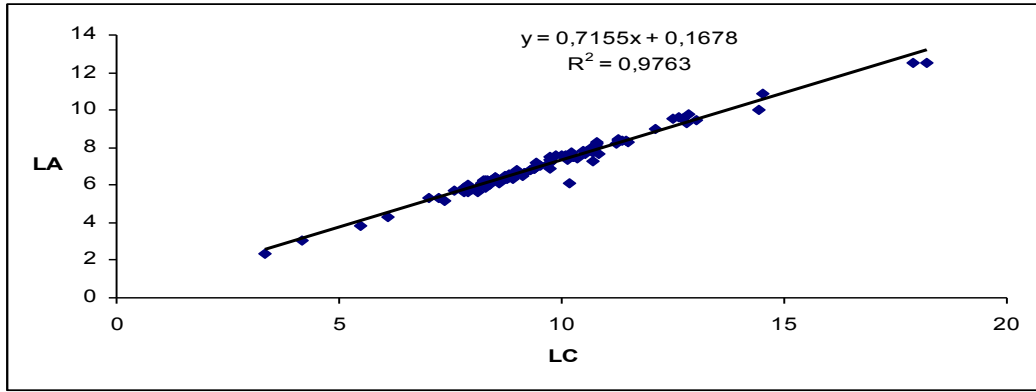


Figura 18.- Relación entre la longitud de concha (LC) y la longitud de apertura (LA) de la población cultivada en el laboratorio.

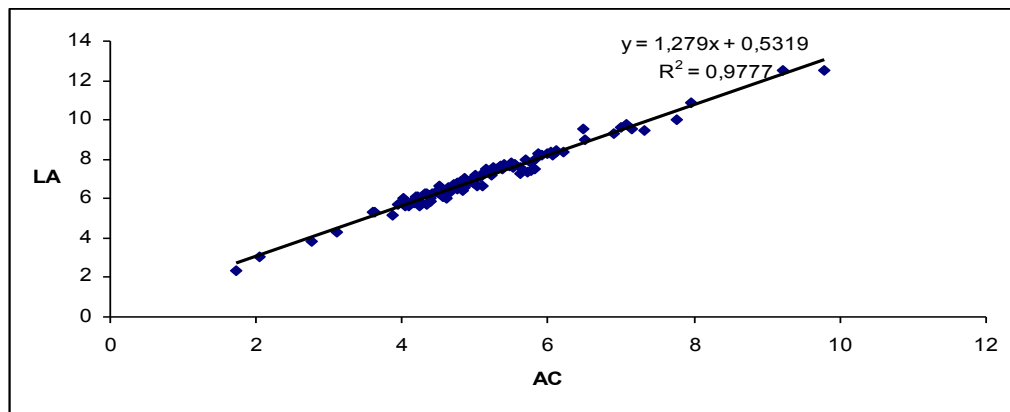


Figura 19.- Relación entre la anchura de concha (AC) y la longitud de la apertura (LA) de la población cultivada en el laboratorio.

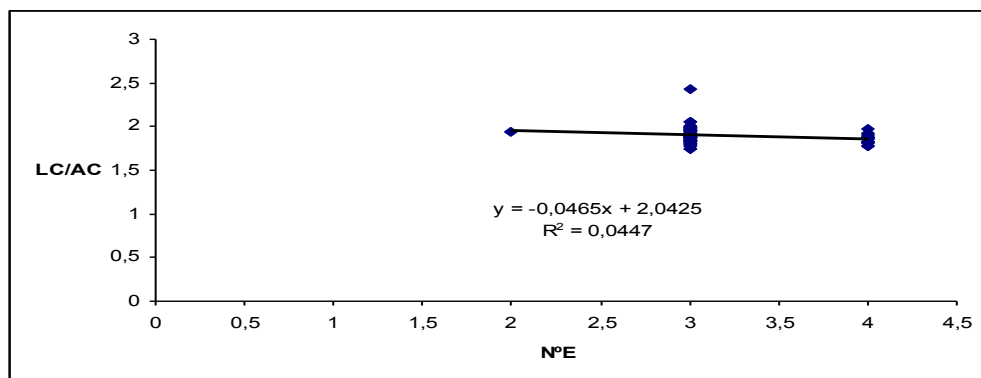


Figura 20.- Relación entre el número de espiras (NºE) y el ratio entre la longitud de la concha y la anchura de la concha (LC/AC) de la población del laboratorio.

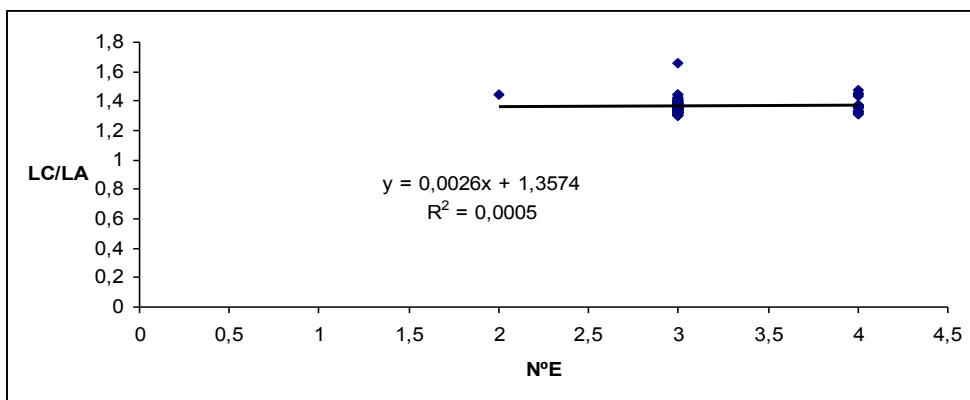


Figura 21.- Relación entre el número de espiras(NºE) y el ratio entre la longitud de la concha y la longitud de la apertura (LC/LA) de la población del laboratorio.

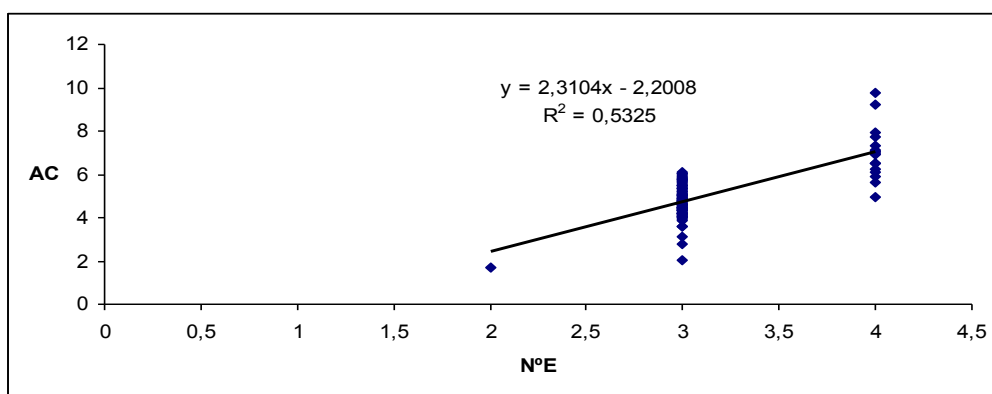


Figura 22.- Relación entre el número de espiras (NºE) y la anchura (AC) de la concha de la población del laboratorio.

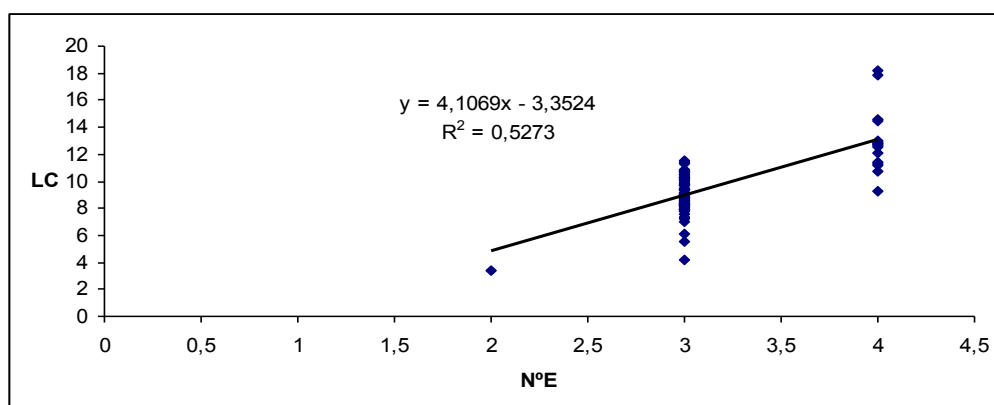


Figura 23.- Relación entre el número de espiras (NºE) y la longitud de la concha (LC) de la población del laboratorio.

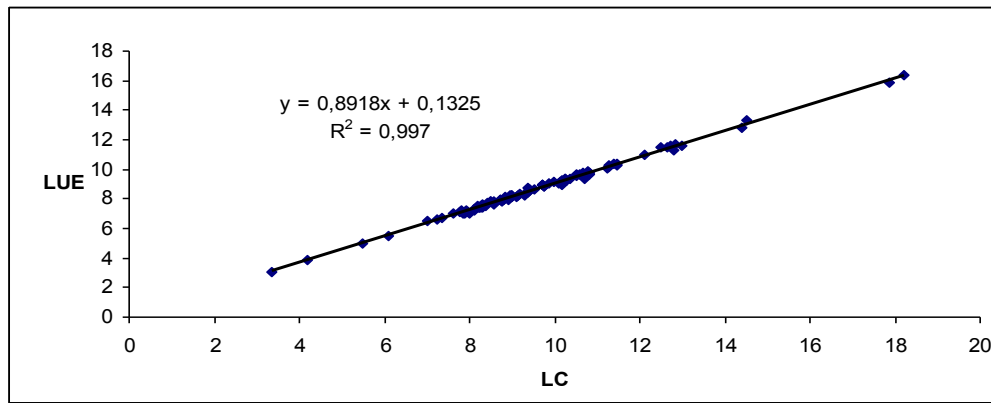


Figura 24.- Relación entre la longitud de concha (LC) y la longitud de la última espira (LUE) de la población del laboratorio.

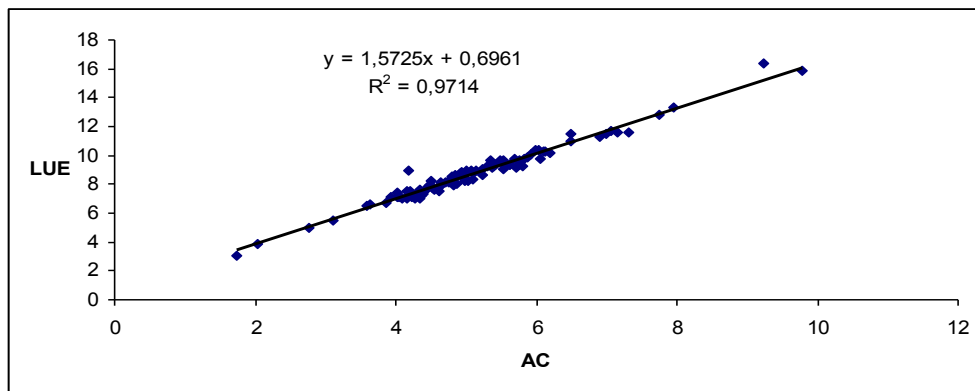


Figura 25.- Relación entre la anchura de concha (AC) y la longitud de la última espira (LUE) de la población del laboratorio.

Parámetros	Población	Coefficiente de Correlación $r^2$
LC-AC	Laboratorio	0,9706
LC-LA	Laboratorio	0,9763
LC-LUE	Laboratorio	0,967
AC-LA	Laboratorio	0,9777
AC-LUE	Laboratorio	0,9714
NºE-LC/AC	Laboratorio	0,0447
NºE-LC/LA	Laboratorio	0,0005
NºE-AC	Laboratorio	0,5325
NºE-LC	Laboratorio	0,5273

Tabla 3.- Resultados de los coeficientes de correlación  $r^2$  de la población de Egipto cultivada en el laboratorio.



#### 4.4.1.3.- EN EL ANTIGUO EGIPTO

Los resultados de las medidas morfométricas realizadas en el collar se recogen en la Tabla 4. La posiciones laterales y superiores en la que se dispusieron las conchas del collar en la fotografía permiten observar que sus características morfológicas corresponden a las de un caracol de la especie *L. caillaudi*: las conchas son ovoides y alargadas, y el ápex puntiagudo, las espiras se arrollan en espiral aumentando rápidamente en altura y separadas por profundas suturas, el cuerpo de la última espira que sobresale forma casi la concha entera, y el ápex es muy pequeño, aproximadamente la novena parte del resto de la concha. También las características típicas de los caracoles Lymnaeidos se observan en la fotografía ya que las espiras se arrollan hacia la derecha dando lugar a una apertura dextrógira y originando una concha helicoidal.

El parámetro de la longitud de la concha (LC) se midió en cada una de las 24 piezas, y la número 13 obtuvo la longitud de concha de 14,13 mm que correspondió a la medida más pequeña de todas las que componen el collar. Su colocación justo en el medio del collar no es casual, ya que cuando el joyero egipcio componía una joya, todos y cada uno de los elementos aportaban un significado y un motivo que daba sentido al resto del conjunto. La posición condiciona su “peso visual” y el diseño del collar transmite la idea de homogeneidad, equilibrio y perfección que siempre intentaba conseguir el artista egipcio. Las piezas con las longitudes de concha (LC) mayores fueron la número 2 con 15,70 mm, seguida de la número 24 que medía 15,63 mm. La mínima anchura de concha (AC) con 7,86 mm correspondió a la pieza número 12, seguida de la número 14 que midió 8,90 mm. La anchura máxima (AC) 9,71 mm correspondió a la número 20 y 9,69 mm para la pieza número 24. La posición casi lateral de las piezas número 1 y 6, no permitió la medición de la anchura de la concha (AC). La proyección de sombra sobre las piezas 2, 7 y 8 impidieron visionar su contorno y obtener la anchura máxima de la concha (AC) en dichas piezas. La longitud de la última espira (LUE) solo se pudo obtener en las piezas con los números 1, 2, 6 y 24 debido a que en sus posiciones en la fotografía se apreciaba claramente el perfil de la sutura de la última espira.

Cuando se observa la fotografía del collar en su conjunto, las 24 conchas de caracol que la componen parecen exactas réplicas una a continuación de otra, dando un aspecto homogéneo al collar. Sin embargo, cada pieza presenta diferencias en cada

una de las medidas morfométricas que se han podido obtener. La población del collar no se seleccionó de forma aleatoria y puede considerarse como una subpoblación escogida dentro de una población o varias por requerimientos estéticos

Los datos estadísticos no arrojan ninguna información al tratarse de una población tan similar, como puede observarse entre la relación de la longitud de la concha (LC) y la anchura de la concha (AC) en la Figura 26, así como tampoco la relación entre el ratio de la longitud de la concha y la anchura (LC/AC) y la longitud (LC) (Figura 27).

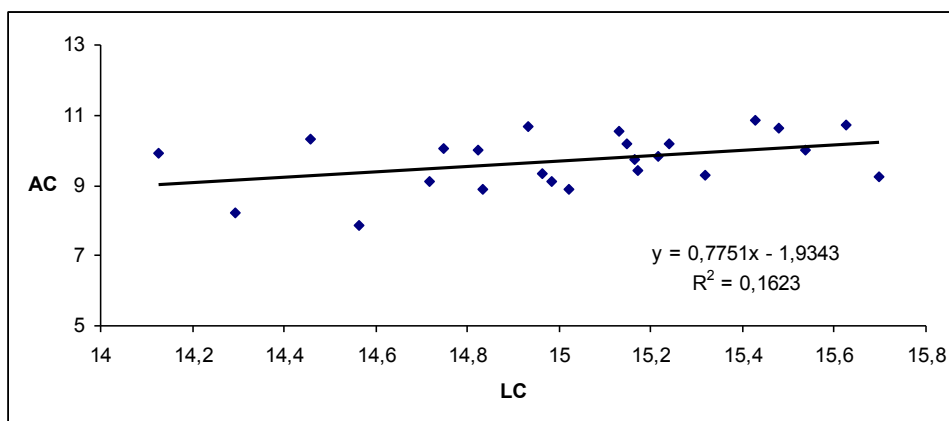


Figura 26.- Relación entre la longitud (LC) y anchura de concha (AC) de las conchas del collar.

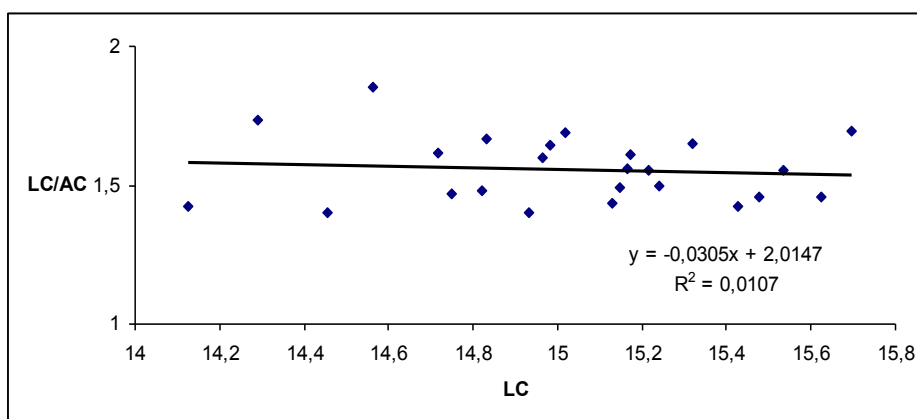


Figura 27.- Relación entre la longitud de la concha (LC) y el ratio entre la longitud de la concha y la anchura de la concha (LC/AC) de las conchas del collar.

Las técnicas malacológicas clásicas utilizadas para caracterizar el fenotipo en Lymnaeidos, y aplicadas en las poblaciones de Faroun-Prince (Alejandría), El-Kazza (Behera) y la población del laboratorio, muestran correlaciones significativas en los siguientes pares de valores ( $p < 0,05$ ): LC-AC, LC-LA, LC-LUE, AC-LA, AC-LUE. Las mismas técnicas no son aplicables a la población del collar dado que no incluyen los distintos estadios de crecimiento.

En un estudio morfométrico, el elemento descriptivo no se limita solamente a la representación de las variaciones del tamaño y de la forma, sino que también le interesa los cambios de dimensiones en el desarrollo del individuo (alometría ontogenética), entre individuos del mismo estadio (alometría estática) o entre poblaciones (alometría evolutiva).

Las técnicas utilizadas en los estudios morfométricos hacen posible validar la hipótesis nula de una población conespecífica si es que tienen un patrón alométrico en común, es decir, si simplemente son la extensión alométrica de las mismas (ROHLF & MARCUS, 1993; KLINGENBERG, 1996; DUJARDIN et al., 2004)

Los datos morfométricos de las cuatro poblaciones estudiadas en el presente trabajo se han analizado utilizando un análisis multivariable, análisis de los componentes principales (ACP). La matriz de covarianza de las medidas log transformadas fué sometida a un análisis canónico discriminante independiente del tamaño para determinar la variación morfométrica entre los ejemplares. Esta técnica consiste en eliminar el efecto de la variación ontogénica dentro de un mismo grupo, regresando cada carácter individual contra el componente principal del grupo mismo, el cual es una estimación multivariable del tamaño (DOS REIS et al., 1990). Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

En el análisis de los componentes principales realizado sobre poblaciones de Faraoun-Prince (Alejandría), El-Kazza (Behera) , la población obtenida en el laboratorio y la población del collar, se observa que esta última se integra casi totalmente dentro del resto de las poblaciones (Figura 28).

Al prescindir del primer componente principal, conseguimos eliminar el efecto tamaño y podemos representar la variación de la forma de la concha de las distintas poblaciones (Figura 29). Se observa que el área perteneciente a la población del collar se integra casi totalmente con las áreas de las poblaciones de Faraoun-Prince (Alejandría), El-Kazza (Behera) y de la población obtenida en el laboratorio.

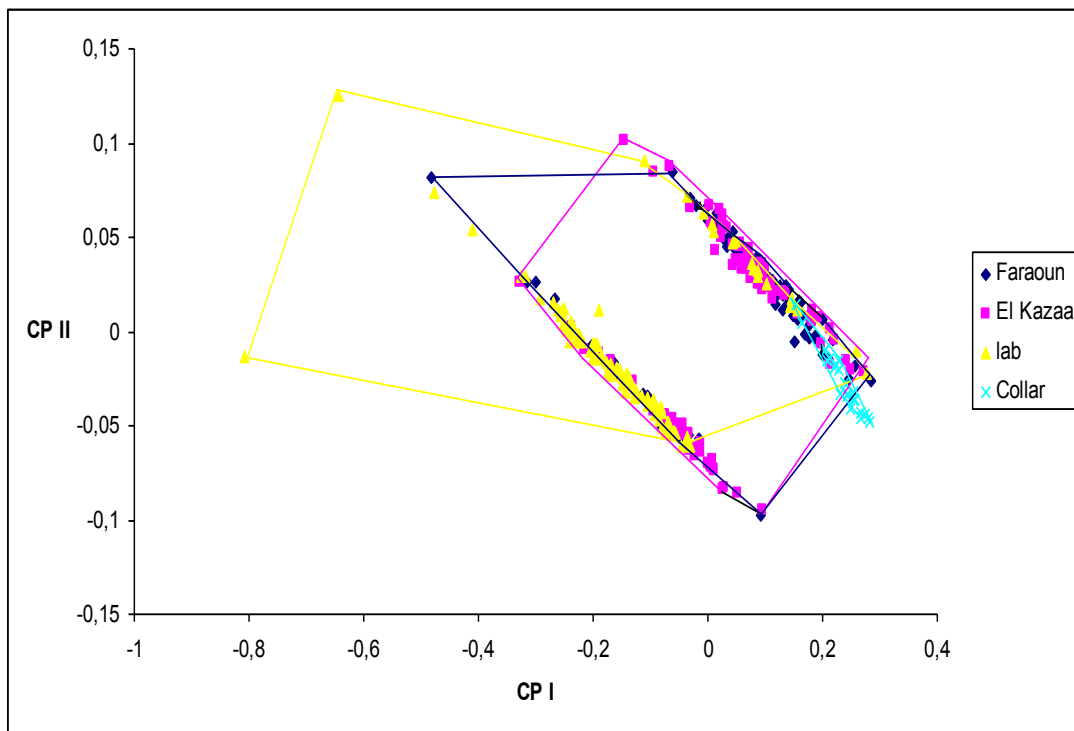


Figura 29- Mapa factorial correspondiente a las poblaciones de Faraoun-Prince (Alejandría), El-Kazaa (Behera), del laboratorio y del collar. Muestras proyectadas sobre el primer (CP I, 91%) y el segundo CP II, 5%) componentes principales. Cada grupo representado por su perímetro.

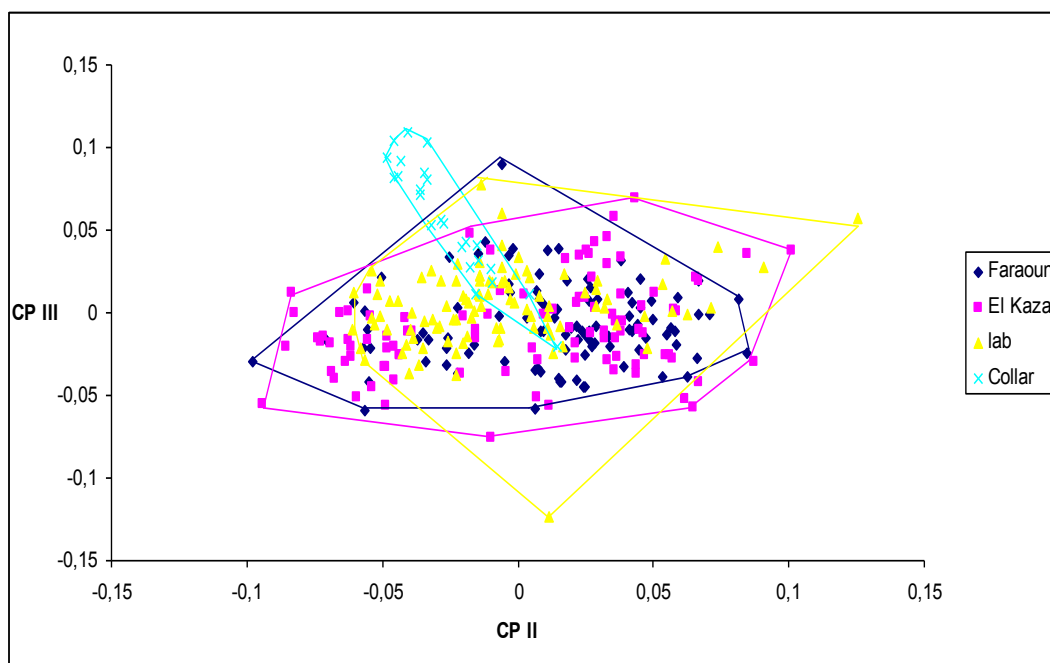


Figura 29.- Mapa factorial correspondiente a la variación de la forma de la concha de las poblaciones de Faroun-Prince (Alejandría), El-Kazaa (Behera), del laboratorio y del collar. Muestras proyectadas sobre el segundo (CP II, 3%) y el tercer (CP III, 0%) componentes principales. Cada grupo representado por su perímetro.

## **4.4.2.- VARIABILIDAD MORFOMETRICA DE LOS CLUSTERS**

### **4.4.2.1.- ESTUDIO DE LOS CLUSTERS**

El estudio morfométrico de los clusters de *R. caillaudi* se efectuó a partir de un material de 884 clusters obtenidos en los cultivos en el laboratorio de la población de Pharaoun (Alejandría) y otro total de 990 clusters asimismo procedentes de cultivos de la misma especie procedente de El-Kazza (Behera), ambos en el Delta del Nilo en áreas endémicas de Fascioliasis humana en Egipto.

La duración del experimento en la población cultivada de Pharaoun tuvo una duración de más de 2 meses, concretamente desde la fecha de 8 de Marzo de 2011 hasta el 19 de Mayo del mismo año. En el caso de la otra población cultivada procedente de El-Kazza, la duración del experimento en cuestión fue mayor, de unos 4 meses, concretamente desde la fecha del 11 de Marzo de 2011 hasta el 6 de Julio del mismo año de 2011.

Los clusters de esta especie de Lymnaeido demuestran ser alargados, sin tendencia a curvarse (solo excepcionalmente) cuando de mayor tamaño. Es de destacar la característica de presentar un segundo estuche interno envolvente de los huevos, si bien este segundo estuche no es visible en la mayoría de los clusters, sino únicamente en unos pocos, aunque lo lógico es deducir que debe estar siempre presente si bien invisible por la falta de tinción en las observaciones efectuadas aquí in vivo.

El análisis comparado de tamaño y forma de los clusters no muestra diferencia significativa alguna entre los clusters de ambas poblaciones, con áreas de hasta 47.15 mm<sup>2</sup> en Pharaoun y de 44.75 mm<sup>2</sup> en El-Kazza.

### **4.4.2.2.- ESTUDIO DE LOS HUEVOS**

El estudio de los huevos de la especie *R. caillaudi* se ha efectuado en los mismos clusters de las mismas poblaciones antedichas.

Dos aspectos destacable consisten en (i) la tendencia que muestran los huevos a distribuirse en 3 hileras cuando se trata de clusters de gran tamaño conteniendo un alto número de huevos, y (ii) en segundo lugar la evolución del número de huevos dentro de los clusters, que tiende a un incremento a medida que pasa el tiempo, hasta llegar a

un máximo, para luego mostrar un descenso progresivo en el número de huevos hasta que se llega al agotamiento y el caracol muere o deja de efectuar puestas.

La comparación entre una población y otra no muestra diferencias significativas ni en número ni en el tamaño de los huevos.

#### **4.4.3.- ANALISIS CRONO-PALEOBIOGEOGRAFICO**

##### **4.4.3.1.- CALCULO DEL RELOJ MOLECULAR EN LYMNAEIDOS**

La tasa general de evolución del gen 18S en los organismos eucariotas se ha estimado en  $1,8 \times 10^{-10}$  sustituciones por sitio por año (1,8% por 100 Millones de años) tras varios estudios en diferentes grupos de organismos que cuentan con restos fósiles datados a través de análisis del Carbono 14 (OCHMAN & WILSON, 1987). Un total de 8 diferencias nucleotídicas aparecieron en el alineamiento de 1818 pb cuando se compararon los 18S ADNr de *Radix auricularia* y *Radix balthica* (= *Radix peregra*), obteniendo una tasa evolutiva de 0,44%. Las ligeras diferencias en las distancias genéticas entre ambos Lymnaeidos se muestran en los árboles filogenéticos de parsimonia y el NJ (Neighbor-joining) que las agrupan a ambas especies en la misma rama (BARGUES & MAS-COMA, 1997).

Los cálculos basados en la anterior tasa de sustitución de base del 18S ADNr indican un tiempo de divergencia de *R. auricularia* y *R. balthica* (= *R. peregra*) de 24 millones de años. Similares cálculos se realizaron entre *Galba truncatula* y *Lymnaea glabra* a partir de las 31 diferencias de nucleótidos obtenidas en el alineamiento de 1818 pb de sus 18S ADNr, y su reloj molecular resultó ser de 94,7 millones de años. *Galba truncatula* muestra un gran número de diferencias de secuencias y altas distancias genéticas cuando se comparan con otros Lymnaeidos y aparece aparte en una rama en los árboles filogenéticos (BARGUES & MAS-COMA, 1997; BARGUES et al., 1997). *G. truncatula* y *R. auricularia* presentaron una tasa de sustitución de base de 1,1%, inferior al 1,7% que resultó entre *G. truncatula* y *L. glabra*, al haber 21 diferencias nucleotídicas entre las dos primeras. Consecuentemente, los tiempos de divergencia en base al 18S ADNr entre *G. truncatula* y *R. auricularia* pueden ser datadas en una estimación inicial de alrededor de 61,1 millones de años.

En Lymnaeidae, los resultados obtenidos a partir de las secuencias del espaciador ITS-2 indican que es un marcador muy útil para resolver problemas taxonómicos en las relaciones supraespecíficas, específicas y de población, a pesar del sesgo G + C.

Como en otros organismos, las secuencias de ITS-2 tienden a evolucionar más rápidamente, permitiendo una mejor diferenciación entre especies muy cercanas (BARGUES et al., 2001). El tiempo de divergencia de *R. auricularia* y *R. balthica* (= *R. peregra*) estimado en 24 millones de años a partir del 18s ADNr puede ser usado para estimar la tasa del reloj molecular del ITS-2 ya que se encontraron 86 diferencias nucleotídicas (20,62% del total de las posiciones variables) en el alineamiento de 417 pb. Si las diferencias nucleotídicas en los alineamientos hubieran sido más elevadas la información no hubiera sido significativa.

Al comparar las secuencias del ITS-2 de las dos Tribus de los vectores de la Enfermedad de Chagas, Triatomini y Rhodniini, se obtuvieron 85,8% de posiciones variables en los alineamientos resultando imposible detectar una acumulación de sustituciones nucleotídicas (BARGUES et al., 2000). De manera similar, el tiempo en que *G. truncatula* y *L. glabra* divergieron, estimado en 94,7 millones de años a partir del reloj molecular del 18S ADNr puede ser utilizado con el mismo propósito, con unas diferencias totales de 193 nucleótidos (38,91% del total de las posiciones variables) en el alineamiento de 496 pb.

La topología de los árboles filogenéticos mostró altas distancias genéticas entre los Lymnaeidos y colocó a *G. truncatula* basal a la dicotomía de *L. glabra* y *R. auricularia*, donde la primera presentó la longitud de ITS-2 más corta, lo que sugiere que *Galba* sería el taxón más antiguo junto con *Radix* con 370-406 pb, y precisamente el elevado número de inserciones/delecciones detectadas puede estar relacionado con este más antiguo origen (BARGUES et al., 2001). Entre *G. truncatula* y *R. auricularia* el tiempo de divergencia estimado en 61,1 millones de años a partir del 18S ADNr permitió obtener a partir 204 diferencias nucleotídicas y 47,77% del total de las posiciones variables en los alineamientos de 427 pb, obteniendo una tasa evolutiva del ITS-2 de 78,18% por 100 millones de años (0,7818% por 1 millón de años). La tasa evolutiva del ITS-2 de *R. auricularia* y *R. balthica* (= *R. peregra*) fue estimada en 85,91% por 100 millones de años y entre *G. truncatula* y *L. glabra* la tasa evolutiva del ITS-2 obtuvo 41,08% por 100 millones de años.

#### **4.4.3.2.- ESTIMACION DE LA DIVERGENCIA EN EGIPTO**

Por lo tanto, en Lymnaeidae la tasa del reloj molecular del ITS-2 es de 0,4108-0,8591%. Para *Radix*, cuya validez taxonómica como género fue demostrada a partir de las divergencias nucleotídicas y las distancias genéticas del ITS-2 (BARGUES et al.,

2001), se puede estimar la tasa del reloj molecular del ITS-2 en 0,8591%. El cálculo del tiempo de divergencia entre *Radix natalensis natalensis* y *Radix natalensis caillaudi* puede ser estimado a partir de la tasa de sustitución de base de *Radix* 0,8591%. Se encontraron un total de 7 diferencias nucleotídicas entre ambas y un 2,0% del total de las posiciones variables, por lo que *Radix natalensis natalensis* y *Radix natalensis caillaudi* divergieron hace 2,32 millones de años.

Habida cuenta que *R. natalensis caillaudi* ha sido descrita en partes del cauce del Río Nilo anteriores a la llegada a Egipto, cabe concluir que el origen paleobiogeográfico de *R. natalensis caillaudi* no debe buscarse en Egipto, sino Río Nilo arriba. De ello cabe concluir que este Lymnaeido muy probablemente llegará a Egipto por arrastre de las aguas del Nilo algo más tarde, evolutivamente hablando, pero siempre de manera muy anterior a la llegada del hombre.



#### 4.5.- ESTUDIO RETROSPECTIVO DE LA FASCIOLIASIS HUMANA EN EL MAGHREB

El amplio estudio retrospectivo de las características de la Fascioliasis humana en el presente trabajo se ha focalizado en los países de Marruecos, Argelia y Túnez en el Maghreb y de Egipto en el norte de Africa. El motivo de esta selección estriba en el doble interés de estos cuatro países debido en primer lugar a ser los países del Africa en los que la Fascioliasis humana presenta un mayor problema de salud pública por el número de casos reportados.

En un segundo lugar, la razón es por ser todos ellos ribereños del sur del Mar Mediterráneo y por tanto aquellos que implican un mayor riesgo de introducción de cepas susceptibles de parasitar al hombre en Europa, como consecuencia de fenómenos ligados al cambio climático, esencialmente el calentamiento lobal, y el cambio global incluyendo movimientos turísticos europeos hacia norte de Africa, inmigración desde Africa a Europa, y finalmente también intercambios comerciales en ambas direcciones.

Procedemos a continuación a dividir este estudio retrospectivo en dos partes, la primera para los tres países del Maghreb y que será de expansión más sucinta, y luego el análisis de la situación en Egipto, mucho más extenso dada las numerosas fuentes.



Figura 13.- Distribución geográfica de los países de Marruecos, Argelia y Túnez en el Maghreb y de Egipto en el norte de Africa, objeto de estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana.

#### 4.5.1.- CASUISTICA EN MARRUECOS

Los casos humanos de fascioliasis humana encontrados en Marruecos pueden ser clasificados en tres categorías: casos epidémicos o grupos de europeos, casos aislados de europeos y casos aislados de autóctonos (HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

Los casos epidémicos o grupos de europeos fueron los siguientes:

A) En Ahermoumou, casi la totalidad de un equipo de trabajadores dedicados a la recolección del maíz se infectaron por consumo de berros. Se trataba de nueve persona que presentaron eosinofilia. El diagnóstico se hizo por hallazgo de huevos en heces y mediante intradermorreacción al antígeno de distomatosis. Fueron tratados con emetina (BERTRAND & FAURE, 1956).

B) En Marruecos, 13 personas pertenecientes a 4 familias de la base aeronaval de Agadir presentaban una alta eosinofilia y nueve de ellos con signos clínicos de tipo toxico-infeccioso. La búsqueda parasitológica en la bilis mostró huevos de *F. hepatica* en 6 sujetos. La intradermorreacción (I.D.R.) del antígeno distomatoso practicado dió positivo en 3 personas. Unos berros parece que fueron los causantes de la contaminación de las familias (CANTAGRILL et al., 1955).

C) En Marruecos, en 1956, nueve obreros de una cantera de la region de Fez fueron probablemente infectados. Solían consumir berros de los alrededores. En dos casos había un estado tifoideo asociado (el serodiagnóstico de Widal fue positivo), pero la temperatura era persistente. A pesar del tratamiento con cloramfenicol, la hepatomegalia era dolorosa y la eosinofilia elevada (30%). Los autores tuvieron sus dudas sobre un diagnóstico de amebiasis hepática. El tratamiento con emetina fue efectivo. En dos casos, se sospechaba de una amebiasis hepática y se instauró un tratamiento con emetina, produciéndose una mejora de la enfermedad. En un caso apareció un absceso amebiano y se decidió operar. El hígado estaba grande, trufado de nódulos blanquecinos de 4 mm de diámetro. En un principio, el estudio anatomo-patológico hizo pensar en una forma nodular anormal de hepatitis vírica. La terramicina provocó una mejora transitoria. Finalmente, se obtuvo un diagnóstico por el antígeno distomatoso preparado por el laboratorio del Dr. Aboudaran. Los tres enfermos siguientes respondieron al diagnóstico con I.D.R. que resultó ser fuertemente positivo. La búsqueda de huevos por el tubo duodenal y coprológico en dos casos resultó negativa. El tratamiento con emetina mejoró repentinamente el estado clínico. El último enfermo presentaba un cuadro clínico idéntico y también fue tratado con emetina (HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

D) En Marruecos, de 1958 a 1960, se informaron de tres epidemias que aparecieron en las bases de Kenitra (1958-59), de Fez (1959) y de Khouribga (1959), y cinco casos de distomatosis hepática, con un caso familiar en Meknès entre 1959 y 1960 (MALENFANT, 1961).

Entre 1958 y 1959, en la base aeronaval de Kenitra, seis enfermos presentaban eosinofilia superior al 20 %. El I.D.R. practicado a cuatro enfermos resultó positivo. El tratamiento con emetina tuvo buenos resultados al provocar una regresión de los signos clínicos.

En 1959 hubo una epidemia en Fez, donde se examinaron a 616 personas y en 102 de ellas se encontró una eosinofilia superior al 7%. En estos últimos se practicaron las siguientes pruebas: el I.D.R. del antígeno distomatoso del Instituto Mérieux el cual fue positivo en 101 personas, el I.D.R. del antígeno de ascaridiano en 22 personas fue positivo, y por último, en las heces no se encontraron huevos.

Entre los 60 casos positivos al antígeno del I.D.R., solo 17 personas presentaban signos clínicos, basados en el estado general, signos digestivos, cutáneos, pulmonares, etc. Los últimos casos fueron tratados exitosamente con emetina. Los otros sujetos positivos al I.D.R. no tenían sintomatología clínica y no fueron tratados. Los exámenes de heces practicados durante meses en numerosas personas fueron negativos y la eosinofilia había disminuido.

En 1959 en Khouribga, se detectaron un total de 85 de hipereosinofilias asociadas a I.D.R. positivo. Solo una veintena de personas se quejaron de signos clínicos. La búsqueda de huevos en heces resultó negativa. El estudio demuestra que menos de un tercio de las personas que dieron positivo al I.D.R. del antígeno del Instituto Pasteur, presentaban síntomas clínicos.

En 1971 un estudio serológico informó que un 2% de individuos dieron reacciones positivas a 1/40 de inmunofluorescencia (BENCHERIT, 1971).

Los casos aislados de europeos en Marruecos se encontraron en 4 pacientes. El diagnóstico de *F. hepatica* se hizo por la presencia de huevos, excepto en dos pacientes que se hizo por estudios inmunológicos en 1959. En dos militares, la hipereosinofilia y la intradermorreacción al antígeno pusieron de manifiesto el diagnóstico (MALENFANT, 1961). También se encontraron duelas en un nódulo subcutáneo (DEKESTER, 1924).

Los casos aislados de autóctonos en Marruecos son relativamente raros porque el berro es raramente consumido. La contaminación parece ser por la ingestión de plantas con gusto ácido (*Oxalis cernua*, *Rumex tingitanus*, *Portulaca oleracea*) (MAAMOURI et al., 1968). En Casablanca se informó de un marroquí que le

diagnosticaron infección por *F. hepatica*, después de sufrir una hipereosinofilia mediante I.D.R. que dió fuertemente positivo. El paciente admitió haber consumido berros las semanas anteriores a los problemas clínicos (MALENFANT, 1961). Otro caso fue el de una mujer de 35 años que estuvo hospitalizada por un ataque agudo de colangitis litiásico. Presentaba fiebre y eosinofilia. Se le practicó una colecistectomía. En el examen de bilis se encontraron huevos de *F. hepatica*. La paciente fue tratada con praziquantel (Biltricid®) a una dosis de 75 mg/ kg tres veces diarias durante siete días con éxito. Otra mujer de 40 años procedente del medio rural fue hospitalizada con fiebre, problemas de la conciencia tipo desorientación y confusión. Desde hacía dos meses presentaba dolor en el hipocondrio. La laparatomía confirmó la presencia de adultos del parásito. Después de la colecistectomía recibió tratamiento satisfactorio con praziquantel (Biltricid®) (AIT ALI et al., 2002).

En un estudio parasitológico realizado en aguas residuales no tratadas en la localidad marroquí de "Ville Haute" en Kenitra llevado a cabo por el Instituto Nacional de Higiene de Rabat, se registró la presencia de varios parásitos entre lo que había unas concentraciones de 1 huevo/L de *F. hepatica* (ZAMO et al., 2003).

#### **4.5.2.- CASUÍSTICA EN ARGELIA**

Siguiendo la misma clasificación que en Marruecos, agrupamos los casos en casos epidémicos o grupos de europeos, casos aislados de europeos y casos aislados de autóctonos (HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

Se encontraron los siguientes casos epidémicos o grupos de europeos:

En Argelia, cuatro familias europeas (12 personas) que vivían en la misma casa de Bougie (Bajaïa), presentaban diferentes signos clínicos y una eosinofilia importante (60%). Dos meses antes de los primeros síntomas consumieron berros de una misma plantación. La búsqueda de huevos en heces y bilis resultó ser negativa. Por el contrario, el I.D.R. del antígeno de distosoma del Instituto Pasteur fue fuertemente positivo. En todos los casos, el tratamiento con emetina consiguió la curación (COUMBARAS, 1966).

Los casos aislados de europeos encontrados en Argelia fueron 14. El diagnóstico de *F. hepatica* se hizo por la presencia de huevos. La coprología fue positiva en 12 casos, en uno se hizo sondaje duodenal y en otro paciente se utilizaron ambas técnicas. En un caso se encontraron duelas del parásito mediante colecistectomía, y en

un caso postmortem se encontraron ejemplares del parásito en el hígado tras la autopsia (HAZOUG-BOEHM et al., 1979; CHAKER et al., 1979).

Muy interesantes fueron tres casos de infestación en una misma familia. Se trataba de un hombre de 52 años, comandante en activo de regreso a Setif, después de una estancia de dos años en Inglaterra. Hizo toda su carrera en África del Norte sin enfermar. Tras síntomas de hepatomegalia, eosinofilia (70%) y fiebre se le detectó *F. hepatica* por presencia de huevos. Extrañado por la enfermedad se evaluó a su hijo que además de *Fasciola* llevaba una tenia desde hacía dos años. Se pensó en su mujer y también estaba infectada. Solo uno de ellos presentaba un cuadro mórbido con un gran hígado, esplenomegalia, fiebre, anemia y astenia. Se instauró un tratamiento de emetina (FRIES, 1946). Otro caso de fascioliasis humana fue encontrado también en Setif (SENEVET & CHAMPAGNE, 1929).

Otro caso fue el de un militar que llevaba 12 meses en Argelia, se evacuó de la enfermería de su unidad por sospecha de tuberculosis pulmonar: estado súbfebril con astenia creciente y cefáleas frontales. Apareció un punto en el lado torácico posterior derecho y tos. Se confirmó por fluoroscopia una imagen pulmonar sospechosa, como asentada en el hemitórax derecho. Después de descartar la tuberculosis por la ausencia de bacilos de Koch, se realizó una radiografía donde se muestra la existencia de una imagen infiltrativa interhiloaxilar derecha, homogénea, borrosa y de límites imprecisos. Se realizó un hemograma y se obtuvo una eosinofilia del 43%. La hepatomegalia y principalmente la noción del consumo de berros salvajes hicieron pensar en la distomatosis. Por contra, los exámenes microscópicos de las heces son negativos y los exámenes en el tubo duodenal positivos. En la terapéutica se utilizó dehidroemetina (BERENI & DUBOUREAU, 1963).

Con respecto a los casos aislados autóctonos se detectaron varias situaciones en la región de Constantina. Según los autores (HAZOUG-BOEHM et al., 1979), era un hecho sorprendente la presencia de un caso aislado en una región donde esta enfermedad no es común. Los hábitos alimentarios no difieren de los de otros habitantes de la región. La colección de plantas acuáticas ácidas (*Oseille* y *Oxalis cernua*) es frecuente. En una mujer originaria de la región se hallaron muchos huevos de duelas encontrados en la vesícula biliar mediante colecistectomía (CHARTRON, 1935). En Octubre de 1934, una persona de 26 años que vivía en Argel, después de varios años manifiesta muy bruscamente una crisis dolorosa. La fórmula leucocitaria practicada comportó un 21% de eosinofilia, orientando hacia un diagnóstico de parasitosis probable. Los huevos de *F. hepatica* fueron encontrados en heces y en el líquido duodenal. Se le hizo un tratamiento con emetina (MANCEAUX & ALCAY, 1939).

Otro caso fue el de un paciente que vivió en Medea y residía en Argel. Ante los síntomas, se pensó que se trataba de una litiasis biliar antigua, complicada y que obstruía el coledoco por un cálculo, y se hizo la intervención quirúrgica. Al retirar el explorador introducido en el coledoco, se detectó una duela enrollada sobre sí misma que resultó ser una *F. hepatica*. La búsqueda de huevos en heces resultó negativa (MAURY & PELISSIER, 1924).

En 1974, se observó el segundo caso de distomatosis autóctona, en el que un paciente de 20 años originario de Sidi-Abdelozy (El Milia) ingresó en un Centro Hospitalario de Constantina por retraso en el desarrollo y principalmente por un síndrome doloroso del hipocondrio derecho. El cuadro clínico recordaba el de una amebiasis hepática y se pasó a la cirugía donde la intervención no confirmó el diagnóstico, pero permitió una biopsia de la pared del absceso. El estudio histológico mostró restos de membranas ovulares de un helminto, los huevos estaban muy deformados y parcialmente destruidos. No estaban situados en los canales biliares. El diagnóstico de *F. hepatica* se obtuvo mediante examen coprológico. En un principio, los huevos resultaron extremadamente raros en las heces, pero según los autores el método de Kato permitió descubrirlo. Los huevos tenían su aspecto habitual, aunque los límites de la válvula no eran visibles con esta técnica. El suero del enfermo fue positivo al antígeno de *F. hepatica* (HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

También en Constantina, un paciente de 13 años y originario de la región, se encontraba en Estrasburgo para evaluar su sordomudez. Una evaluación biológica permitió descubrirle una eosinofilia del 13%. Un examen coprológico mostró dos huevos de *Ascaris*, de *Trichostrongylus*, quistes de *Entamoeba coli*, de *Giardia lamblia* y principalmente huevos de *F. hepatica*. Los exámenes coprológicos se hicieron después de varias horas de régimen alimenticio para eliminar la posibilidad eventual de huevos de *Fasciola* en tránsito. Todos se mostraron positivos. Este es un caso de distomatosis hepatobiliar contraída en la región de Constantina, por un niño que jamás había salido de su país de origen. El tratamiento de la distomatosis y de otras parasitosis se llevó a cabo con dehidrohemetina (Entobex). Los exámenes coprológicos de control se hicieron regularmente, y resultaron negativos 12 horas después del comienzo del tratamiento y el resto también negativos 1 mes después del comienzo del tratamiento. La eosinofilia mostró un incremento en el transcurso y al finalizar el tratamiento (HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

En Argel, un hombre de 38 años llegó en 1987 al hospital para una exploración de una hipereosinofilia sanguínea. La afección se inició hacía dos meses. La sintomatología digestiva consistía en dolor gastrointestinal leve alternando la diarrea y

el estreñimiento, y un adelgazamiento no significativo. La tasa de eosinófilos fue del 52% y había ausencia de anemia. El paciente tenía una noción de haber consumido recientemente berros crudos. Se le practicó un serodiagnóstico de distomatosis; la inmunodifusión doble (I.D.D.) de acuerdo con el método de Ouchtcherlony utilizando el diagnóstico de *F. hepatica* fué positivo revelando dos arcos. La inmunoelectroforésis (I.E.P.) fué positiva con cuatro arcos. La inmunoelectrodifusión (I.E.D.) resultó positiva y reveló un arco. La hemoaglutinación pasiva (H.A.P.) fué positiva con una tasa de 5/120. Las muestras coproparasitológicas de las heces dieron negativas. Se administró una primera dosis de dehidroemetina de 1 mg/kg/día cada 10 horas. Después del tratamiento la eosinofilia remitió al 16%. En otro caso, una mujer de 34 años, llegó por serodiagnóstico de distomatosis. A la pregunta si recuerda el consumo de berro responde que en Argelia pero también en Francia. La afección se declara por astenia y dolores en el hipocondrio derecho. El serodiagnóstico fue positivo, utilizando antígeno de *F. hepatica*. Paralelamente, los exámenes parasitológicos de las heces no revelaron nada. El diagnóstico serológico hizo sugerir un estudio familiar. Un estudio serológico se hizo en el entorno del paciente y una inmunoelectroforésis también a su marido. Ambos pacientes se trasladaron a Francia donde se les administró Biltricide® 10 días consecutivos y flubendazol durante 30 días. En otro caso, un hombre de 35 años, originario de Argel, fue remitido por una eosinofilia. La enfermedad se manifestó únicamente por dolores en el hipocondrio derecho irradiándose al hombro. Ante estos síntomas de cálculos biliares, se realizó una ecografía que resultó normal. En el interrogatorio recuerda haber consumido berro en Argelia. Presenta una tasa elevada de eosinófilos (54%). El examen parasitológico de heces no mostró nada en particular. La serología en busca de *Larva migrans* resultó negativa, y se realizó una inmunoelectroforésis utilizando antígeno de *F. hepatica* que resultó ser positivo (BELKAID et al., 1989).

En Jijel un paciente de 24 años fue hospitalizado en dos ocasiones por una diarrea. Estaba asténico, no icterico, y con ligero dolor en el área hepática. El examen de heces mostró la presencia de huevos de *F. hepatica* (HAMRIOUI et al., 1980).

Un estudio recogió cuatro casos de fascioliasis en Mustapha. Los pacientes eran mujeres de 10, 20 y 42 años de edad, y un hombre de 32 años. El diagnóstico se basó en síntomas clínicos en dos casos y en los otros dos en la presencia de hipereosinofilia. En dos casos *F. hepatica* fue identificada en muestras de heces. Un cuestionario reveló que todos los pacientes habían comido plantas silvestres vegetales que habían sido compradas en la ciudad. Se trataron con Biltricide® (Praziquantel) satisfactoriamente (ZAIT & HAMRIOUI, 2005).

#### 4.5.3.- CASUISTICA EN TUNEZ

De los 36 casos humanos registrados en Túnez desde 1940, la mayoría eran niños y más frecuentemente han sido informados al sudoeste del país (AYADI et al., 1997).

Se encontraron cuatro casos aislados de europeos. Uno fue diagnosticado por coprología, y el otro por coprología y sondaje duodenal. Al tercero se le encontraron duelas mediante colecistectomía. En el cuarto caso ocurrido en 1968, el estudio inmunológico permitió el diagnóstico de distomatosis. La búsqueda de huevos resultó negativa y la infestación ocurrió menos de dos meses antes del diagnóstico (ZAIMI et al, 1971; HAZOUG-BOEHM et al., 1979).

Respecto a casos aislados autóctonos se conocieron cuatro casos. En 1968, en un niño de Nefta se encontraron 60 huevos de *F. hepatica* por gramo de heces. En la autopsia, se retiraron 18 duelas de su hígado (MAAMOURI et al., 1968). En 1969, en dos niños de 5 y 9 años de una familia tunecina de Tozeur, la coprología fue negativa, pero la seroinmunología puso de manifiesto el diagnóstico. En el mismo año, un tunecino había consumido hierbas ácidas crudas en Gafsa poco tiempo antes. Consultó al médico por diversos signos clínicos. La inmunología permitió el diagnóstico de *Fasciola*, mientras que la coprología fue negativa (ZAIMI et al., 1971).

En otro niño de 12 años, que había consumido hierbas ácidas "Gourissa" en el Oasis Haouer, la infección le indujo manifestaciones neurológicas que le provocaron convulsiones. Este hallazgo estimuló realizar un estudio epidemiológico en la zona (AYADI et al., 1971, 1993, 1997).

Una mujer de 46 años sufrió una infección de *Fasciola* acompañada de una artritis que implicaba a la espina y le hacían andar con deterioro (SELLAMI et al., 2002).

Un paciente sufrió de obstrucción del conducto biliar común y colangitis debido a la ocupación de *Fasciola* en los conductos biliares (KHELIFI et al., 2006).

En recientes estudios epidemiológicos llevados a cabo de Julio del 2004 a Junio del 2005 en los oasis de Gafsa, la prevalencia de la infección humana fue del 6,6% (HAMMAMI et al., 2007).



## 4.6.- ESTUDIO RETROSPECTIVO DE LA FASCIOLIASIS HUMANA EN EGIPTO

### 4.6.1.- DISTRIBUCION SEGUN FECHA DE LOS ARTICULOS

A continuación, de acuerdo al número de casos humanos publicados se obtiene, la siguiente evolución por décadas: 1920-1929: 1 artículo (1 caso); 1950-1959: 1 artículo (11 casos); 1970-1979: 2 artículos (45 casos); 1980-1989: 13 artículos (154 casos); 1990-1999: 51 artículos (1935 casos); 2000-2010: 56 artículos (4833 casos); 2010-2012: 9 artículos (342 casos).

Cabe destacar que la fascioliasis humana en Egipto se conoció sobre una base individual (HASEEB et al., 2002). Para encontrar la primera evidencia de manifestación de *Fasciola* en Egipto debemos remontarnos a los tiempos faraónicos donde se hallaron restos del parásito en el hígado de una momia egipcia (CURRY et al., 1979). Es en pleno siglo XX, cuando CHESTER (1928) informa de la siguiente presencia del trematodo en Egipto, describiendo el agente causal como *F. hepatica*. Se trata de un caso fatal en un soldado de 21 años que murió tras varios meses de enfermedad desconocida con diarrea y caquexia. Posteriormente se encontraron 12 duelas del parásito, acompañadas de las típicas modificaciones de la infección en hígado y conductos hepáticos (LIEVRE, 1932).

El siguiente artículo que encontramos en la literatura nos traslada al año 1958 donde se comunican 11 casos (KUNTZ et al., 1958). Probablemente, los huevos de *Fasciola* se observaron más frecuentemente de lo que se ha publicado en la literatura. Sin embargo, el primer caso confirmado parasitológicamente se diagnosticó en 1978 en el área de Abis, un barrio del distrito de Alejandría que fué declarado un foco endémico y se considerara un problema de salud público en extensión (FARAG et al., 1979). A partir de este momento, y en las próximas décadas, se empieza a demostrar una preocupación por la enfermedad en humanos desconocida hasta el momento que se refleja en la proliferación de la publicación de trabajos, siendo más fructífera en la década de los 90 y a principios del siglo XXI. De hecho, a partir de los 80, y después del primer foco humano, los trabajos se amplían al resto de gobernaciones del Delta del Nilo (HASEEB et al. 2002), incluso en aquellas pertenecientes al Alto Egipto (ESTEBAN et al., 1998).

En esta evolución, se observa también una tendencia en la notificación de casos y, de hecho, ESTEBAN et al. (2003) apuntan que aunque el número de casos en Egipto se incrementa cada año, casi toda la información está basada en pacientes diagnosticados en hospitales. Las bases de datos que existen sobre la población en

relación a las características epidemiológicas de la infección son escasas, insuficientes con respecto a la prevalencia, y no proporcionan información sobre la intensidad y concomitancia de las infecciones parasitarias.

#### 4.6.2.- DISTRIBUCION SEGUN GENERO

De los 6979 casos de fascioliasis humana registrados en Egipto, sólo en 51 artículos se especifica el género de los pacientes. De ellos, 1520 (51,5%) son mujeres y 1431 (48,49%) fueron hombres. Diversos estudios se han publicado constatando una mayor prevalencia de la infección en mujeres. En el primer foco de fascioliasis humana reportado en el Delta del Nilo, la prevalencia de mujeres alcanzó el 70% y en hombres fue del 30% (FARAG et al., 1979). Estudios posteriores también registraron un mayor número de casos entre las mujeres; 87 mujeres y 47 hombres (EL-MORSHEDY et al., 1999); en el estudio llevado a cabo por MAHER et al., (1999) con el objetivo de evaluar la inmunodiagnos de la infección, de los 60 participantes, 49 eran mujeres y 11 hombres.

Otros trabajos donde se demuestra la prevalencia superior en mujeres fueron: (FARAG et al., 1988) 5 mujeres y 3 hombres; (BASSIONY et al., 1991) 11 mujeres y 3 hombres; (DOWIDAR et al., 1999) 6 mujeres y 3 hombres; (MOTAWEA et al., 2001); (MATTAR & EL-TOUKHY, 2004), 31 mujeres y 19 hombres; (MASSOUD et al., 2004) de un total de 35 pacientes, 27 eran mujeres y 8 eran hombres; (SOLIMAN et al., 2004) 13 mujeres y 8 hombres; (ABO-MADYAN et al., 2004) la mayoría de casos fueron mujeres (52,9%) y amas de casa (41,2% y también analfabetos (52,9%); (BARDUAGNI et al., 2008) 6 mujeres y 4 hombres; (OSMAN et al., 2010) 53% mujeres (9 casos), (KEISER et al., 2011) con 22 mujeres y 17 hombres infectados; (ESTEBAN et al., 2003) la prevalencia es más alta en mujeres 14,8% (67 casos) que en hombres 8,8% (20 casos). También en un estudio transversal de caso-control (CURTALE et al., 2003b) se recogió una diferencia significativa en la distribución del sexo, siendo 42 las mujeres y 11 los hombres afectados, pero en otro estudio del mismo autor en el mismo año (CURTALE et al., 2003a), la prevalencia de la infección fué mayor, con un 6,2% en mujeres y en hombres 4,3%, aunque no resultó ser una diferencia significativa. Aunque no había diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en la infestación por *Fasciola* spp. entre hombres (3,9%) y mujeres (5,9%), estas últimas demostraron ser más susceptibles a la infestación que los hombres en el trabajo de ABDEL AAL et al. (1999).

La prevalencia de mujeres fue de 5,1% (494 casos) y en hombres de 3,6% (428 casos) en otro estudio (CURTALE et al., 2007). Las niñas en la escuela primaria (6-12 años) estaban significativamente más infectadas que los niños. El nivel de la infección más elevado entre las chicas fue consistente a través de los diferentes años de las investigaciones, desde el 1998 al 2002, y en las diferentes áreas de estudio del Delta del Nilo, a excepción del 2001, cuando, a pesar del hecho de que los niños presentaban 40% de prevalencia de la infección más baja que las chicas, el limitado número de sujetos en el cribado no hizo posible encontrar una significancia estadística para la diferencia.

Aunque en menor número pero los trabajos donde la cantidad de hombres infectados es mayor también es a considerar: (RAGAB & FARAG, 1978), 4 chicos y 1 chica; (FARID et al., 1988), 5 chicas y 13 chicos; (ROSSIGNOL et al., 1998) de los 137 pacientes, 111 eran hombres y 36 mujeres; (HUSSEIN et al., 1994) 31 chicos y 19 chicas; (EL KARASKY et al., 1999) de 40 niños, 32 chicos y 8 mujeres; (HUSSEIN et al., 2000), en Abis 7, 5% de los hombres y 6,4% de las mujeres fueron positivos, pero en Abis 8 la diferencia fué estadísticamente significativa con un 8% de hombres y un 12,8% de mujeres; (MASSOUD et al., 2001) 2 mujeres y 5 hombres; (CURTALE et al., 2000) estudio en el que se reclutaron 340 participantes hombres y 5 de ellos dieron positivos, trabajadores, de edades entre 7-19 años; (KABIL et al., 2000), de los 125 participantes en el estudio 76, eran hombres y 49 mujeres; (HASSAN et al., 2000) de 60 pacientes, reclutados, 37 eran hombres y 23 mujeres; (HASEEB et al., 2003), 11 hombres y 9 mujeres; (ZAKI, 1979) informó de una prevalencia más alta en hombres (1,4%) que en mujeres (0,3%); (NOURELDIN et al., 2004) 26 mujeres y 34 hombres; (EL-SHAZLY et al., 2005) 26 hombres y 22 mujeres.

Y finalmente, estudios donde los casos de hombres doblaban los de mujeres: (HISMAT et al., 1995) el número de casos infectados 18 fue el doble que de mujeres infectadas 9; (NEGM et al., 1995) 12 casos eran hombres y un caso mujer, y un estudio donde el 100% de afectados eran del género masculino con un total de 50 hombres (EBIED et al., 1993). Haciendo referencia a la concomitancia con otro parásito, (OSMAN et al., 2011) especifica que la coinfección con *Schistosoma mansoni* es superior en hombres un 57%. Sin embargo, SAFAR et al. (2005) concreta que no hubo diferencias significativas en la distribución de la edad y el sexo.

El grupo de edad más afectado en mujeres comprende desde los 5 años hasta menos de 15 años (FARAG et al., 1979; EL SAHN et al., 1995), y desde los 16 a los 35 años (EL SHAZLY et al., 1991; EL SAHN et al., 1995; ABDEL AAL et al., 1999).

Cabe destacar los trabajos donde se observan casos de niñas menores de 6 años: una niña infectada (FARAG et al., 1979), otra niña menor de 5 años (FARAG et al., 1988), dos niñas menores de 4 años, una de ellas de 15 meses (HISMAT et al., 1995), otra niña que tenía 6 años (HASEEB et al., 2003), y en un estudio donde las 87 mujeres dieron positivo, el rango de edad era de 2-80 años, lo que cabe suponer que un caso al menos era de ese mínimo de edad (EL-MORSHEDY et al., 1999).

El grupo de edad más afectado en hombres abarca desde los 5 años hasta menos de 15 (FARAG et al., 1979; HISMAT et al., 1995; NEGM et al., 1995), entre los 16 y 35 años (EL SHAZLY et al., 1991; ABDEL AAL et al., 1999). CURTALE et al., (2000) especifica que los 5 hombres que dieron positivo tenían entre 7-19 años de edad. La mínima edad de varones fueron 2 niños de menos de 4 años (HISMAT et al., 1995), y dos niños de 3 y 4 años de edad (HASEEB et al., 2003).

Respecto a la relación de la intensidad de la infección con el género femenino se encuentran las siguientes menciones: 4 mujeres de edades entre 7-15 años tuvieron una intensidad relativamente alta igual o superior a 288 huevos por gramo de heces (epg) (OSMAN et al., 1999); en la localidad de El-Kazza la intensidad más alta que se detectó fue una niña de 9 años quien excretó 432 epg (ESTEBAN et al., 2003); y en (CURTALE et al., 2007) las medias aritméticas y geométricas de epg fueron más altas entre mujeres que en los hombres. Por otro lado, también se encontraron trabajos donde se calcula la intensidad para ambos sexos y el resultado es que no se obtuvieron diferencias significativas entre mujeres y hombres: media geométrica de huevos 60-69 epg (EL MORSHEDY et al., 1999), tampoco en la intensidad en Behera hubo diferencias en la infección de *Fasciola* spp. siendo en hombres la máxima de 576 epg y en mujeres de 528 epg (CURTALE et al., 2003a), y finalmente, 26 hombres y 22 mujeres, informándose de una infección ligera (epg<40) en 29 casos, moderada (epg 40-80) en 13 casos, y grave (epg>80) en solo 6 casos, no encontrándose una relación significativa entre el sexo de los pacientes y los epg (EL-SHAZLY et al., 2005).

Las diferencias de género no son normalmente observadas en enfermedades parasitarias transmitidas a través de la comida, especialmente en un país como Egipto, donde tradicionalmente todos los miembros de la familia comparten la misma comida. Sin embargo, a diferencia de los niños, las niñas están involucradas en la preparación de las comidas del hogar, estando expuestas a la manipulación de diferentes clases de vegetales, que se comen crudos en ensaladas y suelen llevar enquistadas las metacercarias (EL SAYED et al., 1997).

Así, según EL BAHY (1997), la tasa de infestación de Fascioliasis no tiene límite de edad o sexo pero depende principalmente de los hábitos de comida de la gente y de sus medidas generales de higiene.

También se ha citado una relación con el absentismo escolar, más usual en niñas cuyas madres justifican en el colegio que son requeridas en casa para las tareas domésticas. Además un estudio del año 2000 sobre la Salud y Demografía en Egipto estimó que el 25% de las niñas que viven en áreas rurales nunca habían asistido a la escuela o la abandonan, comparado con el 14% de los niños. En este estudio también se confirma la tasa de asistencia a clase (55 vs 45%), al recogerse una muestra aleatoria representativa de los niños de escuela primaria, no estando presentes todas las chicas en el cribado de este estudio, por lo que resultó razonable asumir que las tasas de prevalencia e intensidad hubieran sido mayores (CURTALE et al., 2007).

De hecho, el papel de la mujer en la infección es crucial en Egipto incluso como madre, encontrándose la prevalencia y el riesgo de infección significativamente más elevados en niños cuyas madres se hallaban infectadas (EL SAHN et al., 1995).

El papel del género en Egipto puede estar relacionado con aspectos culturales, higiénicos y de comportamiento, ya que las mujeres se asocian más con el lavado de ropa y utensilios de cocina en los grandes canales donde los Lymnaeidos transmisores están presentes, plantaciones agrícolas como campos de arroz, además de la preparación de las comidas y la manipulación de plantas de río que potencialmente pueden llevar la metacercarias adheridas. Las chicas pueden tener más contacto con los focos de transmisión, con la base de que suelen ausentarse de la escuela más a menudo que los chicos (ESTEBAN et al., 2003).

#### **4.6.3.- DISTRIBUCION SEGUN EDAD**

La edad en años se especificó en 5057 pacientes (72,46%) descritos en las publicaciones. En un caso se anotó como adulto (RAGAB et al., 1988), 30 casos se refirieron como escolares (HASSAN et al., 1996) y en 50 pacientes se refiere a 10 años o más (FARAG et al., 1998).

El intervalo de edad fué desde los 0 años (MABROUK et al., 1994; CURTALE et al., 2000b) hasta los 90 años (KABIL et al., 2000).

Para poder estimar la media de la edad de la población afectada con el fin de poder comparar los estudios, se debe tener en cuenta que muchos de ellos aportan diferentes medidas sobre la edad, y consideramos que es necesario que contengan

como mínimo el tamaño de muestra (N), la distribución de la edad y alguna medida de tendencia central o de frecuencia de ocurrencia de casos, es decir, hacia donde se dirigen más los casos. Por ejemplo, una muestra de esta generalidad se muestra al informar de 50 casos detectados definiendo la distribución de la edad en 10 años o más (FARAG et al., 1998). Es por ello que hemos tenido que dividir los artículos en dos grupos: trabajos donde se especifica la edad y/o la media de edad, y por otro lado, artículos donde se manejan intervalos de edad más prevalentes de la infección. En el primer grupo hemos obtenido los siguientes resultados:

- Media específica de edad: 25,04 ± 13,32
- Intervalo de mayor prevalencia: 6-12 años

#### **4.6.4.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA FASCIOLIASIS HUMANA**

De los 6979 casos humanos encontrados en la literatura, el origen geográfico de los pacientes se determinó en 6507 pacientes (93,23%), mientras que en los 472 (6,77%) casos restantes no se incluyó la procedencia de los casos, estando relacionada la mayoría de estas publicaciones con ensayos realizados en el laboratorio de carácter inmunológico, evaluación de medicamentos o de pruebas de tipo serodiagnósticas (SAAD, 1984; FARAG et al., 1988; KHALIL et al., 1989; HASSAN et al., 1989; ABDEL-RAHMAN et al., 1990; ABOU-BASHA et al., 1990; YOUSSEF et al., 1991; SALEM et al., 1993; OSMAN et al., 1994; AZAB et al., 1996; SABRY et al., 1997; MANSOUR et al., 1998; ABO-SHOUSHA et al., 1999; ABOU-BASHA et al., 2000; entre otros).

Cabe destacar que en muchos trabajos se especifica el pueblo, el distrito y si no, como mínimo la gobernación o provincia de procedencia donde el caso es diagnosticado (BASSIOUNY et al., 1991; ABDEL-RAHMAN et al., 1990a; MABROUK et al., 1994; YASSIEN et al., 1996; ROSSIGNOL et al., 1998; ARAFA et al., 1999; EL-MORSHEDY et al., 1999; CURTALE et al., 2000a; CURTALE et al., 2000b; KABIL et al., 2000; HUSSEIN et al., 2000; ABDEL-RAHMAN & BARAKAT, 2000; EL-SHAZLY et al., 2001; EL-SHAZLY et al., 2002; CURTALE et al., 2003a; CURTALE et al., 2003c; MOHAMED et al., 2004; MASSOUD et al., 2004; ABO-MADYAN et al., 2004; SAFAR et al., 2005; ZAKARIA et al., 2001; CURTALE et al., 2005; EL-SHAZLY et al., 2006b; EL-AHL et al., 2007; CURTALE et al. 2007; BARDUAGNI et al., 2008; MASSOUD et al., 2010; OSMAN et al., 2010; KEISER et al., 2011; OSMAN et al., 2011). Por otro lado, hay otras publicaciones en los que se detalla el centro sanitario al que acuden como pacientes ambulatorios (EL-SHAZLY et al., 1991; EL-SHAZLY et al., 1993; DARWISH

& EL GAMMAL, 1995), departamento por ejemplo de Parasitología de hospitales (EBIED et al., 1993; HAMMOUDA et al., 1997; SALAMA et al., 1988; MATTAR & EL-TOUKHY, 2004; HOLW et al., 2007; ALI et al., 2012), departamentos pediátricos (EL-KARASKY et al., 1999), o bien hospitales de referencia o instituciones sanitarias donde son examinados y/o diagnosticados (FARAG et al., 1986; MIKHAIL et al., 1990; FAWZY et al., 1992; ABDUL FATTAH et al., 1992; HUSSEIN et al., 1994; EL-ZAWAWY et al., 1995; AATY & HASHIM, 1996; ABDEL WAHAB et al., 1996; GABBOUR et al., 1997); FARAG et al., 1998; DOWIDAR et al., 1999; SHEHAB et al., 1999); MAHER et al., 1999; HASSAN et al., 2000; EL-MORSHEDY et al., 2002; OTEIFA et al., 2003; MAHROUS et al., 2003; HEGAB & HASSAN, 2003; EL DIB et al., 2004; MASSOUD et al., 2004; HASSAN et al., 2004; SOLIMAN et al., 2004; EL-SHAZLY et al., 2005a; EL-SHAZLY et al., 2005b; EL-KERDANY et al., 2005; WAHIB et al., 2006; DEMERDASH et al., 2011). En la mayoría de estos casos, es lógico suponer que los pacientes residían y debieron haber adquirido la enfermedad en una localidad cercana a estos centros, y acuden al centro sanitario más próximo, al menos el de su propia gobernación (ATA et al., 1988). Algún caso como 18 niños extremadamente enfermos, con síntomas de fiebre, eosinofilia y hepatomegalia procedentes de diferentes pueblos del Delta del Nilo, fueron referidos al Abbasia Fever Hospital de El Cairo, es decir, fueron referidos a otra gobernación (FARID et al., 1988).

Egipto se encuentra en el extremo noroeste del continente africano, posee costas sobre el Mar Mediterráneo y el Mar Rojo, y su territorio ocupa una superficie de 1.001.450 km<sup>2</sup>. Está ocupado en su inmensa mayoría por el desierto del Sahara y surcado por un único río, el Nilo, que riega la única tierra fértil del país y que ha sido la principal fuente de riqueza y ha permitido el desarrollo de varias culturas a lo largo de la historia de Egipto. Desemboca en el Mediterráneo formando un delta de unos 200 km de extensión en dirección norte-sur y entre Alejandría y Damietta en dirección este-oeste.

Egipto está organizado política y administrativamente en 27 gobernaciones o provincias. Su población actual son aproximadamente 83 millones de personas, de los cuales casi la mitad viven en áreas urbanas, sobre todo en los centros densamente poblados, como son El Cairo y Alejandría. Hay provincias totalmente "urbanas" y otras con mezcla de ambiente "urbano" y "rural". La diferencia oficial entre "urbano" y "rural" se refleja en los niveles administrativos más bajos, es decir, las gobernaciones totalmente urbanas no tienen regiones, como el markaz, un conglomerado de aldeas. Algunas provincias solo incluyen una ciudad, como en el caso de El Cairo o Alejandría, y estas gobernaciones de una ciudad solo se dividen en distritos o barrios urbanos. El

Cairo consta de 23 distritos y Alejandría de seis. Casi la otra mitad de los 80 millones de habitantes de Egipto vive en la tierra fértil del Delta del Nilo, donde Alejandría es la ciudad más densa con 4 millones de personas residiendo.

La división territorial entre Bajo y Alto Egipto tiene sus orígenes en el período predinástico y hace referencia a la zona del Delta y la zona sur respectivamente. El Bajo Egipto que comprende las tierras fértiles del Delta del Nilo está formado por las provincias de Alejandría, Behera, Kafr el Sheikh, Gharbiya, Minufiya, Qalyubiya, Dakahlia, Damietta, Sharqiyah y Port Said.

La mayoría de los casos humanos de Egipto se concentran en las provincias que conforman el Delta del Nilo. A continuación se detallan los casos encontrados en cada una.

En la provincia de Alejandría: 10 casos (FARAG et al., 1986), 40 casos (FAWZY et al., 1992), 50 casos (EBIED et al., 1993), 30 casos (EL-ZAWAWY et al., 1995), 28 casos (GABBOUR et al., 1997), 10 casos (HAMMOUDA et al., 1997), 50 casos (FARAG et al., 1998), 9 casos (DOWIDAR et al., 1999), 17 casos (EL GOHARY et al., 1999), 40 casos (SHEHAB et al., 1999), 16 casos (EL-MORSHEDY et al., 2002), 30 casos (MAHROUS et al., 2003), 20 casos (EL-KERDANY et al., 2005), 32 casos (HOLW et al., 2007), 16 casos (OSMAN et al., 2010) y casos donde se constata la presencia de la infección (ABOU-BASHA et al., 1990; FARAG et al., 1995).

En la propia ciudad de Alejandría: 14 casos viviendo en Alejandría (BASSIOUNY et al., 1991), 287 casos en Alejandría y áreas rurales (FARAG et al., 1993), 1 caso de Alejandría (ROSSIGNOL et al., 1998), 5 casos en barrios de Alejandría (CURTALE et al., 2000a). Presencia en Backos, barrio de Alejandría de *Fasciola* asociada a *Helicobacter pylori* (EL MASRY et al., 2003) y en El-Prince, un pueblo suburbano de Alejandría, 14 casos (2,4%) (FAWZI et al., 2004).

En Abis, ubicado al suroeste de Alejandría, comprende 10 aldeas con una población aproximada de 35,000 personas, alimentada por canales de agua desde el río Nilo, sin acceso al mar Mediterráneo se encontraron: 3 casos (RAGAG & FARAG, 1978), en Abis II, 40 casos (7,3%) (FARAG et al., 1979), 5,6% prevalencia en Abis II (MANSOUR et al., 1983), 10 casos (ABDEL-RAHMAN et al., 1990a), 137 casos (ROSSIGNOL et al., 1998), 134 casos (EL-MORSHEDY et al., 1999), 200 casos en Abis 1 (5,5%) (ABOU-BASHA et al., 2000a), prevalencia del 5,1% (ABOU BASHA et al., 1992), en Abis 7 y Abis 8, 381 casos (7,3%) (HUSSEIN et al., 2000), 24 casos (MOHAMED et al., 2004), 19 casos (KEISER et al., 2011).

Behera es una de las mayores provincias de Egipto. Se extiende a lo largo de la cara oeste del Delta desde Alejandría en el norte hasta la provincia de Giza al sur.



Tiene una población superior a los 4 millones de personas. Está distribuida en 14 ciudades centrales con sus campos.

En la provincia de Behera: 191 casos (2,2% de prevalencia) (OSMAN et al., 2011), 3,6% de niños (CURTALE et al., 1998).

Distribuidos en Damanhour, Abu Hommos, Hosh-Eassa, El-Mahmodiya, Kafr El-Dawar, Delengat, Abou-El Matameer, Rashed se encontraron 27 casos (HISMAT et al., 1995), prevalencia 3,0% en Bulin, Abis, Delengat, Hoss Eisa (CURTALE et al., 2000b), 72 casos (5,4%) en Kafr El-Dawar, Hosh Eissa y Delengat (CURTALE et al., 2003a), 3,6% prevalencia en 1999, después de la monitorización en 2000 fué de 1% y en 2002 del 0,8% en Abou-El Matameer, Abou Hommos, Kafr El-Dawar, Delengat, Rahamania y Hosh Eissa (CURTALE et al., 2003c), en El Aaly, Bolin (Kafr El-Dawar), El Kazza (Hosh Eissa, Tiba (Delengat) se detectaron un rango de prevalencias de 5,2-19,0% con una media del 12,8% (87 casos), la más alta obtenida en Egipto (ESTEBAN et al., 2003) después de las reportadas por FARAG (1997), también en los 6 distritos endémicos Delengat, Abu Hommos, Abu El Matameer, Kafr El-Dawar, Hosh Eissa y Rahamania se alcanzó en 1996 el 5,6% de prevalencia en la región y se disminuyó a menos de un 1% en 2002, después del tratamiento selectivo llevado a cabo por el Ministerio de Salud y Población dirigido a grupos de edad de riesgo en pueblos del año 1998 al 2002 (CURTALE et al., 2005), 932 casos (4,3%) en los seis distritos endémicos (CURTALE et al. 2007), y 10 casos en Kafr El-Dawar y Hosh Eissa (BARDUAGNI et al., 2008).

En el área de Abis, perteneciente a la provincia de Behera, se descubrieron 382 casos (11%) (EL-SAHN et al., 1995). En El-Haddad El-Bahary, noreste del Delta, típico pueblo rural con canales alimentados del río Nilo y sin acceso al Mediterráneo con una población de 8144 personas, se hallaron 22 pacientes (KEISER et al., 2011).

En la provincia de Dakahlia: 9 casos (ALI et al., 1974), 23 casos (EL-SHAZLY et al., 1991), 2 casos (EL-SHAZLY et al., 1993), 20 casos (HASSEB et al., 2003), 21 casos (SOLIMAN et al., 2004), 48 casos (EL-SHAZLY et al., 2005a), 25 casos (EL-SHAZLY et al., 2005b), 41 casos (WAHIB et al., 2006), 152 casos (4,8%) (EL-SHAZLY et al., 2006a). En la capital, Mansoura se encontraron 2 casos (0,2%), (EL-SHAZLY et al., 2006b). En la ciudades de Talkha y Nabarohu la prevalencia fué de 0,4% (CURTALE et al., 2000b) y 35 pacientes en Talkha (MASSOUD et al., 2004).

En Kafr El-Hessa a 10 km de Mansoura, capital de la provincia de Dakahlia: 7% prevalencia (MOTAWEA at al., 2001), 382 casos (7,47%) (EL-SHAZLY et al., 2001), 121 casos (8,2%) (EL-SHAZLY et al., 2002), 21 casos (EL-AHL et al., 2007). En Oweish El-Hager, 2 casos (10,4%) (EL-AHL et al., 2007), y 15 casos en Beni-Sweif

(MASSOUD et al., 2010). En el pueblo agrícola de Gogar, a 8 km de Mansoura, 4 casos (0,4%) (EL-SHAZLY et al., 2006b).

Continuando en el Bajo Egipto, en la provincia de Gharbia se hallaron 26 casos (2,75%) en Seiger, Tanta City, la mayoría eran procedentes de áreas rurales (YASSIEN et al., 1996)

El primer caso en la provincia de Qalyubiya en 1993, se detectó en El Canater Center, después de convertirse en un problema de salud público en las provincias de Alejandría y Dakahlia (MAGDI et al., 1993), y posteriormente, se hallaron 13 casos más (NEGM et al., 1995).

Los primeros casos en la provincia de Menoufia 144 casos (1,6% prevalencia), donde la prevalencia más alta se encontró en Ezbat El Deyaba (10,6%), Ezbet Ashoub (4,2%) y AbdelGhany Shami (3,8%), Kafr Menawehla (3,4%), Ezbet Salim Abul Ela (3,2%) (MABROUK et al., 1994), 125 casos (KABIL et al., 2000), y presencia de la infección en la provincia (ABDEL-RAHMAN et al., 1995).

En la provincia de Sharkia, la primera constatación de presencia de *Fasciola* fué en el año 1985 (ISMAIL et al., 1985), 5 casos (ATA et al., 1988), 30 casos (ABDUL-FATTAH et al., 1992), 27 casos (DARWISH & EL GAMMAL, 1995), 147 casos (10% prevalencia) (HASSAN et al., 1995), 30 escolares (HASSAN et al., 1996), 60 casos (HASSAN et al., 2000), 30 casos (HEGAB & HASSAN, 2003), 50 casos (MATTAR & EL-TOUKHY, 2004), y 13 casos (8,7%) en Kafr Sakr y Abou Hammad (MAKLED et al., 1988).

En la provincia de Kafr El-Sheikh, se detectó un 6% de prevalencia (EL-BAHY et al., 1997).

Otros casos en el Delta del Nilo sin especificar la provincia: 3% prevalencia con al menos 830,00 personas infectadas (WHO, 1995), 8,7% de prevalencia (EL-ASHRY, 1995), prevalencias entre el 7% y 17% (FARAG, 1997), 18 casos (FARID et al., 1988) y 90 casos (HASSAN et al., 2004).

Casos en el Delta encontrados en dos provincias: 21 casos concretamente en Mit Ghamr que se encuentra en el medio de las provincias de Dakahlia y Sharkia (SHAKER et al., 1994). También 14 casos en Alejandría y Behera (HUSSEIN et al., 1994), y en las dos provincias de Menoufia y Cairo, 40 casos (EL-KARASKY et al., 1999).

En cuanto a la zona del Medio Egipto, se encontraron en la provincia de El Cairo los siguientes casos: 7 niños residentes en El Cairo (FARID et al., 1986), 2 casos (SALAMA et al., 1988), 43 casos (MIKHAIL et al., 1990), 30 casos (AATY & HASHIM, 1996), 7 casos (ABDEL WAHAB et al., 1996), 32 casos (OTEIFA et al., 2003), 5 casos

(EL DIB et al., 2004), 30 casos (ALI et al., 2012), y 5 casos (2,24%) en Boulak, El-Sayeda, El-Zatoon y El-Maadi (SAFAR et al., 2005).

En otra provincia del Medio Egipto, en Giza, se informaron 60 casos (MAHER et al., 1999), 6 casos (2,51%) en El-Giza city, El-Hwamdya, Kerdasa y El-Ayaat (SAFAR et al., 2005), 50 casos (DEMERDASH et al., 2011), y sin embargo, en un estudio de 3755 participantes llevado a cabo en nueve pueblos de la gobernación de Giza, no se encontró ningún caso positivo de fascioliasis humana (ZAKARIA et al., 2001).

Respecto al Alto Egipto, como se denomina a la zona sur del país, la primera población donde existe constancia de la infección de fascioliasis fué en en Tamyia Center, provincia de El Fayoum, hallándose 20 casos (3%) (AHMED et al., 1994), 17 casos en Ezbet el Bakly (Markaz Tamyia), a 100 km al sur de El Cairo (ABO-MADYAN et al., 2004). En la provincia de Assiut, un caso en Jahdam (HASSAN et al., 1998) y 8 casos en Naghe Sabea (ABDEL -RAHMAN & BARAKAT, 2000). En la provincia de Beni-Suef se detectaron 11 casos (6,87%) (IBRAHIM, 2004).

Respecto a la zona del canal de Suez, en la provincia de Ismailia, se encontraron 26 casos (4,9%) (ABDEL AAL et al., 1999) y 39 casos (ARAFAT et al., 1999).

La fascioliasis animal está ampliamente extendida por todo el país y se solapa con las zonas de endemia humana. De las 27 provincias en las que se divide el país, la infección animal se ha registrado en 25 de ellas, mientras que la Fascioliasis humana en 14 de ellas como hemos detallado anteriormente. Las prevalencias de la infección animal en las provincias donde existen ambas infecciones se detallan a continuación: ganado vacuno y búfalos 25%, en ovejas 30% en Alejandría, 27% y 28% en Assiut, 21,8% y 29,0% en Behera, en Beni-Suef 39% y 40%, en El Cairo 21% y 33,4%, en Dakahlia 59,5% y 78%, en El Fayoum 40% y 42%, en Gharbia 29,7% 22,5%, en Giza 26% y 33%, en Ismailia 29,2% y 31%, en Kafr El-Sheikh 36,5% y 39,6%, en Menoufia 51,2% y 53%, en Qalyubiyia 33,6% y 41,2%, en Sharkia 34% y 41%, respectivamente (SOLIMAN, 1998; ABDEL AAL et al., 1999; HASEEB et al., 2002; IBRAHIM et al., 2004)

#### **4.6.5.- DISTRIBUCION DE LA CASUISTICA SEGUN LA ESTACION DEL AÑO**

A causa de que el ciclo del parásito está sometido a la gran influencia que el clima ejerce sobre él, y sobre todo la temperatura y la lluvia (MERA Y SIERRA et al., 2011), hemos querido dedicarle un apartado. Desafortunadamente, el mes del año en el que se observan los primeros síntomas de la enfermedad se especifica únicamente en un

reducido número de publicaciones dentro de la amplia literatura sobre casos humanos registrados en Egipto. En algunos otros trabajos, principalmente estudios de campo, se apunta desde que mes y año comienza el trabajo finalizando justo en otro mes del año siguiente o incluso dos o tres años después, sin especificar en qué estación del año se realizó el diagnóstico, como por ejemplo, un estudio realizado entre Mayo de 1996 y Marzo de 1997 en el que se registraron 39 casos de Fascioliasis, basándose el diagnóstico en el hallazgo de huevos en heces (ARAFI et al., 1999). Otro ejemplo en el que se encuentra cierta especificidad en un primer estudio y la indeterminación en el segundo estudio de la misma publicación (KEISER et al., 2011), realizándose el primero entre Abril y Julio del año 2007 para la detección de huevos de *Fasciola* en heces encontrándose 22 individuos infectados, y en el segundo estudio, que se llevó a cabo entre Agosto de 2008 y Mayo de 2010, y en el que 19 pacientes dieron positivo.

Sobre la investigación de la estacionalidad de la fascioliasis humana cabe destacar el trabajo de FARAG et al., (1993), en el cual se evalúa detalladamente la distribución de la infección aguda mensualmente junto con la densidad de *L. caillaudi* también mensualmente, observándose al mismo tiempo ambas infecciones, la del hospedador humano y la del caracol transmisor a lo largo de todo un año.

Teniendo en cuenta que los casos presentados en el diagnóstico pueden encontrarse en la fase aguda o crónica y el flujo de casos varía en los diferentes meses, se observó que del total de los 287 pacientes, los casos crónicos se presentaban a lo largo de todo el año sin un patrón específico. Sin embargo, los casos agudos se manifestaron durante todo el año excepto en Febrero y Marzo, y desde Abril su número incrementó gradualmente alcanzando el pico en Agosto para disminuir después. La distribución relativa en las cuatro estaciones fue del 49% de los casos ocurridos en verano (Junio-Agosto) y 30% en otoño.

Con respecto a la densidad del caracol y su tasa de infección, en el mes de Abril no se encontró ningún caracol infectado, habiendo en el mes de Junio un gran cantidad de caracoles albergando estados inmaduros del parásito y encontrándose en Julio un 28% de los caracoles desprendiendo cercarias. Por lo tanto, considerando la estacionalidad, el verano representa la máxima infección del caracol y su densidad más baja. La conclusión es que el verano es la época de mayor transmisión, explicando la alta proporción de casos agudos de infección humana en Agosto, considerando en este estudio que el período de incubación clínica o prepatente es de uno o dos meses, aunque puede durar de 2-4 meses, solapándose con la fase aguda o invasiva (MAS-COMA, 2004).

Si tenemos en cuenta que este estudio se llevó a cabo entre Octubre de 1991 y Septiembre de 1992, y que las medias mensuales más elevadas de lluvias desde el año 1990 hasta el 2009 en Egipto corresponden a los meses de Diciembre hasta Febrero, el período máximo de lluvias de precipitaciones incluiría hasta Marzo, favorecería que la densidad de población del caracol fuera máxima al final de la primavera e inicios del verano (NAGATY et al., 1959; HIEKAL & EL-SHOKKARY, 1987). También en este período de tiempo, del 1990 al 2009, las temperaturas máximas que se alcanzaron en Egipto fueron de Mayo a Agosto, encontrándose una correlación con que las altas temperaturas del verano dañaran y mataran la mayoría de caracoles (ABDEL LATIF, 1985; ABDEL-GHANI, 1960; SELIM et al., 1987).

También en la publicación realizada por FARID et al., (1988) los 18 casos informados fueron diagnosticados de Junio a Agosto y todos ellos excretaban huevos de *F. hepatica*. Otros 27 pacientes, de los cuales 15 casos fueron agudos y 12 determinados como crónicos (establecido) por la detección de huevos operculados de *Fasciola*, fueron diagnosticados entre Mayo y Agosto (HISHMAT et al., 1995). Otro estudio indica que desde el mes de Junio a Septiembre, 72 casos fueron diagnosticados mediante técnicas coprológicas (CURTALE et al., 2003a).

Merece la pena destacar que en el Programa de Salud Escolar realizado en Behera para controlar la morbilidad relacionada con los helmintos intestinales desde el año 2000 al 2002, las monitorizaciones parasitológicas usando Kato-Katz se realizaron en los tres años en el mes de Mayo, con unas prevalencias de Fascioliasis humana del 3,8%, 2,9% y 1,2% respectivamente (CURTALE et al., 2003c).

Otros 5 pacientes fueron diagnosticados en un estudio transversal llevado a cabo desde Enero a Abril de 1996, suspendiendo el estudio en el mes de Febrero durante el Ramadan (CURTALE et al., 2000a). De Enero a Octubre también fueron diagnosticados 7 pacientes presentando huevos de *Fasciola* en sus heces (MASSOUD et al., 2001).

#### **4.6.6.- DISTRIBUCION SEGUN EL AÑO DEL DIAGNOSTICO**

Debido a que la fascioliasis tiene una dependencia climática capaz de modificar la distribución interanual de detección de casos humanos con un incremento en años de cuantiosas precipitaciones (MAS-COMA et al., 1999a; MAS-COMA, 2004), pasaremos a analizar los años de mayor proliferación de casos reportados, a pesar de que como hemos mencionado en el capítulo referido a la distribución según la fecha del artículo,

probablemente, los huevos de *Fasciola* se observaron más frecuentemente de lo que se ha publicado en la literatura (FARAG et al., 1979).

Con la pequeña excepción de la línea costera mediterránea, Egipto entero tiene un clima árido desértico. Presenta dos estaciones con inviernos suaves de Noviembre a Abril, y veranos calurosos de Mayo a Octubre. Egipto recibe menos de 80 milímetros de precipitaciones en la mayoría de áreas. La mayor parte de las lluvias caen a lo largo de la costa, pero incluso el área más húmeda, alrededor de Alejandría, recibe solamente 200 milímetros de precipitaciones al año. Las lluvias disminuyen rápidamente en el sur. El Cairo tiene un promedio de únicamente 29 mm de lluvias anuales. El lugar habitado más seco del mundo es Aswan con un promedio anual de 0,05 mm. La media anual de precipitaciones de Egipto es de 99 mm con un rango de 0 mm de Junio a Septiembre y hasta 24 mm en Enero, por lo que resulta un período seco todo el año (ESTEBAN et al., 2003).

De esta manera, en Egipto, no se puede encontrar una correlación entre el número de casos de acuerdo al año en que fueron detectados y las lluvias, como así ocurre en otros países como Argentina donde una epidemia de Fascioliasis ocurrida en 1972 podría haber sido causada por el repentino incremento de lluvias en ese año (MERA Y SIERRA et al., 2011).

La concentración de casos en el Delta del Nilo se basa en su especial fisiografía artificial. Tiene la forma de la letra griega Delta ( $\Delta$ ), de ahí el nombre dado por los antiguos griegos. Es uno de los deltas más grandes del mundo. Tiene aproximadamente de norte a sur 160 km de longitud y de este a oeste unos 240 km de costa. La gran área del Delta fue transformada en una llanura agrícola debido al gran sistema de irrigación que consiste en numerosos canales, que van de los grandes canales principales a pequeños canales secundarios. La media anual de evapotranspiración es de 144 mm, con una media mensual que va desde los 71 mm en Enero a 216 mm en Junio (ESTEBAN et al., 2003).

El patrón de la infección en el delta del Nilo ha evolucionado. Inicialmente, hasta los años 80, aparecieron casos humanos esporádicos en zonas conocidas de endemia animal. A partir de entonces, la infección comenzó a propagarse en casi todas las provincias del delta del Nilo convirtiéndose en zonas de endemia humana. Como hemos comentado al principio de este capítulo, los huevos de *Fasciola* se vieron en más ocasiones de lo que se ha registrado en la literatura. Por lo tanto, la mayoría de casos que se han publicado no se correlacionan con el registro de lluvias anuales, el cual es escaso, ya que las características propias del Nilo conllevan a una situación de endemia estable.

#### 4.6.7.- METODOS Y TECNICAS DE DIAGNOSTICO UTILIZADAS

En Egipto, el método diagnóstico utilizado se especificó en todos los estudios de casos humanos excepto en tres de ellos. De los 6979 casos humanos que se informan en artículos, solamente en 79 pacientes no se indica cuál fue el método de detección de la enfermedad. En uno de estos trabajos se incluyeron 5 pacientes destinados a evaluar el efecto de *Fasciola* y el bitionol sobre el hígado y en el cual no especifica la técnica del diagnóstico (ABOU BASHA et al., 1990). En otro trabajo, 50 casos fueron estudiados para valorar el nivel de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el suero de pacientes con fascioliasis (EBIED et al., 1993), y otro tercero se refiere a 24 pacientes que participaron en la identificación de antígenos específicos de *F. hepatica* (MOHAMED et al., 2004).

El estudio retrospectivo muestra que la técnica diagnóstica más aplicada en la mayor parte de los casos de Fascioliasis es la búsqueda de huevos en heces, contabilizando un total de 6657 pacientes. Este procedimiento etiológico fue seguido por serología en 2160 pacientes, técnicas no invasivas en 226 pacientes, 17 con diagnóstico quirúrgico, y 62 mediante otras técnicas. Además, se encontró un único caso post mortem en un paciente soldado de 21 años, al que se le descubrieron 12 duelas de *F. hepatica*, el cual, tras varios meses de enfermedad desconocida falleció, encontrándose las típicas modificaciones en el hígado y en los conductos hepáticos (CHESTER, 1928).

Precisamente el retraso en el diagnóstico se describe en múltiples casos. En este caso post mortem, pasaron 6 meses desde que el paciente fué admitido en el hospital hasta que falleció (CHESTER, 1928).

En otro trabajo se informó del retraso en el diagnóstico en 4 pacientes. En el primero, 4 meses se estuvo quejando de dolor abdominal, fiebre, anorexia y debilidad en general un niño de 10 años hasta que, después de ser visto por varios pediatras y sometido a una larga lista de investigaciones, sufriendo convulsiones, fue diagnosticado. En el segundo caso, transcurrieron 6 meses con dolor de cólico en abdomen superior, anorexia, pérdida de peso y mareos. En el tercer caso, el paciente estuvo con dolor abdominal superior y fiebre recurrente un año y medio. El cuarto caso, un año padeció el paciente con vago dolor abdominal, debilidad general, mareo y fuertes dolores de cabeza (RAGAB & FARAG, 1978).

En otro artículo, 18 niños muy enfermos con diarrea padecieron durante 3 meses hasta que fueron diagnosticados (FARID et al., 1988).

Otros 2 pacientes mostraron fiebre de 1 a 18 meses hasta su diagnóstico (SALAMA et al., 1988). También 6 pacientes, estuvieron tres semanas con diarrea (FARID et al., 1989), y otros 40 pacientes se quejaron de dolor hepático, fiebre intermitente entre 2-12 meses (FAWZY et al., 1992).

Un paciente estuvo con historia de dolor abdominal y blandura en el hipocondrio derecho y epigástrico durante 5 meses (HASSAN et al., 1998).

Incluso en algún artículo, después de conseguir descubrir el diagnóstico de fascioliasis, recomiendan tener en mente la fascioliasis humana cuando traten a pacientes con manifestaciones que lo sugieran, particularmente provenientes de focos animales (MAGDI et al., 1993)

Hay muchos casos en los que se aplican dos o más técnicas diagnósticas al mismo tiempo. Son las pruebas coprológicas junto con las serológicas las más utilizadas conjuntamente con el fin de confirmar el diagnóstico (AHMED et al., 1994).

#### **4.6.7.1.- POR HALLAZGO DE HUEVOS EN EXAMENES COPROLOGICOS**

La observación de huevos de heces es la técnica más común utilizada en Fascioliasis. En Egipto, coexisten *F. hepatica* y *F. gigantica*, así como formas intermedias, lo que explica por qué en la mayoría de los casos no se ha determinado la especie del trematodo (MAS-COMA et al., 1999b). La especie de *Fasciola* involucrada queda en la mayoría de artículos indeterminada (ISMAIL et al., 1985, FARAG et al., 1986; FARAG et al., 1988; BASSILY et al., 1989; BASSOUNY et al., 1991; YOUSSEF et al., 1991; YOUSSEF & MANSOUR, 1991; FAZWY et al., 1992; MAGDI et al., 1993; SHAKER et al., 1994; HASSAN et al., 1995; OSMAN et al., 1999; ABDEL AAL et al., 1999; EL-MORSHEDY et al., 1999; MAHER et al., 1999; ABOU-BASHA et al., 2000; CURTALE et al., 2000a; CURTALE et al., 2000b; HUSSEIN et al., 2000), y en algunos casos identificada como *F. hepatica* (RAGAB & FARAG, 1978; FARAG et al., 1979; FARID et al., 1986; ABOU-BASHA et al., 1989; EL-SHABRAWI et al., 1997; HASSAN et al., 1995; CURTALE et al., 1998; EL-KARASKY et al., 1999). Solo en dos artículos cuya especie mencionada es *F. hepatica* se precisa la medida de los huevos 120 x 78  $\mu\text{m}$  (RAGAB & FARAG, 1978 ) y 119-165 x 55-80  $\mu\text{m}$  (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Incluso en el único caso fatal dado en Egipto, se analizaron huevos intrauterinos que midieron 100-120 x 50-60  $\mu\text{m}$  en un trematodo que difería en varios aspectos de la



morfología con *F. hepatica* encontrada habitualmente en animales, pasando a denominarla *F. hepatica* var. *hominis* (HASSAN et al., 1998).

En tres artículos se informó de *F. gigantica* como causante de la enfermedad. En primer lugar, un caso quirúrgico en el que *F. gigantica* medía 2 x 0,6 cm (RAGAB & FARAG, 1978). Por otro lado, en dos casos ectópicos, los parásitos descubiertos presentaban unas medidas de 32 por 9 mm, y el segundo 39 por 10 mm, identificándolos como *F. gigantica* (EL-SHAZLY et al., 1993), y por otro lado, cuatro casos excretaron huevos de *F. gigantica*, favorecido el diagnóstico por la medida de huevos que oscilaba de 150-190 x 78-100  $\mu\text{m}$  (YASSIEN et al., 1996). Sin embargo, CHEN & MOTT (1990) indica que en Egipto probablemente *F. gigantica* es la única especie en animales domésticos.

La técnicas parasitológicas directas utilizadas para el diagnóstico humano fueron variadas. En 745 casos no se especificó la técnica coprológica utilizada, mencionando solamente una presencia de huevos de *Fasciola* en heces, y en 454 casos se hace referencia a la técnica simplemente como por coprología. De los 6658 pacientes que dieron positivos, el 88,91% (5919 casos) fueron diagnosticados utilizando frotis fecal grueso en celofán de calibre estandarizado o técnica de Kato-Katz (KATZ et al., 1970). Se utilizó en 40 pacientes el simple frotis fecal directo.

De entre los métodos coproparasitarios de concentración de huevos se usaron diversas técnicas basadas en la flotación, sedimentación y centrifugación y flotación. La flotación de azúcar (Método Sheater) se utilizó en 26 casos, 14 pacientes fueron diagnosticados mediante centrifugación con sulfato de Zn, 422 pacientes fueron diagnosticados mediante sedimentación salina y concentración, y 51 casos mediante Flukefinder, también basado en la sedimentación y habitualmente usado en veterinaria (WELCH et al., 1987). La técnica de Ritchie o técnica de concentración formol-éter, muy utilizada en helmintos, en la detección de Fascioliasis humana en Egipto se utilizó en 117 pacientes, en los que en 30 de ellos se utilizó el método de concentración de formol éter modificado (FLECK & MOODY, 1988). El método de concentración de MIFC (merthiolate-iodine-formaldehyde concentration method) (SAPERO & LAWLESS, 1953) fue utilizado en 454 individuos. En un caso se hizo la aspiración duodenal, mostrando por sigmoidoscopia la inflamación intestinal y los huevos operculados (MAGDI et al., 1993), y en otro caso, durante la evacuación se encontró el parásito (EL-SHAZLY et al., 1993). Se realizaron aspiraciones biliares en 10 pacientes y en otros 15 casos fueron aspiraciones duodenales con el objetivo de recoger huevos de *Fasciola* y estudiar la correlación de la Fascioliasis humana y el virus de la hepatitis C (EL NASR et al., 2006).

La técnica de frotis directo, que es usada en muchos laboratorios para la simple detección de huevos, mostró una baja sensibilidad (38.5%), la flotación con sulfato de cinc aún fue menos sensible (7,7%). La técnica de concentración MIFC (formol ether sedimentation and merthiolate iodine formaldehyde) presentó una sensibilidad y especificidad del 100%, siendo igual de sensible y específico que la prueba de IHA (NEGM et al., 1995).

Varios autores mencionan la baja sensibilidad en el hallazgo de huevos en heces (EL-RIDI et al., 1982; FAWZY et al., 1992; FARAG et al., 1993; HASSAN et al., 1995).

#### **4.6.7.2.- POR SEROLOGIA**

Varios tests serológicos han sido usados para el diagnóstico humano en Egipto. Uno de los principales problemas para controlar la morbilidad y mortalidad causadas por parásitos es el limitado acceso al diagnóstico prematuro, rápido y efectivo para proporcionar el tratamiento adecuado. Además los programas de control se ven obstaculizados por el retraso en la recogida de muestras, el análisis y la implementación del control. Una evaluación de la literatura demuestra que los métodos diagnósticos y serológicos están en el primer plano de la investigación de la fascioliasis (ALI et al., 2012).

Las técnicas inmunológicas proporcionan las ventajas de ser aplicables durante todas las etapas de la enfermedad, pero especialmente durante la fase invasiva o fase aguda, y en otras situaciones en las que las técnicas coprológicas son inapropiadas. Casi todos se centran en la detección de anticuerpos circulantes y solo unos pocos diseñados para la detección de antígenos circulantes y complejos inmunes. Las técnicas inmunológicas presentan problemas relacionados con la baja sensibilidad y especificidad (MAS-COMA et al., 2005).

Se han utilizado múltiples antígenos para el serodiagnóstico de la fascioliasis y se han hecho numerosos intentos con las técnicas de cromatografía convencional para aislar y caracterizar potencial específico y somático (HILLYER & CAPRON, 1976; MANSOUR et al., 1983; SANTIAGO & HILLYER, 1986; YOUSSEF & MANSOUR, 1991) o antígenos excretores/secretores (SANTIAGO et al., 1986; ESPINO et al., 1987; RIVERA MARRERO et al., 1988; HILLYER & DE GALANES, 1988; HILLYER et al., 1992). El aislamiento y la identificación de antígenos parasitarios es de fundamental importancia para facilitar la preparación de antígenos purificados adecuados para la inmunodiagnos de la infección (OSMAN et al., 1994).

Solamente en un trabajo que diagnostica Fascioliasis humana en 7 pacientes, no se especifica el método serológico utilizado ni tampoco el parasitario (BASSILY et al., 1989).

Por lo que se refiere a las técnicas de inmunoprecipitación, el método más utilizado fue la contrainmunolectroforésis (CIEP - counter immunoelectrophoresis). En 51 pacientes se empleó esta técnica (FARID et al., 1986; FARID et al., 1988; FARID et al., 1989; YOUSSEF & MANSOUR, 1991). En otros 20 casos de un trabajo se denomina como CCIEP (countercurrent immunoelectrophoresis) (AHMED et al., 1994). En 13 pacientes la técnica empleada es también CIEP aunque se precisa que se hacen servir de antígenos, concretamente de *F. hepatica* (MAKLED et al., 1988), y en 53 pacientes se particulariza que estos antígenos utilizados son crudos (EL-ZAWAWY et al., 1995). En cuanto a CIEP empleando los antígenos de *F. gigantica*, se aplicó a 43 pacientes (MIKHAIL et al., 1990). MANSOUR et al. (1983) apuntaron que el 40% de los pacientes con infección por *F. hepatica* reaccionaron débilmente con el antígeno purificado parcialmente de *F. gigantica*. En un estudio donde se utilizaron las dos técnicas, CIEP y ELISA, el primero fue energicamente positivo en 7 pacientes y con ELISA se detectaron 6 (FARID et al., 1986).

En el suero de 20 pacientes se realizó el test de precipitación de metacercarias. De ellos, 10 casos fueron citados como agudos a pesar de ser diagnosticados por la presencia de huevos en heces y, los otros 10 fueron considerados crónicos y fueron analizados mediante el test de hemaglutinación indirecta (IHA - indirect haemagglutination). Todos ellos precipitaron con un preparado de metacercarias elaborado en el laboratorio procedente de caracoles de *L. caillaudi* infectados de forma natural. El precipitado fue más rápido en su formación y más grande en cantidad con el suero de casos agudos. Los autores terminaron recomendando este test de precipitación por metacercarias al considerarlo como simple, sensible y específico, aconsejando su uso en el suero con una dilución de 1:5 (20%) (FARAG et al., 1995).

Solo en un artículo no se dan más detalles y se indica que la prueba por inmunodifusión serológica se empleó en 26 pacientes en un estudio de campo para determinar la prevalencia de la Fascioliasis, denotando la importancia del serodiagnóstico al detectarse solamente 15 pacientes en análisis repetidos de heces (YASSIEN et al., 1996).

En cuanto a los tests basados en aglutinación, la prueba de IHA fue la que más casos concentró. A 138 pacientes se les determinó el nivel de anticuerpos mediante IHA (FARAG et al., 1995; NEGM et al., 1995; ABDEL WAHAB et al., 1996; GABBOUR et al., 1997; HAMMOUDA et al., 1997; ROSSIGNOL et al., 1998; EL-GOHARY et al.,

1999; SAFAR et al., 2005; EL-AHL et al., 2007). En 793 pacientes se especificaba que el IHA empleado era un kit comercial procedente de Francia (Kits distomiasis Fumouze, Fumouze Laboratories, France). El kit se basa en que sus células rojas están sensibilizadas por un antígeno preparado desde un antígeno de adulto purificado de *F. hepatica* y cuyos trematodos son conseguidos vivos de los conductos biliares, entonces el antígeno es purificado y las fracciones lipídicas separadas. Este antígeno de *F. hepatica* permite el diagnóstico de ambas especies debido a los antígenos comunes de los dos (Fumouse Diagnostics, pers. com. in lit.). El valor del anticuerpo de *Fasciola* igual o superior a 1:320 fue considerado positivo según las instrucciones del kit. Los valores de 1:160 se consideran erróneos para Fascioliasis y positivos para esquistosomiasis. La media de los valores fué de  $996 \pm 436$ , y los valores oscilaron desde 1:320 hasta 1:2048 (EL-SHAZLY et al., 1991; FAWZY et al., 1992; SALEM et al., 1993; FARAG et al., 1993; HUSSEIN et al., 1994; HISHMAT et al., 1995; (AATY et al., 1996; FARAG et al., 1998; ADDEL AAL et al., 1999; EL-KARASKY et al., 1999; SHEHAB et al., 1999; KHALIL et al., 1999; ABOU-BASHA et al., 2000b; ALLAM et al., 2000; EL-SHAZLY et al., 2002; OTEIFA et al., 2003; HASEEB et al., 2003; IBRAHIM et al., 2004; MASSOUD et al., 2004; ALI et al., 2012). Sin embargo, se observaron reacciones cruzadas de *Fasciola* IHA test con casos de hepatitis C (AATY et al., 1996).

Respecto a los pruebas inmunológicas basadas en hemólisis, el test de fijación del complemento (CF-complement fixation), más habitual para la detección de amebiasis, se empleó en 13 pacientes utilizando antígenos de *F. hepatica* (MAKLED et al., 1988).

En lo relativo a los inmunoensayos de fluorescencia, 50 pacientes fueron diagnosticados en la infección de fascioliasis mediante el test de inmunofluorescencia (IFA - immunofluorescence assay) (MOVSESIJAN et al., 1975) con unos valores que oscilaron entre 1:160 a 1:1280 (ABDUL-FATTAH et al., 1992; EL-KERDANY et al., 2005).

De entre todos los tests de diagnóstico de Fascioliasis, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay) (ESPINO et al., 1998), en diferentes usos y con diferentes antígenos, ocupa el primer plano de las investigaciones en el serodiagnóstico de la fascioliasis humana (ALI et al., 2012). De entre todos los trabajos que utilizaron ELISA, se contabilizaron un total de 153 pacientes (FARID et al., 1989; YOUSSEF & MANSOUR, 1991; EL-SHAZLY et al., 2002; SAFAR et al., 2005; WAHIB et al., 2006). En otros 177 casos en que se especificó el empleo de antígenos parcialmente purificados para detectar anti-*Fasciola* IgG 147 (HASSAN et al., 1995; HASSAN et al., 1996). MAKLED et al. (1989) indicaron que utilizaron antígeno de *F. gigantica* purificado parcialmente en la detección de

Fascioliasis humana por ELISA. En otro ensayo, 7 pacientes reaccionaron fuertemente al antígeno de *F. hepatica* (25-26 kD) y dieron negativo con el antígeno de *F. gigantica* (27 kD) usando ELISA (ABDEL-RAHMAN et al., 2000). Otros autores utilizaron antígenos excretorios/secretorios (Fhes) haciéndolo servir en un total de 43 pacientes (HASEEB et al., 2003; EL-AHL et al., 2007). En 12 pacientes se utilizó ELISA sandwich en un estudio que evaluaba la sensibilidad y especificidad del suero y la saliva en la detección de Fascioliasis humana (SABRY & TAHER, 2008).

Otra técnica serológica basada en enzimas que también se utilizó fue EITB (using enzyme-linked immunoelectro-transfer blot), en 60 pacientes utilizando productos E/S de *Fasciola* (NOURELDIN et al., 2004). La técnica EITB también se utilizó en un ensayo para evaluar los antígenos E/S de *Fasciola*, obteniendo una sensibilidad, especificidad y precisión en el diagnóstico de 45,2%, 100% y 70%, respectivamente, mientras que en CIEP fué del 38,7%, 100% y 67,2%, respectivamente (ARAFAT et al., 1999). Comparando EITB con ELISA, éste último reaccionó dando un 100% de sensibilidad 93% de especificidad con un 95,6% de la eficacia en el diagnóstico, mientras que EITB obtuvo un 100% de sensibilidad, 100% de especificidad y 100% en la eficacia del diagnóstico aconsejándose ELISA como un buen test de detección mientras que EITB puede servir como test de confirmación de inmunodiagnos (SHAKER et al., 1994). EITB también se utiliza no solo para el diagnóstico sino también para la evaluación de la cura después del tratamiento (SHEHAB et al., 1999).

La técnica más novedosa en el serodiagnóstico de la Fascioliasis humana corresponde a unas tiras reactivas basadas en dot-ELISA, método que presenta varias ventajas frente al ELISA indirecto, como por ejemplo que no necesita un caro espectrofotómetro para leer los resultados, pudiendo ser leídos a simple vista (INTAPAN et al., 2003). Cuando se comparó la sensibilidad y especificidad de las tiras reactivas frente a ELISA utilizando antígenos excretorios/secretorios de *Fasciola* se obtuvo una precisión del 98,3% una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,7% y un valor predictivo negativo del 100% (ALI et al., 2012).

Se pone de manifiesto por muchos autores que el diagnóstico serológico descubre casos que otras técnicas diagnósticas no detectan. Aunque IHA test fué positivo en 14 de los 50 casos estudiados de hepatomegalia (28%), los huevos de *Fasciola* se detectaron en sólo 11 de esos IHAT positivos (78,6%) (HUSSEIN et al., 1994). También MAKLED et al. (1988) informaron de casos que presentaban huevos en heces en 61,53% de casos probados serológicamente. En otro estudio, ELISA detectó 78 casos de *Fasciola* positivos más que los exámenes de heces, demostrando una

sensibilidad del 100% frente al 47% de análisis de heces, y una especificidad de ELISA del 63%, ya que se detectaron reacciones cruzadas de *Schistosoma* (HASSAN,1995).

Otro ejemplo se dió en 30 casos que dieron positivo con CIEP, y en 24 pacientes no se encontraron huevos de *Fasciola* en sus heces (EL-ZAWAWY et al., 1995). En un estudio de campo se diagnosticaron 15 casos por huevos en heces, pero 26 se detectaron por serología, denotando la importancia del serodiagnóstico en la Fascioliasis prematura (YASSIEN et al.,1996). En un estudio sobre la prevalencia en una determinada población mediante examen fecal detectaron un 04% de prevalencia y con serodiagnóstico 4,9% (ABDEL AAL et al., 1999). En ese sentido, en otro estudio se obtuvo una tasa de prevalencia mediante análisis de heces del 1,25% y del 6,87% mediante IHA (IBRAHIM et al., 2004). También la búsqueda de huevos en heces resultó poco sensible en otro trabajo donde los huevos de *F. hepatica* se recogieron solo en 30 de los 40 casos que IHA test dieron positivo (EL-KARASKY et al., 1999). SAFAR et al. (2005), indicaron que de los 11 casos positivos con heces, un caso fue positivo por ELISA, 4 fueron positivos por IHAT & ELISA, mientras que 5 casos fueron negativos serológicamente, recomendando el uso de ambas técnicas para rellenar la omisión del otro. Y más recientemente, en 23 casos positivos con Kato Katz, solo 19 dieron positivo con IHAT y con ELISA el 100% (EL-AHL et al., 2007).

La búsqueda de antígenos en material fecal fué otra técnica empleada en 142 pacientes para el diagnóstico de Fascioliasis humana.

Para la detección de coproantígenos en heces se utilizó suero hiperinmune de conejos inmunizados con antígenos parcialmente purificados de *F. gigantica* y mediante inmunolectroforesis contracorriente (CIEP) detectar antígenos del parásito en extractos salinos de heces de pacientes. Los extractos salinos se prepararon de forma individual suspendiendo las heces en una muestra de buffer (0.00 2M  $PO_4^-$ , 0,9% NaCl, 0,02%  $NaN_3$ , 0,3% Twee 20) en un ratio de 1:3. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes del buffer se usaron en el test. Los extractos salinos de heces de 108 pacientes desarrollaron 2-5 bandas de precipitación. No hubo precipitación de bandas de los extractos salinos de pacientes con infecciones falsas de *Fasciola* u otras infecciones parasitarias o de controles negativos. El ensayo demostró ser simple, rápido (1 hora), sensible y específico para el diagnóstico de la Fascioliasis en sus estados iniciales además de en los estadíos crónicos. Según los autores, una de las ventajas de esta prueba fue la diferenciación entre infecciones falsas y positivas en el diagnóstico prematuro varias semanas antes de que los huevos sean detectables en la heces (YOUSSEFF et al., 1991).

Otro estudio se diseñó para evaluar la eficacia de la detección coproantigénica de la Fascioliasis humana mediante ELISA y empleando anticuerpos purificados policlonales obtenidos de conejos hiperinmunizados con antígenos crudos de *F. gigantica*. 34 pacientes infectados con *Fasciola* dieron positivo mostrando O.D. (0,615 a 1,310) que fueron superiores al valor de corte (0,120). Curiosamente, de los 34 pacientes, solo 22 dieron positivos por hallazgo de huevos. En los 12 pacientes que dieron negativos en el examen de huevos de heces, probablemente la prueba coproantígena con ELISA fue positiva debido a la presencia de productos excretores/secretores de adulto de *Fasciola* en lugar de la presencia de un antígeno asociado al huevo. Esto indica la habilidad de ELISA para diagnosticar Fascioliasis crónica en ausencia de huevos en heces debido a la excreción irregular (DARWISH et al., 1995).

La técnica de ELISA mediante el uso de monoespecífico anti-49,5 kDa para detectar coproantígenos demostró ser más práctico y fiable que la detección en suero con antígenos excretores/secretores de *Fasciola* utilizando EITB y CEIP. La sensibilidad, especificidad y eficacia del diagnóstico fueron para EITB del 45,2%, 100% y 70%, respectivamente. Para CIEP de 39,7%, 100% y 67,2% respectivamente. Y para ELISA fué del 91,4%, 91,8% y del 92,3%, con un alto valor predictivo negativo (88,9%) y también positivo (94,1%) (ARAFÁ et al., 1999).

#### **4.6.7.3.- POR INTERVENCION QUIRURGICA**

No parece ser una técnica muy recurrida en Egipto. Al parecer, solamente en 17 casos el procedimiento quirúrgico contribuyó al diagnóstico.

El primer caso quirúrgico descrito en Egipto coincide con ser la primera comunicación de presencia de *Fasciola* en el país, destacando la gravedad del caso ya que tuvo un desenlace fatal. Aunque el autor publique el artículo en 1928, el caso se remonta al año 1886, en el que un soldado de la Armada Británica es enviado a Inglaterra procedente de su batallón establecido en el Nilo (Egipto), donde los servicios médicos no habían encontrado la causa de su malestar. Después de seis meses de signos y una sintomatología que fue desde alta temperatura, pulso y respiración rápida, bronquitis, vómitos, anemia hasta el hígado y bazo engrandecidos, y una sospecha de absceso del hígado, finalmente el paciente falleció. El examinador encontró una docena de parásitos de *F. hepatica* en el hígado, repleto de muchas cavidades llenas de bilis y sangre, siendo el diagnóstico el resultado de una examinación post-mortem (CHESTER, 1928).

El segundo caso corresponde precisamente al quinto de una serie de cinco casos reportados individualmente y en los cuales se describen con todos los detalles el sufrimiento de los pacientes en cuanto a la sintomatología y, advirtiéndose el enorme tiempo empleado hasta conseguir el diagnóstico apropiado. Además, este trabajo descubre la incidencia del parásito en el área de Abis (Alejandría) por vez primera, y marcará el punto de partida de la preocupación de la fascioliasis humana como problema de salud pública en Egipto, estimulando la investigación en el área. Como hemos mencionado anteriormente, los autores reconocen que tras una larga lista de investigaciones hasta lograr diagnosticar los primeros 3 casos, este último caso, tras muchas investigaciones para excluir todas las posibilidades, les llevó menos esfuerzo. El hombre fue operado debido a una masa abdominal endurecida. Mientras cortaban a través de la vaina del recto, apareció un gusano de 2 x 6 cm de longitud y que posteriormente, tras ser enviado al departamento de parasitología, fue identificado como *F. gigantica* maduro (RAGAB & FARAG, 1978).

Dos casos más fueron objetos de sendas intervenciones quirúrgicas recogidas ambas en el mismo trabajo como casos erráticos. El primer paciente al que se hace referencia presentaba una protuberancia rojiza dolorosa en la zona umbilical. Se le practicó una incisión vertical en la línea media del área supra umbilical, evacuándose 200 mm<sup>3</sup> de sangre junto con un trematodo del parásito. En el segundo caso, también había una manifestación de tumefacción rojiza en la parte medio superior del muslo. Se le realizó una incisión donde entre los contenidos evacuados se encontraba un ejemplar. Dos biopsias se les realizó a los dos pacientes intervenidos de tejido circundante para estudio histopatológico (EL SHAZLY et al., 1993).

Otros dos casos fueron diagnosticados quirúrgicamente al extraerse trematodos de *Fasciola* de los conductos biliares, de entre 38 pacientes a los que se reclutaron para un estudio sobre la evaluación del kit comercial de IHA, y en el que el resto fueron diagnosticados por hallazgo de huevos en heces y clínicamente (AZAB et al., 1996).

La posible presencia de cálculos en la vía biliar principal o coledocolitiasis que desencadenó una ictericia obstructiva, llevó a un paciente a ser operado. Accidentalmente, durante el transcurso de la operación, se encontraron dos parásitos de *Fasciola* sp. Debido a las diferencias morfológicas observadas por el autor respecto a *F. hepatica*, lo nombró *F. hepatica* var. *hominis* (HASSAN et al., 1998).

La laparatomía fue el diagnóstico que confirmó la presencia del parásito ante el único signo positivo de la enfermedad como la eosinofilia periférica que se observó durante las pruebas rutinarias de laboratorio realizadas en un paciente. Dos



trematodos se recogieron en el conducto biliar durante la exploración (ABDEL & RAHMAN, 2000).

Aunque la biopsia del hígado no es una investigación estándar en la Fascioliasis humana ya que se trata de una técnica invasiva, en 9 pacientes se optó por aplicar esta técnica debido a la presentación clínica complicada y tardía. Las pruebas revelaron el absceso eosinofílico característico que es casi patognomónico de la fascioliasis humana (EL KARASKY et al., 1999).

#### **4.6.7.4.- POR TECNICAS NO-INVASIVAS**

El diagnóstico basado en la imagen en diferentes versiones se utilizaron como herramienta principal (BASSILY et al., 1989), y también como ayuda del diagnóstico patológico (EL-SHAZLY et al., 2001; MASSOUD et al., 2004). En Egipto la técnica no invasiva se empleó en 226 pacientes que fueron diagnosticados mediante este examen abdominal.

La ultrasonografía (US) ha demostrado ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de las lesiones patológicas de las infecciones de *F. hepatica* en el hígado, tracto y vesícula biliar. Se realizaron las pruebas con una unidad sonográfica a tiempo real con un sector transductor de 3.5 MHZ y otro lineal de 5 MHZ (FAWZY et al., 1992; OSMAN et al., 1999).

Se observaron cambios mediante ultrasonografía en la vesícula biliar de 22 pacientes que habían excretado huevos de *Fasciola*. En las vesículas biliares de 12 de ellos se encontraron parásitos de *Fasciola* moviéndose en su interior. Además se pudo observar que en 14 de ellos la vesícula mostraba una contractilidad débil después de una comida grasa, menos del 50% de su tamaño. Un paciente mostró piedras en la vesícula y en otro la tenía llena de lodo biliar. En 15 casos de los presentados la pared de la vesícula biliar estaba engrosada. En los casos crónicos, la ultrasonografía no detectó cambios en la vesícula biliar (FAWZY et al., 1992).

La dilatación y engrosamiento del conducto biliar común son importantes hallazgos en Fascioliasis. Estos cambios son de gran ayuda en el diagnóstico de la enfermedad, especialmente cuando no se encuentran huevos en heces. En nueve casos de un total de 17, se observaron cambios en los conductos biliares, dilatación, engrosamiento, siete trematodos de *Fasciola*, y en sus vesículas biliares se hallaron 5 parásitos en su interior, además de su engrosamiento, piedras y lodo biliar (AHMED et al., 1994). En

otros 15 casos el examen ultrasonográfico descubrió cambios leves del tejido hepático y, además en 3 de ellos la vesícula se había engrosado (FARAG et al., 1998).

En 17 pacientes se utilizó este examen abdominal junto con el hallazgo de huevos de *Fasciola* en heces con el fin de relacionar la intensidad de la infección, mediante recuento de huevos en las heces y la presencia de múltiples trematodos de *Fasciola* en el sistema biliar (OSMAN et al., 1999). En otro estudio, 60 pacientes fueron examinados por diversas técnicas, complementando con la ultrasonografía abdominal para determinar el tamaño de la masa y el patrón del hígado, el tamaño del bazo, de la vesícula biliar, conductos biliares y la presencia de ejemplares del parásito (NOURELDIN et al., 2004). Otros 21 pacientes fueron sometidos a diversas pruebas diagnósticas y además la ultrasonografía abdominal (SOLIMAN et al., 2004).

Se empleó la sonografía abdominal en otros 7 pacientes en conjunto con otras técnicas diagnósticas como examen de heces y examen clínico completo (ABDEL-RAHMAN & BARAKAT, 2000).

La ultrasonografía también demostró la presencia de ascitis en 2 casos, y en otros 3 casos crónicos se encontraron adultos de *Fasciola*, uno de ellos sufrió ictericia obstructiva y presentaba 8 ejemplares (HISHMAT et al., 1995).

Se detectó ascitis en otros 3 casos de un estudio en el que se evaluaba el uso del triclabendazol en 50 pacientes. Entre estos, en 14 casos se observó esplenomegalia y en 28 hepatomegalia, en 12 pacientes se observaron sombras en la vesícula biliar y en 6 individuos el conducto biliar común se encontraba dilatado (EL KARASKY et al., 1999).

La radiología se empleó en 12 pacientes, realizándose rayos-X en el tórax junto con la ultrasonografía abdominal. Los hallazgos demostraron que cinco tenían efusión pleural y uno ascitis. En dos casos se observaron nódulos ovales y otros dos tenían lesiones hepáticas quísticas. En tres casos se mostraron trematodos del género *Fasciola*, probablemente inmaduros (EL-SHAZLY et al., 2002).

Otra técnica no invasiva empleada fué la tomografía computerizada (CT) (TAKEYAMA et al., 1986) que se empleó en el diagnóstico de un caso junto con el ultrasonido del hígado. Se pudieron observar lesiones focales de densidad reducida con grupos de sombras nodulares en el lóbulo derecho y una dilatación de los radicales intrahepáticos biliares, algunos con cavidades medianas, principalmente en lóbulo derecho. El conducto biliar común estaba rodeado por una hipodensidad focal. Estos hallazgos ayudaron al diagnóstico de Fascioliasis con una obstrucción del tracto biliar intrahepático, asociado a lesiones necróticas focales del hígado (ROSSIGNOL et al., 1998).

También conjuntamente se utilizaron CT y US en el diagnóstico de 9 pacientes cuyos hallazgos mostraron áreas quísticas, lesiones nodulares y formación de ramas en el parénquima hepático, formando las madrigueras creadas por el parásito (HASEEB et al., 2003).

#### **4.6.7.5.- POR OTRAS TECNICAS**

La saliva también se ha utilizado para la detección de la Fascioliasis humana y animal en Egipto. En un estudio se compararon la saliva y el suero en 12 pacientes, 17 vacas y 20 ovejas. Para ello se utilizaron antígenos circulantes de *F. gigantica* (AFAb) y anticuerpos de anti-*F. gigantica* (CFAg) llevados a cabo de forma experimental en conejos utilizando ELISA sandwich. Los resultados mostraron que AFAb en saliva mostró una sensibilidad del 66,6%, 64,7% y 65% en pacientes, vacuno y ovejas, mientras que en el suero fue del 91,66%, 94,11% y 100%, respectivamente. Por el contrario, AFAb en saliva fue más específico (100%) que el suero dando unos valores de 100%, 92% y 96% en humanos, vacuno y ovejas respectivamente. CFAg en saliva demostró más sensibilidad comparada con AFAB obteniendo un 83,3%, 76,7% y 85% en pacientes, vacuno y ovejas respectivamente. La especificidad de CFAg en saliva fue más alta que con el suero, obteniendo unos valores de 100%, 96% y 96% en los tres grupos respectivamente (SABRY et al., 2008).

Hay otro artículo que utiliza la saliva para el diagnóstico de fascioliasis con 50 pacientes en unos estudios para evaluar las pruebas de ELISA de detección de IgM, IgG, IgG1, IgG4, en el suero, y además IgA en saliva y heces. Los ensayos demostraron que la sensibilidad en suero de IgM, IgG, IgG1, IgG4 fue del 100%. Por otro lado, IgA salivar y fecal mostraron una sensibilidad del 92% y 96% y una especificidad del 100% y 100% respectivamente, demostrando que ambas técnicas pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico de fascioliasis (NOURELDIN et al., 2004).

#### **4.6.8.- DIAGNOSTICO CLINICO/EPIDEMIOLOGICO**

La presentación clínica puede ser útil para el diagnóstico, aunque solo los hallazgos parasitológicos pueden confirmar el diagnóstico de la infección y los tests serológicos positivos permiten un presunto diagnóstico. La Fascioliasis es considerada frecuentemente entre los diagnósticos diferenciales en algunas áreas endémicas

conocidas. Sin embargo, en áreas donde la enfermedad es rara o existe una ausencia de casos publicados, los médicos pueden no considerar esta posibilidad de diagnóstico (ESTEBAN et al., 1998). En algunos casos, aquellos pacientes que por sus síntomas sugerían Fascioliasis, eran objeto de exámenes de heces (EL-GOHARY et al., 1999). En un trabajo, se examinaron 462 pacientes en un estudio para detectar la prevalencia de la infección de *Fasciola* de los que se sospechaba clínicamente de Fascioliasis pero no se especificó los signos ni síntomas (SAFAR et al., 2005).

En 421 pacientes, el cuadro clínico fue el método diagnóstico en Egipto (RAGAB & FARAG, 1978; FARID et al., 1989; SALAMA et al., 1988; MIKHAIL et al., 1990; FAWZY et al., 1992; ABDEL WAHAB et al., 1996; AZAB et al., 1996; YASSIEN et al., 1996; HAMMOUDA ET AL., 1997; EL-KARASKY et al., 1999; EL-GOHARY et al., 1999; ABOU BASHA et al., 2000b; ALLAM et al., 2000; SAFAR et al, 2005; DEMERDASH et al., 2011).

Las situaciones clínicas en que las que se consideró la infección de *F. hepatica* en humanos en Egipto fueron variadas pero hay ciertos aspectos de los cuadros clínicos que se repitieron más frecuentemente.

Uno de los síntomas más habituales fue la fiebre. En 207 pacientes la fiebre se presentaba de diversas maneras. De estos casos febriles, 48 individuos presentaban una fiebre prolongada, incluso uno de ellos padeció un año y medio. Otros 54 enfermos se manifestaron como fiebre intermitente o recurrente, y en 2 casos, los pacientes fueron clasificados bajo el diagnóstico de fiebre de origen indeterminado con el criterio de que los desordenes hepatobiliares son causantes de fiebre. La temperatura media fue de 38,7°C con una máxima de 39,5°C. Entre ellos, 6 pacientes tenían una fiebre de grado bajo.

La eosinofilia fue uno de los síntomas más habituales. En 217 personas se detectaron niveles elevados de eosinófilos, La media de los niveles de eosinófilos fue de  $8,35 \pm 5$ , oscilando entre un 23% y un 80%. Cabe resaltar que, entre estos casos, se diagnosticaron a 40 bajo la denominación de "síndrome eosinofílico" que incluye fiebre, hepatomegalia y alta eosinofilia (DIAAZ et al., 1983). Además, 18 casos se refirieron a leucocitosis.

Hubo 133 pacientes que se quejaron de dolor abdominal, en 9 casos se especificó que el dolor era en la parte superior, en 48 se refería a dolor hepático y en 24 se mencionaba como dolor en el hipocondrio derecho. En dos casos el dolor fue vago.

En 69 casos hubo manifestaciones de hepatomegalia y en otros tres casos se observó el hígado engrosado, incluso en uno de ellos hasta cuatro dedos. También hubo 6 casos que se referían a la blandura del hígado.

Se observó el bazo engrosado en una ocasión y en dos casos era palpable.

El dolor de cólico se presentó en dos casos, un paciente incluso tuvo un ataque agonizante de dolor de cólico en hipocondrio derecho. Hubo un caso de cólico renal izquierdo y severo.

En cuanto a las manifestaciones gastrointestinales también fueron frecuentes. 118 individuos presentaron diarrea, 50 tenían dispepsia, 3 tenían vómitos y otros 3 sufrieron náuseas. Hubieron 51 personas que manifestaron pérdida de peso, 5 personas que presentaban anorexia y 2 pérdida de apetito.

La anemia se detectó en 4 casos, concretándose en uno de ellos que no era seria.

Otros signos que se observaron en el diagnóstico fueron: ictericia en un caso, debilidad general en 3 individuos, en uno escalofríos, también hubo un caso de toxemia, y 2 pacientes sufrieron mareos, uno de las cuales además sufrió transpiración, dolor de cabeza severo y convulsiones en los primeros días de la hospitalización, provocándole un ataque agudo que le causó una hemiplejía en la parte derecha (RAGAB & FARAG, 1978).

Las condiciones medioambientales, los hábitos alimenticios por el uso de agua estancada de los canales, por el lavado de vegetales crudos, la presencia de caracoles de *L. caillaudi*, ganado vacuno y ovejas infectados de *Fasciola* en las casas y la presencia de refugios de animales cerca de las fuentes de agua, estuvieron significativamente relacionados con los 26 casos de fascioliasis que se descubrieron en la provincia de Gharbia en un estudio aleatorio sobre la prevalencia (YASSIEN et al., 1996).

En uno de los casos más prematuros, una niña de 15 meses que excretaba huevos, la madre presentó un historial de permitir al niño chupar lechuga varios meses atrás (HISHMAT et al., 1995).

En un estudio de campo llevado a cabo por el Departamento de Parasitología del Hospital Universitario de Alejandría, las características comunes sobre las que se hizo un especial énfasis para reclutar a los 53 participantes, todos ellos presentando eosinofilia, fue un historial relacionado con una inadecuada higiene en el lavado de vegetales crudos (EL-ZAWAWY et al., 1995).

#### **4.6.9.- ASPECTOS CLINICOS**

Los artículos revisados son de muy diversa naturaleza. Los trabajos que informan de casos individualmente, o series de casos, son los que incluyen detalladas

descripciones clínicas, sobre todo al comienzo de los años ochenta cuando la enfermedad empezó a ser de interés público sanitario. Algunos artículos presentan los resultados generales de los aspectos clínicos sin aportar la distribución entre los pacientes, por lo tanto no especifican los síntomas en cada individuo evaluado e infectado de Fascioliasis (KABIL et al., 2000).

Los síntomas y los resultados de laboratorio que se presentaron más frecuentemente en Egipto fueron los que se comentan a continuación:

**Eosinofilia:** Es la manifestación más habitual descrita entre todas las observaciones. De un total de 6979 casos registrados en la literatura, en 1165 pacientes (16,69%) se realizó un recuento positivo de eosinófilos, teniendo en cuenta que la mayoría de autores definen la eosinofilia por encima de los valores 0-350 cell/ mm<sup>3</sup> y 0-400 cell/ mm<sup>3</sup>. No siempre se especifica el recuento absoluto de eosinófilos, ya que muchos autores solamente mencionan que el sujeto infectado presentaba eosinofilia, En aquellos que se cuantificó se obtuvo una media de 29,64% ( $\pm 12,35$ ). Los recuentos absolutos de eosinófilos fueron muy altos en muchos pacientes, destacando las repetidas menciones de muchos autores hacen referencia a "acusadas eosinofilias". La máxima eosinofilia que se detectó en un paciente fue de 80% eosinófilos (RAGAB & FARAG, 1978). Se hace también mención al conocido como "síndrome eosinofílico febril" en 40 pacientes descrito por DIAAZ et al. (1990) que incluye la fiebre, la hepatomegalia y la alta eosinofilia como manifestaciones típicas de Fascioliasis.

**Leucocitosis:** En 163 pacientes se evaluó el recuento leucocitario, obteniéndose una media 14376,60 ( $\pm 6731,01$ ), y un máximo de 22,000 en el paciente antes mencionado. Por otro lado, en 51 pacientes se describió leucopenia.

**Fiebre:** Un total de 863 pacientes presentaron fiebre, de los cuales en 41 individuos fué especificada como intermitente y prolongada (hasta dos años), en otros 18 se definió como recurrente, en 14 de suave a moderada, y en 27 casos fue catalogada inicialmente como fiebre de origen indeterminado. Sólo en 63 de estos pacientes la temperatura fue descrita. Los valores oscilaron entre 37,5°C y 40°C con una media de 39°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

**Dolor abdominal:** Este síntoma aparece en 1019 pacientes y es recogido en terminología variada, incluso en algunos casos se reseñan muchos detalles como cólico hepático, cólico abdominal, dolor cólico, dolor epigástrico. En 165 de estos pacientes, los autores determinaron el dolor en el hipocondrio derecho, en 97 se trataba de un dolor hepático, en 16 casos era un dolor abdominal generalizado y en 6 individuos se trataba de un vago dolor. En 43 pacientes se repite la descripción de un hígado de aspecto reblandecido. La distensión abdominal o hinchazón se observó en

86 enfermos, en un caso se expuso una rigidez abdominal generalizada, y en 5 casos se describió un abdomen timpánico.

Hepatomegalia: En 825 casos se observó hepatomegalia. En 53 casos se definió como hígado agrandado y en 42 se anotó como hígado reblandecido.

Esplenomegalia: Se describió en 167 personas, en algunos casos como bazo agrandado. En 3 casos se detalló que el bazo era palpable.

Anemia: En 815 pacientes la anemia fue un signo relacionado con la infección. En 290 casos se especifica que se trata de anemia normocítica normocrómica y en 106 pacientes concretó en una anemia normocítica hipocrómica. La media de los valores de hemoglobina fueron 8,5-10,5 g/dl ( $\pm 1,41$ ).

Palidez: Recogida en 678 pacientes probablemente es causa la marcada reducción de la hemoglobina.

Astenia: Se observó en 354 pacientes, entre los cuales se acompañaba de debilidad y fatiga, y malestar general en 3 pacientes.

Anorexia: En 100 casos este síntoma fué observado.

Perdida de peso: Se describió en 98 individuos, pero en ningún caso se dieron detalles del los kilogramos perdidos.

Nauseas: En 337 individuos enfermos.

Vómitos: 63 pacientes.

Diarrea: En 113 infectados.

Ictericia: Se registró en 71 pacientes, en 2 de ellos era relatada como obstructiva.

Síntomas gastrointestinales: En general en 26 casos. En 76 individuos hubo dispepsia, 20 tuvieron ardor epigástrico y 15 sufrieron flatulencia. 10 padecieron cólicos intestinales.

Colecistitis calcular: Se observó en 8 pacientes y en otros 6 se trataba de colecistitis no calcular.

Ascitis: La patogénesis de la ascitis se consideró como una respuesta inflamatoria a una gran cantidad de ejemplares juveniles penetrando en las paredes intestinales, irritando el peritoneo y penetrando en la cápsula del hígado durante su migración (CHEN & MOTT, 1990). En Egipto se registraron 15 casos.

Dolor de cabeza: en 22 pacientes, uno de ellos era severo. 11 personas tenían mareos.

Otros síntomas menos diagnosticados: Incluye 8 pacientes con tos, 10 casos con sudoración nocturna, urticaria en 6 casos, en otros 6 picor, 5 casos con dolor de pecho, hemoptisis o expulsión de sangre en el esputo o flema en 5 pacientes, mialgia en 2, escalofríos en 2 casos, convulsiones en 1 caso, pérdida de apetito en 1 caso y

erupciones en 1 caso. Se describieron síntomas en el ojo en 2 personas con una disminución de la visión, quemazón o estrabismo.

En 646 pacientes se realizaron pruebas de los enzimas hepáticos: La fosfatasa alcalina (ALP) tuvo los valores más elevados en 78 pacientes, con unos valores medios de  $(23 \pm 4,2 \text{ K\&A unidades/dl})$ . La  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT), también tuvo valores anormales en 82 pacientes con una media de  $93,0 \pm 18,22 \text{ U/L}$ . La  $\beta$ -glucuronidasa registró valores anormales en 50 pacientes con una media de  $450-870 \pm 17,48$  unidades Fishman en  $100\text{ml}^{-1}$ . Su elevada actividad en Fascioliasis humana podría afectar la actividad de estos carcinógenos y pre-carcinógenos que han sido detoxificados por esterificación a glucurónidos en el hígado.

Lesiones hepáticas: En 238 pacientes se observó fibrosis periportal. Un engosamiento de las paredes vesiculares biliares fué recogido en 274 personas. Se observó una dilatación del conducto biliar común en 115 pacientes. La dilatación de radicales biliares intrahepáticos se observó en 31 casos. Lesiones quísticas se vieron en 5 ocasiones distintas, lesiones focales en 4 y en un caso se observó una obstrucción del tracto biliar intrahepático.

#### **4.6.10.- CASOS ECTOPICOS**

La Fascioliasis ectópica tiene efectos directos e indirectos en animales y humanos (RASHED et al., 2010).

Los casos erráticos humanos de Fascioliasis se dieron esporádicamente en Egipto y se recogieron en 8 artículos. Dos casos ectópicos se registraron en Mansoura, en la provincia de Dakhalia. El primero se trataba de un paciente diabético de 45 años, que se quejaba de dolor en una hinchazón rojiza en la zona umbilical. Después de suministrarle un tratamiento antibiótico, la hinchazón fluctuaba y medía 10 cm de diámetro. Se le practicó una incisión en la línea media supra umbilical de la cual evacuaron líquidos compuestos de sangre alterada, entre las que apareció un trematodo identificado como *F. gigantica*. En el segundo caso, un granjero de 23 años padecía de dolor en una protuberancia rojiza en la parte superior del muslo. Se le diagnosticó un absceso y se le intervino quirúrgicamente, practicándole una incisión que también evacuó líquidos y un ejemplar igualmente identificado morfológicamente como *F. gigantica* (EL-SHAZLY et al., 1993).

En un estudio de campo realizado en Tamy Center, en la provincia de Fayoum en 700 individuos, 17 de ellos resultaron positivos. Durante el examen mediante



ultrasonido se encontraron 7 trematodos del parásito en el conducto biliar común, y en la vesícula biliar se descubrieron otros 5 ejemplares. No se especifica en cuantos pacientes se obtuvo cada ejemplar (AHMED et al., 1994).

Entre los 15 casos agudos detectados en un estudio llevado a cabo entre 30 pacientes sospechosos, uno fué descrito como fascioliasis ectópica con una alta eosinofilia y procedente del pueblo de Damanhour en la provincia de Behera. El parásito se encontraba subcutáneamente sobre la séptima costilla intercostal en la parte anterior de la pared del pecho (HISHMAT et al., 1995).

En otro artículo se recoge el caso de un niño que sufría de un absceso en el tobillo izquierdo. Se le practicó una incisión sobre el absceso y apareció un trematodo pegado aparentemente aplastado. Los estudios histológicos, morfológicos y los tests intradermales probaron que el parásito correspondía a un ejemplar inmaduro de *F. gigantica* (EL-GHAWABI et al., 1978).

En un caso, además de hepatomegalia, se encontró una masa en la pared abdominal anterior de la región epigástrica. Esta masa era una lesión de una *F. hepatica* ectópica que respondió dramáticamente al tratamiento con triclabendazol y desapareció completamente del paciente tras la curación (EL-KARASKY et al., 1999).

Los hallazgos radiológicos de infectados por fascioliasis confirmaron 5 casos de pacientes con una infección ectópica pulmonar. Además uno de ellos presentó ascitis. La efusión pleural y los fluidos de ascitis mostraron una eosinofilia alta. Sin embargo, los huevos de *Fasciola* en heces solamente se detectaron en tres de ellos (EL-SHAZLY et al., 2002).

Los hallazgos por sonografía permitieron descubrir un trematodo de *Fasciola* en la vesícula biliar de un paciente en el transcurso de un estudio donde se evaluaba el triclabendazol en el tratamiento de fascioliasis humana (SABRY et al., 1997).

En otra publicación se encontraron 24 trematodos de *Fasciola* en la vesícula biliar, también por ultrasonografía abdominal en un estudio clínico (EL-SHAZLY et al., 2001).

También en Egipto se informó de un caso aberrante de fascioliasis en la cavidad peritoneal (MAKLED & AZAB, 1994).

#### **4.6.11.- TRATAMIENTO**

En toda la literatura revisada, el tratamiento se especificó en 2931 pacientes. Los medicamentos utilizados fueron el triclabendazol (2412 pacientes), el que más ampliamente se empleó, la nitazoxanida (263 pacientes), extracto de mirra (248

pacientes), praziquantel (136 pacientes), emetina (106 pacientes), bitionol (67 pacientes), arteméter (39 pacientes), y metronidazol (27 pacientes). En 140 pacientes se utilizaron más de dos medicamentos.

El primer artículo sobre el tratamiento de Fascioliasis humana en Egipto fue sobre el clorhidrato de emetina administrada a 4 pacientes. El primero fue un niño de 10 años. Su sintomatología había sido muy severa durante meses con dolor abdominal, fiebre, anorexia y dolor en el hipocondrio derecho. Sufrió ataques variados llegando a una convulsión generalizada de la que se recuperó pero con hemiplejia derecha. El examen de heces reveló huevos de *Fasciola*. Se le administró clorhidrato de emetina en dosis apropiada y los huevos de *Fasciola* desaparecieron. También recuperó su apetito y su hemiplejia mejoró considerablemente. El segundo paciente fue una niña de 11 años que se quejaba de dolor de cólico severo en el abdomen superior. Tenía fiebre y los exámenes de heces revelaron una gran cantidad de huevos de *Fasciola*. Se le administró clorhidrato de emetina. El dolor abdominal desapareció y su condición general mejoró. La fiebre remitió y la paciente dejó de excretar huevos de *Fasciola*. El tercer caso fue en un niño de 7 años con dolor abdominal que le sobrevenía una o dos veces por semana, y fiebre recurrente desde hacia un año y medio. Presentaba fiebre junto con el hígado y el bazo palpables. En sus heces se encontraron una gran cantidad de huevos de *Fasciola*. Después de una dosis apropiada de clorhidrato de emetina, las muestras en heces fueron negativas y el paciente mejoró. El cuarto caso, también con buenos resultados, fue el de un hombre de 26 años con dolor abdominal, debilidad general, mareos y dolor de cabeza severo durante un año. Las muestras de heces presentaban huevos de *Fasciola*. Se le trató con clorhidrato de emetina y los huevos de *Fasciola* desaparecieron así como sus dolores también mejoraron (RAGAB & FARAG, 1978).

Los efectos terapéuticos derivados de la emetina para eliminar la infección y además en mejorar los síntomas son de sobra conocidos, pero causan una variedad de manifestaciones tóxicas sobre en el corazón, hígado y tracto digestivo. Se observaron cambios frecuentes en el electrocardiograma y una hipotensión, que con la vida media tisular corta de la dehidroemetina, desaparece más rápidamente del corazón y del hígado, comparado con la emetina (MERA Y SIERRA et al., 2011).

De hecho, los próximos pacientes ya fueron tratados con el derivado del clorhidrato de emetina. La dehidroemetina se administró con éxito a 7 pacientes para resolver el tratamiento ineficaz del praziquantel. Después del fracaso del tratamiento, los niños fueron retratados con dehidroemetina (15 mg diarios en 10 dosis). Una vez el tratamiento con dehidroemetina había comenzado, los niños dejaron de tener fiebre

dentro de los 4-7 días siguientes y mejoraron rápidamente. No se encontraron efectos adversos (FARID et al., 1986).

Los mismos autores volvieron a fracasar con el praziquantel en 2 niños, los cuales tuvieron que ser nuevamente tratados pero con dehidroemetina obteniendo buenos resultados. Otros ocho niños, cuyas edades variaban entre 3 y 6 años recibieron una dosis de 1,0 mg/kg diaria de 10 a 14 dosis de dehidroemetina intramuscular. 4 se curaron y los otros 4 continuaron con fiebre recurrente y huevos de *Fasciola* en sus heces. Se les administró una segunda dosis de dehidroemetina. Los autores consideraron que en los casos agudos de Fascioliasis en niños pequeños era más fácil el tratamiento parenteral que intentar forzar el oral (FARID et al., 1988).

Precisamente se evaluó el efecto del praziquantel en infecciones de *Fasciola*, de *Heterophyes heterophyes* y *Hymenoleosis nana*. Se administró una dosis de 20 mg/kg de praziquantel obteniéndose un tasa de cura para *H. nana* del 94,1% y para *H. heterophyes* del 95%. Sin embargo, los cinco casos de Fascioliasis resultaron positivos después de un mes del tratamiento con el praziquantel (ATA et al., 1988).

Otro estudio que avala que el praziquantel no es el medicamento de elección para la Fascioliasis, demostró una infectividad del 95% (AHMED et al., 1994). Para corroborar más si cabe la ineficacia frente a la Fascioliasis del praziquantel, en otro trabajo, los resultados del tratamiento con praziquantel en una dosis de 75 mg/kg/día durante 10 días contra la infección de *F. gigantica* resultó efectivo en el 86,71% de los casos tratados, aunque en algunas dosis superiores de 50 mg/kg/ día durante 21 días, resultó efectiva en el tratamiento de todos los casos estudiados (YASSIEN et al., 1996).

Otro fracaso del praziquantel, aunque esta vez el medicamento de retratamiento fue el triclabendazol. En 8 pacientes falló la respuesta a un tratamiento de 75 mg/ kg dado más de una vez. Se retrató esta vez con triclabendazol a una dosis de 10 mg/ kg peso. Después de 6 meses todos los casos normalizaron todos los desajustes en los valores del laboratorio. 4 días después de la administración del triclabendazol, se registraron episodios de fiebre y dolor abdominal. Esto podía ser debido a la desintegración de la muerte del parásito (EL KARASKY et al., 1999).

Por aquella época el bitionol también se empleaba contra la Fascioliasis humana. De hecho se realizó un estudio en el que se evaluaba su eficacia. Se administraron 200 mg de bitionol en dosis de 30 mg/kg cada día durante 5 días. Los huevos de *Fasciola* desaparecieron en una segunda o tercera dosis con una tasa de cura del 100%. Los tests hepáticos y renales mostraron casi todos los valores normales y no se observaron efectos adversos (FARAG et al., 1988).

Se administró bitionol a 14 pacientes con Fascioliasis crónica en una dosis de 30 mg/kg cada día en 5 tomas. Los huevos de *Fasciola* desaparecieron completamente en la quinta dosis dada alcanzando una tasa de cura del 100%. Así se probó que el bitionol resultó ser un potente fasciolicida con mínimos efectos adversos (BASSIOUNY et al., 1991).

En otro estudio sobre el bitionol, se encontró que el mecanismo de cura de la terapia podía ser a través de la acentuación de un efecto inmunoregulador (ABDEL-RAHMAN et al., 1990b). El mismo autor realizó otro estudio en el que evaluaba en pacientes con Fascioliasis crónica, las actividades de las enzimas glutatión en sangre (GSH), eritrocito glutatión s-transferasa (GST) y la suero  $\gamma$  glutamil transferasa (GGT). Las variaciones observadas en los parámetros fueron restauradas a los correspondientes valores normales confirmando las características tóxicas de la Fascioliasis con el tratamiento de bitionol. No se observó ningún efecto adverso del bitionol en los parámetros estudiados (ABDEL-RAHMAN et al., 1990a). Otra prueba estudiaba la patología de la fascioliasis humana antes y después del tratamiento con bitionol. Tanto la luz microscópica como la electrónica revelaron una regresión del cuadro de Fascioliasis a normal después del tratamiento con bitionol sin ningún signo de toxicidad en el hígado (ABOU-BASHA et al., 1990).

En la década de los 90, otro medicamento, el metronidazol fue utilizado en Fascioliasis humana, aunque su utilización fue escasa y solo se emplearon en dos trabajos. El primer paciente fue tratado con éxito. Se trataba de un granjero de 30 años que presentaba cólico hepático, fiebre, vómitos, rigidez abdominal generalizada, fiebre irregular y diarrea más o menos persistente. Presentaba una anemia muy marcada, una eosinofilia acusada y una leucocitosis prematura. Se le administró una dosis de 1,5 g diariamente durante tres semanas (MAGDI et al., 1993). En el otro trabajo, el metronidazol se empleó junto con el praziquantel. Se demostró que el uso de la monoterapia con praziquantel fue efectiva en el 86,76% de los casos estudiados y resultó 100% efectiva cuando se combinó con el metronidazol (YASSIEN et al., 1996).

Aunque la nitazoxanida se le suministró a 263 pacientes, solo se empleó en dos ocasiones que corresponden a dos publicaciones (ROSSIGNOL et al., 1998; KABIL et al., 2000). En el primer trabajo que corresponde al año 1998, se señala que el tratamiento óptimo de la Fascioliasis humana aún no se había encontrado. De hecho, se explica que el hidrocloreuro de emetina y el bitionol habían sido asociados con múltiples efectos adversos y reacciones tóxicas, y que por otro lado, se habían publicado artículos conflictivos sobre el praziquantel (KNOBLOCH et al., 1985; SCHIAPPACASSE et al., 1985). Además, se limitaba el uso del triclabendazol a los

tratamientos antihelmínticos veterinarios, y había sido testado en Fascioliasis solamente en un pequeño número de personas, no estando aprobado su uso (HAMMOUDA et al., 1995). La nitazoxanida fue administrada oralmente en una pastilla de 500 mg cada 12h durante 7 días consecutivos. Se evaluó su tolerancia y eficacia a los 8, 15 y 30 días siguientes en un seguimiento clínico, hematológico, coprológico y serológico. Los síntomas clínicos mejoraron y a los 15 días el paciente se consideró normal. La hematología y serología mejoró a los 8 días. Al final de los 30 días después del tratamiento el paciente estaba curado. A partir de este momento, los autores trataron con nitazoxanida a 137 pacientes más, obteniendo una tasa de curación del 82,4% con una buena tolerancia, excepto 3 pacientes que sufrieron efectos adversos como vómitos y dolores abdominales. Este estudio se realizó en momentos en los que la nitazoxanida estaba siendo registrada en Estados Unidos y Europa para el uso farmacéutico del tratamiento de infecciones parasitarias de amplio espectro, sugiriendo los autores que la Fascioliasis podría ser candidata (ROSSIGNOL et al., 1998). En el otro estudio al que se sometieron a 125 pacientes la nitazoxanida se administró en dosis de 500 mg (200 mg para niños) dos veces al día (mañana y tarde) durante 6 días consecutivos. Los resultados mostraron que 121 (97%) de los 125 pacientes ya no excretaban huevos en heces a los 30 días de inicio del tratamiento. El medicamento fue bien tolerado (KABIL et al., 2000).

El medicamento más utilizado y que ha obtenido mejores resultados ha sido el triclabendazol. Inicialmente utilizado en veterinaria, en los primeros años de su uso en Egipto no estaba comercializado para humanos. En el primer artículo donde conste su utilización, simplemente como triclabendazol sin ninguna especificación más, se administró a 10 adultos en una dosis simple de 10 mg/kg peso corporal con buenos resultados en el estudio de los cambios de los parámetros lipídicos antes y después del tratamiento (OSMAN et al., 1995). En el segundo artículo donde el triclabendazol aparece como tratamiento para Fascioliasis humana, se especifica que se trata de la presentación comercial para uso veterinario Fasinex desarrollado por Novartis. Se administró en forma líquida a 7 pacientes una dosis de 10 mg/kg peso corporal oralmente con el estómago vacío (1 cm<sup>3</sup> contenía 100 mg). A los pacientes muy enfermos se le administró prednisona 5 mg 3 veces al día (ABDEL WAHAB et al., 1996). Seguidamente, a otros 28 pacientes con fascioliasis aguda y crónica se les suministró dos dosis orales de 10 mg/kg peso corporal durante dos días consecutivos de triclabendazol (Fasinex solución, Ciba Geigy). A los pacientes se les pidió el consentimiento antes de su administración (GABBOUR et al., 1997).

Ya constatado su éxito en animales, el triclabendazol, químicamente relacionado con los benzimidazoles, y tras los fracasos de otros tratamientos y/o los efectos secundarios con clorhidrato de emetina, bitionol y praziquantel, comienza a establecerse como tratamiento de elección.

Se testó un preparado de triclabendazol para humanos (CGP 23030) con éxito en 25 pacientes a una dosis de 10 mg/kg peso corporal. La tasa de cura fue del 100% después de una semana de terapia, y del 88% a los 2 meses del tratamiento. Su tolerabilidad fue total en todos los pacientes, algún dolor en hipocondrio derecho, náuseas y vómitos en algún caso, que decrecieron rápidamente al final de la primera semana. Se demostró su seguridad mediante las investigaciones de laboratorio (SABRY et al., 1997). Este mismo preparado para uso humano, triclabendazol (CGP 23030) y con la misma única dosis de 10 mg/kg, también fue sometido a evaluación de tolerancia y eficacia en otro estudio con buenos resultados. Proporcionado a 50 pacientes, tras dos meses, la tasa de curación fue de 94% y los efectos secundarios despreciables. Su uso estaba justificado (FARAG et al., 1998).

Comenzaron a publicarse estudios en los que se valoraba la eficacia y seguridad del triclabendazol (HASSAN et al., 2000; MAHROUS et al., 2003; EL-TANTAWY et al., 2007). En un estudio, después de 3 meses de tratamiento con triclabendazol (Fasinex, Ciba-Geigy), el 50% de los casos tenían una elevados niveles de anticuerpos (HAMMOUDA et al., 1995). En otro estudio se usó la técnica modificada de doble anticuerpo con sandwich ELISA, para probar que los niveles de antígenos circulantes de *Fasciola* cayeron en todos los casos, 3 meses después del tratamiento con triclabendazol (Fasinex, Ciba-Geigy) en 10 pacientes a los que se les suministró oralmente una dosis única de 10 mg/kg peso corporal (HAMMOUDA et al., 1997). Se evaluaron parámetros alterados por la infección, ácidos biliares, aspartato y alanino amino transferasas (ALT y AST), antes y después del tratamiento con triclabendazol, confirmando la mejora de la colelitiasis en todos los casos de Fascioliasis tratados (OSMAN et al., 1999). Después del tratamiento con triclabendazol, los niveles de IL-1 y IL-4 aumentaron significativamente indicando un obvio mejora en las respuestas inmunológicas de los pacientes (ALLAM et al., 2000).

La eficacia del triclabendazol se sometió a un estudio comunitario. A 68 individuos enfermos se les dió una dosis única de 10 mg/kg y otros 66 pacientes recibieron dos dosis de 10 mg/kg durante 2 días consecutivos. La tasa de curación, cinco semanas después del tratamiento, fue de 79,4% en el primer grupo y del 93,9% en el segundo grupo. El medicamento se toleró bien, y no se encontraron efectos adversos serios (EL-MORSHEDY et al., 1999). En 40 niños enfermos de Fascioliasis, que tras el

consentimiento paterno, fueron tratados con triclabendazol en una dosis simple de 10 mg/kg postpandrialmente, la tasa de curación fue del 78% a los 2 meses. El resto necesitó una segunda dosis de triclabendazol. No se registraron efectos adversos (EL KARASKY et al., 1999). Se registró en 60 pacientes otro éxito del triclabendazol (Fasinex®, Ciba Geigy, Basel, Switzerland), primer artículo en el que aparece esta denominación (MAHER et al., 1999).

El Ministerio de Sanidad y Población de Egipto contraindicó el uso del triclabendazol en niños menores de 5 años (MOTAWEA et al., 2001a). Sin embargo, cabe destacar que el triclabendazol dió excelentes resultados en el programa lanzado por el Ministerio de Salud y Población de Egipto para controlar la Fascioliasis entre niños en la zona del Delta del Nilo. Desde 1998 al 2002, se seleccionaron 36,000 niños, entre una preselección de pueblos endémicos de Behera. Durante este período, 1280 casos de Fascioliasis fueron tratados con triclabendazol. El objetivo de este estudio no era evaluar la tasa de curación del triclabendazol, si no evaluar la eficacia del programa. Sin embargo, el cribado que se llevó a cabo a los 18 meses después del primer cribado, otorgó una clara indicación de su eficacia. No se observaron efectos adversos, incluso con la dosis única adoptada en el protocolo. El principal problema relacionado con el triclabendazol, fue su limitada disponibilidad y dificultad en conseguir las suficientes existencias para tratar el gran número de casos detectados (CURTALE et al., 2000b; CURTALE et al., 2005).

La eficacia y seguridad del triclabendazol en la coinfección con *S. mansoni* también ha sido evaluada. A la misma dosis (10 mg/kg) que el triclabendazol se administra en Fascioliasis, no resultó ser suficientemente efectivo en el tratamiento de *S. mansoni*. (BARDUAGNI et al., 2008). El tratamiento con dos dosis distintas de triclabendazol se administro a 49 pacientes coinfectados. A las 8 semanas del tratamiento, la tasa de curación fue del 96% para Fascioliasis y 32,7% para esquistosomiasis. Se recomienda el pretratamiento con praziquantel en la infección combinada (OSMAN et al., 2011).

En un estudio reciente se probó la eficacia del arteméter (Artemidine®), agente antipalúdico, en 39 pacientes infectados de Fascioliasis, después de dar su consentimiento, y tras aprobación por el correspondiente comité ético. El triclabendazol (Egaten® tabletas de 250 mg) se administró en aquellos pacientes en los que el tratamiento con arteméter falló. Las tasas de curación fueron del 35% para el grupo al que se le administró 6 x 80 mg de arteméter tres días consecutivos, y del 6% a los que se les suministraron 3 x 200 mg en 24 horas. La conclusión fué que el arteméter muestra poco o ningún efecto contra la infección de la Fascioliasis, aunque deja una puerta abierta a la administración conjunta con triclabendazol (KEISER et al., 2011).

En el año 2001 se evaluó la eficacia y la seguridad del Mirazid. Se trata de una combinación de extracto de oleo-resina de mirra (*Commiphora molmol*, Familia Bruseraceae). Un total de 292 pacientes infectados con *Fasciola* recibieron una dosis de 10 mg/kg una hora después del desayuno durante 6 días consecutivos. El medicamento se dió en una cápsula para adultos y en supositorio para niños. Parasitológicamente se alcanzó una cura del 98.6% a las 4 semanas del tratamiento. El resto, el 1,4% de los pacientes que siguieron dando positivo después de una dosis simple, mostraron una reducción acusada de huevos de *Fasciola* en heces, y además presentaban infección por otro parásitos. Los autores consideraron que la reducción tan importante en el recuento de huevos de *Fasciola* disminuía la capacidad de transmisión del parásito en la comunidad. Con respecto a los efectos adversos, solo se registraron en 6,5% de los pacientes tales como mareo, somnolencia y acidez. Ningún paciente paró el tratamiento y todos los efectos adversos continuaron (MOTAWEA et al., 2001a). Otros autores también informaron de excelentes resultados del tratamiento con mirra, por ejemplo en Alejandría (EL-GOHARY et al., 1999). En otros estudios se probó su alta eficacia terapéutica como medicamento contra trematodos, especialmente en Esquistosomiasis y Fascioliasis, y también contra cestodos (HEGAB & HASSAN, 2003; SOLIMAN et al., 2004; ABO-MADYAN et al., 2004; HASSAN et al., 2004; MASSOUD et al., 2001, 2004, 2010; OSMAN et al., 2010, 2011).

#### **4.6.12.- FUENTES DE INFECCION HUMANA**

La ingestión de plantas de agua dulce con las metacercarias pegadas en ellas, preferentemente berros, son la principal fuente de infección en humanos (MAS-COMA et al., 2005). En Egipto, muchas especies de verduras y hierbas se comen crudas en ensaladas. Estas incluyen *Eruca sativa* (El gargeer), *Lactuca sativa* (El khas) y *Allium porrum* (El korrat), *Petroselinum sativum* (bakdoones) y *Portulaca oleracea* (El regla). No son plantas acuáticas, pero se cultivan a lo largo de los bancos de agua de los canales del Nilo y necesitan una irrigación frecuente. Se recogen y se lavan allí mismo para prepararlas dándoles color verde y ser vendidas en el mercado. La irrigación y el lavado deja expuesta a las verduras a llevar pegadas las metacercarias (HASSEB et al., 2002; ESTEBAN et al., 2003). Efectivamente, CURTALE et al. (2003b) encontraron habitual entre los casos infectados el consumo de berros cultivados o salvajes. Encontraron además que en el proceso de secado de semillas crudas que eran



lavadas en el canal varias veces, las metacercarias podían quedar enquistadas en la piel, rompiéndola el consumidor con sus dientes.

En el primer foco endémico que se conoció en el delta del Nilo, con 40 personas infectadas, los autores apuntan que el modo de infección pudo deberse al consumo de verduras verdes crudas, conseguidas en la propia localidad, y que además, la distribución familiar de los casos infectados favorece que los individuos de la misma familia hayan compartido todos la misma comida infectada (FARAG et al., 1979).

En un estudio llevado a cabo en el pueblo de El-Prince, cercano a Alejandría, se encontró que el conocimiento sobre las verduras con hojas como fuente de infección de *Fasciola* entre las amas de casa, era indirectamente proporcional a la edad, mejor en amas de casa jóvenes y con educación secundaria alta o superior. Un 57% de las amas de casa entrevistadas lavaban las verduras bajo el grifo y un 32,7% las mojaban en el grifo. Solamente un 9,6% las mojaban en agua mezclada con una sustancia como vinagre, zumo de limón y sal común. Solamente un 5% de las que se infectaron con vegetales que transmitían parásitos, lavaban sus verduras mojándolas con agua y una sustancia añadida (agua, vinagre, zumo de limón, sal), comparado con el 19% de las mujeres libre de infección (FAWZI et al., 2004).

Dos riesgos más de contraer la enfermedad son la propia producción de vegetales comidos en casa y el agua en tuberías suministradas desde el canal con agua contaminada de metacercarias (CURTALE et al., 2003b).

Por lo que respecta a la infección en el hombre, la presencia de animales de granja y sus refugios en el interior de las casas de los propios granjeros suponen un alto riesgo de infección. La mayoría de los granjeros lavan a sus animales en los canales junto con las verduras y los utensilios. De esta manera, comen las verduras contaminadas y beben agua en estos utensilios contaminados (MOTAWEA et al., 2001b; HUSSEIN et al., 2000). Según CURTALE et al. (2003b), la presencia de vacas, búfalos y/o ganado en la casa, y el hábito de llevar los animales al canal para bañarlos, estaba significativamente asociado a la infección. La posibilidad de que la gente use el canal para lavar platos, ropa, verduras y ellos mismos, cerca de donde los animales tomaron el baño, donde el caracol está presente representa un obvio enlace para entre el animal y el humano.

Además, mientras los niños nadan en el agua, tragan agua contaminada involuntariamente (MOTAWEA et al., 2001b; HUSSEIN et al., 2000). Por el contrario, otros autores apuntan que nadar en el canal no representó ningún factor de riesgo para la infección en un estudio llevado a cabo en el año 2000 por el Ministerio de Salud y Población de Egipto (CURTALE et al., 2003b). Algunos autores consideran que estas

circunstancias aumentan en una clase social más baja y mayor cuanto más amplia sea la familia (MOTAWEA et al., 2001b; HUSSEIN et al., 2000). Otros apuntan que no existe una asociación significativa entre las clases sociales de las familias y un riesgo aumentado de sufrir la infección (EL-SAHN et al., 1995). La prevalencia de la infección fue mayor entre analfabetos que entre los individuos que habían recibido educación (EL SHAZLY et al., 2009). En otro trabajo, se describe que las madres con niños no infectados eran más conscientes de la infección, que las madres cuyos niños estaban infectados (FARID et al., 1998).

Las diferencias en el género no se suelen observar normalmente en enfermedades parasitarias transmitidas a través de la comida, especialmente en un país como Egipto, donde todos los miembros de la familia comparten la misma comida. Sin embargo, las chicas jóvenes están a menudo más involucradas en la preparación de las comidas caseras, quedando más expuestas que los chicos a la manipulación de diferentes vegetales, que son comidos crudos en las ensaladas (CURTALE et al., 2007). El papel del sexo en Egipto puede estar relacionado con factores culturales, higiénicos y de comportamiento, donde las mujeres están más asociadas con el lavado de ropa y utensilios de cocina en los canales (ESTEBAN et al., 2003).

#### **4.6.13.- SITUACIONES DE ENDEMIAS HUMANAS**

El cuadro epidemiológico de la Fascioliasis humana ha sufrido un cambio mundial y Egipto es uno de los más claros ejemplos. El patrón de la infección de *Fasciola* ha evolucionado en las provincias del Delta del Nilo de manera diferente.

Algunos autores afirmaron que la infección estaba difundiéndose de la situación original de casos humanos esporádico en zonas conocidas como focos animales endémicos hasta los años 80, a presentar una distribución de endemia humana, que puede ser catalogada como zona mesoendémica incluyendo unos focos humanos hiperendémicos, como por ejemplo la provincia de Behera, basado en la clasificación de situaciones epidemiológicas de Fascioliasis humana (MAS-COMA et al., 1999b). Tal situación era consistente con la impresión general de que la Fascioliasis humana era un problema de salud público emergente en la región del Delta del Nilo, un hecho que ha sido relacionado con la introducción de *F. hepatica* en ganado importado desde Europa en el siglo XX (ESTEBAN et al., 2003).

La provincia de Alejandría es representativa de esta proliferación de la enfermedad, clasificándola como una verdadera zona mesoendémica. En esta provincia fue donde

se declaró en 1979 el primer foco humano de Fascioliasis con una prevalencia del 7,3%, aunque los autores ya habían detectado 16 casos procedentes de Abis 2, un barrio de la ciudad de Alejandría (FARAG et al., 1979). Es precisamente en el mismo barrio de Alejandría donde en el año 1983 se detecta una prevalencia similar del 6% (MANSOUR et al., 1983). En los años siguientes, se siguieron descubriendo en Abis 2 altas prevalencias de la enfermedad, del 6,74% en 1988 (SOLIMAN et al., 2008), 5,1% en 1992 (ABOU BASHA et al., 1992), 3,6% en 1998. En el año 2000 se registraron prevalencias de 5,5% en Abis 1 y del 7,3% en Abis 7 y Abis 8 (ABOU-BASHA et al., 2000a; HUSSEIN et al., 2000).

Numerosos casos aparecieron por entonces en estos barrios de la ciudad de Alejandría, 137 infectados (ROSSIGNOL et al., 1998), otros 134 infectados en 1999 (EL-MORSHEDY et al., 1999), 287 en la ciudad de Alejandría y sus áreas rurales (FARAG et al., 1993), en la ciudad cercana de El Prince se detectó una prevalencia del 2,4%. Incluso más recientemente, en el 2010 y 2011, 16 y 19 casos respectivamente se han informado en Abis (OSMAN et al., 2011; KEISER et al., 2011).

Respecto a la provincia de Behera el patrón de inicio y la irrupción de la enfermedad es menos pronunciado que en Alejandría. Las primeras prevalencias empiezan a conocerse gracias a estudios transversales. Uno de ellos, se llevó a cabo en la zona para evaluar la prevalencia y la intensidad. Se pretendía desarrollar un plan apropiado de medidas de control bajo las directrices de el Ministerio de Salud y Población de Egipto junto con la Cooperación Italiana y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se realizaron desde el año 1996 hasta el 2000 (CURTALE et al., 2000b). Otro estudio básico para conocer la prevalencia en la zona se realizó en el año 2003 por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Valencia (ESTEBAN et al., 2003). En el año 2005, la provincia de Behera registró una prevalencia del 11% (EL-SAHN et al., 1995). Las prevalencias alcanzaron el 5,6% en los distritos de Delengat, Abu Hommos, Kafr El-Dawar, Delengat, Rahamania y Hosh Eissa en 1996. En 1999 eran del 3% en Bulin, Abis, Delengat, Hosh Eissa y del 1% en Abou El-Matameer, Abou Hommos, Kafr El-Dawar, Hosh Eissa, Rahamania. La prevalencia más alta se alcanzó en Bulin (20%). En el 2002 se logró reducir la prevalencia en la zona al 0,8% (CURTALE et al., 2000b; CURTALE et al., 2003a; CURTALE et al., 2003c). En 2003, la prevalencia total en El-Aaly, Kafr El-Dawar, Hosh Eissa, y Delengat fue del 12,8% con unos valores que oscilaron entre el 5,2% y el 19% (ESTEBAN et al., 2003). En el año 2007 se registró una prevalencia del 4,3% en los seis distritos endémicos: Delengat, Abu Hommos, Abu El-Matameer, Kafr El-Dawar, Hosh Eissa y Rahamania (CURTALE et al. 2007). Recientemente, en el año 2011, se registró en El-Haddad El-Bahary una

prevalencia del 2,7% (KEISER et al., 2011). Podríamos referirnos a Behera como un área mesoendémica que incluye varios focos hiperendémicos.

En la provincia de Dakahlia, la prevalencia de la Fascioliasis fue del 0,4% en la ciudades de Talkha y Nabarohu en el año 2000 (CURTALE et al., 2000b). En el 2001 se registraron prevalencias del 7% y del 7,47% en Kafr El-Hessa, a 10 km de Mansoura, capital de la provincia (MOTAWEA et al., 2001; EL-SHAZLY et al., 2001). En la misma localidad, el año siguiente, la prevalencia fue del 8,2% (EL-SHAZLY et al., 2002). Aunque se dieron más casos en los años siguientes, en el año 2006 se registraron prevalencias del 4,8%, del 0,2% en la capital Mansoura y en el área rural concretamente en Gogar, se observó una prevalencia del 0,4% (EL-SHAZLY et al., 2006a; EL-SHAZLY et al., 2006b). En el año 2007 se registró una prevalencia del 10,4% en Oweish El-Hager (EL-AHL et al., 2007). Se trata de una zona mesoendémica en la que la infección aparece distinta con respecto a Behera, ya que en aquella provincia la mayoría de casos positivos se centran en seis distritos endémicos.

En el resto de provincias del Delta del Nilo las situaciones pueden considerarse epidemiológicamente como mesoendémicas. En Gharbia la prevalencia fue del 2,75% (YASSIEN et al., 1996). En la provincia de Menoufia, la prevalencia total fue de 1,6%, encontrándose la prevalencia más alta en Ezbat El Deyaba (10,6%), y en el resto de localidades fueron: Ezbet Ashoub (4,2%) y AbdelGhany Shami (3,8%), Kafr Menawehla (3,4%), Ezbet Salim Abul Ela (3,2%) (MABROUK et al., 1994). En Sharkia se alcanzó el 10% prevalencia (HASSAN et al., 1995) y el 8,7% en Kafr Sakr y Abou Hammad (MAKLED et al., 1988). En la provincia de Kafr El-Sheikh, se detectó un 6% de prevalencia (EL-BAHY et al., 1997). En Qalyubyya hubieron 13 casos (MAGDI et al., 1993; NEGM et al., 1995).

En el resto de provincias del país, las del Medio y del Alto Egipto, las prevalencias fueron inferiores al 10%. En El Cairo, 2,24%, en Giza del 2,51% y en El Fayoum fue del 3%. En la provincia de Assiut, hubo un caso, en Beni-Suef se detectó el 6,87% y en la provincia de Ismailia, 4,9% (SAFAR et al., 2005; AHMED et al., 1994; HASSAN et al., 1998; IBRAHIM, 2004; ABDEL AAL et al., 1999).

#### **4.6.14.- EPIDEMIAS FAMILIARES Y/O LOCALES**

Entre toda la literatura revisada, dos artículos se refieren a varios miembros de una misma familia infectados. En el pueblo de Abis II perteneciente a la provincia de Alejandría se informó de la primera epidemia local. En un principio se diagnosticaron

16 casos de fascioliasis confirmada los cuales se presentaron en el Medical Research Institute. Este descubrimiento fue el que estimuló más investigaciones para estimar la extensión de la enfermedad. Se seleccionaron 610 personas del mismo pueblo que vivían en 65 casas. De 517 individuos examinados, se encontraron huevos de *Fasciola* en 40 casos. La prevalencia fue del 7,3%. Se observó que el 38,5% de las familias de Abis II tenían uno o más casos infectados entre sus miembros. El 20% de esas familias tenía dos miembros de su familia infectados, y el 20% tenían hasta tres de sus miembros infectados.

Con respecto al modo de infección, podría ser a través del consumo de verduras verdes crudas de origen local. La distribución familiar de los casos infectados favorece que los individuos de una misma familia hubieran compartido la misma comida infectada (FARAG et al., 1979). En el segundo artículo, en un estudio realizado en la provincia de Fayoum se obtuvo una prevalencia del 3%. Dos familias tuvieron a cinco de sus miembros infectados a la vez. Se indica que la infección pudo ser debida a compartir la misma comida (AHMED et al., 1994).

Los autores relatan un brote durante el mes de Junio a Agosto de 1986. Un total de 18 niños, 5 chicas y 13 chicos fueron referidos al hospital. Todos procedían de varios pueblos de el Delta del Nilo, sin especificar la localidades. Se encontraban muy enfermos con síntomas de fiebre, hepatomegalia y eosinofilia (FARID et al., 1988).

En la provincia de Dakahlia los autores se refieren a la Fascioliasis como un problema de salud público, diagnosticándose 23 casos (EL-SHAZLY et al., 1991).

Durante 2 años se diagnosticaron 40 niños que se presentaron al Departamento Pediátrico del Hospital Infantil en El Cairo (EL-KARASKY et al., 1999).

En tres meses, un total de 48 pacientes coinfectados con Fascioliasis fueron atendidos en el Hospital Universitario de Mansoura, en Dakahlia (EL-SHAZLY et al., 2005).

#### **4.6.15.- COINFECCION CON OTROS PARASITOS**

En Egipto, el parásito concomitante que más veces se ha publicado es *S.mansoni*, incluyendo un total de 419 pacientes que presentaban simultáneamente ambos parásitos. En muchos casos, la infección con *S. mansoni* es más prevalente que la Fascioliasis como ocurrió en Behera donde se obtuvo una prevalencia de *Fasciola* del 4,3% y de *S. mansoni* del 4,3%. Menos del 1% de los pacientes estuvo infectado con ambos parásitos (CURTALE et al., 2007).

Cabe destacar la asociación positiva de Fascioliasis y Esquistosomiasis detectada en la localidad de Tiba (Behera). Esta asociación nunca se había descrito previamente, aunque en muchos casos se han presentado una concomitancia de ambas especies en Egipto. Puede deberse esta asociación a que en ambos parásitos sus caracoles intermediarios comparten el mismo hábitat. La principal especie transmisora de Fascioliasis en Egipto según la bibliografía es *L. caillaudi*, y muestra una preferencia por los lugares amplios, profundos, permanentes y contaminados con una superficie relativamente densa y cubierta de vegetación. En ese mismo hábitat, normalmente coexisten *B. alexandrina* y *B. truncatus*, las especies de planórbidos que transmiten *S. mansoni* en la región del Delta del Nilo, y se observaron por los alrededores de Tiba y El Kaza, localidades donde Fascioliasis y Esquistosomiasis son más altas.

En Behera, la asociación entre *F. hepatica* y *G. intestinalis* no fue significativa, aunque las relativas altas prevalencias de giardiasis detectadas en los pueblos estudiados deben destacarse porque la infección con *G. intestinalis* es el único protozoo significativamente asociado con la anemia, como es el caso de la Fascioliasis. Se destaca que este hallazgo en la provincia de Behera puede ser importante para encontrar un modo similar de transmisión (ESTEBAN et al., 2003).

En una ocasión se encontró una asociación con *Strongyloides stercoraris*, y en otro caso con *Hymenolepis nana*. Existen muchos casos de multiparasitismo pero no se especifica cuantos pacientes. Otras especies encontradas junto con *Fasciola* fueron: *S. haematobium*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, toxocariasis, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba buetschilii*, *Chilomastix mesnili*, *Enteromonas hominis*, *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Blastocystis hominis*, y *Balantidium coli*.



## **CAPITULO V**

### **DISCUSION**





## **5.- DISCUSION**

### **5.1.- VALOR DE LOS ESPACIADORES DEL ADN<sub>r</sub> NUCLEAR PARA LA DISTINCION DE ESPECIES DE LYMNAEIDOS EN AFRICA**

#### **5.1.1.- ITS-2**

El segundo espaciador transcrito interno del ADN ribosomal nuclear ITS-2 demuestra ser ideal para la diferenciación de las especies de Lymnaeidae en el continente africano. En este sentido, pues, el ITS-2 no hace sino afianzarse como el marcador de especie por excelencia cuando nos referimos a los hospedadores intermediarios de la Fascioliasis.

Estos resultados se muestran acordes con conclusiones del mismo tipo ya alcanzadas con anterioridad en estudios sobre Lymnaeidae de otros continentes, como en Europa (BARGUES et al., 2001) o América del Sur (MAS-COMA et al., 2001; BARGUES et al., 2007; BARGUES et al., 2011a, b, c; 2012a, b).

#### **5.1.2.- ITS-1**

El segundo espaciador transcrito interno del ADN ribosomal nuclear ITS-1 demuestra ser un buen bastión de apoyo a las indicaciones del ITS-2, mostrando un paralelismo evolutivo evidente entre los dos ITSs, si bien con tasas de mutación algo mayores en el ITS-1 que en el ITS-2. Ello viene a indicar que el ITS-1 evoluciona en Lymnaeidos algo más rápidamente que el ITS-2, que por tanto cabe considerar algo más conservado.

Los resultados obtenidos con el ITS-1 se ajustan a las características de los resultados encontrados con el mismo marcador en otros continentes como Europa (BARGUES et al., 2006) o América Latina (MAS-COMA et al., 2001; BARGUES et al., 2007; BARGUES et al., 2011a, b, c; 2012a, b). Todo ello realza las conclusiones generales ya obtenidas en estos estudios tanto sobre Lymnaeidae (BARGUES & MAS-COMA, 2005) como sobre invertebrados vectores en general (MAS-COMA & BARGUES, 2009).

La única consideración destacable es la gran variabilidad que el ITS-1 demuestra presentar en la especie *R. natalensis* a lo largo y ancho de todo el continente africano, siendo así que el ITS-2 se muestra mucho más conservado. Este fenómeno podría

considerarse como distintas vías evolutivas locales conducentes a progresivos fenómenos de especiación futura por aislamiento geográfico.

## **5.2.- FAUNA Y DISTRIBUCION DE LYMNAEIDOS EN AFRICA**

### **5.2.1.- LYMNAEIDOS EN EL NORTE DE AFRICA**

Las especies de Lymnaeidae detectadas y confirmadas molecularmente en los países del Maghreb, *G. truncatula*, *L. fuscus*, *R. balthica* y *R. auricularia*, demuestran sin lugar a dudas que se trata de una fauna esencialmente europea y sin siquiera un solo elemento autóctono africano.

No sucede lo mismo, empero, en Egipto, donde se da la superposición de *G. truncatula* de origen europea, *L. schirazensis* procedente del Próximo Oriente, *R. natalensis caillaudi* que cabe considerar como un elemento autóctono de origen africano y un elemento con gran capacidad colonizadora y ya conocido como introducido en todos los continentes como es *P. columella*.

En este sentido, pues, resulta que en el norte de Africa, a pesar de la similitud latitudinal y climática, así como también de tradiciones e historia humanas y animal, las diferencias entre la parte occidental y la oriental del norte de Africa son bien patentes.

### **5.2.2.- LYMNAEIDOS EN AFRICA SUBSAHARIANA Y OCCIDENTAL**

En el Africa subsahariana y occidental únicamente cabe reseñar la presencia por doquier de la misma y sola especie de Lymnaeido *R. natalensis*.

Sea como sea, la variabilidad nucleotídica mostrada por esta especie, sobre todo a nivel de ITS-1, sugiere que estamos ante poblaciones bien aisladas las unas de las otras como consecuencia de las grandes distancias y ante fenómenos de divergencia evolutiva actualmente en marcha, que pueden relacionarse sin duda con la gran variabilidad fenotípica que esta especie muestra en el continente africano en general (HUBENDICK, 1951; BROWN, 1994).

### **5.2.3.- LYMNAEIDOS EN AFRICA ORIENTAL Y MERIDIONAL**

El panorama que muestran los Lymnaeidos en Africa oriental y meridional es similar, caracterizándose por el dominio de *R. natalensis* en las tierras bajas cálidas, como especie autóctona africana, y la existencia de *G. truncatula* en tierras altas más templadas en temperatura.

La existencia de *G. truncatula* en islotes en ciertos países de la franja oriental africana expandiéndose incluso hasta Africa del Sur, ya fue recientemente dilucidada como resultante de introducciones efectuadas por el hombre tiempo atrás (MAS-COMA et al., 2009a) y no debidas a transporte pasivo por aves migratorias como se había asumido durante muchos años (BROWN, 1994).

#### **5.2.4.- LYMNAEIDOS EN ISLAS ADYACENTES**

En esta Tesis Doctoral solamente hemos podido estudiar Lymnaeidos de Madagascar y de Cabo Verde. En ambas islas, muy arcaicas y separadas del tierras continentales desde tiempos inmemorables, se detecta la presencia de únicamente *R. natalensis*, indudablemente como consecuencia de introducciones fortuitas llevadas a cabo por el hombre desde tiempos antiguos.

#### **5.3.- RELACIONES FILOGENETICAS ENTRE LOS LYMNAEIDOS DE AFRICA**

El estudio filogenético realizado, mediante diferentes tipos de análisis y obtención de diferentes árboles filogenéticos, muestra resultados totalmente esperables a priori, incluyendo la superposición en Africa de una única especie autóctona *R. natalensis* con diferentes formas, incluida *R. natalensis caillaudi*, y demás especies europeas introducidas por el norte occidental y por la franja oriental desde Egipto hasta la misma Africa del Sur.

Un único elemento extraño es *L. schirazensis*, de origen en el Próximo Oriente y que únicamente se ha encontrado en Egipto, lo cual tampoco debe sorprender mucho por proximidad geográfica (BARGUES et al., 2012b) y por los intercambios de ganado tenidos lugar desde hace miles de años entre el Fértil Creciente de la antigua Mesopotamia y el Antiguo Egipto (MAS-COMA et al., 2009a).

Es de destacar también que los Stagnicolinos únicamente muestran representantes en el Maghreb (*L. fuscus*), si bien hay una cita de *L. stagnalis* en Egipto aún por confirmar (BROWN, 1994), que *R. auricularia* de Europa sustituye a su especie próxima *R. natalensis* en el Maghreb y que el grupo de las *Radix* de mediano tamaño,

numeroso en Europa (BARGUES et al., 2001) parece estar solo representado en Africa por *R. balthica*.

Puestas así las cosas, los árboles filogenéticos no muestran singularidad alguna que no se esperara, asemejándose a los ya conocidos sobre este grupo de moluscos dulceacuícolas con anterioridad. Las ramas de los Stagnicolinos, de Galba/Fossaria, y de los *Radix* salen bien independientes unas de otras, con altos valores de soporte (bootstraps), situándose las especies africanas en las ramas oportunas y relacionándose con las especies próximas de parentescos ya establecidos.

#### **5.4.- RELACIONES ENTRE LYMNAEIDOS Y FASCIOLIASIS HUMANA EN EGIPTO**

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de cuatro especies de Lymnaeidos en las áreas de endemia de Fascioliasis humana y animal en el Delta del Nilo:

- *Galba truncatula*: Esta especie es conocida como el mejor hospedador intermediario de *F. hepatica* conocido. Es la especie tipo del genero Galba y consiguientemente miembro del grupo Galba/Fossaria de Lymnaeidos de pequeño tamaño y conocidos por su fuerte caracter anfibio (BARGUES et al., 2001).
- *Lymnaea schirazensis*: Especie considerada un mero sinónimo de *G. truncatula* desde siempre, quizás con la excepción de algún especialista ruso, fue retornada a validez taxonómica únicamente de manera muy reciente, demostrándose además que es una especie de muy amplia distribución geográfica en Asia, Africa, Europa, Caribe, América del Norte y América del Sur, lugares en que siempre había sido confundida con *G. truncatula* (BARGUES et al., 2012b).
- *Radix natalensis caillaudi*: Unica especie que cabe considerar autóctona del continente africano, habiendo demostrado las secuencias de los ITSs del ADN ribosomal nuclear aquí obtenidas que se trata solamente de una forma o subespecie de *R. natalensis*.
- *Peudossuccinea columella*: Especie de gran capacidad colonizadora, a la que se le otorga un origen paleobiogeográfico en la zona del sur de América del Norte y Caribe y que a lo largo de la historia ha demostrado ser capaz de ser transportada y llegar a colonizar diferentes continentes, esencialmente gracias al tráfico de vegetales y demás plantas ornamentales y también por

intercambios de jardines botánicos en los que es frecuente (BARGUES et al., 2011a).

#### **5.4.1.- TRANSMISION Y EPIDEMIOLOGIA DE *FASCIOLA HEPATICA***

##### **5.4.1.1.- INTRODUCCION DE *GALBA TRUNCATULA***

Esta especie, a la que en general se considera típicamente europea pero que en realidad podría tener un origen paleobiogeográfico en el Próximo Oriente (MAS-COMA et al., 2009a), fue muy probablemente introducida en los albores del período postdomesticación, en el Mesolítico y Neolítico, hace unos 12000-10000 años. La introducción en Egipto se debió dar probablemente a través del puente que une Africa con Asia y a través del cual los intercambios de ganado fueron muy habituales en ese largo periodo antes de JC (MAS-COMA et al., 2009a). Así es como formas subfósiles adscritas a esta especie fueron ya encontradas en el Cuaternario reciente por VAN DAMME (1984) y su existencia concreta en Egipto es conocida desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX (PALLARY, 1909, 1924).

*Galba truncatula* es considerado el hospedador intermediario más idóneo para la transmisión de la Fascioliasis al hombre, precisamente debido a su peculiar y bien conocida antropofilia (BARGUES et al., 2012b). Es así, pues, como cabe considerar a esta especie como la responsable principal de la Fascioliasis por *F. hepatica* en el hombre y también en los animales en Egipto.

##### **5.4.1.2.- INTRODUCCION DE *LYMNAEA SCHIRAZENSIS***

Estudios experimentales de transmisión efectuados en el laboratorio del Equipo de Valencia demostraron que ciertas poblaciones de las zonas de endemia de Fascioliasis humana y animal en el Delta del Nilo no eran capaces de transmitir la enfermedad. Inicialmente se pensó que se estaba ante fenómenos de inmunidad o incompatibilidad de parásito-hospedador intermediario, pero luego se constató que el problema no era tal sino que en realidad se trataba de otra especie del grupo *Galba/Fossaria* casi idéntica a *G. truncatula*, con la que siempre se había confundido, y que simplemente no tenía capacidad transmisora (BARGUES et al., 2011b).

Los estudios genéticos, filogenéticos, paleobiogeográficos e históricos, llevados a cabo durante un largo período de 10 años, acabaron demostrando que esta especie se originó muy probablemente también en el Próximo Oriente y fuese introducida en Egipto de manera temporal y en modo al igual que *G. truncatula*.

El interés de esta especie pues se refiere al hecho de no tener papel alguno en la enfermedad, pero si en el confusionismo con poblaciones del verdadero hospedador intermediario que en realidad no lo es.

#### **5.4.2.- TRANSMISION Y EPIDEMIOLOGIA DE *FASCIOLA GIGANTICA***

##### **5.4.2.1.- LLEGADA DE *RADIX NATALENSIS CAILLAUDI*: EL NILO Y EL ANTIGUO EGIPTO**

Forma subespecífica de *R. natalensis*, los estudios moleculares aquí efectuados indican que esta subespecie debió originarse en el cauce del Nilo pero río arriba, en zonas probablemente de Etiopía o Sudán, bastante tiempo atrás (alrededor de 2 millones de años antes). Este Lymnaeido habría de ser posteriormente arrastrado con las aguas río abajo y llegar así a colonizar hasta el mismo Delta del Nilo en tiempos ya algo más recientes.

Como forma de la especie *R. natalensis* que es, estamos claramente ante un gran hospedador intermediario de *F. gigantica*. Esta especie se muestra ecológicamente muy distinta de *G. truncatula* y *L. schirazensis*. Estos dos miembros de Galba/Fossaria habitan en aguas escasamente profundas, preferentemente en charcas resultantes de lluvia y pequeños canales de irrigación de los muy frecuentes en ambos lados del Nilo en la amplia llanura del Delta. Sin embargo, *R. natalensis caillaudi* precisa de colecciones de agua más profundas, como canales de drenaje hondos y en los que el agua circula más que estar estancada, aunque en general lentamente. Esta característica ecológica está relacionada con el carácter claramente acuático de esta especie, hecho que la diferencia significativamente del carácter anfibio general de los dos Galba/Fossaria.

El estudio aquí realizado del brazalet del Antiguo Egipto viene a indicar que esta especie ya se encontraba en las actuales zonas de endemia de Fascioliasis hace varios miles de años. Como sea que el antiguo escrito de LOOSS (1896) demuestra de manera evidente que la única especie de *Fasciola* existente antiguamente en Egipto era *F. gigantica*, debe concluirse pues que *R. natalensis caillaudi* era el único

transmisor de Fascioliasis en el Antiguo Egipto e incluso después hasta por lo menos la mitad del siglo XX pasado en que se empieza a detectar la presencia de *F. hepatica* en ganado importado (EL-AZAZY & SCHILLHORN VAN VEEN, 1983).

#### **5.4.2.2.- EL PAPEL DE *PSEUDOSUCCINEA COLUMELLA***

El caracter de especie introducida de *P. columella*, molusco de origen norteamericano-caribeño, es indudable en Egipto, al igual que en otros continentes, pero una cuestión diferente es especular sobre cómo y cuando debió tener lugar. Esta introducción podría haber sido algo antigua, quizás incluso hace unos dos siglos, si se considera la similitud de la figura 38 de *Limnaea laurenti* en la plancha III de la obra de PALLARY (1909).

El interés de *P. columella* en Egipto estriba en su capacidad ambivalente, esto es, de transmitir ambas especies *F. hepatica* y *F. gigantica*, de acuerdo con la numerosa bibliografía de otros continentes (BARGUES et al., 2001).

Las características ecológicas de *P. columella* son las propias de una especie que prefiere climas cálidos y colecciones de agua abundantes y en general profundas. En este sentido, pues, las preferencias medioambientales de *P. columella* se aproximan más a las de *R. natalensis caillaudi* que a las de los miembros del grupo Galba/Fossaria. Ello sugiere, pues, que *P. columella* constituye un hospedador intermediario con relativamente importante papel en la transmisión a animales domésticos, pero menos a humanos, como sucede en Brasil.

### **5.5.- HETEROGENEIDAD DE LA FASCIOLIASIS HUMANA EN EL NORTE DE AFRICA**

#### **5.5.1.- EL "HOT SPOT" DEL MAGHREB**

El análisis comparado de las situaciones de los países del Maghreb sugiere unas características de transmisión y epidemiología de la Fascioliasis con evidentes semejanzas entre Marruecos, Argelia y Túnez.

Entre los elementos comunes que presentan estos tres países, podemos distinguir:

- Agente causal: La Fascioliasis se muestra causada únicamente por *F. hepatica*, sin que se vislumbre la existencia de formas diferentes o intermedias.



- Hospedadores intermediarios: Marruecos, Argelia y Túnez muestran similitud en lo que se refiere a la fauna de especies de Lymnaeidae, incluyendo a la especie *G. truncatula* como única especie transmisora de *F. hepatica*, acompañada por otros elementos introducidos de los grupos de los Stagnicolinos y los *Radix*, siendo de destacar la ausencia de *R. natalensis* como elemento típicamente africano autóctono.
- Fascioliasis humana: En los tres países del Maghreb parece encontrarse una situación epidemiológica similar, comprendiendo infestación humana esporádica y detectada siempre en hospitales y centros de salud, con general ausencia de estudios tipo encuestas que hayan detectado situaciones de endemia humana, lo que implica ausencia de datos sobre posibles prevalencias en humanos.
- Patrón de transmisión: Las características climatológicas de los países del Maghreb indican una transmisión estacional, más concretamente biestacional en primavera y otoño y con interrupción en invierno y en el muy caluroso verano.

Estas características corren paralelas en todos los aspectos a las conocidas en los países de la Europa occidental, concretamente Francia, España y Portugal. Ello sugiere la conveniencia de incluir los tres países del Maghreb dentro el mismo "hot spot" de Fascioliasis humana del Mediterráneo occidental en el que se incluyen Francia, España y Portugal. Los intercambios históricos tenidos lugar durante 8 siglos, en el periodo de colonización árabe de la Península Ibérica, debieron de jugar un papel indudable en esta "homogeneización" Europa occidental-Maghreb, sin olvidar los orígenes de colonización por *F. hepatica* a partir del Mediterráneo oriental incluso ya desde los tiempos de los Fenicios (MAS-COMA et al., 2009a).

### 5.5.2.- EL "HOT SPOT" DE EGIPTO

Sin embargo, cuando se realiza la comparación de la situación de la Fascioliasis en los países del Maghreb por un lado y Egipto por el otro lado, se observan diferencias notables y significativas. Así, en Egipto las características fundamentales de la Fascioliasis son las siguientes:

- Agente causal: Si bien en el pasado Egipto solamente presentaba la especie *F. gigantica*, en la actualidad y tras la introducción de *F. hepatica* hacia la mitad del siglo pasado, la situación es de "solapación local" (en el sentido de MAS-

COMA et al., 2009a) de ambas especies en áreas llanas y bajas del amplio Delta del Nilo, con presencia de formas intermedias muy variadas (PERIAGO et al., 2008).

- Hospedadores intermediarios: Presencia de 4 especies de Lymnaeidae en las áreas de endemia de Fascioliasis humana y animal, incluyendo a *R. natalensis caillaudi* como transmisor preferente de *F. gigantica*, *G. truncatula* como transmisor preferente de *F. hepatica*, *P. columella* como potencial transmisor de ambas especies, y finalmente de *L. schirazensis* que no actúa como transmisor pero que contribuye a un gran confusionismo en la identificación de *G. truncatula*.
- Fascioliasis humana: Los numerosos conocimientos indican que en Egipto el riesgo de infección humana se distribuye por todo el amplio Delta del Nilo, con un muy alto número de pacientes diagnosticados en hospitales y centros de salud, pero sobre todo con varias encuestas demostrando la existencia de situaciones de endemia humana que van desde situaciones de hiperendemia (prevalencias superiores al 10%) hasta situaciones de mesoendemia (prevalencias entre el 1% y el 10%), con prevalencias que alcanzan hasta el 19% en población total y con marcada preferencia por edades de infancia (5 a 15 años de edad) (ESTEBAN et al., 2003). La estimación de 830.000 personas infectadas basada en prevalencias locales de 5-7% (WHO, 1990), deben incrementarse hasta 3-4 millones de personas si se consideran las prevalencias superiores descritas más recientemente (ESTEBAN et al., 2003).
- Patrón de transmisión: La latitud sudmediterránea indica una transmisión estacional, de tipo biestacional primavera-otoño semejante a lo que sucede en los países del Maghreb y Sur de Europa.

Estas características demuestran como Egipto constituye un "hot spot" de Fascioliasis humana singular y que no tiene nada que ver con el "hot spot" del Mediterraneo occidental del SO de Europa y NO de Africa. Por otra parte, el "hot spot" del Mediterraneo oriental de Egipto ya demostró con anterioridad no compartir características tampoco con el "hot spot" del Próximo Oriente representado por Irán y países vecinos (MAS-COMA et al., 2009a).

## **5.6.- LA COMPLEJIDAD DE LA TRANSMISION Y EPIDEMIOLOGIA DE LA FASCIOLIASIS Y SU IMPACTO SOBRE LA AFECCION HUMANA EN EGIPTO**

## **5.6.1.- CONSECUENCIAS DEL ENTORNO HISTORICO Y GEOGRAFICO**

### **5.6.1.1.- EL PAPEL DE EGIPTO EN LA DISPERSION DE LA FASCIOLIASIS EN TIEMPOS PREDOMESTICACION**

Las tierras del actual Egipto jugaron un papel crucial de puente intercontinental en la expansión nórdica de la Fascioliasis mediante los rumiantes silvestres africanos del Mioceno al migrar hacia el norte y penetrar en Asia colonizando el Próximo Oriente (MAS-COMA et al., 2009a). Ello sugiere que una proto-*Fasciola*, o quizás ya la misma *F. gigantica* en sus inicios evolutivos, se expansionó por Egipto y cruzó el país hacia el periodo de 25 a 20 millones de años aproximadamente. Este hecho resultó fundamental, porque permitió la aparición de *F. hepatica* en la adaptación a tierras frías nórdicas y de altitud, a *G. truncatula* y a ovicaprinos paleárticos hace unos 19 millones de años (MAS-COMA et al., 2009a).

El subsiguiente enfriamiento climático habría de conllevar una retirada de la fauna africana introducida en el Próximo Oriente, que se retrajo de nuevo a sus tierras africanas originales. Sin embargo, muchos elementos africanos (leones, hipopótamos, etc.) habían de permanecer en Egipto incluso hasta épocas relativamente recientes, tal y como testimonian pruebas arqueológicas de la antigua Mesopotamia (Persépolis) y del Antiguo Egipto. Ello podría interpretarse como una sugerencia de que *F. gigantica* pudiera haber estado presente en Egipto desde tiempos tan arcaicos (MAS-COMA et al., 2009a).

### **5.6.1.2.- EL PAPEL DE EGIPTO EN LA DISPERSION DE LA FASCIOLIASIS EN TIEMPOS POSTDOMESTICACION**

La domesticación de los rumiantes empieza a partir de los 10000 años antes de JC tanto en el Fertil Creciente alrededor de la antigua Mesopotamia como también en las primeras dinastías del Antiguo Egipto, lo que indica que las tierras de estos dos países fueron verdaderos vergeles florecientes por aquel entonces, con medioambientes sin duda muy diferentes a los que presentan en la actualidad (MAS-COMA et al., 2009a).

Los estudios arqueológicos demuestran que Mesopotamia y Antiguo Egipto tenían amplios intercambios comerciales que sin duda utilizaban ganado para el transporte de enseres. Todo indica que ese período debió ser el momento en el que *F. hepatica* encuentra la puerta de entrada para colonizar Africa mediante la importación de ovinos

y caprinos domesticados. Todos los resultados sugieren además que este periodo y el traspaso a través de Egipto fueron el origen de la presencia actual de *F. hepatica* y de *G. truncatula* en varios países de la franja oriental de Africa, como Etiopía, Sudán, Kenia, Tanzania y hasta Africa del Sur (MAS-COMA et al., 2009a).

La pregunta que automáticamente se origina entonces es porqué en Egipto los resultados antiguos disponibles indican la ausencia de *F. hepatica* hasta por lo menos la mitad del siglo XX pasado? Lo lógico es pensar que el cambio climático habido después del periodo del Fértil Creciente y Antiguo Egipto, cambio muy bien documentado en ambas zonas cruciales de la historia de la humanidad, representó la inevitable desaparición de *F. hepatica* debido a las altas temperaturas y sequías. La presente Tesis Doctoral sugiere que la construcción de la presa del Nilo y las numerosas canalizaciones de irrigación a lo largo y ancho del Delta del Nilo vinieron a representar el cambio medioambiental necesario para *F. hepatica* para poder volver a introducirse y establecerse en Egipto en tiempos bien recientes.

#### **5.6.1.3.- COMPARACION DE RESULTADOS FENOTIPICOS**

Los resultados aquí obtenidos demuestran la presencia de sólo 4 especies de Lymnaeidos en las áreas de endemia de Fascioliasis humana y animal en el Delta del Nilo.

Dos de estas especies son pequeñas y pertenecen al grupo Galba/Fossaria, *G. truncatula* y *L. schirazensis*, y son morfológica- y morfométricamente indiferenciables a nivel de concha y muy difícilmente a nivel de anatomía interna. Solamente características de ojos y tentáculos *in vivo*, pero sobre todo de forma de los clusters, redondeados ovalados en *G. truncatula* y alargados curvados en *L. schirazensis*, permiten su diferenciación. Ello explica precisamente la confusión entre estas dos especies durante muchísimas décadas hasta sólo hace 2 años (BARGUES et al., 2012a). Sea como sea, el problema para los responsables en salud encargados de realizar los trabajos de campo es evidente, porque está claro que no tiene sentido tener que recurrir bien a la secuenciación de individuos bien a la comparación microscópica de especímenes vivos por parte de dicho personal.

Las dos otras especies son Lymnaeidos que alcanzan gran tamaño, *R. natalensis caillaudi* y *P. columella*, filogenéticamente sin tener nada que ver el uno con el otro, pero que también plantean problemas de diferenciación morfológica y morfométrica a nivel de coquilla.

Desgraciadamente, nuestros resultados no hacen sino aportar más datos para el confusiónismo, ya que los clusters de huevos de *R. natalensis caillaudi* son muy parecidos a los de *P. columella*, incluyendo tanto la forma con tendencia a alargarse de manera más o menos rectilínea y sin curvarse y la tendencia a alinearse los huevos en hileras de a 3 a medida que aumenta el número de huevos dentro el cluster. Incluso la presencia de una segunda capa interna o estuche directamente envolvente de los huevos se encuentra presente en *P. columella* de manera semejante a lo detectado en *R. natalensis caillaudi*.

#### **5.6.1.4.- ADSCRIPCION FENOTIPICA ESPECIFICA DE LOS MOLUSCOS DEL ANTIGUO EGIPTO**

El análisis morfométrico comparado de todas y cada una de las piezas del brazalete de oro del Antiguo Egipto hallado en el Museo de Egiptología de El Cairo demuestra la rigurosidad con que la persona que la elaboró tiempo atrás. Cada pieza muestra un tamaño parecido a las demás, comprendiendo una selección estudiada de ejemplares de la misma especie y probablemente población.

La perfección de las 24 piezas indica que la elaboración consistió en un recubrimiento con oro fundido de las coquillas recolectadas. Esto explica el que el tamaño de algunas piezas sea algo superior al tamaño de los especímenes que hoy en día cabe recolectar en las poblaciones naturales en Egipto.

La solapación de las medidas obtenidas y la forma de las 24 piezas demuestra que todas pertenecieron al Lymnaeido *R. natalensis caillaudi*, y que por tanto este Lymnaeido ya existía por aquel entonces en el Antiguo Egipto.

#### **5.6.2.- DISTRIBUCION Y EXPANSION GEOGRAFICA ACTUALES DENTRO DEL PAIS**

En principio puede sorprender la existencia de Lymnaeidos y de *Fasciola* en un país tan cálido y casi por completo ocupado por terrenos marcadamente áridos y dunas del desierto. Sin embargo, hay que considerar dos aspectos cruciales al respecto.

En primer lugar una consideración temporal, por cuanto los conocimientos paleoclimatológicos e históricos demuestran que Egipto distó antaño de la aridez general que presenta en la actualidad. En segundo lugar una consideración de cambio

antropogénico del medio, por cuanto la presa de Assuan Rio Nilo arriba y las muy numerosas canalizaciones de regadío han convertido al Delta del Nilo en una amplísima región cultivable en donde la vegetación florece por doquier a ambos lados del Río Nilo.

Ello explica el porque la Fascioliasis se encuentra restringida a dichas zonas de influencia de los regadíos a lo largo y ancho de todo el Delta del Nilo, extendiéndose hoy en día incluso hasta la misma ciudad de El Cairo. Ambas especies de *Fasciola* e incluso formas intermedias han sido halladas a lo largo y ancho de esta región del Delta del Nilo.

No obstante, a medida que nos alejamos de El Cairo hacia el Sur, el denominado Alto Egipto, las temperaturas se incrementan y todo indica que el medio ambiente se hace inhóspito para *G. truncatula* y *F. hepatica*. Así es como en estas latitudes más meridionales sólo cabe encontrar a *F. gigantica* en ganado doméstico transmitida por *R. natalensis caillaudi* (HUSSEIN et al., 2006) y la infección humana por *Fasciola* pasa a brillar por su ausencia (CURTALE et al., 1998).

Las diferencias latitudinales de temperatura explican también la mayor expansión de *F. hepatica* y *G. truncatula* en el Norte del Delta, cerca del Mediterráneo, y su progresiva desaparición gradual a medida que nos vamos trasladando hacia el Sur del país. Este fenómeno está evidentemente también relacionado con el hecho de que *F. hepatica* fuese indudablemente introducida desde el Norte del país.

### **5.6.3.- EPIDEMIOLOGIAS DE LAS FASCIOLIASIS POR *F. HEPATICA* Y *F. GIGANTICA***

La situación de "solapamiento local" (en el sentido de MAS-COMA et al., 2009a), con la presencia y transmisión de ambas especies *F. hepatica* y *F. gigantica* en los mismos lugares, debido a la presencia de *G. truncatula*, *R. natalensis caillaudi* y *P. columella* las unas cerca de las otras, en colecciones de agua próximas las unas a las otras, en tierras homogéneas llanas de baja altitud, conlleva la coinfección de tanto humanos como animales por ambas especies.

Así, a la problemática antes analizada de la distinción fenotípica entre las especies de Lymnaeidos presentes en dichas zonas de endemia, cabe añadir la problemática planteada por la existencia de formas intermedias entre ambas especies de *Fasciola* (PERIAGO et al., 2008).

La coexistencia de especies diferentes de Lymnaeidos permitiendo la transmisión de ambas especies *F. hepatica* y *F. gigantica* en un mismo lugar plantea una gran complejidad de transmisión, por cuanto en *G. truncatula* va a permitir la transmisión de la enfermedad en las épocas templadas del año mientras que *R. natalensis caillaudi* y *P. columella* permitirán la transmisión de la Fascioliasis en épocas más cálidas de año, ampliándose así la ventana anual de transmisión y el riesgo temporal de infección en humanos y animales. Aunque las muy altas temperaturas que se alcanzan en el verano de Egipto conllevan una aridez tal que las poblaciones de incluso estas especies de Lymnaeidos desaparecen, ello no impide que la ventana de transmisión anual sea amplísima. Ello viene a representar la situación epidemiológica con un patrón de transmisión más cercano al de transmisión permanente durante todo el año de la Fascioliasis humana y animal en el Altiplano norte de Bolivia (MAS-COMA et al., 1999c).

Toda esta problemática se incrementa por la existencia de formas intermedias (PERIAGO et al., 2008), consecuencia de hibridación entre especímenes de una y otra especie de *Fasciola* dentro del mismo hospedador definitivo coinfectado, esencialmente frecuente en animales pero también en humanos. En principio, aunque ello resulte aún desconocido, cabe deducir con buena lógica que las formas intermedias ostenten requerimientos de temperatura y consecuentes épocas de transmisión intermedias también, en todo lo cual la especie *P. columella* con su capacidad de transmitir a ambas especies podría jugar un papel importante adicional.

Además de la problemática de diagnóstico que todo ello plantea, no cabe olvidar que *F. gigantica* es a priori mucho más patógena que *F. hepatica* debido a su mucho mayor tamaño de los especímenes adultos que se desarrollan dentro del microhabitat de parasitación hepático. Desgraciadamente, la existencia de formas intermedias dificulta una posible diferenciación de la patogenicidad de una y otra especie en Egipto.

#### **5.6.4.- PROBLEMAS DE DIAGNOSTICO DIFERENCIAL**

La conveniencia de poder efectuar un diagnóstico diferencial entre infección por *F. hepatica* y por *F. gigantica*, tanto en diagnóstico in vivo de humanos como de animales (esto es, no postmortem) se basa en tres características: (i) la transmisión y epidemiología de ambas especies de *Fasciola* difiere significativamente; (ii) la patogenicidad de ambas especies difiere sobre todo por el muy diferente tamaño del estadio adulto entre ambas; y (iii) las medidas de control incluirán estrategias distintas

según se trate de una u otra especie, ya que, aunque a veces conjuntos o vecinos y próximos, las características ecológicas y requerimientos de tipos de colecciones de agua, temperatura y épocas del año de transmisión difieren también.

Desgraciadamente, hasta la fecha ningún tipo de diagnóstico coprológico ni serológico es capaz de diferenciar entre una y otra especie de *Fasciola*. Un nuevo método de PCR-RFLP descrito por el Equipo de Valencia a principios de los estudios sobre la situación en Egipto (MARCILLA et al., 2002), basado en la aplicación de dos enzimas de restricción sobre una secuencia seleccionada del gen 28S del ADN ribosomal nuclear es de utilidad para el diagnóstico diferencial de las dos especies de *Fasciola* si bien únicamente cuando genéticamente puras.

La irrupción del hallazgo de *Fasciola* híbridas intermedias inutiliza desgraciadamente la utilidad de dicho test, ante la necesidad de tener que basarse en varios marcadores moleculares simultáneamente para la detección de introgresión (MAS-COMA et al., 2009a).

Así la situación, en el momento actual sigue sin disponerse de ningún test que permita el diagnóstico diferencial de formas puras y formas intermedias de *Fasciola*. Todos los tests desarrollados muy recientemente en este sentido por equipos orientales resultan inútiles, al basarse en fundamentos de hibridación erróneos.

Una orientación cabe sin embargo obtenerse a partir del tamaño de los huevos emitidos en las muestras fecales tanto de los pacientes como de los animales infectados. Así, VALERO et al. (2009) demuestran como los huevos de formas intermedias también se muestran intermedios en tamaño, basándose en estudios exhaustivos llevados a cabo en zonas de endemia humana y animal de todos los continentes, e incluyendo también a Egipto.

#### **5.6.5.- LA PROBLEMATICA DEL TRATAMIENTO**

La droga de elección actualmente para la Fascioliasis humana es el triclabendazol para uso humano, comercializado como Egaten® por Novartis Farma (SAVIOLI et al., 1999; KEISER & UTZINGER, 2004; WHO, 2007). Desgraciadamente, *Fasciola* ha mostrado la capacidad de dar lugar a resistencia al triclabendazol. Situaciones de resistencia han sido descritas ya inicialmente en Australia (OVEREND & BOWEN, 1995), luego en Irlanda (LANE, 1998; O'BRIEN, 1998), Escocia (MITCHELL et al., 1998), Países Bajos (MOLL et al., 2000; GAASENBECK et al., 2001), y también España (ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2006). Más recientemente, la resistencia al



triclabendazol ha sido asimismo reportada ya en el sur de Brasil (OLIVEIRA et al., 2008) y también la Patagonia de Argentina (OLAECHEA et al., 2011), y por tanto ya en el Nuevo Mundo. Esta resistencia fue precisamente ya el motivo de que se sugiriese la posibilidad de recurrir a tratamientos combinados de otras drogas tiempo atrás (FAIRWEATHER & BORAY, 1999).

Afortunadamente, todos estos reportes se refieren a áreas de endemia animal. Sin embargo, muy recientemente ya ha sido descrita la resistencia al triclabendazol por primera vez en un área de endemia humana de Fascioliasis, concretamente en la zona de hiperendemia humana de Cajamarca en Perú (ORTIZ, 2011; ORTIZ et al., 2013). De aquí la importancia de contar con posibles drogas alternativas.

En la actualidad, la nitazoxanida (comercializado bajo diferentes nombres, como por ejemplo Colufase®) se está erigiendo como la alternativa más prometedora. Este medicamento ha demostrado ya su eficacia contra la Fascioliasis humana tanto en Egipto (ROSSIGNOL et al., 1998; KABIL et al., 2000) como en Perú (FAVENNEC et al., 2003). En Egipto también se han realizado otros ensayos con esta misma droga (ABDEL-RAHMAN et al., 1997). Incluso también se ha visto como mantiene su eficacia en el tratamiento de pacientes que no responden al tratamiento con triclabendazol (GARGALA et al., 2005).

En Egipto, concretamente, hay que destacar la amplia bibliografía que se refiere a la eficacia de otro producto de origen egipcio, llamado myrrh y comercializado con el nombre de Mirazid® (HARIDY et al., 2003; HASSAN et al., 2004; HEGAB et al., 2003; MASSOUD et al., 2001, 2004; SOLIMAN et al., 2004, etc.). A pesar de todos estos y muchos otros artículos al respecto, un reciente y serio estudio también realizado en Egipto ha venido a demostrar su ineficacia para el tratamiento de la Fascioliasis, de manera similar a con la Equistosomiasis, otra enfermedad contra la cual se había también sostenido su eficacia (BOTROS et al., 2009).

#### **5.6.6.- PERSPECTIVAS DE CONTROL EN EL FUTURO**

La seriedad de la problemática causada por la Fascioliasis humana en la región del Delta del Nilo fue el motivo que condujo a la Sede Central de la Organización Mundial de la Salud a lanzar una iniciativa de control de esta enfermedad en Egipto. Así fue como Egipto fue uno de los 4 países seleccionados, y el único en el continente africano, para realizar una iniciativa piloto mediante la utilización del Eगतen para el tratamiento de los sujetos parasitados.

En esta iniciativa, definida en una reunión de expertos en Ginebra e 2007 (WHO, 2007), se tomó la decisión de aplicar diferentes estrategias de control según las características diferentes en patrones de transmisión y situaciones epidemiológicas de cada uno de los 4 países seleccionados, que en este sentido venían pues a actuar de modelos.

La estrategia definida para Egipto fue la de proceder a la detección activa de casos infectados mediante encuestas en zonas de alto riesgo y proceder subsiguientemente al diagnóstico específico de la enfermedad, esencialmente por Kato-Katz que permitía el análisis cualitativo y cuantitativo simultáneo. Subsiguientemente, aquellos individuos que fueron detectados como positivos seran tratados mediante Egaten a la dosis adecuada.

La finalidad de la estrategia de detección activa tiene por finalidad evitar en lo posible la aparición de resistencia, habida cuenta el gran potencial de recombinación genética existente en Egipto, tal y como lo demuestra la amplia presencia de formas intermedias (PERIAGO et al., 2008). Esta estrategia sigue utilizándose por el momento de manera exitosa siguiendo las directrices marcadas tiempo atrás (CURTALE et al., 2003c).



## **CAPITULO VI**

### **CONCLUSIONES**



## 6.2.- CONCLUSIONES

A partir de los estudios realizados formando parte de la presente Tesis Doctoral, cabe extraer numerosas y variadas conclusiones. Para facilitar su exposición, procedemos a enumerarlas por grupos según sus diferentes objetivos.

A) En lo que concierne a conclusiones que cabe extraer de los resultados de secuenciación y análisis filogenético de los Lymnaeidos presentes en zonas de endemia de Fascioliasis humana y/o animal en los 11 países estudiados de Marruecos, Argelia, Egipto, Senegal, Burkina Faso, Nigeria, Angola, Tanzania, Africa del Sur, Madagascar y Cabo Verde, son de destacar las siguientes:

- los marcadores ITS-2 e ITS-1 del ADN ribosomal nuclear demuestran su utilidad tanto para la clasificación específica de especímenes como para su caracterización genética por haplotipaje combinado;
- los marcadores del ITS-2 y del ITS-1 resultan ser adecuados para la clasificación y caracterización genética de todas las 7 especies sudamericanas encontradas;
- a nivel continental, cabe también concluir en una composición total de 7 especies válidas de Lymnaeidae en Africa: *Lymnaea (Stagnicola) fuscus*, *Galba truncatula*, *Lymnaea schirazensis*, *Radix auricularia*, *Radix balthica*, *Radix natalensis*, y *Pseudosuccinea columella*;
- en las tierras insulares de Madagascar y Cabo Verde, todo indica que la existencia del único Lymnaeido autóctono africano *Radix natalensis* ha sido fruto de introducciones en el pasado;
- la única especie autóctona africana demuestra ser *Radix natalensis*, extendida por todo el Africa al Sur del Sahara y con una expansión nórdica por el cauce del Río Nilo que la lleva hasta Egipto y el mismo Delta del Nilo en su desembocadura en el Mar Mediterráneo;
- a lo largo y ancho de esta vasta región, *Radix natalensis* muestra una variabilidad intraespecífica muy notable, sobre todo a nivel de ITS-1, que sugiere fenómenos actuales de especiación en marcha por aislamiento;
- la forma de *Radix natalensis* en Egipto también se muestra singular y en este sentido puede ser diferenciada por mantenimiento a nivel de subespecie, *Radix natalensis caillaudi*;
- las demás especies de Lymnaeidae detectadas demuestran haber sido introducidas bien a partir de Europa (todas excepto *Lymnaea schirazensis*), bien a partir del Próximo Oriente (*Lymnaea schirazensis*);

- del análisis filogenético cabe concluir en la existencia de 4 grupos de especies bien definidos, incluyendo el grupo *Galba/Fossaria* con *Galba truncatula* y *Lymnaea schirazensis*, el grupo de los Stagnicolinos representado únicamente por *Lymnaea (Stagnicola) fuscus*, el grupo de los Radicinos representado por *Radix auricularia*, *Radix balthica* y *Radix natalensis*, y finalmente el grupo monoespecífico de *Pseudosuccinea columella*;
- desde el punto de vista de distribución geográfica, cabe distinguir 4 regiones faunísticas diferentes en África: (i) el Maghreb, caracterizado por la presencia de solamente especies europeas; (ii) Egipto, en donde se presenta una solapación de un elemento autóctono africano (*Radix natalensis caillaudi*), una especie introducida desde Europa (*Galba truncatula*), una especie introducida desde el Próximo Oriente (*Lymnaea schirazensis*) y una especie introducida desde las Américas (*Pseudosuccinea columella*); c) la amplia región de África al sur del Sahara y el África occidental, habitada únicamente por *Radix natalensis*; y finalmente (iv) la larga franja oriental del África desde el cauce del Río Nilo pasando por Kenia, Tanzania y hasta África del Sur en donde se presenta *Radix natalensis* en las tierras bajas y *Galba truncatula* en las tierras altas; la única salvedad en esta última franja es la introducción de *Pseudosuccinea columella* en África del Sur.

B) En lo que se refiere al estudio fenotípico del Lymnaeido *Radix natalensis caillaudi* en Egipto, realizado dado su interés como única especie autóctona en la zona de alta endemia de Fascioliasis humana en el Delta del Nilo, podemos enumerar las siguientes conclusiones:

- el estudio morfométrico comparado mediante CIAS de las coquillas de poblaciones naturales, una población mantenida experimentalmente en el laboratorio y de las 24 piezas de caracoles de un brazalete de oro del Antiguo Egipto encontrado en el Museo de Egiptología de El Cairo, demuestra que *Radix natalensis caillaudi* ya existía en Egipto en tiempos previos a JC;
- el estudio morfométrico comparado mediante CIAS de los clusters de huevos a partir de dos poblaciones mantenidas experimentalmente en el laboratorio demuestran una gran similitud con los clusters propios de la especie *Pseudosuccinea columella* y, consecuentemente, no parecen ser apropiados para la diferenciación respecto de esta última especie con la que presenta problemas de diferenciación para los responsables de salud encargados de trabajos de campo;

- el análisis crono-paleobiogeográfico basado en el cálculo del reloj molecular sugiere una divergencia de *Radix natalensis caillaudi* a partir de formas ancestrales de *Radix natalensis* existentes cauce arriba del Río Nilo al Sur de Egipto y subsiguiente llegada a Egipto por arrastre mediante las aguas de dicho Río Nilo algún tiempo después, coincidiendo esta datación con la proporcionada por el elemento arqueológico del brazalete del Antiguo Egipto.

C) En el estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana en el Maghreb cabe extraer las siguientes conclusiones:

- la Fascioliasis en Marruecos, Argelia y Túnez se muestra causada únicamente por *Fasciola hepatica*, sin que se vislumbre la existencia de formas diferentes o intermedias;
- Marruecos, Argelia y Túnez muestran similitud en lo que se refiere a la fauna de especies de Lymnaeidae, incluyendo a la especie *G. truncatula* como única especie transmisora;
- en los tres países del Maghreb parece encontrarse una situación epidemiológica similar, comprendiendo infestación humana esporádica y detectada siempre en hospitales y centros de salud, con general ausencia de estudios tipo encuestas que hayan detectado situaciones de endemia humana, lo que implica ausencia de datos sobre posibles prevalencias en humanos;
- las características climatológicas de los países del Maghreb indican una transmisión estacional, más concretamente biestacional en primavera y otoño y con interrupción en invierno y en el muy caluroso verano;
- estos resultados sugieren la conveniencia de incluir los tres países del Maghreb dentro el mismo "hot spot" de Fascioliasis humana del Mediterráneo occidental en el que se incluyen Francia, España y Portugal.

D) Finalmente, en el amplio estudio retrospectivo de la Fascioliasis humana en Egipto cabe extraer las siguientes conclusiones:

- la muy numerosa bibliografía sobre este tema, desperdigada en su mayoría en publicaciones en revistas locales y muy secundarias, muchas de muy difícil obtención, explican el motivo por el cual un estudio irremediamente muy prolongado y arduo como el aquí realizado nunca se había efectuado con anterioridad;
- los resultados de este estudio permiten comprender la evolución de la Fascioliasis en Egipto, incluyendo la existencia original de únicamente *Fasciola gigantica*



transmitida por *Radix natalensis caillaudi* y posterior introducción de *Fasciola hepatica* transmitida por *Galba truncatula* hasta confeccionar el complejo panorama de la situación de la Fascioliasis actual en este país;

- la situación actual de la Fascioliasis en Egipto es de "solapación local" de ambas especies de *Fasciola* en áreas llanas y bajas del amplio Delta del Nilo, con presencia de formas intermedias muy variadas;
- presencia de 4 especies de Lymnaeidae en las áreas de endemia de Fascioliasis humana y animal, incluyendo a *R. natalensis caillaudi* como transmisor preferente de *F. gigantica*, *G. truncatula* como transmisor preferente de *F. hepatica*, *P. columella* como potencial transmisor de ambas especies, y finalmente de *L. schirazensis* que no actúa como transmisor pero que contribuye a un gran confusiónismo en la identificación de *G. truncatula*;
- el riesgo de infección humana se distribuye por todo el amplio Delta del Nilo, con un muy alto número de pacientes diagnosticados en hospitales y centros de salud, pero sobre todo con varias encuestas demostrando la existencia de endemia humana que va desde situaciones de hiperendemia (prevalencias superiores al 10%) hasta situaciones de mesoendemia (prevalencias entre el 1% y el 10%), con prevalencias que alcanzan hasta el 19% en población total y con marcada preferencia por edades de infancia (5 a 15 años de edad) y el sexo femenino; así, la estimación de 830.000 personas infectadas efectuada por la OMS debe incrementarse hasta 3-4 millones de personas si se consideran las prevalencias superiores descritas más recientemente;
- la latitud sudmediterránea indica una transmisión estacional, de tipo biestacional primavera-otoño semejante a lo que sucede en los países del Maghreb y Sur de Europa;
- Las diferencias latitudinales de temperatura explican la mayor expansión de *F. hepatica* y *G. truncatula* en el Norte del Delta, cerca del Mediterráneo, y su progresiva desaparición gradual a medida que nos vamos trasladando hacia el Sur del país, en donde sólo se presenta *F. gigantica* transmitida por *R. natalensis caillaudi*; este fenómeno está evidentemente también relacionado con el hecho de que *F. hepatica* fuese recientemente introducida desde el norte del país;
- todas las características demuestran como Egipto constituye un "hot spot" de Fascioliasis humana singular y que no tiene nada que ver con el "hot spot" del Mediterráneo occidental del SO de Europa y NO de Africa, ni tampoco con el "hot spot" del Próximo Oriente representado por Irán y países vecinos;

- finalmente cabe concluir que en Egipto se dan varios aspectos de transmisión y epidemiología aún por analizar, otros en patogenicidad y diagnóstico por mejorar, y otros en tratamiento por difundir, si bien la actual estrategia de control en las zonas de hiperendemia humana demuestran estar bien encaminadas.



**CAPITULO VII**  
**BIBLIOGRAFIA**



## 7.- BIBLIOGRAFIA

- ABD-RABO (T.M.A.) & ABOU-RAWASH (A.A.), 1998.- Some observations on *Fasciola gigantica* in donkeys at Kafr El-Sheokh. En: 4<sup>th</sup> Vet.Med. Zag. Congress (Hurgada, Egypt): 394-403.
- ABDEL-RAHMAN (M.S.), EL-BAHY (M.M.) & EL-BAHY (N.M.), 1997.- Testing the parasitocidal efficacy of nitazoxanide. *Alexandria Journal of Veterinary Science*, 13: 447-458.
- ABDEL-RAHMAN (M.S.), FAHMY (M.M.) & EL-BAHI (M.M.), 1988.- Laboratory studies on the efficacy of some molluscicides on Egyptian snails. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 95: 205-207.
- ABO-MADYAN (A.A.), MORSY (T.A.), MOTAWEA (S.M.), EL-GARHY (M.F.) & MASOUD (A.M.A.), 2005.- Spot light survey on fresh-water snails of medical importance in Al Fayoum Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35 (1): 49-58.
- ABOU BASHA (L.M.), EL SAYAD (M.H.), ALLAM (A.F.) & OSMAN (M.M.), 1994.- The effect of *Ambrosia maritima* (Damsissa) on the viability of *Lymnaea caillaudi* an experimental study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 24 (3): 513-517.
- AL-SAFADI (M.M.), 1990.- Freshwater molluscs of Yemen Arab Republic. *Hydrobiologia*, 208 (3): 245-251.
- ALI (M.E.), EL-KANNISHY (M.H.), EL-KHOLY (E.S.), HEGAZI (M.M.), KHASHABA (A.A.), RIFAAY (M.R.), EL-BASSOUSY (E.M.), SHEIR (Z.M.) & RIFAAT (M.A.), 1974.- Clinical and laboratory studies on human fascioliasis in Egypt. *Mansoura Medical Bulletin*, 3, 4: 295-300.
- ALVAREZ-SANCHEZ (M.A.), MAINAR-JAIME (R.C.), PEREZ-GARCIA (J.) & ROJO-VAZQUEZ (F.A.), 2006.- Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, 159: 424-425.
- ANONYMOUS, 1988.- Parasitic diseases: hepatic distomiasis caused by *Fasciola hepatica*. *Weekly Epidemiological Record (WHO)*, 63: 109-111.
- ARAFI (M.M.) & LASHEN (A.H.), 1993.- A case of human fascioliasis in Qalyobia Governorate. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 23: 599-600.
- ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.L.), AGRAMUNT (V.H.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*. *Acta Tropica*, 120 (3): 245-257.
- ASHRAFI (K.), MASSOUD (J.), HOLAKUEI (K.), MAHMOODI (M.), JO-AFSHANI (M.A.), VALERO (M.A.), FUENTES (M.V.), KHOUBBANE (M.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* may be the most prevalent causal agent of fascioliasis in the endemic province of Gilan, northern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 33 (4): 31-37.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.), PERIAGO (M.V.), MASSOUD (J.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitology International*, 55: 249-260.
- ASHRAFI (K.), MASSOUD (J.), HOLAKOUIE NAIENI (K.), JO-AFSHANI (M.A.), MAHMOODI (M.), EBADATI (N.), REZVANI (S.M.), ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. *Iranian Journal of Public Health, Tehran*, 36 (4): 42-49.
- ASPÖCK (H.), AUER (H.) & PICHER (O.), 1999.- Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in Central Europe. *Helminthologia*, 36: 139-145.
- ASSMAR (M.), MILANINIA (A.), AMIR-KHANI (A.), YADEGARI (D.), FORGHAN-PARAST (K.), NAHRAVANIAN (H.), PIAZAK (N.), ESMAYLI (A.), HOVANESIAN (A.)

- & VALADKHANI (Z.), 1991.- Seroepidemiological investigation of fascioliasis in northern Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 5: 23-27.
- AUDOUSSET (J.C.), RONDELAUD (D.), DREYFUSS (G.) & VAREILLE-MOREL (C.), 1989.- Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7: 217-224.
- BAKER (F.C.), 1928.- The freshwater Mollusca of Wisconsin. *Wisconsin Academy of Science, Arts and Letters*.
- BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14 (5): 569-577.
- BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2005.- Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*, 79 (3): 257-267.
- BARGUES (M.D.), FUNATSU (I.R.), OVIEDO (J.A.) & MAS-COMA (S.), 1996a.- Natural water, an additional source for human infection by *Fasciola hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. *Parassitologia*, 38 (1-2): 251.
- BARGUES (M.D.), OVIEDO (J.A.), FUNATSU (I.R.) & MAS-COMA (S.), 1996b.- The human host, a viable definitive host for *Fasciola hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. *Parassitologia*, 38 (1-2): 252.
- BARGUES (M.D.), MANGOLD (A.J.), MUÑOZ-ANTOLI (C.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 1997.- SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *Journal of Parasitology*, 83 (6): 1086-1092.
- BARGUES (M.D.), MARCILLA (A.), RAMSEY (J.), DUJARDIN (J.P.), SCHOFIELD (C.J.) & MAS-COMA (S.), 2000.- Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 567-573.
- BARGUES (M.D.), VIGO (M.), HORAK (P.), DVORAK (J.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER-BROOK (C.) & MAS-COMA (S.), 2001.- European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 1 (2): 85-107.
- BARGUES (M.D.), HORAK (P.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER-BROOK (C.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, 10: 243-255.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), JACKIEWICZ (M.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2006a.- Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda). *Heldia (Münchner Malakologische Mitteilungen), München*, 6 (1/2): 29-40.
- BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.), GOMEZ (H.G.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2006b.- Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. *Animal Biodiversity and Conservation*, 29 (2): 191-194.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), MERA Y SIERRA (R.L.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2007a.- Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101 (7): 621-641.
- BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.), GOMEZ (H.G.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2007b.- Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública. *Enfermedades Emergentes, Barcelona*, 9 (2): 77-82.
- BARGUES (M.D.), KLISIEWICZ (D.R.), GONZALEZ-CANDELAS (F.), RAMSEY (J.M.), MONROY (C.), PONCE (C.), SALAZAR-SCHETTINO (P.M.), PANZERA (F.), ABAD

- (F), SOUSA (O.E.), SCHOFIELD (C.J.), DUJARDIN (J.P.), GUHL (F.) & MAS-COMA (S.), 2008.- Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2 (5): e233.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2011a.- DNA sequence characterisation and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasites & Vectors*, 4: 132.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), FLORES (R.), GLÖER (P.), ROJAS-GARCIA (R.), ASHRAFI (K.), FALKNER (G.) & MAS-COMA (S.), 2011b.- *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS ONE*, 6 (9): e24567 (33 pp. + 3 Suppl. Tables + 5 Suppl. Figures).
- BARGUES (M.D.), GONZALEZ (C.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2011c.- A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasites & Vectors*, 4: 200 (18 pp.).
- BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.L.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2012a.- DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (1): 111-124 (+ 2 Suppl. Tables).
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), ORTIZ (P.), NAQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2012b.- Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*, 5: 174 (16 pp.).
- BELOT (J.), GEERTS (S.) & DIOUF (M.), 1993.- Observations on the population dynamics of snail hosts for the Schistosomes in the Delta of the Senegal river basin. *Journal of Molluscan Studies*, 59: 7-13.
- BENDEZU (P.), 1969.- Liver fluke in humans. *Veterinary Record*, 85: 532-533.
- BETHUNE (S.) & ROBERTS (K.S.), 1991.- Checklist of the freshwater fishes of Namibia. En: *Status and Conservation of Wetlands in Namibia*. Special Wetlands edition *Madoqua*, 17 (2): 193-199.
- BIFFA (D.), JOBRE (Y.) & CHAKKA (H.), 2006.- Ovine helminthosis, a major health constraint to productivity of sheep in Ethiopia. *Animal health research reviews/Conference of Research Workers in Animal Disease*, 7(1-2): 107-18.
- BISHOP (M.J.), 1977.- Approaches to the quantitative description of terrestrial mollusc populations and habitats. *Malacologia*, 161: 61- 68.
- BOCH (J.) & SUPPERER (R.), 1982.- *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Editorial Hemsiferio Sur S.A., Buenos Aires. 627 pp.
- BOIX-BUSSON (D.) & RONDELAUD (D.), 1984.- Étude des relations deux espèces de Limnées dans leurs habitats naturels. *Revue du Médecine Vétérinaire*, 135: 449-457.
- BOIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985a.- Etude de facteurs influençant la durée de période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 5-10.
- BOIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985b.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Les caractéristiques des émissions cercariennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 11-21.
- BORAY (J.C.), 1969.- Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-210.
- BORAY (J.C.), 1982.- Fascioliasis. En: *Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses*. Volume III (G.V. Hillyer & C.E. Hopla edit.), CRC Press, Boca Raton-Florida: 71-88.
- BORCHERT (A.), 1981.- *Parasitologia Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza, 745 pp.



- BOTROS (S.S.), EL-LAKKANY (N.M.), BADAWY (A.A.), MAHMOUD (S.S.), EBEID (F.A.) & FENWICK (A.), 2009.- Mirazid shows insignificant activity against ovine fascioliasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103 (7): 605-616.
- BOUCHET (F.), 1991.- Etude parasitologique: recherche de œufs d'helminthes dans les fosses et dépotoirs du site des Jardins du Carrousel. En: *Les Jardins du Carrousel à Paris*, Rapport du Ministère de la Culture, de la Communication et des Grands Travaux, Fouilles 1989-1990: 165-171.
- BOUCHET (F.), 1994.- Analyse parasitologique des Logis de la Cour des Suisses. *Archéologia: Les Dossiers d'Archéologie*, 190: 87 and 92-93.
- BOUCHET (F.), 1995a.- La Paléoparasitologie au Grand Louvre. *Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur*, 37ème année: 8-11.
- BOUCHET (F.), 1995b.- Recovery eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris, France). *Journal of Parasitology*, 80: 785-786.
- BOUCHET (F.), 1997.- Les œufs d'helminthes: éléments traces des parasitoses néolithique et paléolithique en sites français. *Comptes Rendus de la Société de Biologie Fil.*, 191 (4): 529-536.
- BOUCHET (F.), BENTRAD (S.) & PAICHELER (J.C.), 1998.- Enquête épidémiologique sur les helminthiases à la cour de Louis XIV. *Médecine/Sciences*, 14: 463-466.
- BOUCHET (F.), HARTEK (S.) & LE BAILLY (M.), 2003.- The state of the art of palaeoparasitological research in the old World. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. 1): 95-101.
- BROBERG (G.), CHERUIYOT (H.K.) & WACHIRA (T.M.), 1984.- Laboratory observations of the actions of *Glinus lotoides* (Fam. Aizoacea) fruit on snail hosts of *Fasciola* and *Schistosoma*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 78 (6): 663.
- BROWN (D.S.), 1965.- Freshwater gastropod Mollusca from Ethiopia. *Bulletin of British Museum of Natural History, Zoology*, 12: 37-94.
- BROWN (D.S.), 1980.- *Freshwater snails of Africa and their medical importance*. Taylor & Francis, London: 487 p.
- BROWN (D.S.), 1994.- *Freshwater Snails and Their Medical Importance*. Taylor & Francis, London: 617 pp.
- BROWN (D.S.) & GALLAGHER (M.D.), 1985.- Freshwater snails of Oman, South Eastern Arabia. *Hydrobiologia*, 127: 125-149.
- BROWN (D.S.), FISON (T.), SOUTHGATE (V.R.) & WRIGHT (C.A.), 1984.- Aquatic snails of the Jonglei region, southern Sudan, and transmission of trematode parasites. *Hydrobiologia*, 110: 247-271.
- BURTON (J.B.) & CHENG (T.), 1998.- *Human Parasitology*, 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press. Cal., USA, 484 pp.
- CARVALHO GONZALVES (M.L.), ARAUJO (A.) & FERREIRA (L.F.), 2002.- Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 1-16.
- CHARTIER (C), NGOTA (A.), LONU (L.) & CABARET (J.), 1990.- Dynamics of *Lymnaea natalensis* population in the Bunia area Ituri, Aut.-Zaire. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 65: 177-182.
- CHEN (M.G.) & MOTT (K.E.), 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin*, 87 (4): R1-R38.
- CHINGWENA (G.), MUKARATIRWA (S.), CHIMBARI (M.), KRISTENSEN (T.K.) & MADSEN (H.), 2004.- Population dynamics and ecology of freshwater gastropods in the highveld and lowveld regions of Zimbabwe, with emphasis on schistosome and amphistome intermediate hosts. *African Zoology*, 39 (1): 55-62.
- CHO (S.-Y.), LEE (N.S.), SHIN (M.H.) & KONG (Y.), 1999.- Age-dependent infectivity of orally transferred juvenile *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 85: 739-742.

- CLARKE (V. de V.), SHIFF (C.J.) & BLAIR (D.M.), 1961.- The Control of Snail Hosts of Bilharziasis and Fascioliasis in Southern Rhodesia. *Bulletin of World Health Organization*, 25: 549-58.
- COBBOLD (T.S.), 1855.- Description of a new trematode worm (*Fasciola gigantica*). *Edinbourg N. Phil. Journal*, N.S. 2 (Oct.): 262-266.
- COLLINS (F.H.) & PASKEWITZ (S.M.), 1996.- A review of the use of ribosomal DNA to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5, 1-9.
- CONG (D.D.), ANH (L.Q.Q.), LUAN (L.C.), TUAN (N.) & TUAN (N.V.), 2001.- Case report of cholangitis by *Fasciola gigantica*. *Ho Chi Minh City Medical Magazine*, 5 (Suppl. 1): 83-84.
- CURRY (A.), ANFIELD (C.) & TAPP (E.), 1979.- Electron microscopy of the Manchester mummies. En: *Manchester Museum Mummy Project: multidisciplinary research on ancient Egyptian mummified remains* (Editor: A. R. Davis). Manchester Museum, UK: pp. 103-111.
- CURTALE (F.), PEZZOTI (P.), SHARBINI (A.L.), AL MAADAT (H.), INGROSSO (P.), SOHBY (Y.) & BABILLE (M.), 1998.- Knowledge, perceptions and behaviour of mothers towards intestinal helminths in Upper Egypt: implications for control. *Health Policy and Planning*, 13 (4): 423-432.
- CURTALE (F.), HAMMOUD (E.S.), EL WAKEEL (A.), MAS-COMA (S.) & SAVIOLI (L.), 2000.- Human fascioliasis, an emerging public health problem in the Nile Delta, Egypt. *Research and Reviews in Parasitology*, 60 (3-4): 129-134.
- CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.E.), EL WAKEEL (A.), MAS-COMA (S.) & MONTRESOR (A.), 2003a.- Distribution of human fascioliasis by age and gender among rural population in the Nile Delta, Egypt. *Journal of Tropical Pediatrics*, 49 (5): 264-268.
- CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.E.W.), BARDUAGNI (P.), PEZZOTTI (P.), MAS-COMA (S.) & SAVIOLI (L.), 2003b.- Clinical signs, household characteristics and hygienic habitats associated with human fascioliasis among rural population in Egypt. A case-control study. *Parasitología*, 45: 5-11.
- CURTALE (F.), HASSANEIN (Y.A.W.), EL WAKEEL (A.), BARDUAGNI (P.) & SAVIOLI (L.), 2003c.- The School Health Programme in Behera: an integrated helminth control programme at governorate level in Egypt. *Acta Tropica*, 86 (2-3): 295-307.
- DANIS (M.), NOZAIS (J.P.) & CHANDENIER (J.), 1985.- La distomatose à *Fasciola hepatica*. II: La fasciolose humaine en France. *Action Veterinaire*, 907: VII-VIII.
- DAR (Y.D.), RONDELAUD (D.) & DREYFUSS (G.), 2005.- Update of fasciolosis-transmitting snails in Egypt (Review and comment). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35 (2): 477-490.
- DAVID (A.), 1997.- Disease in Egyptian mummies, the contribution of new technologies. *The Lancet*, 349: 1760-1763.
- DAWES (B.) & HUGHES (D.L.), 1964.- Fascioliasis: the invasive stage of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Advances in Parasitology*, 2: 97-168.
- DAWES (B.) & HUGHES (D.L.), 1970.- Fascioliasis: the invasive stages in mammals. *Advances in Parasitology*, 8: 259-274.
- DE (N.V.), MURRELL (K.D.), CONG (L.D.), CAM (P.D.), CHAU (L.V.), TOAN (N.D.) & DALSGAARD (A.), 2003.- The food-borne trematode zoonoses of Vietnam. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34 (Suppl. 1): 12-34.
- DE KOCK (K.N), JOUBERT (P.H.) & PRETORIUS (S.J.), 1989.- Geographical distribution and habitat preferences of the invader freshwater snail species *Lymnaea columella* (Mollusca: Gastropoda) in South Africa. *The Onderstepoort Journal Of Veterinary Research*, 56 (4): 271-5.
- DESPRES (L.), IMBERT-ESTABLET (D.), COMBES (C.), BONHOME (F.), 1992.- Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 295-304.

- DITTMAR (K.) & TEEGEN (W.R.), 2003.- The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale-Unstrut Valley, Germany. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. 1): 141-143.
- DOMMELIER (S.), BENTRAD (S.), BOUCHET (F.), PAICHELER (J.C.), PETREQUIN (P.), 1998.- Parasitoses liées à l'alimentation chez les populations du site néolithique de Chalain (Jura, France). *Anthropozoologica*, 27: 41-49.
- DOS REIS (S.P.), PESSOA (L.M.), STRAUSS (R.E.), 1990.- Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographical differentiation. *Brazilian Journal of Genetics*, 13: 509-520.
- DOUMENGE (J.P.), MOTT (K.E.), CHEUNG (C.), VILLENAVE (D.), CHAPUIS (O.), PERRIN (M.F.) & REAUD-THOMAS (G.), 1987.- Atlas of the global distribution of schistosomiasis. Centre d'Etudes de Géographie Tropicale, CNRS and Parasitic Diseases Programme, WHO, Talence-Geneva, Presses Universitaires de Bordeaux, Talence, 400 pp., 47 tabl. & 49 maps.
- DRAZ (O.A.), 1949.- "Increase in food supplement of man by combating animal diseases". Quoted by Soliman and Zaki (1964).
- DUJARDIN (J.-P.), 2002.- BAC software. Institut de Recherches pour le Développement (IRD, France) (<http://www.fsf.org/copyleft/gpl.html>).
- DUJARDIN (J.P.) & FE PONT (F.), 2004.- Geographical variation of metric properties within the neotropical sandflies. *Infection, Genetics & Evolution*, 4: 353-359.
- EDDIN (S.), 1955.- Rapport général sur la situation sanitaire de l'Égypte en ce qui concerne les maladies parasitaires. *Bulletin de l'Office International des Épidémiologies*, 43: 204-213.
- EL KHOBY (T.), 1997.- Fascioliasis: an emerging problem in Egypt and the region. *Abstracts of the International Conference on Infectious Disease and Public Health*, Alexandria, Egypt, S73: 40.
- EL-AZAZY (O.M.E.) & SCHILLHORN VAN VEEN (T.W.), 1983.- Animal fascioliasis and schistosomiasis in Egypt and Sudan. *Helminthological Abstracts*, Series A, 52: 421-428.
- EL-DAFRAWY (S.M.), 2002.- Morphological and ecological studies on *Lymnaea natalensis* the snail vector of *Fasciola gigantica* in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32 (2): 447-456.
- EL-MAGDOUB (A.A.), EL-SAYED (I.A.) & MAHDY (A.E.), 1999.- Relationship between system of raising Egyptian buffaloes and the effect of climate conditions on the helminthic infection rate, middle Delta, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 29: 505-515.
- EL-REFAIL (A.H.) & MICHAEL (S.A.), 1972.- Vectors of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Egypt. *Journal of the Egyptian Veterinary Medicine Association*, 34: 172-189.
- EL-SHAZLY (A.M.), EL-WAFA (S.A.), HARIDY (F.M.), SOLIMAN (M.), RIFAAT (M.M.) & MORSY (T.A.), 2002.- Fascioliasis among live and slaughtered animals in nine centers of Dakahlia Governorate. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32: 47-57.
- EL-SHAZLY (A.M.), HANDOUSA (A.E.), YOUSSEF (M.E.), RIZK (H.) & HAMOUDA (M.M.), 1991.- Human fascioliasis: a parasitic health problem in Dakahlia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 21 (2): 553-559.
- ESCALANTE (A.A.) & AYALA (F.J.), 1995.- Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on ARNr genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5793-5797.
- ESTEBAN (J.G.) FLORES (A.), AGUIRRE (C.), STRAUSS (W.), ANGLES (R.) & MASCOMA (S.), 1997a.- Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 66: 1-14.

- ESTEBAN (J.G.), FLORES (A.), ANGLES (R.), STRAUSS (W.), AGUIRRE (C.) & MAS-COMA (S.), 1997b.- A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano. *Tropical Medicine and International Health*, 2 (7): 695-699.
- ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1998.- Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 58 (1): 13-42.
- ESTEBAN (J.G.), FLORES (A.), ANGLES (R.) & MAS-COMA (S.), 1999.- High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93 (2): 151-156.
- ESTEBAN (J.G.), GONZALEZ (C.), BARGUES (M.D.), ANGLES (R.), SANCHEZ (C.), NAQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2002.- High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Tropical Medicine and International Health*, 7 (4): 339-348.
- ESTEBAN (J.G.), GONZALEZ (C.), CURTALE (F.), MUÑOZ-ANTOLI (C.), VALERO (M.A.), BARGUES (M.D.), EL SAYED (M.), EL WAKEEL (A.), ABDEL-WAHAB (Y.), MONTRESOR (A.), ENGELS (D.), SAVIOLI (L.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages of the Nile Delta, Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69 (4): 429-437.
- EUZEBY (J.), 1984.- *Les parasitoses humaines d'origine animale. Cactères épidémiologiques*. Edit. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 324 pp.
- EUZEBY (J.), DESMOULINS (J.), GEVREY (J.A.) & LESTRA (N.T.), 1979.- *La fasciolose à Fasciola hepatica*. Travail de Laboratoire de Parasitologie. Ecole de Veterinaires, Lyon, 64 pp.
- EZZAT (M.A.E.), 1950.- A helminthological investigation on some animals in Dakhla and Karga oases. *Technical Bulletin, Ministry of Agriculture, Egypt*, 256, 4 pp.
- FACEY (R.V.) & MARSDEN (P.D.), 1960.- Fascioliasis in man: an outbreak in Hampshire. *British Medical Journal*, ii: 619-625.
- FAIRWEATHER (I.) & BORAY (J.C.), 1999.- Fasciolicides: efficacy, action, resistance and its management. *The Veterinary Journal*, 158: 81-112.
- FARAG (H.), 1997.- Human fascioliasis. The Egyptian Experience. *Abstracts of the International Conference on Infectious Diseases and Public Health Alexandria, Egypt*, S74: 40.
- FARAG (H.F.), 1998.- Human fascioliasis in some countries of the Eastern Mediterranean Region. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4: 156-160.
- FARAG (H.F.) & EL-SAYAD (M.H.), 1995.- *Biomphalaria alexandrina* naturally infected with *Fasciola gigantica* in Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 36.
- FARAG (H.F.), BARAKAT (R.M.R.), RAGAB (M.) & OMAR (E.), 1979.- A focus of human fascioliasis in the Nile Delta, Egypt. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 188-190.
- FARAG (H.F.), RAGAB (M.), SALEM (A.) & SADECK (N.), 1986.- A short note on praziquantel in human fascioliasis. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89: 79-80.
- FARAG (H.F.), SALEM (A.), EL-HIFNI (S.A.) & KANDIL (M.), 1988.- Bithionol (Bitin) treatment in established fascioliasis in Egyptians. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 240-244.
- FARID (Z.), TRABOLSI (B.), BOCTOR (F.) & HAFEZ (A.), 1986.- Unsuccessful use of praziquantel to treat acute fascioliasis in children. *Journal of Infectious Diseases*, 154: 920-921.
- FARID (Z.), KAMAL (M.) & WOODY (J.), 1988.- Treatment of acute toxemic fascioliasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 299.

- FARID (Z.), KAMAL (M.) & MANSOUR (N.), 1989.- Praziquantel and *Fasciola hepatica* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 299.
- FARID (Z.), MANSOUR (N.), KAMAL (M.), SAFWAT (Y.) & WOODY (J.N.), 1990.- The treatment of acute *Fasciola hepatica* infection in children. *Tropical and Geographical Medicine*, 42: 95-96.
- FAVENNEC (L.), JAVE ORTIZ (J.), GARGALA (G.), LOPEZ CHEGNE (N.) & AYOUB (A.), 2003.- Double blind, randomized, placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of fascioliasis in adults and children from northern Peru. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17: 265-270.
- FILLER (J.), 1995.- *Disease*. Egyptian Book-shelf. British Museum Press, Trustees of the British Museum Press, London: 112 pp.
- FORGHANPARAST (K.), 1993.- Clinicoepidemiological study of human fascioliasis in Gilan. *Journal Med. Coll., Gilan University of Medical Sciences*, 2 (6-7): 63-64.
- FRANSEN (F.), 1983.- A field guide to fresh water snails in countries of the WHO Eastern Mediterranean Region. *Danish Bilharziasis Laboratory. Copenhagen, Denmark*, 30-31.
- FUNATSU (I.R.), 1998.- *Fascioliasis humana y animal en el Altiplano Norte boliviano. Caracterización de biológica de aislados humanos y porcino de Fasciola hepatica*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológica, Universidad de Valencia, 363 pp.
- GAASENBEEK (C.P.H.), MOLL (L.), CORNELISSEN (J.B.W.J.), VELLEMA (P.) & BORGSTEEDE (F.H.M.), 2001.- An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95: 37-43.
- GAILLET (P.), LIANCE (M.), RIVOLLET (D.) & HOUIN (R.), 1983.- Situation de la fasciolose humaine en France, enquête retrospective portant sur les 30 dernières années. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 1: 79-82.
- GARGALA (G.), ABOUD (P.), BORSA-LEBAS (F.), COURCHAY (E.), KONING (E.), FAVENNEC (L.) & CARON (F.), 2005.- Case report of successful treatment of triclabendazole resistant fascioliasis by nitazoxanide. In: *Medicine and Health in the Tropics* (XVIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Marseille, France, 11-15 Sept. 2005), Abstract Book, P680: 283.
- GERBI (S. A.), 1985 - Evolution of ribosomal DNA. *Molecular Evolutionary Genetics*. RJ MacIntyre, ed., Plenum Publishing (New York) pp. 419-517.
- GIL-BENITO (A.), CIOLKOVITCH (A.), MAS-COMA (S.) & QUILICI (M.), 1991.- Enquête sur la Distomatose à *Fasciola hepatica* en Corse. *Méditerranée Médicale*, Marseille, 403: 21-25.
- GIRONES (N.), VALERO (M.A.), GARCIA-BODELON (M.A.), CHICO-CALERO (M.I.), PUNZON (C.), FRESNO (M.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, 195 (10): 1504-1512.
- GOHAR (N.), 1934-35.- Liste des trématodes parasites et de leurs hôtes vertébrés signalés dans la vallée du Nil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 12: 322-331; 13: 80-90.
- GONZALEZ (J.F.), PEREZ (R.), PEREZ (O.), GONZALEZ DE LA (R.), LASTRE (M.), BRITO (M.) & DIAZ (J.), 1987.- *Fascioliasis humana epidémica, Cuba 1983 II*. Estudio epidemiológico. GEN 41 : 53-57.
- GONZALEZ (L.C.), ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.), ORTIZ (P.), NAQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica*, 120: 119-129.
- GONZALEZ (L.C.), ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.), ORTIZ (P.), NAQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica*, 120: 119-129.

- GUTIERREZ (A.), POINTIER (J.P.), FRAGA (J.), JOBET (E.), MODAT (S.), PEREZ (R.T.), YONG (M.), SANCHEZ (J.), LOKER (E.S.) & THERON (A.), 2003.- *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology*, 105: 211-218.
- HAMMOUDA (N.A.), EL-MANSOURY (S.T.), EL-AZZOUNI (M.Z.) & EL-GOHARI (Y.), 1995.- Therapeutic effect of triclabendazole in patients with fascioliasis in Egypt: a preliminary study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 25: 137-143.
- HAMMOUDA (N.A.), EL-MANSOURY (S.T.), EL-AZZOUNI (M.Z.) & HUSSEIN (E.D.), 1997.- Detection of circulating antigens in blood to evaluate treatment of fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 27: 365-37.
- HARIDY (A.M.), IBRAHIM (B.B.), MORSY (T.A.) & EL-SHARKAWY (I.M.A.), 1999.- Fascioliasis is an increasing zoonotic disease in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 29 (1): 35-48.
- HARIDY (F.M.), EL GARHY (M.F.) & MORSY (T.A.), 2003.- Efficacy of Mirazid (*Commiphora molmol*) against fascioliasis in Egyptian sheep. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33 (3): 917-924.
- HASEEB (A.N.), EL SHAZLY (A.M.), ARAFA (M.A.S.) & MORSY (A.T.A.), 2002.- A review on fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32: 317-354.
- HASSAN (M.M.), ABBAZA (B.E.), EL-KARAMANY (I.), DYAB (A.K.), EL SHARKAWY (E.M.), ISMAIL (F.) & ASAL (K.H.), 2004.- Detection of anti-*Fasciola* isotypes among patients before and after treatment with Mirazid. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34 (3): 857-864.
- HEGAB (M.H.) & HASSAN (R.M.), 2003.- Role of circulating *Fasciola* antigens and IgG4 isotype in assessment of cure from fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33 (2): 561-570.
- HIEN (T.V.), DUNG (T.T.K.), TRI (N.H.), DANH (P.H.) & HANH (P.T.), 2001a.- Fascioliasis in Vietnam. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 32 (Suppl. 2): 48-50.
- HIEN (T.V.), DUNG (T.T.K.), TRI (N.H.), DANH (P.H.) & HANH (P.T.), 2001b.- Human fascioliasis in Vietnam. *Ho Chi Minh City Medical Magazine*, 5: 75-78.
- HILLIS (D.M.) & DIXON (M.T.), 1991 - Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66 (4): 411.
- HILLYER (G.V.), 1998- Improved diagnosis in human fascioliasis. En: *Infectious Diseases and Public Health*, M.Angelico and G.Rocchi, Eds., Balaban Publishers, Philadelphia, L'Aquila, pp. 314-324.
- HUBENDICK (B.), 1951.- Recent *Lymnaeidae*. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Almqvist & Wiksells Boktryckeria*, Stocholmo, 214 pp.
- HUSSEIN (A.A.), KHALIFA (R.M.A.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Trematode larval stages infecting *Radix natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) in Qena Governorate, Egypt, with special reference to fasciolid cercariae. *Research and Reviews in Parasitology*, 66 (1-4): 69-74.
- IHEAGWAM (E.U.) & OKAFOR (F.C.), 1984.- Biology, life-tables, and intrinsic rates of increase of *Bulinus globosus* Morelet and *Lymnaea natalensis* Kraus (Gastropoda: Pulmonata) the snail intermediate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Fasciola gigantica*, respectively, in Southeastern Nigeria. *Beiträge zur tropischen Landwirtschaft und Veterinärmedizin*, 22 (4): 429-34.
- IRVING (J.A.), SPITHILL (T.W.), PIKE (R.N.), WHISSTOCK (J.C.) & SMOOKER (P.M.), 2003.- The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution*, 57: 1-15.
- ISMAIL (N.M.M.) & EL-GAMAL (A.E.R.A.), 2003.- Correlation between snails and fish ponds of World Fish Center (ICLARM) with special reference to snail vectors of schistosomiasis and fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33 (2): 413-424.

- JACKSON (H.G.), 1921.- A revision on the genus *Fasciola* with particular reference to *F. gigantica* (Cobbold) and *F. nyanzi* (Leiper). *Parasitology*, 13: 48-56.
- JEFFREYS (J.G.), 1881.- On the Mollusca Procured during the "Lihgtening" and "Porcupine" Expeditions, 1868-70 (Part 4). *Proceedings of Zoology of the Society of London*, 51: 922-947, pls. 70-71.
- JORGENSEN (R.A.) & CLUSTER (P.D.), 1988 - Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75 (4): 1238-1247
- JOUET (D.), FERTE (H.), DEPAQUIT (J.), RUDOLFOVA (J.), LATOUR (P.), ZANELLA (D.), KALTENBACH (M.L.) & LEGER (N.), 2008.- *Trichobilharzia* spp. in natural conditions in Annecy Lake, France. *Parasitology Research*, 103 (1), 51-58.
- KABIL (S.M.), EL ASHRY (E.) & ASHRAF (N.K.), 2000.- An open-label clinical study of nitazoxanide in the treatment of human fascioliasis. *Current Therapeutic Research*, 61: 339-345.
- KEISER (J.) & UTZINGER (J.), 2004.- Chemotherapy for major food-borne trematodes: a review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5: 1711-1726.
- KENDALL (S.B.), 1953.- The life-history of *Lymnaea truncatula* under laboratory conditions. *Journal of Helminthology*, 27: 17-28.
- KENDALL (S.B.), 1965.- Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan host. *Advances in Parasitology*, 3: 59-98.
- KENDALL (S.B.), 1974.- Some parasites of domestic animals in the Aswan Governorate, Arab Republic of Egypt. *Tropical Animal Health and Production*, 6 : 128-130.
- KENDALL (S.B.) & MC CULLOUGH (F.S.), 1951.- The emergence of the cercariae of *Fasciola hepatica* from snail *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology*, 25: 77-92.
- KHALIL (M.T.) & BISHAI (H.M.), 1992.- Biological diversity of Egypt. Freshwater Mollusca in Egypt. The United Nations Environment Programme. GF/6105-92-02-2205.
- KHOUBBANE (M.), 2002.- *Fascioliasis humana y animal en Egipto e Irán, caracterización biológica y molecular de las especies parásitas implicadas y de sus moluscos hospedadores intermediarios*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia: 332 pp.
- KHOUBBANE (M.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA, (S.), 2004.- Epidemiología de la Fascioliasis en Egipto: susceptibilidad de los lymnaeidos y su papel en la transmisión. *Enfermedades emergentes*, 6 (3), Nº 29: p. 142.
- KLINGENBERG (C.P.), 1996.- *Multivariate allometry*. En: Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice, D. (Eds.), *Advances in Morphometrics*. Proceedings of the 1993 NATO-ASI on Morphometrics, NATO ASI, Ser. A, Life Sciences (587 pp.). Plenum Publishers, New York, 23-49.
- KNOBLOCH (J.), 1985.- Human fascioliasis in Cajamarca/Perú. II. Humoral antibody response and antigenaemia. *Tropical Medicine and Parasitology*, 36:91-93.
- KNOBLOCH (J.), DELGADO (A.E.), ALVAREZ (G.A.), REYMANN (U.) & BIALEK (R.), 1985.- Human fascioliasis in Cajamarca/Perú. I. Diagnostic methods and treatment with praziquantel. *Tropical Medicine and Parasitology*, 36: 88-90.
- KUNTZ (R.E.), LAWLESS (D.K.), LANGBEHM (H.R.) & MALAKATIS (C.M.), 1958.- Intestinal protozoa and helminths in the people of Egypt living in different localities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7 : 613.
- LANE (G.), 1998.- Anthelmintic resistance. *Veterinary Record*, 143: 332.
- LAVAZEC (C.), NATTIER (V.), DOMMELIER (S.), BENTRAD (S.), PAICHELIER (J.C.) & BOUCHET (F.), 2000.- Etude de la parasitofaune du site médiéval de Charavines (Lac de Paladru, France). *Bulletin de la Société Française de Zoologie*, 125: 205-215.

- LECAILLON (J.B.), GODBILLON (J.) & CAMPESTRINI (J.), 1998.- Effect of food on bioavailability of triclabendazole in patients with fascioliasis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45: 601-604.
- LEIPER (R.T.), 1916.- Report of the result of Bilharzia Mission in Egypt. 1915, Part IV. Egyptian Mollusca. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 27: 171-190.
- LINNAEUS (C.), 1758.- *Systema Nature per Regna Tria Nature, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentis, Sinonimis, Locis*, Tomus I, Editio Decima, Reformata. Holmiae, Impensis Direct. Laurentii Salvii.
- LOOSS (A.), 1896.- *Recherches sur la faune parasitaire de l'Égypte*. 1re Partie. Mémoires de l'Institut Egyptien, III, I-XVII: 1-252.
- LOTFY (W.M.) & HILLYER (G.V.), 2003.- *Fasciola* species in Egypt. *Experimental Pathology and Parasitology*, 6 (11): 9-22.
- LOTFY (W.M.), EL-MORSHEDY (H.N.), EL-HODA (M.A.), EL-TAWILA (M.M.), OMAR (E.A.) & FARAG (H.F.), 2002.- Identification of the Egyptian species of *Fasciola*. *Veterinary Parasitology*, 103: 323-332.
- MADSEN (H.), 1983.- Distribution of *Helisoma duryi*, an introduced competitor of intermediate hosts of schistosomiasis, in an irrigation scheme in northern Tanzania. *Acta Tropica*, 40 (3): 297-306.
- MADSEN (H.), 1992.- Ecological studies on the intermediate host snails and the relevance to schistosomiasis control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(4): 249-53.
- MADSEN (H.), DAFFALLA (A.A.), KAROUM (K.O.) & FRANDSEN (F.), 1988.- Distribution of Freshwater Snails in Irrigation Schemes in the Sudan. *The Journal of Applied Ecology*, 25 (3): 853-866.
- MALEK (E.A.), 1962.- *Laboratory guide and notes for medical malacology.*, Burgess Publishing company. Minneapolis, Minn, USA, 154 pp.
- MALEK (E.A.), 1980.- *Snail-transmitted parasitic diseases*. Vol I Y II. CRC. Press Boca ratón, Florida, EEUU. 334PP + 324PP.
- MALEK (E.A.), 1985.- *Snail hosts of Schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual*. Pan American Health Organization, Washington, 325 pp.
- MALONE (J.B.), 1994.- Epidemiology of fasciolosis: geographic determinants of disease risk. En: *Abstracts of the VIIIth ICOPA* (M.A. Özcel & M.Z. Alkan edit.), Vol. 1, Turkish Society for Parasitology, Izmir: 97.
- MALONE (J.B.), LOYCANO (A.F.), HUGH-JONES (M.E.) & CORTKUM (K. C.), 1984.- A three-year study on seasonal transmission and control of *Fasciola hepatica* of cattle in Louisiana. *Previews in Veterinary Medicine*, 3: 131-141.
- MANDAHL-BARTH (G.), 1962.- Key to the Identification of East and Central African Freshwater Snails of Medical and Veterinary Importance. *Bulletin of the World Health Organization*, 27: 135-50.
- MANGOS (P.) & MENZIES (S.), 1973.- Human fascioliasis in Australia. *Medical Journal of Australia*, 1: 295-296.
- MANSOUR (N.S.), YOUSSEF (F.G.), MIKHAIL (E.M.) & BOCTOR (F.N.), 1983.- Use of partially purified *Fasciola gigantica* worm antigen in the serological diagnosis of human fascioliasis in Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32: 550-554.
- MARCILLA (A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2002.- A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Molecular and Cellular Probes*, 16 (5): 327-333.
- MAS-COMA (S.), 1999.- Los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADN ribosomal como marcadores en sistemática, ecología, evolución y filogenia de parásitos y vectores, p. 5-6. Abstracts XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (Acapulco, Octubre 1999).



- MAS-COMA (S.), 2004a.- Chapter 19: Human fascioliasis. In: World Health Organization (WHO), *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. (J.A. Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer & V.P.J. Gannon edit.), IWA Publishing, London, UK: 305-322.
- MAS-COMA (S.), 2004b.- Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 35: 1-11.
- MAS-COMA (S.), 2005.- Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*, 79 (3): 207-216.
- MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 1997.- Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (3-4): 145-218.
- MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 2009.- Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*, 110: 112-136.
- MAS-COMA (S.), FONS (R.), FELIU (C.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & GALAN-PUCHADES (M.T.), 1987.- Conséquences des phénomènes liés à l'insularité dans les maladies parasitaires. La Grande douve du foie (*Fasciola hepatica*) et les Muridés en Corse. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*, 110: 57-62.
- MAS-COMA (S.), FONS (R.), FELIU (C.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & GALAN-PUCHADES (M.T.), 1988.- Small mammals as natural definitive hosts of the liver fluke, *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae): a review and two new records of epidemiologic interest on the island of Corsica. *Rivista di Parassitologia*, 5 (49), 1: 73-78.
- MAS-COMA (S.), FONS (R.), JIMENEZ (A.M.), VALERO (M.A.), PASCUAL (F.J.), JOURDANE (J.), RENAUD (F.), BARGUES (M.D.), GALAN-PUCHADES (M.T.), ESTEBAN (J.G.), SORRIBES (J.) & RIPOLL (B.), 1990.- The Black rat as normal definitive host of *Fasciola hepatica* on Corsica island. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (Suppl. 2): 736.
- MAS-COMA (S.), ANGLES (R.), STRAUSS (W.), ESTEBAN (J.G.), OVIEDO (J.A.) & BUCHON (P.), 1995.- Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Research and Reviews in Parasitology*, 55 (2): 73-93.
- MAS-COMA (S.), RODRIGUEZ (A.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.), COELLO (J.R.) & ANGLES (R.), 1997.- Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (1): 39-46.
- MAS-COMA (S.), ESTEBAN (J.G.) & BARGUES (M.D.), 1999a.- Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (4): 340-346.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & ESTEBAN (J.G.), 1999b.- Human Fasciolosis. En: *Fasciolosis* (J.P. Dalton edit.), CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK: 411-434.
- MAS-COMA (S.), ANGLES (R.), ESTEBAN (J.G.), BARGUES (M.D.), BUCHON (P.), FRANKEN (M.) & STRAUSS (W.), 1999c.- The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine and International Health*, 4 (6): 454-467.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), MARTY (A.M.) & NEAFIE (R.C.), 2000.- Hepatic trematodiasis. En: *Pathology of Infectious Diseases*, Vol 1 Helminthiasis (Meyers, W.M., Neafie, R.C., Marty, A.M., Wear, D.J. edit.), Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington D.C.: 69-92.
- MAS-COMA (S.), FUNASTSU (I.R.) & BARGUES (M.D.), 2001.- *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123: S115-127.

- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & FUENTES (M.V.), 2003.- Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. En: *Taxonomy, Ecology and Evolution of metazoan parasites*. Volume II, (Combes, C & Jourdan, J. edit) Perpignan, Perpignan University: 81-123.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2005.- Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1255-1278.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2008.- Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. In: *Climate Change: Impact on the Epidemiology and Control of Animal Diseases* (S. de La Rocque, G. Hendrickx & S. Morand coord.). Scientific and Technical Review, World Organisation for Animal Health (OIE), Paris. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties*, August, 27 (2): 443-457.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009a.- *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 69: 41-146.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009b.- Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163 (4): 264-280.
- MASSOUD (A.), EL SISI (S.), SALAMA (O.) & MASSOUD (A.), 2001.- Preliminary study of therapeutic efficacy of a new fasciolicidal drug derived from *Commiphora molmol* (myrrh). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65 (2): 96-99.
- MASSOUD (A.M.), EL-KHOLY (N.M.), EL-SHENNAWY (F.A.) & FARAG (R.E.), 2004.- Study of some immune aspects in patients with fascioliasis before and after *Chomiphora molmol* (Mirazid) treatment. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34 (1): 315-332.
- MASSOUD (J.), 1990.- Fascioliasis outbreak of man and drug test (Triclabendazole) in Caspian littoral, northern part of Iran, 1989. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (Suppl. 1): 438.
- MASSOUD (J.), 1993.- Present status of human fascioliasis in Iran. En: *Food-borne trematodes*, World Health Organization, WHO Manual, Manila, Mimeogr. Rep. Sch/SG/93 w, p. 19.
- MEIER-BROOK (C.) & BARGUES (M.D.), 2002.- *Catascopia*, a new genus for three Nearctic and one Palaearctic stagnicoline species (Gastropoda: Lymnaeidae). *Folia Malacologica*, 10 (2): 83-84..
- MENDONÇA (M.M.), 1987.- *A fasciolose por Fasciola hepatica L. 1758 em s. Miguel Açores. Contribuição para o estudio das condições ecologicas da sua transmisibilidade*. Tesis Doctoral, Universidade de Lisboa, 203 pp
- MENDONÇA (M.M.), 1992.- Les foyers d'infestation par *Fasciola hepatica* L., 1758 dans l'île de S. Miguel (Açores). *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 10 (1): 31-41
- MERA Y SIERRA (R.), ARTIGAS (P.), CUERVO (P.), DEIS (E.), SIDOTI (L.), MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 2009.- Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 166: 73-79.
- MILLAN (J.C.), MULL (R.), FREISE (S.) & RITCHER (J.), 2000.- The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 264-269.
- MITCHELL (G.B.), MARIS (L.) & BONNIWELL (M.A.), 1998.- Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record*, 143: 399.

- MITTERPAK (J.), 1968.- Zu den Besonderheiten der Epizootologie von Fasziole in den tropischen Bedingungen von Kuba. *Wiadomości Parazytologiczne*, 14: 503-507. [341]
- MOGHADDAM (A.S.), MASSOUD (J.), MAHMOODI (M.), MAHVI (A.H.), PERIAGO (M.V.), ARTIGAS (P.), FUENTES (M.V.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004a.- Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran. *Parasitology Research*, 94 (1): 61-69.
- MOGHADDAM (A.S.), MASSOUD (J.F.), MAHMOODI (M.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), PERIAGO (M.V.), FUENTES (M.V.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004b.- Distributional outline of lymnaeid snails (Gastropoda) in the fascioliasis endemic area of Mazandaran, Iran. *Acta Parasitologica*, 49 (2): 145-152.
- MOLL (L.), GAASENBEEK (C.P.H.), VELLEMA (P.) & BORGSTEEDE (F.H.M.), 2000.- Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Record*, 91: 153-158.
- MOUKRIM (A.) & RONDELAUD (D.), 1992.- Vertical spatial behaviour patterns of *Lymnaea truncatula* in relation with origin of snails, infection with *Fasciola hepatica*, and experimental environment. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 67: 174-179.
- MÜLLER (H.W.) & THIEM (E.), 2000.- *L'or de l'Égypte ancienne*. Sélection du Reader's Digest, S.A., Paris: 256 pp.
- MUSTERS (W.), BOON (K.), Van Der SANDE (C.), Van HEERIKHUIZEN (H.) & PLANTA (R.J.), 1990 - Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *The EMBO Journal*, 9 (12): 389-396.
- MZEMBE (S.A.T.) & CHAUDHRY (M.A.), 1981.- The epidemiology of fascioliasis in Malawi part II. Epidemiology in the definitive host. *Tropical Animal Health and Production*, 13 (1): 27-33.
- NAGATY (H.F.), 1942.- On some parasites collected in Egypt from food mammals. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 25: 110-111.
- NAGATY (H.F.), EL-GINDY (M.S.) & ABDEL MAGEED (S.M.), 1959.- On the morphology, anatomy and trematode infection of some lymnaeid snails from Egypt with special reference to fascioliasis. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 19: 51-77.
- NAGATY (H.F.), ABDEL MAGEED (S.M.) & EL GINDY (M.S.), 1962.- Studies on lymnaeid snails in Egypt with special reference to their transmission of fascioliasis. Part 1. *Journal of the Arabian Veterinary Medical Association*, 22: 117-123.
- NDIFON (G.T.) & UKOLI (F.M.A.), 1987.- Ecology of freshwater snails in south-western Nigeria. I: Distribution and habitat preferences. *Hydrobiologia*, 171 (3): 231-253.
- NEHUAUS (W.), 1953.- Ubre den chemischen Sinn der Miracidien von *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 15: 476-490.
- O'NEILL (S.M.), BRADY (M.T.), CALLANAN (J.J.), MULCAHY (G.), JOYCE (P.), MILLS (K.H.) & DALTON (J.P.), 2000.- *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22, 147-155.
- O'BRIEN (D.J.), 1998.- Fasciolosis: a threat to livestock. *Irish Veterinary Journal*, 51: 539-541.
- OCHMAN (H.) & WILSON (A.C.), 1987.- Evolution of bacteria: evidence for a universal rate in cellular genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 26: 74-86.
- ODENING (K.), 1971.- *Der Grosse Leberegel und Seine Verwendten*. A Ziemsen Verlag Wittenberg, Luther Stadt.
- OFOEZIE (I.E.), 1999.- Distribution of freshwater snails in the man-made Oyan Reservoir, Ogun State, Nigeria. *Hydrobiologia*, 416 (0): 181-191.
- OGAMBO-OGOMA (A.H.), 1972.- The effect of clearing on the population of *Lymnaea natalensis*. *Bulletin of epizootic diseases of Africa*, 20 (1): 25-30.

- OLAECHEA (F.), LOVERA (V.), LARROZA (M.), RAFFO (F.) & CABRERA (R.), 2011.- Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*, 178 (3/4): 364–366.
- OLIVEIRA (D.R.), FERREIRA (D.M.), STIVAL (C.C.), ROMERO (F.), CAVAGNOLLI (F.), KLOSS (A.), ARAUJO (F.) & MOLENTO (M.B.), 2008.- Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandare, Parana, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17 (Supl. 1): 149-153.
- ORTIZ (P.), 2011.- Estado actual de la infección por *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Peru. *Biomédica*, 31 (Supl. 3): 172-173.
- ORTIZ (P.), SCARCELLA (S.), CARNA (C.), ROSALES (C.), CABRERA (M.), GUZMAN (M.), LAMENZA (P.) & SOLANA (H.), 2013.- Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001>.
- OSMAN (M.M.), HELMY (M.) & MEGEHED (M.A.), 1995.- Studies of human fascioliasis in Egypt: some serum lipid parameters before and after treatment. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 22: 27-35.
- OVER (H.J.), 1982.- Ecological basis of parasite control: trematodes with special reference to fascioliasis. *Veterinary Parasitology*, 2: 85-97.
- OVEREND (D.J.) & BOWEN (F.L.), 1995.- Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*, 72: 275-276.
- OVIDO (J.A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1995.- Lymnaeid snails in the human fascioliasis high endemic zone of the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 55: 35-43.
- PALLARY (P.), 1909.- Catalogue de la faune malacologique de L'Égypte. *Memoires de l'Institut Egyptien*, 6 (1): 1-92 + pl. I-V.
- PALLARY (P.), 1924.- Supplément à la faune malacologique terrestre et fluviatile de L'Égypte. *Memoires présentées à l'Institut Egyptien et publiés sous les auspices de Sa Majesté Fouad 1er, Roi d'Égypte*, Imprimerie de l'Institut Français d'Archéologie Orientale, Le Caire, 7 (1): 1-61 + pl. I-IV.
- PANTELOURIS (E.M.), 1965.- *The common liver fluke Fasciola hepatica* L. Pergamon. Press., Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt, 259 pp.
- PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), EL SAYED (M.), ASHRAFI (K.), EL WAKEEL (A.), MOHAMED (M.Y.), DESQUESNES (M.), CURTALE (F.) & MAS-COMA (S.), 2008.- First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 51-58.
- PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitology Research*, 99 (4): 368-378.
- PHIRI (A.M.), PHIRI (I.K.), CHOTA (A.) & MONRAD (J.), 2007.- Trematode infections in freshwater snails and cattle from the Kafue wetlands of Zambia during a period of highest cattle-water contact. *Journal of Helminthology*, 81 (1): 85-92.
- PILSBRY (H.A.), 1919.- A review of the Land Mollusks of the Belgian Congo Chiefly Based on the Collections of the American Museum Congo Expedition, 380 pp.
- PITMAN (W.C. III), CANDE (S.), LA BRECQUE (J.) & PINDELL (S.C.), 1993.- Fragmentation of Gondwana: the separation of Africa and South America, p 15-37. En: P Goldbatt (ed), *Biological Relationships between Africa and South America*, Yale University Press, New Haven.
- POURTAGHVA (M.), SHAFI (A.), SABERI (A.), BAHAR (K.) & SOLYMANLOU (F.), 1990.- Fasciolase en Iran. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (Suppl. 1): 404.

- PRASERTPHON (S.), 1990.- An observation on the ecology, distribution and abundance of freshwater snails in the northern states of Nigeria. *Journal of Parasitology*, 91 (1): 63-67
- PROFT (J.), MAIER (W.A.) & KAMPEN (H.), 1999.- Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitology Research*, 85: 837-843.
- PUSLEDNIK (L.), PONDER (W.F.), DOWTON (M.) & DAVIS (A.R.), 2009.- Examining the phylogeny of the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52 (3): 643-659.
- RAGAB (M.) & FARAG (H.F.), 1978.- On human fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 61: 773-780.
- RAHMAN (M.S.A.), MOSSALAM (I.), SELIM (M.K.) & EL-REFAIL (A.H.), 1976, pub. 1978. A comparative field trial on the efficacy of some anthelmintics on gastrointestinal nematodes of sheep in Egypt. *Veterinary Medical Journal, Cairo*, 24: 39-48.
- REMIGIO (E.A.) & BLAIR (D.), 1997.- Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1540-1545.
- RIPERT (C.), TRIBOULEY (J.), LUONG DINH GIAP (G.), COMBES (A.), LABORDE (M.) & BOURIANNE (C.), 1988.- Epidémiologia de la fasciolose humaine dans le sud ouest de la France. *Médecine et Chirurgie Digestives*, 17: 355-358.
- ROBERTS (E.W.), 1950.- Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Lymnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 44: 187-206
- ROGNLIE (M.C.), DIMKE (K.L.) & KNAPP (S.E.), 1994.- Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *Journal of Parasitology*, 80: 748-755.
- ROHLF (F.J.) & MARCUS (L.F.), 1993.- *A revolution in morphometrics*. TREE 8, 129-132.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1978.- Arguments et propositions pour une nouvelle interprétation de l'évolution de *Fasciola hepatica* L. dans *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53: 201-213.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1981.- Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. Chez *Lymnaea truncatula* Müller à propos des effets de plusieurs facteurs. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 57: 245-262.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1983.- Les modifications structurales du rein chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 582: 109-116.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1986.- Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. Premières observations chez des limnées tronquées en fin de cycle parasitaire. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 4: 29-38.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1987.- *Fasciola hepatica* L.: étude du développement des rédies chez quatre espèces de limnées. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 5: 99-104.
- ROSS (J.G.) & O'HAGAN (J.), 1968.- *Lymnaea truncatula* populations studies: sampling techniques. *Journal of Medical Laboratory Technology*, 25: 112-116
- ROSSATI (G.), 1988.- Adornos preciosos: alhajas y amuletos. En: *Civilización de los egipcios. La vida cotidiana*. (A.M. Donado Roveri coord.). Museo Egipcio de Turín, Istituto Bancario San Paolo di Torino, Electa Spa, Milano: pp 218-231.
- ROSSIGNOL (J.F.), ABAZA (H.) & FRIEDMAN (H.), 1998.- Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92: 103-104.

- RUFFER (M.A.), 1910.- Note on the Presence of 'Bilharzia Haematobium' in Egyptian Mummies of the XX th Dynasty 1250-1000 BC. *British Medical Journal*, 1: 16.8
- RUTHERFORD (P.), 2000.- The diagnosis of schistosomiasis in modern and ancient tissues by means of immunocytochemistry. *Chungará, Revista de Antropología Chilena*, 32 (1):127-131.
- SABOKBAR (R.D.), 1960.- Geographical distribution of *Fasciola hepatica* and its relation with human distomatosis. *Journal of the School of Medicine of the Tehran University*, 17: 251-260. (in Persian)
- SAHBA (G.H.), ARFAA (F.), FARAHMANDIAN (I.) & JALALI (H.), 1972.- Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran. *Journal of Parasitology*, 58 (4): 712-716.
- SALEM (A.I.), ABOU BASHA (L.M.) & FARAG (H.F.), 1987.- Immunoglobulin levels and intensity of infection in patients with fascioliasis, single or combined with schistosomiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 17: 33-40.
- SAVIOLI (L.), CHITSULO (L.) & MONTRESOR (A.), 1999.- New opportunities for the control of fascioliasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 300.
- SCHILLHORN VAN VEEN (T.W.), 1980.- Fascioliasis (*Fasciola gigantica*) in West Africa. *Veterinary Bulletin*, 50: 529-533.
- SELIM (M.K.), EL-REFAIL (A.H.), EL-AMROUSI (S.) & HOSNY (Z.), 1970.- Studies on the variou parasites harbouring imported animals to U. A. R. With particular reference to their pathology. *Veterinary Medical Journal, Cairo*, 17: 173-193.
- SELIM (M.K.), HEIKAL (F.D.A.) & EL-SHOKKARY (M.Y.), 1987.- Population dynamics of snail intermediate hosts of *Fasciola gigantica* in Beheira governorate. *Alexandria Journal of Veterinary Science*, 3: 119-126.
- SIMON-VICENTE (F.), 1968.- Datos sobre la ecología de *Lymnaea truncatula* y la evolución larvaria de *Fasciola hepatica* en una zona de regadío. *Revista Ibérica de Parasitología*, 28 (3): 333-348.
- SMITH (A.G.), HURLEY (A.M.) & BRIDEN (J.C.), 1981.- *Phanerozoic Paleontological World Maps*. Cambridge University Press, Cambridge.
- SMITHERS (S.R.), 1982.- Fascioliasis and other trematode infections. En: *Immunology of Parasitic Infections*, 2nd edition (S. Cohen & K.S. Warren edit.), Blackwell Scientific Publications, Oxford: 608-621.
- SOLIMAN (K.N.) & FARID (A.), 1960.- An outbreak of parasitic bronchopneumonia in a flock of imported sheep. En: *Proceedings, 1<sup>st</sup> Annual Veterinary Congress*, Cairo, Egypt, 269-275.
- SOLIMAN (K.N.) & ZAKI (H.), 1964.- The present situation concerning liver fluke disease in Egypt. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 12 : 455-460.
- SOLIMAN (M.S.), 1998.- Control of veterinary fascioliasis. En: *Infectious Diseases and Public Health. A research and clinical update* (M. Angelico and G. Rocchi edit), Balaban Publishers, Philadelphia, L'Aquila: 334-346.
- SOLIMAN (O.E.), EL-ARMAN (M.), ABDUL-SAMIE (E.R.), EL-NEMR (H.I.) & MASSOUD (A.), 2004.- Evaluation of myrrh (Mirazid) therapy in fascioliasis and intestinal schistosomiasis in children: immunological and parasitological study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34 (3): 941-966.
- SORRIBES (J.), AUBARY (M.J.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1990.- Revisión de los casos humanos de Fascioliasis en España entre los años 1970 y 1989. En : *Congreso de Zoonosis. 1º Interautonómico. Reunión de la International Zoonoses Association (IZA)*, Valencia, 186.
- SOULSBY (E.J.L.), 1988.- *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. Nueva Editorial Interamericana, Mexico-España-Nueva Cork-Israel-Colombia-Venezuela: 823 pp.
- SPITHILL (T.W.), SMOKER (P.M.) & COPEMAN (D.B.), 1999.- *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: *Fasciolosis* (J.P. Dalton edit.), CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK: 465-525.

- STORK (M.G.), VENABLES (G.S.), JENNINGS (S.M.F.) & BEESLEY (J.R.), 1973.- An investigation of endemic fascioliasis in Peruvian village children. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 231-235.
- SZIDAT (L.), 1944.- On the preservation of helminth eggs in pre-and early historical bog corpses. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 13: 265-274.
- TAIRA (N.), YOSHIFUJI (H.) & BORAY (J.C.), 1997.- Zoonotic potential of infection with *Fasciola* spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing immature flukes. *International Journal for Parasitology*, 27: 775-779.
- TALAIÉ (H.), EMAMI (H.), YADEGARINIA (D.), NAVA-OCAMPO (A.A.), MASSOUD (J.), AZMOUDEH (M.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Randomized trial of a single, double and triple dose of 10 mg/kg of a human formulation of triclabendazole in patients with fascioliasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 777-782.
- TAWFIK (M.A.) & HASSAN (A.A.), 1979.- On parasitic infestations among sheep of the north-west coast of Egypt. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 39: 137-141.
- TAYLOR (E.L.), 1965.- *La fascioliasis y el distoma hepático*. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO), Estudios Agropecuarios, nº 64, Roma: 264 pp.
- TESANA (S.), PAMARAPA (A.) & SIO (O.T.S.), 1989.- Acute cholecystitis and *Fasciola* sp. infection in Thailand: report of two cases. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 20 (3): 447-452.
- TORGERSON (P.) & CLAXTON (J.), 1999.- Epidemiology and control. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*, CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 113-149.
- TURRIENTES (M.C.), A. SAENZ DE STA. MARIA (A.), CEBALLOS (E.), DIAZ (M.), BARRENO (M.), MURO (A.), PARDO (J.) & R. LOPEZ-VELEZ (R.), 2004.- Fasciolosis importada y autóctona. In: IV Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI 4), Abstracts (S. Mas-Coma coord.) (Valencia, 18-22 July 2004), *Enfermedades Emergentes*, 6 (3), No. 119: p. 188.
- UENO (H.), ARANDIA (R.), MORALES (G.) & MEDINA (G.), 1975.- Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano region of Bolivia. *Animal National Institute of Health Quarterly*, 15: 61-67.
- URQUHART (G.M.), ARMOUR (J.), DUNCAN (J.L.), DUNN (A.M.) & JENNING (F.W.), 1987.- *Veterinary Parasitology*. Longman scientific & technical. Churchill Livingstone Inc. NewCork: 286 pp.
- VALERO (M.A.), MAS-COMA (S.), FONS (R.), COMES (A.M.), FAYOS (C.), MARCOS (M.D.) & OVIEDO (J.A.), 1992.- Experimental study on the role of reservoir host of the Black rat, *Rattus rattus*, in Fasciolosis on Corsica Island (France). En: VIth European Multicolloquium of Parasitology, Abstracts, The Hague: 221.
- VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1996.- A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Research and Reviews in Parasitology*, 56 (1): 13-20
- VALERO (M.A.), MARTI (R.), MARCOS (M.D.), ROBLES (F.) & MAS-COMA (S.), 1998a.- Le mollusque *Lymnaea truncatula* (Lymnaeidae) dans les rizières de l'Est de l'Espagne. *Vie et Milieu*, 48 (1): 73-78.
- VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 1998b.- *Fasciola hepatica* development in experimentally infected black rat, *Rattus rattus*. *Parasitology Research*, 84: 188-194.
- VALERO (M.A.), MARCOS (M.D.), COMES (A.M.), SENDRA (M.) & MAS-COMA (S.), 1999.- Comparison of adult liver flukes from highland and lowland populations of Bolivian and Spanish sheep. *Journal of Helminthology*, 73: 341-345.

- VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2001.- Developmental differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highland and European lowlands. *Parasitology Research*, 87: 337-342.
- VALERO (M.A.), SANTANA (M.), MORALES (M.), HERNANDEZ (J.L.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, 188: 787-793.
- VALERO (M.A.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2005.- Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *Journal of Helminthology*, 79 (3): 217-225.
- VALERO (M.A.), NAVARRO (M.), GARCIA-BODELON (M.A.), MARCILLA (A.), MORALES (M.), GARCIA (J.E.), HERNANDEZ (J.L.) & MAS-COMA (S.), 2006.- High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100 (1-2) 17-23.
- VALERO (M.A.), DE RENZI (M.), PANOVA (M.), GARCIA-BODELON (M.A.), PERIAGO (M.V.), ORDOÑEZ (D.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Crowding effect on adult growth, pre-patent period and egg shedding of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 133: 453-463.
- VALERO (M.A.), GIRONES (N.), GARCIA-BODELON (M.A.), PERIAGO (M.V.), CHICO-CALERO (I.), KHOUBBANE (M.), FRESNO (M.) & MAS-COMA (S.), 2008.- Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 108: 35-43.
- VALERO (M.A.), PEREZ-CRESPO (I.), PERIAGO (M.V.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2009.- Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*, 111: 150-159.
- VAN DAMME (D.S.), 1984.- *The Freshwater Mollusca of Northern Africa*. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster: 164 pp.
- VAN DER SANDE (C.A.), KWA (M.), VAN NUES (R.W.), VAN HEERIKHUIZEN (H.), RAUE (H.A.) & PLANTA (R.J.), 1992 - Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Journal of Molecular Biology*, 223 (4): 899-910.
- VIGO (M.), BARGUES (M.D.), YONG (M.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2000.- Ribosomal DNA ITS-2 characterisation of populations of *Lymnaea cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae), main snail species transmitting human fascioliasis in Cuba. *VX International Congress for Tropical Medicine and Malaria* (Cartagena de Indias, Colombia, 20-25 August 2000), Abstracts Book, 2: 156. ISBN= 958-9329-24-1.
- WAHBY (M.M.), 1943.- Gleanings of an Egyptian abattoir. *Veterinary Journal*, 99: 189-190.
- WEISZ (P.B.), 1987.- *La ciencia de la Zoología*. 6ta ed. Editorial Omega S.A., Barcelona, España, 933 pp.
- WHEELER (W.C.) & HONEYCUTT (R.L.), 1988.- Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 5 (1): 90-96.
- WILSON (G.I.) & SAMSON (K.S.), 1971.- The incidence of Fasciolosis of sheep and cattle in the Southwest with observations on the snail vectors. *Proceedings of Helminthology Society of Washington*, 38(1): 52-56
- WOLMARANS (C.T.) & YSSEL (E.), 1988.- Uptake and distribution of copper sulphate and its effect on the respiration rate of the hemocyanin-producing freshwater snail *Lymnaea natalensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41 (2): 214-221.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995a.- Foodborne trematode infections. *Bulletin WHO*, 73: 397-399.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995b.- Control of Foodborne Trematode Infections : *World Health Organization Technical Report Series*, 849: 1-157.



- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007.- Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. World Health Organization, Headquarters Geneva, 17-18 October 2006: WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.
- XUAN (L.T.), HUNG (N.T.), HIEN (T.V.) *et al.*, 2001.- Case report of *Fasciola gigantica*. *Ho Chi Minh City Medical Magazine*, 5 (Suppl. 1): 83-84.
- YADEGARI (D.) & TALAIE (H.), 1996.- Six years follow-up of triclabendazole in human fascioliasis. En: *7th Iranian Congress of Internal Medicine* (16-19 May 1996), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Abstracts: 167.
- YADEGARI (D.), FORGHAN-PARAST (K.) & ASMAR (M.), 1990.- Investigation of an epidemic of fascioliasis in North Iran. En: *7th International Congress of Parasitology* (Paris), *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (Suppl. 2): 868.
- YADEGARI (D.), TALAIE (H.) & MASSOUD (J.), 1999.- Clinical trial of Triclabendazole on human fascioliasis: long term follow up. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 13 (2): 89-91
- YAMAGUTI (S.), 1958.- *Systema Helminthum*, Vol I. The Digenetic Trematodes of Vertebrates, Parts 1 and 2, Interscience Publishers, New York: 1575 pp.
- YAMAGUTI (S.), 1975.- *Digenea of Mammals. Review of the life of Digenetic Trematodes of Vertebrates*. Keigaku Publ. Co., Tokyo, Japan: 590 pp.
- YOUSIF (F.), ROUSHDY (M.) & HAROON (N.), 1984.- Distinguishing *Helisoma (Seminolina) duryi* from *Biomphalaria alexandrina* found in the same habitats in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 14 (1). 55-76.
- ZUCKERKANDL (E.) & PAULING (L.), 1965.- Evolutionary divergence and convergence in proteins, p. 97-166. En V Bryson & HJ Vogel (eds), *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York.
- ZUTA (P.C.), 1995.- Aspects of the ecology and public health importance of snails in the Weija lake. *Ghana Medical Association*, 29: 654-663.

**ANEXOS**  
**PUBLICACIONES POR ORDEN CRONOLOGICO**



# WORLD HEALTH ORGANIZATION

## The Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group (FERG)

### Parasitic Diseases Task Force

---

## THE GLOBAL BURDEN OF FOODBORNE FASCIOLIASIS

**S. MAS-COMA, V.H. AGRAMUNT, M.D. BARGUES and M.A. VALERO**

*Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia,  
Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

### INDEX

- 1.- Introduction
- 2.- Human fascioliasis
  - 2.1.- Background
  - 2.2.- Heterogeneity of epidemiological scenarios and transmission patterns
  - 2.3.- Human infection sources
- 3.- Methodology
  - 3.1.- Literature sources
  - 3.2.- Review methods
  - 3.3.- Problems found in the literature review
  - 3.4.- Quality assessment
  - 3.5.- Calculations of incidence
- 4.- Results
  - 4.1.- Geographical distribution of human fascioliasis
  - 4.2.- Prevalences, intensities and relationships with gender and age
  - 4.3.- Proportion attributable to transmission through food
  - 4.4.- Estimates of data
    - A) Infection risk areas
    - B) Incidence
    - C) Duration of the disease
    - D) Complications and sequelae, their incidence and duration, and proportion of cases that recover fully or partially
    - E) Time-lag between acute disease and onset of every sequela
    - F) Case-fatality from the disease and sequelae
  - 4.5.- Disease diagram
- 5.- Discussion
  - A) Assumptions and uncertainties
  - B) Knowledge gaps and recommendations for future work
  - C) Suggestions on what kind of gaps could be filled through country studies, and how
- 6.- Database
- 7.- References

### 1.- INTRODUCTION

The Foodborne Disease Burden Epidemiological Expert Group (FERG) of the World Health Organization (WHO) has the aim of providing global estimates on the burden of foodborne diseases from microbiological and chemical causes, as well as tools to enable countries to conduct national foodborne disease burden studies to assess the impact and the cost - effectiveness of their food safety interventions. This scientific evi-

REVIEW

Open Access

# Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research

Roberto Mera y Sierra<sup>1,2</sup>, Veronica H Agramunt<sup>3</sup>, Pablo Cuervo<sup>1</sup> and Santiago Mas-Coma<sup>3\*</sup>

## Abstract

In Argentina, human fascioliasis has never been adequately analysed, although having a physiography, climate, animal prevalences and lymnaeids similar to those of countries where the disease is endemic such as Bolivia, Peru and Chile. We performed a literature search identifying 58 reports accounting for 619 cases, involving 13 provinces, their majority (97.7%) from high altitudes, in central mountainous areas and Andean valleys, concentrated in Cordoba (430 cases), Catamarca (73), San Luis (29) and Mendoza (28), the remaining provinces being rarely affected. This distribution does not fit that of animal fascioliasis. Certain aspects (higher prevalence in females in a local survey, although a trend non-significant throughout Argentina) but not others (patient's age 3-95 years, mean 37.1 years) resemble human endemics in Andean countries, although the lack of intensity studies and surveys in rural areas does not allow for an adequate evaluation. Human infection occurs mainly in January-April, when higher precipitation and temperatures interact with field activities during summer holidays. A second June peak may be related to Easter holidays. The main risk factor appears to be wild watercress ingestion (214) during recreational, weekend outings or holiday activities, explaining numerous family outbreaks involving 63 people and infection far away from their homes. Diagnosis mainly relied on egg finding (288), followed by serology (82), intradermal reaction (63), surgery (43), and erratic fluke observation (6). The number of fascioliasis-hydatidosis co-infected patients (14) is outstanding. Emetine appears as the drug most used (186), replaced by triclabendazole in recent years (21). Surgery reports are numerous (27.0%). A long delay in diagnosis (average almost 3.5 years) and high lithiasis proportion suggest that many patients are frequently overlooked and pose a question mark about fascioliasis detection in the country. High seroprevalences found in recent random surveys suggest human endemic situations. This analysis highlights that human fascioliasis may have been overlooked in the past and its real epidemiological situation in high risk rural, mainly altitudinal areas, may currently be underestimated. Results provide a valuable baseline on which to design appropriate multidisciplinary studies on humans, animals and lymnaeids to assess up to which level and in which areas, human fascioliasis may represent a health problem in Argentina.

## Background

Fascioliasis, a major veterinary problem worldwide due to the economic losses it causes in animal husbandry, has recently become increasingly important in public health, with human reports increasing in number and the description of human endemic areas, comprising hypo- to hyperendemic situations in many countries of Latin America, Africa, Europe and Asia [1-4]. This emergence appears to be partly related to climate change, global

warming and the so-called global change, among which mainly anthropogenic modifications of the environment and increasing short- and long-distance travel and import/export facilities available nowadays. All these phenomena have shown to have a great impact on snail-borne zoonotic diseases, as is the case of a trematodiasis very dependent on climate and environment characteristics such as fascioliasis [5-7].

The magnitude of fascioliasis impact on communities of human endemic areas, mainly on children and females [3], is due to its chronic, debilitating, and poverty-promoting characteristics, with a pathogenicity until recently considered restricted mainly to the acute phase

\* Correspondence: [S.Mas.Coma@uv.es](mailto:S.Mas.Coma@uv.es)

<sup>3</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

[2,8], but which has recently proved to constitute a health problem during the very long chronic phase [9-12]. Impact and wide emergence prompted the World Health Organization (WHO) to include human fascioliasis on its list of priorities among neglected tropical diseases (NTDs) [13].

In the Americas, this helminthic disease is caused by the liver fluke *Fasciola hepatica* [4], transmitted by many different freshwater snail vectors belonging to the family Lymnaeidae, mainly species included within the *Galba/Fossaria* group [14,15]. In South America, human endemic areas have been described in Andean regions, mainly in higher altitude areas of countries such as Bolivia, Peru and Chile, and secondarily in Ecuador and Venezuela [3,16-22].

In Argentina, the situation of human fascioliasis has never been the subject of an adequate analysis. Only short reports within large worldwide reviews may be specifically acknowledged [2,8]. This is surprising when taking into account that (i) neighbouring countries such as Bolivia and Chile reported hyperendemic areas of human fascioliasis long ago [16-21], (ii) the country presents a very widely distributed veterinary problem of fascioliasis in livestock [23], (iii) it includes Andean environmental characteristics appropriate for fascioliasis transmission to humans [3,24], and (iv) recent studies have reported the discovery of lymnaeid vector species of well-known transmission capacity to humans to be the same combined haplotype of *Galba truncatula* responsible for the human hyperendemic area presenting the highest prevalences and intensities known [25,26] and *Lymnaea neotropica* [27]. Argentina is a country of high livestock production, where sheep and cattle but also equines constitute important economic sources. All these different domestic species are important reservoirs of fascioliasis and represent similar sources of infection for humans, given the results obtained in experimental studies which have demonstrated that snail-borne infective metacercarial stages originating from different animal species do not significantly differ in their infection capacity [28,29].

The purpose of the present ten-year research work is to provide an in-depth analysis of the results obtained in a thorough bibliographical search of human fascioliasis cases in Argentina. In that country, even though there are national data on animal fascioliasis, where slaughterhouse reports have been submitted to the authorities for practically a hundred years, there are, however, no official reports on human fascioliasis, because human infection by the liver fluke is not of obligatory declaration. Thus, published and unpublished written reports are the only source of information, whether they may be articles in scientific journals, books, university theses, communications at scientific meetings, or internal reports of agencies, ministries, hospitals, health centres, etc. [30].

## Review

### Description of dataset

The first case published in Argentina concerned an Arab immigrant who had just arrived in Argentina [31]. The onset of symptoms was upon arrival, indicating that the disease was most probably acquired in his homeland. The patient died and the diagnosis was made during autopsy when numerous flukes were found in the liver. Since this case was not autochthonous, it is not considered in this review.

This overview begins from the first autochthonous case diagnosed by coprology in 1924 [32]. More cases followed soon, such as a coprologically diagnosed patient from San Luis province [33], another diagnosed during surgery [34] and yet another one from San Luis province [35]. Fifty three cases had already been published prior to 1960.

The first WHO review [8] refers to only 13 human reported cases in Argentina for the 1970-1990 period, namely only those reported by Carena et al. [36]. This number of human cases was increased to 85 in the following extensive WHO initiative [2]. The present review offers a completely new picture of human fascioliasis in Argentina, including a total of 619 autochthonous cases in 58 reports of different kinds analysed up to 2010 (Table 1), which means that the number of human cases published is more than seven times greater than previously noted. Such a pronounced difference seems to be due to the great amount of overlooked local publications (and also communications at scientific meetings with abstract books of restricted dissemination). When considering that human fascioliasis infection is in Argentina of non-obligatory declaration, similarly to the rest of the world, one may conclude that the number of infected patients should be even greater than that. Interestingly, the need for Argentinian health authorities to warn about this disease was already noted long ago when fascioliasis was cited in animals in the country for the first time [37].

Both report and case numbers follow a parallel evolution with quite important fluctuations (Figure 1). This result is most likely to be linked to particular circumstances encouraging physicians to publish their diagnosed cases rather than a real reflection of the annual evolution of the epidemiological situation. For instance, only two authors, C. Rodriguez and C. Siciliano [38-42], are responsible for 51% of the cases reported in Argentina, the decades when they were active publishing appearing as those decades with the greatest amount of cases (1960's and 1980's).

### Characteristics of the infected population

In only 267 cases did the authors specify the gender of the patients: 120 (44.94%) were male and 147 (55.06%) were female. A somewhat higher preference for females

**Table 1 Human fascioliasis reports in Argentina, arranged chronologically, including details on infection according to number of cases, gender, province, diagnostic method, treatment, and clinical data**

YEAR	AUTHOR	Ref. No.	No. cases	GENDER	PROVINCE	DIAGNOSTIC METHOD	TREATMENT	CLINICAL DATA
1924	Greenway	[32]	1	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>
1927	Bengolea et al.	[33]	1	F <sub>(1)</sub>	SL <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub>
1928	Del Valle & Donovan	[34]	1	F <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1930	Bacigalupo et al.	[35]	1	F <sub>(1)</sub>	SL <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>
1933	Mascheroni	[108]	1	F <sub>(1)</sub>	BA <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>
1933	Scrimaglio (In Bacigalupo et al. 1943)	[93]	1	M <sub>(1)</sub>	SFe <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>
1937	Castex & Greenway	[91]	1	M <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Ect <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub>
1939	Boto	[69]	1	F <sub>(1)</sub>	Tuc <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub> Urt <sub>(1)</sub>
1939	Paladino & Galarce	[92]	1	F <sub>(1)</sub>	BACity <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub> Ect <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub>
1940	Cames	[76]	2	M <sub>(2)</sub>	Cba <sub>(1)</sub> SFe <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub> Surg <sub>(1)</sub>	Em <sub>(2)</sub> MFE <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(2)</sub> WL <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub>
1942	Bacigalupo	[52]	5 <sub>(fo1)</sub>	F <sub>(2)</sub> M <sub>(3)</sub>	Cba <sub>(4)</sub> BA <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(2)</sub> Es <sub>(1)</sub> CE <sub>(2)</sub>	Em <sub>(4)</sub> NS <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(4)</sub> AP <sub>(4)</sub> Fev <sub>(3)</sub> WL <sub>(1)</sub>
1943	Solari & Canepa	[77]	1	F <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub>
1943	Bacigalupo et al.	[93]	1	M <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(1)</sub>	Ect <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub>
1944	Cuenya	[109]	3	F <sub>(1)</sub> M <sub>(2)</sub>	Tuc <sub>(1)</sub> Ju <sub>(1)</sub> Sal <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(3)</sub> Es <sub>(1)</sub>	NS <sub>(3)</sub>	AP <sub>(1)</sub>
1947	Cid Cames et al.	[79] [80]	1	F <sub>(1)</sub>	Tuc <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub> Ect <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> WL <sub>(1)</sub> Lith <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1952	Rodríguez	[38]	16	F <sub>(3)</sub> M <sub>(1)</sub> NS <sub>(12)</sub>	Cbsa <sub>(15)</sub> Cat <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(16)</sub>	NS <sub>(16)</sub>	Eo <sub>(5)</sub> AP <sub>(1)</sub> Lks <sub>(4)</sub> Ic <sub>(1)</sub>
1953	Longo & Daraio	[89]	1	F <sub>(1)</sub>	Sal <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub> NI <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Urt <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Lith <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub>
1954	Petraglia	[98]	1	M <sub>(1)</sub>	Cha <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Eo <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub>
1954	Rodríguez	[39]	10	F <sub>(1)</sub> M <sub>(2)</sub> NS <sub>(7)</sub>	Cba <sub>(9)</sub> Cat <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(10)</sub>	NS <sub>(10)</sub>	Eo <sub>(4)</sub> Lks <sub>(1)</sub>
1955	Cáceres	[55]	1	F <sub>(1)</sub>	BACity <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> Lith <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub>
1955	Logaldo	[101]	1	F <sub>(1)</sub>	Mza <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Lith <sub>(1)</sub>
1961	Ahualli & Arias	[110]	1	F <sub>(1)</sub>	Tuc <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> WL <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub> Dia <sub>(1)</sub>
1961	Rodriguez	[40]	23	NS <sub>(23)</sub>	Cba <sub>(22)</sub> Cat <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(23)</sub>	NS <sub>(23)</sub>	NS <sub>(23)</sub>
1961	"Other colleagues" cited in Rodriguez 1961	[40]	150	NS <sub>(150)</sub>	Cba <sub>(150)</sub>	NS <sub>(150)</sub>	NS <sub>(150)</sub>	NS <sub>(150)</sub>
1961	Strada	[72]	19	F <sub>(1)</sub> M <sub>(1)</sub> NS <sub>(17)</sub>	Cba <sub>(19)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(2)</sub> Surg <sub>(1)</sub> NS <sub>(15)</sub>	Em <sub>(2)</sub> NS <sub>(17)</sub>	Eo <sub>(2)</sub> AP <sub>(3)</sub> Fev <sub>(3)</sub> Lks <sub>(1)</sub> WL <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1962	Urrutia & Ferraris	[111]	1	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>
1964	Cornejo & Castillo	[112]	1	M <sub>(1)</sub>	Sal <sub>(1)</sub>	Ec <sub>(1)</sub> Es <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub>
1964	Simon et al	[86]	1	M <sub>(1)</sub>	Mza <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub> ID <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub> WL <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub>
1964	Cañas et al	[113]	1	M <sub>(1)</sub>	Ju <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Asth <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Dia <sub>(1)</sub> Cst <sub>(1)</sub>
1965	Niño	[107]	4	NS <sub>(4)</sub>	BACity <sub>(2)</sub> NS <sub>(2)</sub>	Ec <sub>(2)</sub> Es <sub>(2)</sub>	NS <sub>(4)</sub>	NS <sub>(4)</sub>
1967	Sosa & Romero	[114]	2	F <sub>(1)</sub> M <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(2)</sub>	Es <sub>(2)</sub>	Em <sub>(2)</sub>	Eo <sub>(2)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(2)</sub> WL <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> Dia <sub>(1)</sub>
1967	Ruggieri et al.	[94]	1	F <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub> Ect <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Urt <sub>(1)</sub> Nau <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1969	Correa et al.	[95]						
1969	Peiretti et al.	[87]	17	NS <sub>(17)</sub>	Mza <sub>(15)</sub> SL <sub>(2)</sub>	Es <sub>(5)</sub> ID <sub>(17)</sub>	NS <sub>(17)</sub>	NS <sub>(17)</sub>
1969	Trossero & Nocetti	[103]	1	F <sub>(1)</sub>	SFe <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	Em <sub>(1)</sub>	AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub>
1970	Padilla Antoni et al.	[99]	1	NS <sub>(1)</sub>	Tuc <sub>(1)</sub>	Surg <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1972	Carena et al.	[36]	13	F <sub>(4)</sub> M <sub>(9)</sub>	Cba <sub>(11)</sub> Cat <sub>(1)</sub> Tuc <sub>(1)</sub>	Es <sub>(13)</sub>	Em <sub>(13)</sub>	Eo <sub>(13)</sub> AP <sub>(8)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Asth <sub>(3)</sub> Urt <sub>(2)</sub> HA <sub>(2)</sub> Cst <sub>(1)</sub> Dia <sub>(1)</sub>
1972	Ossola et al.	[49]	12 <sub>(fo3)</sub>	F <sub>(7)</sub> M <sub>(5)</sub>	Cba <sub>(12)</sub>	Ec <sub>(2)</sub> Es <sub>(2)</sub> ID <sub>(12)</sub>	NS <sub>(12)</sub>	Eo <sub>(11)</sub> AP <sub>(12)</sub> Fev <sub>(9)</sub> WL <sub>(8)</sub> Asth <sub>(10)</sub> Urt <sub>(4)</sub> Ic <sub>(3)</sub> Cst <sub>(3)</sub> Dia <sub>(2)</sub>
1973	Sonzini Astudillo et al.	[104]	5	F <sub>(4)</sub> M <sub>(1)</sub>	NS <sub>(5)</sub>	Es <sub>(1)</sub> Surg <sub>(4)</sub>	Em <sub>(1)</sub> NS <sub>(4)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(4)</sub> Asth <sub>(1)</sub> Lith <sub>(3)</sub> Ic <sub>(4)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1973	Peiretti & Morales	[50]	4 <sub>(fo1)</sub>	F <sub>(1)</sub> M <sub>(3)</sub>	SL <sub>(4)</sub>	ID <sub>(4)</sub>	Em <sub>(4)</sub>	Eo <sub>(4)</sub> AP <sub>(4)</sub> Fev <sub>(2)</sub> Lks <sub>(2)</sub> WL <sub>(1)</sub> Ic <sub>(1)</sub> Cst <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub>
1981	Majul et al.	[102]	6	NS <sub>(6)</sub>	NS <sub>(6)</sub>	Es <sub>(2)</sub> Surg <sub>(6)</sub>	Em <sub>(6)</sub>	Eo <sub>(2)</sub> AP <sub>(6)</sub> Lith <sub>(6)</sub>

**Table 1 Human fascioliasis reports in Argentina, arranged chronologically, including details on infection according to number of cases, gender, province, diagnostic method, treatment, and clinical data (Continued)**

1981	Alaggia (in Andrada et al., 1983 [90])	[100]	16	NS <sub>(16)</sub>	NS <sub>(16)</sub>	Surg <sub>(16)</sub>	NS <sub>(16)</sub>	NS <sub>(16)</sub>
1982	Pizzi et al.	[106]	54	NS <sub>(54)</sub>	Cba <sub>(54)</sub>	EC <sub>(54)</sub>	NS <sub>(54)</sub>	NS <sub>(54)</sub>
1982	Siciliano	[41]	101	F <sub>(50)</sub> M <sub>(51)</sub>	Cba <sub>(101)</sub>	EC <sub>(61)</sub> Es <sub>(16)</sub> ID <sub>(29)</sub>	Em <sub>(97)</sub> Clq <sub>(4)</sub>	Eo <sub>(87)</sub> AP <sub>(78)</sub> Fev <sub>(58)</sub> Lks <sub>(69)</sub> WL <sub>(56)</sub> Anrx <sub>(53)</sub> Asth <sub>(67)</sub> Urt <sub>(37)</sub> Nau <sub>(31)</sub>
1983	Andrada et al.	[90]	5	F <sub>(5)</sub>	Cat <sub>(5)</sub>	Surg <sub>(4)</sub> NI <sub>(5)</sub>	Em <sub>(5)</sub>	Eo <sub>(3)</sub> AP <sub>(5)</sub> Urt <sub>(1)</sub> Ic <sub>(2)</sub> Lith <sub>(2)</sub>
1983	Giffoniello et al.	[78]	2	F <sub>(1)</sub> M <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(2)</sub>	Es <sub>(1)</sub> Surg <sub>(1)</sub> NI <sub>(1)</sub>	Em <sub>(2)</sub>	Eo <sub>(2)</sub> AP <sub>(2)</sub> Fev <sub>(2)</sub> WL <sub>(1)</sub> Asth <sub>(1)</sub> Lith <sub>(1)</sub> Vo <sub>(1)</sub> HA <sub>(1)</sub>
1985	Miguel et al.	[97]	5	NS <sub>(5)</sub>	BA <sub>(3)</sub> Mza <sub>(1)</sub> For <sub>(1)</sub>	Es <sub>(5)</sub>	Em <sub>(5)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(5)</sub> Lks <sub>(4)</sub> Ic <sub>(2)</sub>
1989	Siciliano et al.	[42]	15	F <sub>(9)</sub> M <sub>(5)</sub> fo <sub>(2)</sub>	Cba <sub>(15)</sub> NS <sub>(1)</sub>	EC <sub>(2)</sub> Es <sub>(1)</sub> Surg <sub>(2)</sub>	Em <sub>(15)</sub>	Eo <sub>(14)</sub> AP <sub>(15)</sub> Fev <sub>(15)</sub> Lks <sub>(10)</sub> Urt <sub>(8)</sub> Ic <sub>(2)</sub>
1991	Melero et al.	[88]	1	M <sub>(1)</sub>	SL <sub>(1)</sub>	Es <sub>(1)</sub> NI <sub>(1)</sub>	Tcl <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub> WL <sub>(1)</sub>
1995	Minoprio et al.	[51]	5	fo <sub>(1)</sub>	F <sub>(3)</sub> M <sub>(2)</sub> Mza <sub>(5)</sub>	Ect <sub>(1)</sub> CE <sub>(4)</sub> NI <sub>(3)</sub>	Tcl <sub>(5)</sub> Pzq <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(3)</sub> AP <sub>(2)</sub> Fev <sub>(2)</sub> Lks <sub>(1)</sub> Asth <sub>(2)</sub> Urt <sub>(3)</sub> Ic <sub>(1)</sub>
2000	Ale et al.	[115]	1	F <sub>(1)</sub>	SL <sub>(1)</sub>	EC <sub>(1)</sub>	NS <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub>
2005	Carnevale (in Rubel et al. 2005)	[61]	4	NS <sub>(4)</sub>	SL <sub>(4)</sub>	Ser <sub>(4)</sub>	NS <sub>(4)</sub>	NS <sub>(4)</sub>
2005	Rubel et al.	[61]	1	F <sub>(1)</sub>	Neu <sub>(1)</sub>	Ser <sub>(1)</sub>	Tcl <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub>
2005	Lloret et al.	[54]	5	fo <sub>(1)</sub>	M <sub>(5)</sub> Mza <sub>(5)</sub>	EC <sub>(2)</sub> Es <sub>(1)</sub> Ser <sub>(2)</sub>	Tcl <sub>(5)</sub>	Eo <sub>(5)</sub> AP <sub>(5)</sub> Lks <sub>(5)</sub> WL <sub>(2)</sub> Fev <sub>(5)</sub> Dia <sub>(2)</sub> Urt <sub>(3)</sub>
2006	Salomon et al.	[48]				CE <sub>(2)</sub>		
2006	Corti et al.	[85]	1	F <sub>(1)</sub>	Cba <sub>(1)</sub>	Ser <sub>(1)</sub> NI <sub>(1)</sub>	Tcl <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub>
2008	Rios et al.	[62]	1	M <sub>(1)</sub>	Neu <sub>(1)</sub>	EC <sub>(1)</sub> Ser <sub>(1)</sub>	Alb <sub>(1)</sub>	Eo <sub>(1)</sub> AP <sub>(1)</sub> Fev <sub>(1)</sub> Lks <sub>(1)</sub> Asth <sub>(1)</sub> Urt <sub>(1)</sub>
2008	Nieto Sosa et al.	[47]	23	NS <sub>(23)</sub> fo <sub>(2)</sub>	Cba <sub>(8)</sub> SL <sub>(15)</sub>	EC <sub>(23)</sub> Ser <sub>(9)</sub>	Em <sub>(15)</sub> Tcl <sub>(8)</sub>	Eo <sub>(23)</sub> AP <sub>(23)</sub> Fev <sub>(23)</sub> Lks <sub>(23)</sub>
2009	Malandrini et al.	[43]	54	F <sub>(37)</sub> M <sub>(17)</sub>	Cat <sub>(54)</sub>	Ser <sub>(54)</sub>	NS <sub>(54)</sub>	NS <sub>(54)</sub>
2009	Malandrini et al.	[53]	10	NS <sub>(10)</sub>	Cat <sub>(10)</sub>	Ser <sub>(10)</sub>	NS <sub>(10)</sub>	NS <sub>(10)</sub>

**Abbreviations:** F: female; M: male; NS: not specified; Fo: family/group outbreaks.

**Provinces:** BA: Buenos Aires; BAcity: Buenos Aires city; Cat: Catamarca; Cha: Chaco; Cba: Córdoba; For: Formosa; Ju: Jujuy; Mza: Mendoza; Neu: Neuquén; Sal: Salta; SL: San Luis; SFe: Santa Fé; Tuc: Tucumán.

**Treatment:** Em: emetine; Tcl: triclabendazole; Alb: albendazole; MFE: male fern extract; Pzq: praziquantel; Clq: Cloroquine.

**Diagnostic Method:** Ec: egg observation in coprological sample; Es: egg observation in sample obtained by sondage; ID: intradermal test; CE: clinical/epidemiological; Ect: ectopic presentation; NI: non invasive image-based diagnosis; Ser: serology.

**Clinical Data:** AP: abdominal pain; Anrx: anorexia; Asth: asthenia; Cst: Constipation; Dia: diarrhea; Eo: eosinophilia; Fev: fever; HA: headache; Ic: ictericia; Lks: leucocytosis; Lith: lithiasis; Nau: nausea; Urt: urticaria; Vo: vomiting; WL: weight loss.

**Note:** number of cases noted in parenthesis

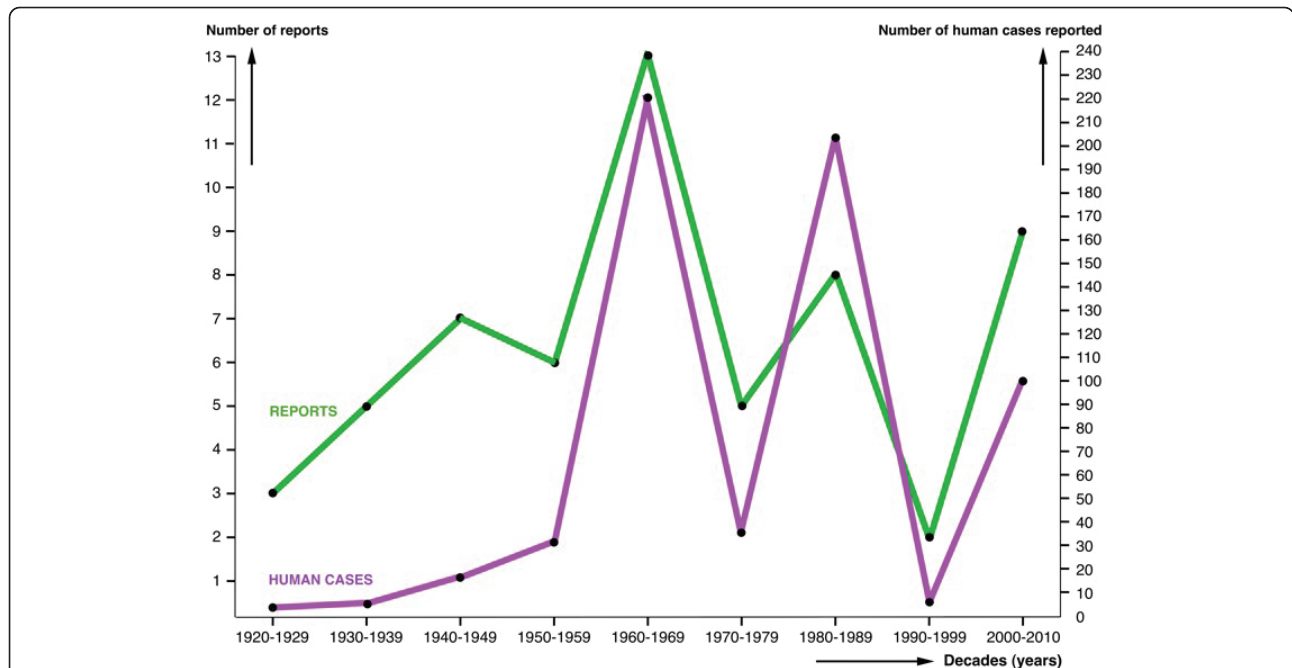
(68.52% out of 54 subjects) was also found in the serological study performed with ELISA by Malandrini and collaborators [43] in the locality of Taton, Tinogasta, Catamarca, the only randomized survey carried out in Argentina so far. Unfortunately, no studies on eggs per gram of faeces (epg) have been performed in Argentinian patients, so that a gender relationship with intensity could not be assessed. Although that apparent preference for females is not statistically significant in Argentina, this trend is consistent with what has been described in human endemic areas: significantly higher intensities in females in Bolivia and Peru [19-22], and significantly higher prevalences in Chile [17] and Egypt [44]. However, such a female preference rule does not always appear to be significant at prevalence level [19-22,45,46].

Age in years was specified in 219 (35.38%) patients and noted for guidance only (e.g., child, adult) in

another 12. The range was from 3 [41] to 95 years of age [43] (average  $37.09 \pm 17.07$  years) (Figure 2). In Argentina, the only random survey detected positivity from small children to old individuals, without age preference [43]. This absence of age correlation contrasts with other countries, where prevalences and intensities peak in the 9-11 age group, although adults and old age groups may also show high infection rates, as is the case of Bolivia [19-21], Peru [22] and Egypt [44]. However, no differences between age groups were found in Chile [17] or Iran [45].

In Argentina, several outbreaks presenting typical foodborne characteristics appear related to the most common risk factor: ingestion of watercress naturally growing along the river- and stream-beds picked during recreational, weekend or vacation activities. Many of these field excursions are undertaken by a family or as a group activity. This explains why family outbreaks have





**Figure 1 Reports on human fascioliasis in Argentina.** Evolution of the number of reports on human fascioliasis and number of human infection cases in Argentina according to decades.

been noted to be common, whereas isolated cases seem to be rare in the country [47]. Outbreaks described in eleven families involving a total of 63 people [42,47-52], including a maximum of up to 15 family members affected at once [47], are good examples. However, results obtained in a recent serological survey of a local

resident population in Catamarca [43] show that not all situations including several infected subjects are in fact family outbreaks.

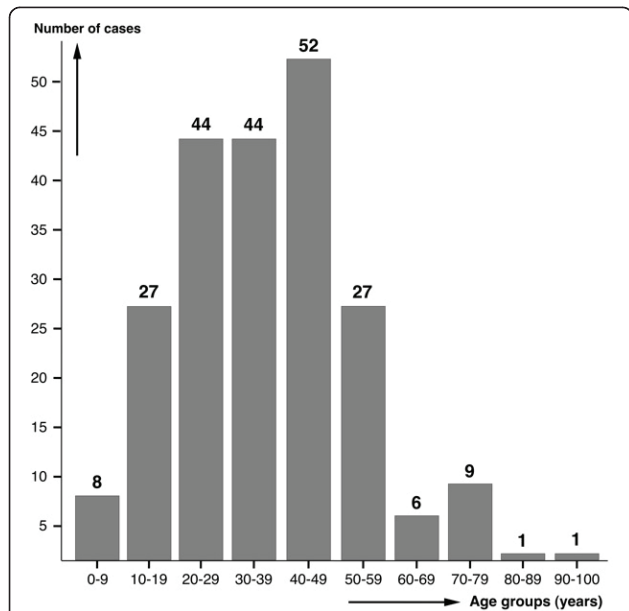
**Biogeographical aspects**

**Geographical distribution according to provinces**

The geographical origin of the patients was specified in 587 patients (94.83%), whereas in 32 cases (5.17%) not even the province of origin was noted. Sometimes only the province where the infection occurred was mentioned, in other instances the specific locality was also added.

Human cases have been found in 13 out of the total of 23 provinces plus Buenos Aires capital, covering more than half (51.48%) of the total surface of continental Argentina. Cordoba, Catamarca, San Luis and Mendoza include the largest number of patients detected, the remaining provinces being only rarely affected (Table 2 Figure 3). Human infection has most probably been completely overlooked in La Rioja and San Juan provinces, with no case reported despite being surrounded by the aforementioned provinces. Adequate studies are needed to assess whether human infection occurs in La Rioja and San Juan given their physiographic and climatic characteristics which suggest infection risks similar to those in the aforementioned neighbouring ones.

The pronounced concentration of cases in the Cordoba and Andean areas is worth mentioning, although not in absolute numbers, at least with regard to the



**Figure 2 Age of fascioliasis patients.** Age distribution in 219 patients in whom fascioliasis was diagnosed.

**Table 2 Evolution of human fascioliasis infection reports in Argentina, according to provinces where infection was presumed to have occurred, number of cases and respective articles furnishing the information**

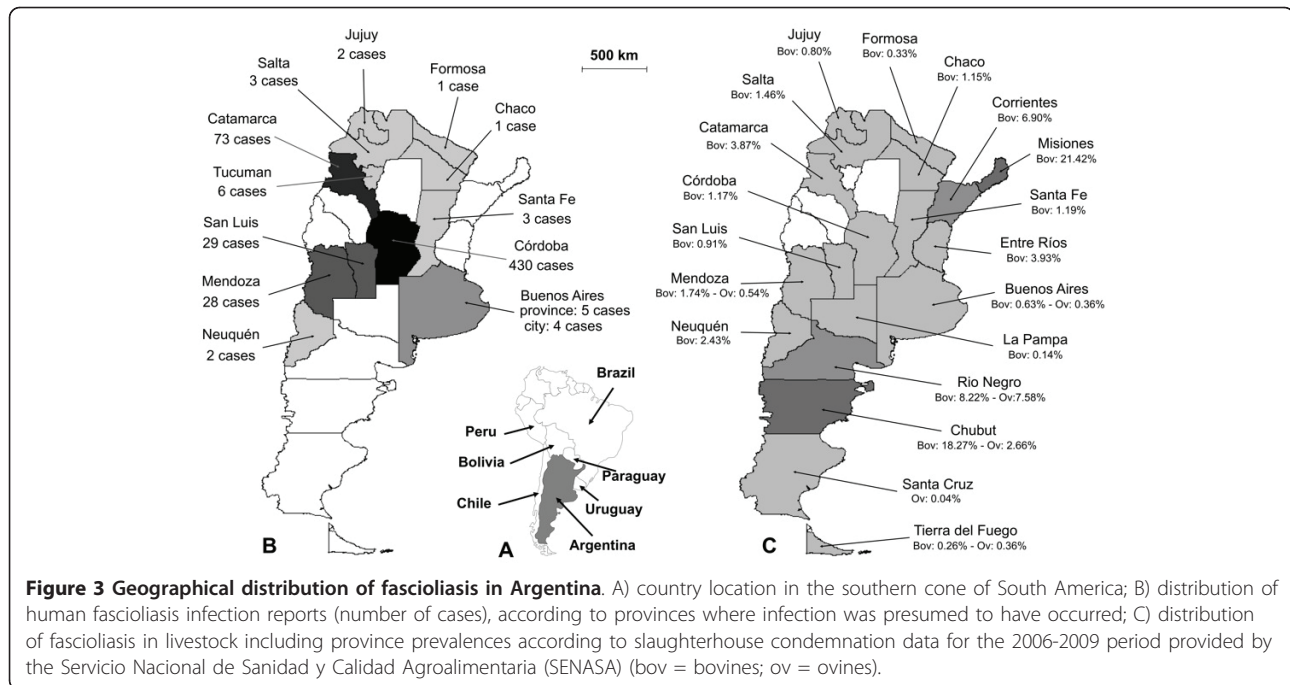
Province	Total No. of cases	No. of cases per individual references (ordered according to year of publication)	Observations
Cordoba	430	1 case published in 1937 [91]; 1 in 1940 [76]; 4 in 1942 [52]; 1 in 1943 [93]; 1 in 1943 [77]; 1 in 1944 [109]; 5 in 1952 [38]; 9 in 1954 [39]; 22 in 1961 [40]; 150 in 1961 [unpublished by other colleagues, cited in 40]; 19 in 1961 [72]; 2 in 1967 [114]; 1 in 1967 & 1969 [94,95]; 11 in 1972 [36]; 12 in 1972 [49]; 54 in 1982 [106]; 101 in 1982 [41]; 2 in 1983 [78]; 15 in 1989 [42]; 1 in 2006 [85]; 8 in 2008 [47]	Two papers deal with the same case [94,95]
Catamarca	73	1 case published in 1952 [38]; 1 in 1954 [39]; 1 in 1961 [40]; 1 in 1972 [36]; 5 in 1983 [90]; 54 in 2009 [43]; 10 in 2009 [53]	these 73 cases do not include 10 serologically suspicious patients who could not be confirmed due to absence of eggs in stools [116]
San Luis	29	1 case published in 1927 [33]; 1 in 1930 [35]; 2 in 1969 [87]; 4 in 1973 [50]; 1 in 1991 [88]; 1 in 2000 [115]; 4 in 2005 [Carnevale in 61]; 15 in 2008 [47]	these 29 cases include an 11% seropositivity found in 34 samples obtained randomly in the population by Carnevale [unpublished data in 61]
Mendoza	28	1 case published in 1955 [101]; 1 in 1964 [86]; 15 in 1969 [87]; 1 in 1985 [97]; 5 in 1995 [51]; 5 in 2005 & 2006 [48,54]	Two papers describe the same outbreak [48,54]
Tucuman	6	1 case published in 1939 [69]; 1 in 1944 [109]; 1 in 1947 [79,80]; 1 in 1961 [110]; 1 in 1970 [99]; 1 in 1972 [36]	Two papers refer to the same case [79,80]
Buenos Aires	5	1 case published in 1933 [108]; 1 in 1942 [52]; 3 in 1985 [97]	
City of Buenos Aires	4	1 case published in 1939 [92]; 1 in 1955 [55]; 2 in 1965 [107]	
Salta	3	1 case published in 1944 [109]; 1 in 1953 [89]; 1 in 1964 [112]	
Santa Fe	3	1 case published in 1940 [76]; 1 in 1933 [Scrimaglio in 93]; 1 in 1969 [103]	
Neuquen	2	1 case published in 2005 [61]; 1 in 2008 [62]	
Jujuy	2	1 case published in 1944 [109]; 1 in 1964 [113]	
Chaco	1	1 case published in 1954 [98]	
Formosa	1	1 case published in 1985 [97]	
Province not specified	32	1 case published in 1924 [32]; 1 in 1928 [34]; 1 in 1962 [111]; 2 in 1965 [107]; 5 in 1973 [104]; 16 in 1981 [100]; 6 in 1981 [102]	
Total: 13 provinces	619 cases	58 reports	

proportion of human case distribution. Unfortunately, human community surveys (active detection) have not been undertaken. All reports concern symptomatological subjects who voluntarily seek medical assistance (passive detection), except the only survey performed [43,53] whose results increased the human case number for Catamarca province from 9 to 73.

The very high case number in Cordoba results from patients diagnosed by different physicians throughout many decades (see Table 2), mainly at the end of the 50s and beginning of the 60s as noted in the compilation, made by one active Cordobese author, of the many patients diagnosed by himself plus the 150 patients diagnosed by other Cordobese colleagues, and which he presented at the Primer Congreso Médico Sanitario de la Provincia de Cordoba, held in La Falda on August 1957 [see [40]. Although of course such a pronounced case number difference when comparing Cordoba with other

provinces may in part be the consequence of a bias due to the absence of similarly actively publishing authors in the other provinces, the very high case number in Cordoba merits an analysis. The literature review suggests an explanation related to the very large number of villages and towns playing an important role in recreational, weekend or holiday activities. These recreational areas attended by thousands of tourists, campers or weekend visitors overlap with areas in which lymnaeids and animal fascioliasis are present (Figure 4) [27]. In such places, the infection risk for a large amount of people is greater than in scarcely inhabited Andean areas. Moreover, the social, cultural and economic level of people spending holidays in such areas is high and the likelihood for them to seek appropriate medical assistance and obtain a correct diagnosis is greater than for people living in rural areas.

This highlights that people may become infected in a place different, sometimes even far or very far away,



from the place where they live. Several family outbreaks described in Cordoba province support this assumption: the first such outbreak in La Calera [52], another family infected during a picnic, another during a few days camping, another family buying uninspected watercress sold by a street vendor [49], and finally an eight-member family in La Punilla [47]. In San Luis province, an outbreak involved two families that camped together in El Volcan [50], and another affected 15 family members in Merlo [47]. Similar family outbreaks occurred in Mendoza province, one involving five members [51] and another with five members infected during a trip to the Andean region of San Carlos [48,54].

**Distribution according to altitude**

Even though human infection risk is present in many geographical regions of the country, data indicate higher probabilities in given high altitude areas. Indeed, the great majority of cases including information on infection place (574: 97.79%), are from hilly or mountainous areas. Human reports appear concentrated in: (i) the central mountainous areas of Cordoba and San Luis, and (ii) the Andes mountains, mainly in Andean valleys.

Cordoba, the province with the greatest amount of cases, is a good example, with practically all human cases coming from its western mountainous areas (Sierras de Cordoba), despite higher precipitation rates and livestock abundance in its eastern lowland plains. Nevertheless, a possible sample bias cannot be ruled out in this case concentration due to the extensive patient-record publication by two local authors [38-42]. Similar situations are found in San Luis and Mendoza provinces, both with all

human cases from their western mountainous areas, instead from their eastern plains.

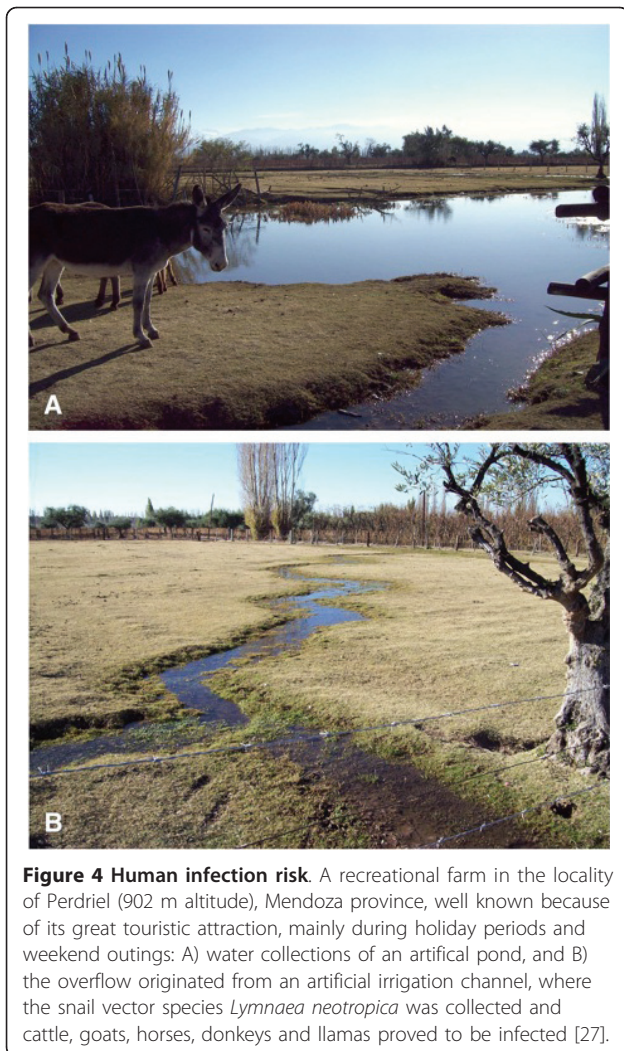
Only 13 cases (2.21%) originated from areas near sea level and flat terrain, namely from Buenos Aires province and City, Sante Fe, Chaco and Formosa. These few reports were all related to important rivers. One interesting case was a patient from Buenos Aires city who declared not having left the city in the previous 17 years [55].

Such a case concentration in mountainous areas is not unlike Bolivia, Peru and Chile, where human endemic areas are linked to altitude areas, as a consequence of both (i) geographical distribution of the main lymnaeid vectors involved in transmission to humans restricted to or preferring such altitude areas [56], and (ii) the greater liver fluke transmission capacity in high altitude areas [24]. This suggests the appropriateness of verifying whether human fascioliasis endemic situations may also exist in high altitude areas of Argentina.

**Links to livestock infection**

The distribution of human infection does not appear to fit the one of animal fascioliasis, which covers the whole country according to official slaughterhouse records (Figure 3). In this respect certain areas are worthy of note, such as Corrientes province with absolutely no human case reported in the literature but high prevalences in livestock [57-60], and Neuquen province with only two human cases reported [61,62] despite a very high prevalence in cattle [63].

A similar lack of geographical fit between human and animal fascioliasis has already been seen in other



**Figure 4 Human infection risk.** A recreational farm in the locality of Perdriel (902 m altitude), Mendoza province, well known because of its great touristic attraction, mainly during holiday periods and weekend outings: A) water collections of an artificial pond, and B) the overflow originated from an artificial irrigation channel, where the snail vector species *Lymnaea neotropica* was collected and cattle, goats, horses, donkeys and llamas proved to be infected [27].

countries [3,4]. Unfortunately, in Argentina it becomes impossible to ascertain whether this is the real situation or only a distorted picture due to incomplete data. Lack of appropriate human community surveys in areas with high prevalences in animals, absence of human-case reporting due to non-obligatory declaration, and overlooked human infection related to misdiagnosis or to inhabitants of rural areas not attending health centres for diagnosis may explain such situations.

However, the lack of geographical fit in question may also be due to an altitude factor, in its turn related to both (i) altitudinal selection of lymnaeid vector species with ecological characteristics adequate for transmission to humans and (ii) altitudinal climatic factors enhancing *F. hepatica* life cycle development, as already demonstrated in other Andean countries [24,56]. Concentration of human cases in hilly or mountainous areas support this altitude explanation.

### Seasonality

Both fasciolid life cycle and lymnaeid population dynamics are markedly dependent on climate, mainly temperature and rainfall [5-7,64]. This climatic influence is evidenced by three different transmission patterns which define human and animal infection characteristics [3,65]: monoseasonal, biseasonal and annual, permanent depending on the existence of one rainfall concentration period per year, two of them, or appropriate water body availability throughout the year [5,56]. Sometimes seasonality is related to the ingestion of contaminated plants, with most human cases occurring during the watercress season [2].

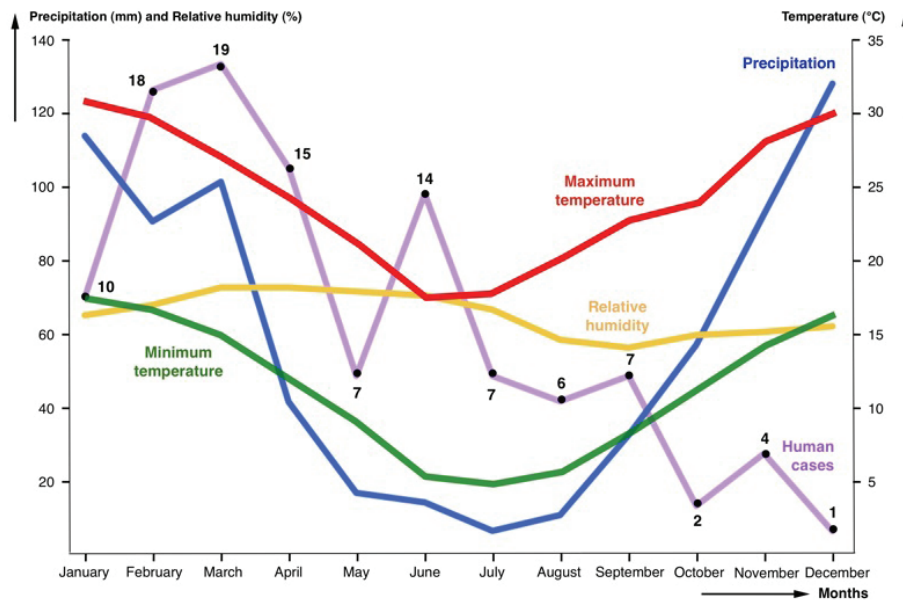
To estimate the moment when metacercariae were ingested, a prepatent period of 2-4 months should be considered. This overlaps with the acute phase, egg appearance in faeces marking the beginning of the chronic phase [66]. For instance, in Europe, human infection takes place in summer and autumn and symptoms appear in winter, and a prolonged and wet summer has often been followed by an outbreak [2].

In Argentina, a total of 110 case reports were found in which the month of the first appearance of symptoms was noted. Most of them (97) corresponded to reports from Cordoba province, of which 93 had already been analysed from that point of view [41].

A first pronounced January-April peak appears in the monthly distribution of these 110 cases. When comparing case distribution with the annual distributions of mean monthly data of precipitation and humidity and with mean monthly data of maximum and minimum temperatures for Cordoba province concerning the decades 1961-1970 and 1971-1980 during which the patients were infected (Figure 5), significant correlations with monthly precipitation, monthly maximum temperature and monthly minimum temperature appeared when time lags of 2 months ( $p$  values of 0.013, 0.008 and 0.0069, respectively), 3 months ( $p$  values of 0.003, 0.0049 and 0.0035, respectively) and 4 months ( $p$  values of 0.0389, 0.0293 and 0.0358, respectively) were considered. This fits with the logical delay between infection moment and symptom appearance and diagnosis. However, this largest peak of January-April may not only be due to higher precipitation and temperature data. Many people enjoy summer holidays in January and February in Cordoba province, so that the increase of recreational field activities may also interact with rainfall and temperature increases in inducing this monthly January-April incidence peak.

There is a second peak in June which poses a question mark, as no such climatic correlation appears. Other factors may be involved, such as the second yearly increase of recreational field activities during the Easter holidays. Metacercariae are known to keep their





**Figure 5 Human fascioliasis monthly incidence.** Distribution of human fascioliasis incidence according to the month in which symptoms appear, compared with the annual distributions of mean monthly data of precipitation, humidity, and maximum and minimum temperatures. Data concerns the province of Cordoba in the 1960's and 1970's when the patients were infected.

infectivity for months (even up to two years) under adequate environmental conditions [28], so that remaining metacercariae, namely those already available but not having been ingested from January, may be the cause of that delayed incidence peak.

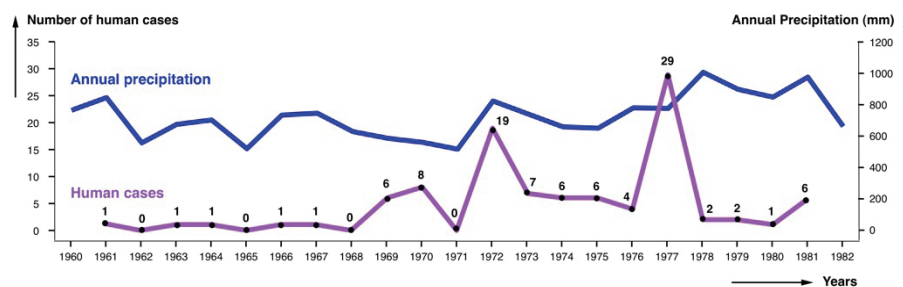
Human infection mainly during the first months of the year is also suggested in another 15 case reports from Cordoba, in which the first month with symptoms was unfortunately not specified (therefore not included in the aforementioned statistical analysis) but the season of autumn (i.e., 21 March to 21 June) was noted [42].

However, in Argentina other transmission patterns and human infection risk seasonalities/periodicities may not be ruled out according to the large geographical heterogeneity of the different endemic areas of such a vast country.

#### Relationships with annual climate changes

The climatic dependence of fascioliasis is also known to modify the interannual distribution of human case detection, with increases in years with heavy rainfall [2,66].

When analysing the evolution of the human case number in the whole country according to decades, one peak appears in the 1960s and another one in the 1980s (Figure 1). The annual human case number for a more detailed study was, however, only sufficient when restricted to Cordoba province during the 1960's and 1970's. The comparative analysis with annual precipitation (Figure 6) shows that the 1972 outbreak may have been caused by the sudden increase of rainfall in that year in Cordoba province, as already highlighted a long time ago [41]. However, we could not find any significant correlation.



**Figure 6 Human fascioliasis annual incidence.** Distribution of human fascioliasis incidence according to the year in which symptoms appear, compared with annual precipitation data. Data concerns the province of Cordoba in the 1960-1982 period during which the patients were infected.

The most pronounced outbreak in 1977 does not appear to have any apparent climatic causal origin, although it was argued that this year was the one with the largest amount of precipitation during the 1973-1981 period [41]. We have confirmed that the rainiest year in the Cordoba area in question was 1978 and not 1977. Thus, this second human report increase may have been linked to a passing fad or temporary professional trend for reporting.

#### **Sources of human infection**

Ingestion of freshwater plants carrying attached infective metacercariae, among which preferentially watercress, is known to constitute the main fascioliasis infection source in humans worldwide [3,67]. The consumption of aquatic plants other than watercress, as described in the hyperendemic area of Bolivia [30], is not a common practice in Argentina. Watercress is almost the only aquatic wild plant regularly consumed. In this country, with the highest beef consumption in the world, it is traditional to accompany barbecue meat ("asado") with salad. When camping or doing outdoor activities, it is very common to go to a stream and collect watercress to cover for the absence of salads.

Previous watercress ingestion has been described in 214 patients. A relationship between watercress and fascioliasis was described already long ago [33,35] and has recently been highlighted again in an editorial article [68]. Among a total of 101 cases reported from Cordoba, 94 (93,07%) had a history of watercress consumption [41].

Besides watercress, there are a very few reports which relate fascioliasis to other plants. In two cases from Cordoba province, ingestion of dandelion (*Taraxacum officinale*) was noted as a possible infection source [41]. Two other patients are mentioned to have chewed on grass that grew on a riverbank [69].

Water consumption has also been involved as a human infection source [58]. In Argentina, natural water was already presumed to be an infection source for livestock as early as two centuries ago [37]. With regard to humans, contaminated water as a possible infection source was noted in only two patients who mentioned having drunk natural water from mountain streams [51,69].

#### **Diagnostic aspects**

##### **Methods and techniques used**

The diagnosis of human fascioliasis poses well-known methodological and technical problems [3,70,71]. In Argentina, the diagnostic method used was specified in the majority of the human patient reports analysed (454 cases: 73.34%) (Table 1). In several cases, even more than one method/technique was used. The diagnostic method was not specified when referring to 150 unpublished cases detected by other colleagues [40], and it

was insufficiently clarified in 15 other cases mentioned in an endnote as "patients having been diagnosed while in press" [72].

Fascioliasis diagnosis in Argentina has usually relied on traditional techniques, mainly egg detection (288 positive patients), followed by common serological techniques (82), intradermal reaction (63), fluke finding during surgery (45), and erratic fluke observation (6). Sensitivity and specificity of these techniques are far from the standards in more modern ones [46,73,74]. Additionally, the absence of the use of quantitative methods, such as the standardized Kato-Katz technique to assess both pathogenicity and intensity for adequate treatment dose selection [75], is worth mentioning.

An historical account (see Table 1) shows that diagnosis by egg identification was the method used from the very beginning and, although still used in the last decade, surgical findings were common during the 1969-1989 period and serology from 2005 onwards. The intradermal test appears to have been used only during the 60's and at the beginning of the 70's and abandoned after 1982. Other methods based on clinical/epidemiological observations, non-invasive techniques, and ectopic presentations have been only sporadically applied.

The long delay with which many patients were diagnosed should be emphasized. In given reports on 26 patients, the time elapsed between the appearance of symptoms and confirmation of infection by appropriate diagnosis is noted in days or sometimes years. Calculated delay average is very high, of 1262 days, nearly three and a half years, and there are references about patients having suffered from symptoms for ten or more years without diagnosis [33,34,76-80]. This suggests either infected subjects not looking for professional diagnosis due to mild symptoms of low fluke burdens and/or misdiagnosis of patients due to the non-pathognomonic clinical picture, easily confused with other diseases when the patient attends a health centre not used to dealing with fascioliasis [81].

##### **Egg finding**

Coprological analyses were performed in 278 patients, including positive egg finding in 221 (79.50%). Details about the coprological technique used were very rarely described. Where noted, the Charles Barthelemy sedimentation technique, M.I.F., flotation, Baerman and multiple concentrations were mentioned, although without giving further specifications [40]. Other techniques, such as the veterinary Lumbreras Rapid Sedimentation technique [42] and those of Faust and Sheather [48], have been also used in Argentina.

Duodenal sondage was performed in 90 patients, yielding egg detection in 67 (74.44%). Interestingly, nine cases appeared negative in a coprological examination, while positive in duodenal sondage.

Despite egg finding still being the gold standard today, problematic situations giving rise to overlooking an infection may be taken into account, such as (i) absence of egg shedding during the acute phase, (ii) no egg production by given fluke strains when in humans, and (iii) lack of sufficient sensitivity in light infections. These are common in human sporadic infections in animal endemic areas, as appears to be the case in many reports from Argentina, e.g. in travellers, weekend family outings, and tourists. Thus, the widespread use of an egg finding technique as the single method for patient diagnosis may have been the reason for overlooking human infection in Argentina in the past.

Unfortunately, no study on egg size variability in human stools has been performed in the country. Consequently, given the absence of *F. gigantica*, the recently corrected egg size ranges to be henceforth used in Argentina are 100.6-162.2/65.9-104.6  $\mu\text{m}$  in humans and 73.8-156.8/58.1-98.1  $\mu\text{m}$  in animals [82], which are pronouncedly different from the range of 130-150/63-90  $\mu\text{m}$  previously used both for humans and animals worldwide.

#### **Serology**

Its use in Argentina has been reported only recently, despite serological techniques having been available for this disease for a long time [71]. However, an ELISA developed locally by means of recombinant procathepsin L cystein proteinase was successfully assayed in test serum samples from 16 coprologically positive patients [83], and a Micro-ELISA method showed a sensitivity of 100% and a specificity of 97% when applied to 22 test serum samples from patients with fascioliasis infection previously verified by coprology, surgical observation, or retrograde cholangiopancreatography, thus proving to be highly useful, mainly for the previous screening of a large amount of samples [84]. The technique specified was such an ELISA in 69 cases [43,48,53,61,62]. In another case, an ELISA without further details specified was employed [85].

In 13 patients the serological technique applied was not mentioned [Carnevale, unpublished data in 47,62]. In three patients diagnosed by coprology or duodenal sondage, serology appeared positive, being negative in two other patients in whom eggs were not found [48]. Surprisingly, when applying serology to 11 patients shedding eggs in their stools, only nine of them gave a positive serological result [47]. The two coprologically positive although serologically negative patients suggest either spurious cases (fluke eggs in transit after infected livestock liver ingestion) or lack of sufficient sensitivity of the serological test applied. The opposite, that is negative coprology and positive serology, was found in another case [85]. In many human case reports, serology was the sole diagnostic method used [43,53,61].

Serological diagnosis was mentioned to have been used in the only article dealing with a random human survey performed in Argentina up to the present. In 148 randomly selected subjects from Tinogasta, province of Catamarca, ELISA was positive in 54 of whom (36.48%), as well as in ten among other 14 patients from the same locality [43,53].

#### **Intradermal tests**

This diagnostic method, today known to be insufficiently specific [70] and considered obsolete for the diagnosis of individual patients although still potentially useful as a quick indicator within broad field screening, seems to have been quite commonly used in Argentina in the sixties, seventies and eighties (in chronological order): 1 case [86], 17 cases [87], 12 cases [49], 4 cases [50], and 29 cases [41]. Since there has never been a commercial or standardized test, details on antigen and correlation with other diagnostic tests noted in the aforementioned articles need to be taken into account.

#### **Diagnosis by non-invasive techniques**

Many image-based diagnostic techniques are useful for fascioliasis [2,8,70] and have also been applied in Argentina since the eighties, although mainly for initial detection followed by confirmation by another more specific diagnostic technique [51,78,85,88-90].

#### **Ectopic cases**

In a 25-year-old male patient, a fluke was eliminated through the urethra [91]. In a female patient undergoing surgery for appendicitis, a fluke was removed from the appendix [92]. A *F. hepatica* specimen was found when surgically opening a tumor at the level of the last rib in a 32-year-old man who lived in the endemic zones of Cordoba, San Luis and Mendoza [93]. In a 35-year-old woman from Tucuman, *F. hepatica* eggs were found in peritoneal granulomas adhered to the gall bladder and near to the transverse colon [79,80]. Another case of intracranial fascioliasis was reported in a 44-year-old female from Cordoba [94,95]. More recently, a case of cutaneous fascioliasis was described in a 26-year-old male from Mendoza [51].

#### **Clinical/epidemiological diagnosis**

In some cases, patients were diagnosed based on clinical and epidemiological characteristics compatible with fascioliasis even though coprological or serological analyses yielded negative results.

In an outbreak, four family members living in the same dwelling had shared meals including watercress and presented compatible symptoms, although eggs were only found in two of them [52,93]. One of the coprologically negative patients had eosinophilia, fever and generalized pain. Symptoms disappeared after emetine treatment and in two months the patient had gained 7 kg weight. The other negative patient also showed eosinophilia (52%) and suffered generalized pain but no temperature. After

treatment, pain disappeared and eosinophilia diminished to 14%.

In another family outbreak [51], the wife of a male patient showing a cutaneous fluke, had pruritic skin lesions, eosinophilia and compatible images in the gall bladder during ecography later confirmed by CATScan; her symptoms disappeared after triclabendazol treatment. The mother had asthenia, urticaria, and multiple gallstones that did not allow for the visualization of parasites through ecography; her symptoms also subsided after treatment. The brother-in-law had eosinophilia and fever, and became asymptomatic after triclabendazole selftreatment. A fifth patient, a 14-year-old girl who participated in the same family outing, had hepatomegalia and urticaria, compatible images upon ecography, and also recovered after triclabendazole medication.

After consuming wild watercress during an outing, five persons showed compatible symptoms, including eosinophilia and leucocytosis. In three of them diagnosis was confirmed by coprology and/or serology. In the remaining two patients, analyses yielded negative results but they were considered as having been infected when recovering after fascioliasis treatment [48].

## Medical aspects

### Clinical findings

Symptoms, laboratory results and their frequency do not appear to differ from those described elsewhere. Articles reviewed are very diverse in nature. Some include detailed clinical descriptions, but many are merely an enumeration of human cases with very vague or sometimes even no accompanying clinical data at all. Thus, information has to be treated with caution. Establishing prevalences of symptoms in the total population of patients becomes impossible, and assumptions may only be obtained from the few articles in which the symptomatology was sufficiently described (Table 1).

Of 225 patients in whom eosinophil counts were performed, 198 (88.00%) had eosinophilia. In 143 patients, authors did not note the eosinophil level. Among those in whom it was quantified, the mean was 28.00% ( $\pm$  21.33%). Very high counts were found in some patients, with a maximum of 84% [69].

Leucocytosis was found in 128 of 167 patients (76.65%) in whom leucocyte counts were analysed, with a mean of 12478.72 ( $\pm$  7917.89), the lowest value of 4,400, and the maximum of 52,600 found in the aforementioned patient in whom eosinophilia of 84% was also detected [69].

Fever was described in 138 among 153 patients (90.20%) in whom temperature was analysed. In the great majority it was just referred to as simply presenting fever. In the only 10 patients in whom the exact temperature was described, the mean was 39 °C ( $\pm$  0.62 °C). In the

article in which a higher number (69) of patients was recorded in whom temperature analysis was performed, 58 (84.06%) had fever [41].

Abdominal pain, noted in 200 patients, appears to be the most frequent finding. Unfortunately, it appears not always adequately described. Thus, in most instances only terms as “diffuse”, “right hypocondrial pain”, “epigastrical”, or similar are mentioned.

Weight loss due to the disease was found in 76 of 91 patients (83.52%) in whom a weight control follow-up was made. In the majority of cases only presence or absence of weight loss is stated. It was quantified in only 8 patients, with a range from 4 to 21 kg lost (mean 13.00  $\pm$  5.48 kg). In two articles, the weight loss was classified according to its degree [41,49]: in 20 patients it was slight, in 18 moderate, and in 29 intense or very intense.

Anorexia was described in 53 out of 74 patients (71.6%) in whom this symptom was evaluated in a study [41]. In the literature analysed, anorexia appeared described only in one other patient [69]. Asthenia was described in only 86 patients in Argentina, whereas weakness is commonly associated with mild to moderate anaemia during the acute phase elsewhere [2]. Urticaria was only found in 62 Argentinian patients, although this symptom is considered a distinctive feature in the early stage of fluke invasion [2]. Other less diagnosed symptoms in the country include nausea in 38 patients, ictericia 23, lithiasis 17, vomiting 11, headache 9, diarrhoea 8, and constipation 6.

### Co-infection with other parasites

Co-infections of fascioliasis with other protozoan and helminth species have recently proved to be the usual rule in human fascioliasis endemic areas [3,19-22,44]. Clinical synergistic associations of fascioliasis with other pathogens are believed to be at the base of high morbidity and mortality rates in children [66], immunological responses being markedly suppressed and concomitant infection being exacerbated following liver fluke infection [12,96].

In Argentina, unfortunately patient analyses do not appear to have particularly focused on co-infections. The most frequently reported parasite co-infecting with *F. hepatica* appears to be *Echinococcus granulosus*, including a total of 14 patients reported to simultaneously present both parasites. All of these cases were from an hydatidosis endemic zone in Mendoza province [87,97]. This relative high number of fascioliasis-hydatidosis co-infected patients is outstanding, as such a co-infection has never been detected in human endemic areas of other countries so far.

Other parasite species found in the coprological diagnosis of fascioliasis patients were: *Entamoeba coli* (6 patients), *Giardia intestinalis* (5), *Blastocystis hominis*



(4) and *Entamoeba histolytica* (2) among protozoans, and *Enterobius vermicularis* (1), *Strongyloides stercoralis* (1) and *Hymenolepis nana* (1) among helminths. Only two patients have been described to present more than one parasite species additional to *F. hepatica*, namely *G. intestinalis* and *E. vermicularis* in one case [98], and *E. coli* and *G. intestinalis* in another patient [72]. In total, only 30 patients had co-infections with other parasites, of whom only 16 had intestinal parasites. This low amount of co-infection reports may perhaps partly be explained by the geographical origin of the fascioliasis patients, usually dry regions where other helminth diseases are relatively difficult to find, and also by the age of the patients, since most were adult subjects in whom intestinal parasitic diseases are not so prevalent.

#### **Treatment**

This was specified in 212 patients. Drugs mentioned to have been used were emetine (in 186 patients), triclabendazole (21), cloroquine (4), praziquantel (1), albendazole (1) and male fern extract (1). In two patients, more than one drug was used. A historical analysis shows that emetine was the only drug used up to the end of the 80's, except for the sporadic use of chloroquine [41]. From the beginning of the 90's, triclabendazole became the drug of choice, although praziquantel, albendazole and again emetine were applied in given cases (Table 1).

The first successful treatment report was with emetine intravenous administration in a 38-year-old female patient. Fever and abdominal pain subsided shortly after treatment and coprological analyses showed the disappearance of eggs [33]. Emetine was also successfully used a few years later [35] and in another patient to solve the lack of effectiveness of male fern extract [76]. In Argentina, only a few treatment failures with emetine have been reported [39]. An efficacy of 92.4% was obtained in 65 patients in whom *F. hepatica* eggs ceased to be found after treatment [39]. Emetine was even recently used in a family outbreak involving 15 patients, amongst whom two presented severe hypotension. Coprological analyses became negative 60 days after a 10-day-long treatment [47].

Emetine derivatives were the classic drugs and continue to be used today, administered intramuscularly or subcutaneously, at doses of 1-10 mg/kg emetine/day for ten days [8,42,99]. Worldwide, dehydroemetine, at a dose of 1 mg/kg daily for 10-14 days, was considered the therapy of choice a few decades ago [2,8,70]. However, emetine derivatives cause a variety of toxic manifestations involving the heart, liver and digestive tract. A cardiac counter-indication led to the ineffective treatment with chloroquine of four patients to whom emetine could not be prescribed: all of these patients continued to shed fluke eggs after chloroquine administration [41].

Even though there was no triclabendazole formulation for humans available in Argentina, it was, nevertheless, given to patients in its veterinary form, usually with prior consent. The first report of triclabendazole treatment concerned a dose of 10 mg/kg in a 40-year-old male patient with prolonged high temperature and eosinophilia, including a repeated dose 9 weeks later. Clinical symptoms and eggs in stools disappeared thereafter [88].

Another report of triclabendazole use concerned a family outbreak. First, a 26-year-old male patient with fever, eosinophilia, hepatic abscesses, and an ectopic subcutaneous fluke in the abdominal region, was treated with 900 mg/day praziquantel for three consecutive days, with initial disappearance of symptoms. After relapsing two weeks later, the patient was re-treated with 750 mg praziquantel every 8 hours for two days. As symptoms persisted, 10 mg/kg triclabendazole were applied three weeks later. Symptoms disappeared within 48 hours, and normalization of clinical and laboratory parameters was obtained. Four other patients of the same outbreak were also successfully treated with triclabendazole [51]. Triclabendazole was also used at a dose of 400 mg/day for two days in a 20-year-old female [61], as well as with a single 10 mg/kg dose in a 58-year-old woman [85], both with remission of symptoms. In an eight-person family outbreak, six patients received triclabendazole (dosage and protocol not specified) with elimination of egg shedding. Another patient had to receive a second dose to stop egg shedding, and three triclabendazole doses were needed for the last patient [47].

Albendazole at a dose of 400 mg/12 hours was used in a 54-year-old man with remission of clinical manifestations within days. This report stated that albendazole was used for it was impossible to obtain triclabendazole [62]. Although Egaten<sup>®</sup> (triclabendazole, the drug of choice for human treatment at present) has been recently available from WHO [13,75] it has been still never applied in Argentina. Nitazoxanide has been approved for human use in Argentina for fascioliasis, but no reports have been found in the literature.

#### **Surgical cases**

Even though the number of patients in whom surgery was involved is small (6.9%), publications dealing with surgical cases appear to be proportionally important (15; 26.7%). Surgical description was indeed the main objective of several articles. In the first surgical case reported, actually the third autochthonous case of the country [34], the intervention was described in great detail, but no epidemiological information was provided, not even the province of origin of the patient.

In 45 cases, a surgical procedure contributed to the diagnosis when flukes were unexpectedly found upon liver exploration. The largest number of surgical cases

described within one article is 16 [100]. Unfortunately, sometimes no details were given and cases were merely referred to as surgical [72].

In the majority, surgery was indicated due to abdominal pain and biliary obstruction suggestive of lithiasis. Indeed, gallstone disease has recently proved to be one of the effects of advanced chronic fascioliasis, since *F. hepatica* is able to survive up to 9-13.5 years within a human host [9]. Hence, such a high lithiasis proportion suggests that long-term infected patients having been overlooked for a long time has been a relatively frequent situation in Argentina. This agrees with the not unusual long delay in diagnosis already emphasized before, and both observations together pose a question mark about human fascioliasis detection in the country.

In most of these surgical cases with lithiasis suspicion, the patient inhabited a large city (Buenos Aires, Cordoba, Mendoza, Tucuman) as opposed to a rural area where attending a health centre is less usual due to economic reasons or at least complicated due to the long journey that has to be made. This additionally suggests a far greater underestimation of the problem in rural areas.

The importance of intraoperative cholangiography was highlighted in cases in which, even though gallstones were removed, evidence of obstruction observed during the cholangiography led to the finding of flukes [55,89,101]. Gallstones were found and concomitant fascioliasis diagnosis made while performing choledochotomy in another six cases [102]. Two more patients with lithiasis in whom *F. hepatica* was diagnosed upon surgery were described later [42].

In a patient in whom a gallstone was suspected, intraoperative cholangiography showed that in fact, instead of a lithiasis problem, a *F. hepatica* specimen was involved [78]. In another patient operated due to lithiasis suspicion and to resolve a hiatus hernia, stones were neither found at cholecystectomy but flukes were after undertaking an intraoperative cholangiography that indicated stenosis altering normal bile flow to the duodenum [103]. Similarly, no stones were observed but parasites found when performing choledochotomy in another patient diagnosed shortly after [99].

Among four operated patients, fluke infection was detected in two only after a second surgical intervention. In the first operation, cholecistectomy was performed to remove stones but flukes were not detected since intraoperative cholangiography had not been applied. Upon re-operation, fascioliasis was diagnosed when *F. hepatica* was found in the common bile duct [104].

The usefulness of intraoperative cholangiography for fascioliasis diagnosis was highlighted for cases in which preoperative diagnosis was difficult [90]. This was concluded when operating five cases due to severe abdominal pain and lithiasis suspicion in only three of them.

In an interesting case, diagnosis was made after surgery to the brain when an expansive parasagittal process was diagnosed by means of a carotid arteriogram performed in a patient with memory loss, nominal aphasia and discrete right facial paresia [95]. Two cysts containing *F. hepatica* eggs were extracted from the cortex. The patient died 24 hours after surgery. This is one of the few fatal cases known to be due to fascioliasis worldwide [2]. In Argentina, the other reported fatal case was the first ever to be diagnosed in the country [31], but since it was an imported case it is not accounted for in the present study.

#### Present situation and future perspectives

All aforementioned aspects suggest that, in Argentina, human fascioliasis may have been overlooked in the past and its real epidemiological situation may be underestimated in the present, mainly in high risk rural high altitude areas. The recent detection of lymnaeid vector species such as *G. truncatula* [25,26] and *L. neotropica* [15,27], well-known to be linked to high prevalences and intensities of human fascioliasis in neighbouring and close countries such as Bolivia and Peru, add concern to this question. The very high prevalences recently obtained in a survey in Catamarca province [43], of the level of a human hyperendemic situation [1], also point in the same direction.

Thus, the need for appropriate epidemiological studies in the field, in selected areas where lymnaeid vector species of high liver fluke transmission are present, has to be emphasized. Health centres in these areas should be informed about human infection probabilities, main clinical picture characteristics, adequate diagnosis techniques and the need for Egaten<sup>®</sup> (triclabendazole for human use) availability. Triclabendazole resistance, recently detected in Argentinian cattle in the province of Neuquen [105], where human infection has already been reported twice [61,62], and its capacity to spread to other areas of the country poses a serious question mark on human treatment in Argentina in the future.

The results of this retrospective overview provide a valuable baseline on which to design adequate multidisciplinary studies on fascioliasis in humans, animal reservoirs and lymnaeid vectors to assess up to which level and in which areas of this very large and environmentally heterogeneous country, human fascioliasis may represent a public health problem in Argentina.

#### Methods

##### Information sources and review methods

Sources of the literature reviewed include databases, national and multinational web-entries and free collections, multititle packages or web platforms, libraries, and personal e-mail requests when appropriate. Different key

words were used when searching in digital sources. Due to the fact that most of the references originate from local publications, the majority of them are not to be found in electronic databases. Special efforts were made to obtain old references published in local journals or very secondary, non-digitalised journals, unpublished reports, abstracts of meetings, symposia, congresses or similar (usually produced by simple photocopying and in very reduced number of copies), and Master's and PhD theses.

The scope was in need to be widened to non-medical journals, as this disease in humans was so neglected in the past that obtaining acceptance for an article dealing with human reports in a medical journal was sometimes difficult. Articles including a high number of human reports but published in veterinary journals as that of Pizzi *et al.* [106] are good examples.

Human fascioliasis case reports were obtained from the following sources: a) local medical and veterinary articles published in Argentina: 41 references; b) local medical and biological publications from Uruguay: 2 references [35,52]; c) a publication in a medical journal from Spain: 1 reference [36]; d) a publication in an international journal: 1 reference [94]; e) scientific communications at medical and veterinary congresses and meetings (abstract books): 7 references; f) a parasitology book published in Argentina: 1 reference [107]; and g) doctoral theses made at Argentinian universities: 2 references [41,69]. More than half of the references were more than 40 years old.

Great care was taken not to repeat any case, since in many instances duplications could be ascertained and the same patient accounted for in successive publications. Additionally, most of the old articles were published in local, non-peer-reviewed journals, and several were made by non-specialists in fascioliasis. Consequently, data were in many cases only considered at informative or suggestive level. However, information furnished by old published reports proved to be very useful to assess areas where fascioliasis transmission may follow characteristics enabling human infection. In many of these endemic areas, the absence of additional human reports or the very low number of patients diagnosed may be due to inhabitants not attending health centres for different reasons, misdiagnosis of other patients, and/or lack of appropriate surveys.

The problem of being a neglected, usually non-fatal, clinically mild, and non-reportable infection explains why many human cases are never published or reported to national health authorities, nor reported anywhere else. Liver fluke-infected patients described in university theses and afterwards never published anywhere else clearly show this problem.

### Climatic data

For the analysis of the seasonal and annual distributions of human cases with regard to climatic characteristics, only Cordoba province was selected due to its relatively high number of human reports. No other province presented a sufficiently large enough number of cases as to allow for a significant comparative analysis.

Mean monthly data of maximum and minimum temperatures, precipitation and humidity was obtained from the Servicio Nacional de Meteorología, Buenos Aires. Data analysed only concerned the 1960's and 1970's, when the patients were infected. The aforementioned climatic variables were furnished by ten different meteorological stations throughout the province of Cordoba, strategically selected according to the completeness of the data per station and the appropriate coverage of the geographical distribution of human cases. Geographical coordinates of the ten stations are as follows: Cordoba Aero (31° 19' S, 64° 13' W); Cordoba Observatorio (31° 24' S, 64° 11' W); Dique Cruz del Eje (30° 45' S, 64° 45' W); Dique La Viña (31° 53' S, 65° 02' W); Dique Pisco Huasi (30° 20' S, 64° 00' W); Embalse (32° 11' S, 64° 23' W); Huerta Grande (31° 05' S, 64° 29' W); Rio Cuarto Aero (33° 05' S, 64° 16' W); Rio Tercero (32° 10' S, 64° 08' W); and Villa Dolores Aero (31° 57' S, 65° 08' W).

To investigate the correlation between the moment of diagnosis of the human cases in Cordoba province between the years 1961 and 1981, and different climatic parameters (precipitation, relative humidity, maximum temperature, and minimum temperature), Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) was used by means of Infostat 2008 software. The human cases were correlated with the climatic parameters on a month per month basis and considering time lags of 1, 2, 3, 4, and 5 months considering the incubation period of fascioliasis which can be of up to two to four months. A correlation analysis was also applied to assess the potential relationship between annual precipitation and the number of cases per year in the aforementioned years.

### Acknowledgements and funding

Studies in Argentina funded by Programa de Proyectos Bienes, Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado, Universidad Nacional de Cuyo, and Area de Investigación, Universidad Juan Agustín Maza, both Mendoza, Argentina. Spanish collaboration supported by Projects No. SAF2006-09278 and No. SAF2010-20805 of the Spanish Ministry of Science and Technology, Madrid, Spain, and the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET (Grants No. C03/04, No. PI030545 and No. RD06/0021/0017 of the Program of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa), FIS, Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain. Joint coordination activities carried out within Project No. RLA5049 of the International Atomic Energy Agency (Animal Production and Health Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, IAEA Headquarters Vienna, Austria). Literature search and review partially funded by the Global Burden of Foodborne Disease Initiative of the Department of Food Safety Zoonoses and Foodborne Diseases (FOS) at the World Health Organization (WHO Headquarters Geneva) in relationship with the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG).



Official livestock prevalence data furnished by the Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Buenos Aires.

#### Author details

<sup>1</sup>Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad J.A. Maza, Av. de Acceso Este - Lateral Sur 2245, S. José, Guaymallén, Mendoza, Argentina. <sup>2</sup>Área de Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Av. Libertador 80, Mendoza, Argentina. <sup>3</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés / n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

#### Authors' contributions

RMS performed the bibliographical search in the country, analysed the data and contributed to article drafting; VHA performed the bibliographical search on the internet and contributed to article preparation; PC performed the climatic data search and analyses; SMC conceived and designed the study and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 November 2010 Accepted: 11 June 2011

Published: 11 June 2011

#### References

- Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD: **Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification.** *Bull WHO* 1999, **77**:340-346.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Esteban JG: **Human Fasciolosis.** In *Fasciolosis*. Edited by: Dalton JP. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing; 1999:411-434.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA: **Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses.** *Int J Parasitol* 2005, **35**:1255-1278.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD: **Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control.** *Adv Parasitol* 2009, **69**:41-146.
- Fuentes MV, Valero MA, Bargues MD, Esteban JG, Angles R, Mas-Coma S: **Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude.** *Ann Trop Med Parasitol* 1999, **93**:835-850.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD: **Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis.** *Rev Sci Techn Off Int Epiz* 2008, **27**:443-457.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD: **Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis.** *Vet Parasitol* 2009, **163**:264-280.
- Chen MG, Mott KE: **Progress in assessment of morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature.** *Trop Dis Bull* 1990, **87**: R1-R38.
- Valero MA, Santana M, Morales M, Hernandez JL, Mas-Coma S: **Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model.** *J Inf Dis* 2003, **188**:787-793.
- Valero MA, Navarro M, Garcia-Bodelon MA, Marcilla A, Morales M, Garcia JE, Hernandez JL, Mas-Coma S: **High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis.** *Acta Trop* 2006, **100**:17-23.
- Valero MA, Girones N, Garcia-Bodelon MA, Periago MV, Chico-Calero I, Khoubbane M, Fresno M, Mas-Coma S: **Anemia in advanced chronic fasciolosis.** *Acta Trop* 2008, **108**:35-43.
- Girones N, Valero MA, Garcia-Bodelon MA, Chico-Calero MI, Punzon C, Fresno M, Mas-Coma S: **Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model.** *J Inf Dis* 2007, **195**:1504-1512.
- World Health Organization: **Fact sheet on fascioliasis.** *Action Against Worms* Geneva, Switzerland: World Health Organization, Headquarters; 2008, **10**: 1-8.
- Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S: **European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences.** *Inf Gen Evol* 2001, **1**:85-107.
- Bargues MD, Artigas P, Mera y Sierra R, Pointier JP, Mas-Coma S: **Characterisation of Lymnaea cubensis, L. viatrix and L. neotropica n. sp., the main vectors of Fasciola hepatica in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA.** *Ann Trop Med Parasitol* 2007, **101**:621-641.
- Apt W, Aguilera X, Vega F, Zulantay I, Retamal C, Apt P, Sandoval J: **Fascioliasis en la población rural de las provincias de Curico, Talca y Linares.** *Rev Méd Chile* 1992, **120**:621-626.
- Apt W, Aguilera X, Vega F, Alcaino H, Zulantay I, Apt P, Gonzalez V, Retamal C, Rodriguez J, Sandoval J: **Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres en tres provincias de Chile.** *Bol Of Sanit Panam* 1993, **115**:405-414.
- Hillyer GV, Soler de Galanes M, Rodriguez-Perez J, Bjorland J, Silva de Lagrava M, Guzman SR, Bryan RT: **Use of the Falcon™ assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian altiplano.** *Am J Trop Med Hyg* 1992, **46**:603-609.
- Esteban JG, Flores A, Aguirre C, Strauss W, Angles R, Mas-Coma S: **Presence of very high prevalence and intensity of infection with Fasciola hepatica among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano.** *Acta Trop* 1997, **66**:1-14.
- Esteban JG, Flores A, Angles R, Strauss W, Aguirre C, Mas-Coma S: **A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano.** *Trop Med Int Health* 1997, **2**:695-699.
- Esteban JG, Flores A, Angles R, Mas-Coma S: **High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia.** *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999, **93**:151-156.
- Esteban JG, Gonzalez C, Bargues MD, Angles R, Sanchez C, Naquira C, Mas-Coma S: **High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru.** *Trop Med Int Health* 2002, **7**:339-348.
- Olaechea FV: **Epidemiología y control de Fasciola hepatica en la Argentina.** In *Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos*. Edited by: Nari A, Fiel C. Montevideo, Uruguay: Editorial Agropecuaria, Hemisferio Sur SRL; 1994:213-232.
- Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD: **Fasciola hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America.** *Parasitology* 2001, **123**:S115-S127.
- Bargues MD, Mera y Sierra R, Gomez HG, Artigas P, Mas-Coma S: **Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of Galba truncatula (Gastropoda: Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina.** *Anim Biodiv Cons* 2006, **29**:191-194.
- Bargues MD, Mera y Sierra R, Gomez HG, Artigas P, Mas-Coma S: **Caracterización molecular de Galba truncatula, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública.** *Enf Emerg, Barcelona* 2007, **9**:77-82.
- Mera y Sierra R, Artigas P, Cuervo P, Deis E, Sidoti L, Mas-Coma S, Bargues MD: **Fascioliasis transmission by Lymnaea neotropica confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina.** *Vet Parasitol* 2009, **166**:73-79.
- Valero MA, Mas-Coma S: **Comparative infectivity of Fasciola hepatica metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region.** *Folia Parasitol* 2000, **47**:17-22.
- Valero MA, Darce NA, Panova M, Mas-Coma S: **Relationships between host species and morphometric patterns in Fasciola hepatica adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region.** *Vet Parasitol* 2001, **102**:85-100.
- Mas-Coma S, Angles R, Strauss W, Esteban JG, Oviedo JA, Buchon P: **Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data.** *Res Rev Parasitol* 1995, **55**:73-93.
- Roffo AH: *Distomatosis humana, primer caso observado en el país* Buenos Aires, Argentina: Imprenta y Editora Coni Hermanos; 1913, 1-38.
- Greenway D: *Distomatosis humana por Fasciola hepatica en la Argentina. Primer diagnóstico coproscópico.* *Prensa Méd Arg* 1924, **11**:369.
- Bengolea J, Bacigalupo J, Velazco Suarez G: *Distomatosis por Fasciola hepatica.* *Arch Arg Enf Apar Dig Nutr* 1927, **3**(1):151.
- Del Valle D, Donovan R: *Síndrome de cólico hepático provocado por Fasciola hepatica.* *Arch Arg Enf Apar Dig Nutr* 1928, **4**:697-710.
- Bacigalupo J, Bengolea J, Velazco Suarez G: *Algunas consideraciones biológicas sobre distomatosis por Fasciola hepatica en el hombre. A propósito de dos casos encontrados en la Argentina.* *Arch Soc Biol Montevideo* 1930, **5**:1211.

36. Carena EJ, Trakal E, Ortiz GA, Butti AL, Carena FL, Robin de Augier MR: **Infestación humana por *Fasciola hepatica* (nuestra experiencia en 13 casos).** *Rev Esp Enf Apar Dig* 1972, **36**:531-542.
37. Durand Savoyat M: **El saguainé. Epizootia causada por el Saguainé vulg. Duva o *Fasciola* de Linné.** *An Soc Rural Arg* 1867, 173-176.
38. Rodríguez C: **Parasitosis por *Fasciola hepatica*, Consideraciones. Experiencia Personal.** *Rev Méd Córdoba* 1952, **40**:9-12.
39. Rodríguez C: ***Fasciola hepatica*. Biología del Parásito.** *Rev Méd Córdoba* 1954, **42**:213-216.
40. Rodríguez C: **Parasitosis intestinales en Córdoba. Estadística sobre diez mil casos.** *Rev Méd Córdoba* 1961, **49**:37-40.
41. Siciliano C: **Distomatosis hepática, perfil clínico.** *Tesis Doctoral* Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; 1982, 1-118.
42. Siciliano C, Chalub E, Sosa L, Barnes A, Shicton G: **Distomatosis hepática, nuevos casos en Córdoba, Argentina.** *Prensa Méd Arg* 1989, **76**:106-109.
43. Malandrini JB, Carnevale S, Velazquez J, Soria CC: **Diagnóstico de *Fasciola hepatica* con la técnica de ELISA en el Departamento de Tinogasta.** *Ciencia* 2009, **4**:143-151.
44. Esteban JG, Gonzalez C, Curtale F, Muñoz-Antoli C, Valero MA, Bargues MD, El Sayed M, El Wakeel A, Abdel-Wahab Y, Montresor A, Engels D, Savioli L, Mas-Coma S: **Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages in the Nile Delta of Egypt.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **69**:429-437.
45. Moghaddam AS, Massoud J, Mahmoodi M, Mahvi AH, Periago MV, Artigas P, Fuentes MV, Bargues MD, Mas-Coma S: **Human and animal fascioliasis in Mazandaran province, northern Iran.** *Parasitol Res* 2004, **94**:61-69.
46. Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, Gonzalez C, Neyra V, Terashima A, Samalvides F, Gotuzzo E, Chavarry E, Huaman C, Bargues MD, Valero MA, Mas-Coma S: **Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**:977-982.
47. Nieto Sosa L, Barnes A, Jimenez G, Cicaerli G: **Fasciolosis: evaluación clínica y terapéutica.** *III Congreso Latinoamericano de Zoonosis y VI Congreso Argentino de Zoonosis* Buenos Aires, Argentina, Resúmenes de las Comunicaciones; Junio 2008, 35.
48. Salomon MC, De Jong L, Tonelli RL, Borremans CG, Bertello D, Jofre CA, Pagella H, Lloret L, Carnevale S, Carena J: **Confirmación etiológica de un brote de distomatosis hepática en Mendoza.** *XII Jornadas Argentinas de Microbiología: 14-17 Junio 2006* Mendoza, Argentina: Resúmenes de las Comunicaciones; 2006, 108.
49. Ossola A, Siciliano C, Garcia Faure J: **Distomatosis hepática, tres epidemias familiares en Córdoba, Argentina.** *Rev Asoc Bioq Arg* 1972, **37**(201):100-106.
50. Peiretti JA, Morales JR: **Epidemia familiar de distomatosis por *Fasciola hepatica*.** *Prensa Méd Arg* 1973, **60**:262-264.
51. Minoprio JE, Donna RA, Borremans CG, Passardi AH, Glatstein de Wolf T, Olindo AL, Jorg ME: **Epidemia familiar de distomatosis humana por *Fasciola hepatica*. Localización errática (cutánea).** *Prensa Méd Arg* 1995, **82**:869-877.
52. Bacigalupo J: ***Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo en la República Argentina.** *An Fac Vet Montevideo* 1942, **4**:7-134.
53. Malandrini JB, Soria CC, Carnevale S, Velazquez J, Pizarro MC: **Estudio de la Fascioliasis desde una perspectiva multidisciplinaria.** *XXVIII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias: 25-27 September 2009* Villa Giardino, Córdoba; 2009.
54. Lloret L, de Jong L, Salomon S, Carena J: **Hiper eosinofilia en un brote urbano de distomatosis hepática.** *XIV Congreso Nacional de Medicina: 21-24 November 2005*; Buenos Aires, Argentina *Libro de Resúmenes* 2005, P-08-02.
55. Caceres MA: **Distomatosis hepática - Síndrome coledociana por *Fasciola hepatica*.** *Soc Arg Cirujanos, Boletines y Trabajos* 1955, **19**:528-534.
56. Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, Strauss W: **The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis.** *Trop Med Int Health* 1999, **4**:454-467.
57. Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD, Lombardero OJ: ***Fasciola hepatica* y otros trematodos de bovinos. Prevalencia según decomisos en plantas faenadoras en la provincia de Corrientes (Argentina).** *Veterinaria Argentina* 2001, **17**(177):493-498.
58. Moriena RA, Racioppi O, Alvarez JD, Lombardero OJ: **Distomatosis hepática (*Fasciola hepatica*) y otros trematodos de los rumiantes. Distribución en la provincia de Corrientes.** *Com Cient Tecnol Univ Nac Nordeste, Cienc Vet, Corrientes, Argentina* 2002 [http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-055.pdf].
59. Lombardero OJ, Moriena RA, Racioppi O, Quiroz L: **Bionomía de *Limnaea* sp. en la Provincia de Corrientes.** *Veterinaria, Rev Fac Cienc Vet, Univ Nac Nordeste, Corrientes, Argentina* 1979, **2**:5-19.
60. Lombardero OJ, Moriena RA, Racioppi O, Coppo JA, Schiffo HP: **Distomatosis hepática de los bovinos en la Provincia de Corrientes.** *Veterinaria, Rev Fac Cienc Vet, Univ Nac Nordeste, Corrientes, Argentina* 1979, **2**:21-29.
61. Rubel D, Prepelitchi L, Kleiman F, Carnevale S, Wisnivesky-Colli C: **Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquén.** *Medicina Buenos Aires* 2005, **65**:207-212.
62. Rios N, Pavia M, Meana M, Serrano G, Navarro R: **Un caso de fascioliasis hepática.** *III Congreso Latinoamericano de Zoonosis y VI Congreso Argentino de Zoonosis: Junio 2008* Buenos Aires, Argentina: Resúmenes de Comunicaciones; 2008, 35.
63. Kaczorkiewicz AJ: **Distomatosis en la provincia de Neuquén.** *Rev Med Vet* 1983, **64**:354-356.
64. Ollerenshaw CB: **The influence of climate on the life cycle of *Fasciola hepatica* in Britain with some observations on the relationship between climate and the incidence of fascioliasis in the Netherlands.** *Facts and Reflections, Symposium Proceedings: 3 June 1971* Lelystad: Parasitology Department of the Centraal Diergeneeskundig Instituut; 1971, 41-63.
65. Mas-Coma S: **Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas.** *J Helminthol* 2005, **79**:207-216.
66. Mas-Coma S: **Human fascioliasis.** In *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control.* Edited by: Cotruvo JA, Dufour A, Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver DO, Craun GF, Fayer R, Gannon VPJ. London, UK: World Health Organization and IWA Publishing; 2004:305-322.
67. Ashrafi K, Valero MA, Massoud J, Sobhani AR, Soleymani-Mohammadi S, Conde P, Khoubbane M, Bargues MD, Mas-Coma S: **Plant-borne human contamination by fascioliasis.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:295-302.
68. Barcat JA: **El berro y otras comidas peligrosas.** *Medicina, Buenos Aires* 2005, **65**:277-279.
69. Boto D: **Distomatosis humana por *Fasciola hepatica*.** *Tesis de Doctorado* Universidad de Buenos Aires; 1939, **5193**: 1-46.
70. Esteban JG, Bargues MD, Mas-Coma S: **Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review.** *Res Rev Parasitol* 1998, **58**:13-42.
71. Hillyer GV: **Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis.** In *Fasciolosis.* Edited by: Dalton JP. Wallingford, Oxon, UK: CAB International Publishing; 1999:435-447.
72. Strada L: **Fascioliasis hepática humana.** *Prensa Méd Arg* 1961, **48**:2985-2992.
73. O'Neill SM, Parkinson SM, Strauss W, Angles R, Dalton JP: **Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* (Fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase.** *Am J Trop Med Hyg* 1998, **58**:417-423.
74. Ubeira FM, Muiño L, Valero MA, Periago MV, Perez-Crespo I, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Romaris F, Paniagua E, Cortizo S, Llovo J, Mas-Coma S: **MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:156-162.
75. World Health Organization: **Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. Meeting: 17-18 October 2006.** Geneva, Switzerland: World Health Organization, Headquarters, 2007; WHO/CDS/NTD/PCT/2007.1.
76. Cames OJ: **Distomatosis por *Fasciola hepatica*.** *An Cirugía Rosario* 1940, **6**:143-147.
77. Solari AV, Canepa L: **Consideraciones sobre distomatosis hepática por *Fasciola hepatica*, un nuevo caso de parasitismo humano.** *Rev Med Cienc Afines* 1943, **55**:795-799.
78. Giffoniello AH, Miravet SV, D'Angelo JC, Nogaro E: **Distomatosis por *Fasciola hepatica*.** *Prensa Méd Arg* 1983, **70**:70-73.
79. Cid JM: **Granuloma tuberculoido y gomoide peritoneal por *Fasciola* errática.** *Arch Soc Arg Anat Norm y Pat* 1947, **9**:389-401.
80. Cames OJ, Cid JM, Alvarez A: **Parasitosis errática peritoneal por *Fasciola* hepática.** *Boletín de la Sociedad de Cirugía de Rosario* 1947, **8**:306-313.
81. La Pook JD, Magun AM, Nickerson KG, Meltzer JI: **Sheep, watercress, and the Internet.** *Lancet* 2000, **356**:218.
82. Valero MA, Perez-Crespo I, Periago MV, Khoubbane M, Mas-Coma S: **Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*.** *Acta Trop* 2009, **111**:150-159.

83. Carnevale S, Rodríguez MI, Guarnera EA, Carmona C, Tanos T, Angel SO: **Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cysteine proteinase.** *Diagn Microbiol Inf Disease* 2001, **41**:43-49.
84. Carnevale S, Rodríguez MI, Santillan G, Labbe JH, Cabrera MG, Belegarde EJ, Velasquez JN, Trgovcic JE, Guarnera EA: **Immunodiagnosis of human fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Micro-ELISA.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, **8**:174-177.
85. Corti ME, Palmieri OJ, Mendez N, Gancedo E, Sawicki M, Millet S: **Diagnóstico por imágenes en la fasciolosis hepática.** *Rev Arg Radiol* 2006, **70**:197-200.
86. Simon MP, Bustos Araujo A, Sosa Lara E: **Colecistitis crónica alitiásica (cólico hepático) por distomatosis hepática.** *VII Jornada Quirúrgica de Cuyo: 11 Julio 1964* Hospital Central, Mendoza, Argentina: Resúmenes de las Comunicaciones; 1964, 1-15.
87. Peiretti JA: **Distomatosis hepática, contribucion al diagnóstico precoz.** *Día Médico* 1969, **10**:248.
88. Melero M, Rigou RC, Lloveras J, Gennaro O: **Fascioliasis hepática causa infrecuente de síndrome febril prolongado con hipereosinofilia e imágenes hipodensas en la tomografía computada de hígado.** *Medicina Buenos Aires* 1991, **51**:244-248.
89. Longo OF, Daraio M: **Distoma del colédoco. Importancia de la colangiografía operatoria.** *Prensa Méd Arg* 1953, **43**:2910-2911.
90. Andrada JG, Avalos E, Eguez A, Bosch Andrada JP: **Aspectos quirúrgicos de la distomatosis biliar.** *Rev Argentina Cirugía* 1983, **46**:44-49.
91. Castex M, Greenway D: **Distomatosis hepática con ejemplar errático eliminado por uretra.** *Bol Acad Med Buenos Aires* 1937, 461-464.
92. Paladino JE, Galarce J: **Parasitosis apendicular.** *La Semana Médica* 1939, **2**:689-690.
93. Bacigalupo J, Zavaleta DE, Laurito JO: **Fasciola hepatica en la Argentina.** *Semana Méd* 1943, **4**:5-9.
94. Ruggieri F, Correa AJE, Martinez E: **Cerebral distomiasis. Case report.** *J Neurosurg* 1967, **27**:268-271.
95. Correa AJ, Ruggieri F, Martinez E: **Fasciola hepatica de localización intracraneal.** *Rev Méd Santa Fé* 1969, **3**:38-41.
96. Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KH: **Fasciola hepatica supresses a protective Th1 response against Bordetella pertussis.** *Infection Immunity* 1999, **67**:5372-5378.
97. Miguel CM, Mallea Gil MS, Basile MA, Mauro EL: **Distomatosis por Fasciola hepatica.** *Prensa Méd Arg* 1985, **72**:192-195.
98. Petraglia AA: **Parasitosis humana por Fasciola hepatica: primer caso que se describe en el Noreste Argentino.** *Act Trab Asoc Arg Est Enf Transm* 1954, **3**:47-48.
99. Padilla Antoni F, Saleme A, Jorratt M: **Fasciola hepatica. A propósito de una observación.** *Prensa Méd Arg* 1970, **57**:521-525.
100. Alaggia LE: **Patología hepatobiliar por distomatosis.** *XXIII Congreso Cuyano de Cirugía San Luis, Argentina*; 1981.
101. Logaldo E: **Distomatosis de las vías biliares, litiasis vesicular.** *Rev Asoc Méd Arg* 1955, 260-261.
102. Majul EJ, Salich JC, Bender AL: **Distomatosis hepatobiliar por Fasciola hepatica.** *Prensa Méd Arg* 1981, **68**:81-83.
103. Trossero AI, Nocetti VM: **Distomatosis por Fasciola hepatica.** *Semana Méd Septiembre* 1969, 879-882.
104. Sonzini Astudillo C, Cuenca Perez M, Tiglio M, Candizano H: **Distomatosis hepática Fasciola hepatica.** *Semana Méd* 1973, **143**(17):507-510.
105. Olaechea FV, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R: **Triclabendazole-resistant liver fluke in Patagonian (Argentina) cattle.** *XII International Congress of Parasitology ICOPA XII: 16-20 August 2010 Melbourne, Australia. Conference Abstracts*; 2010, No. 1783.
106. Pizzi H, Navarro Z, Pizzi D, Benivissuto G: **Estudio epidemiológico e implicaciones económicas de la distomatosis hepatica en la provincia de Córdoba, Argentina.** *Gaceta Vet* 1982, **44**:944-947.
107. Niño F: *Parasitología. Zooparásitos y Patología de las Zooparasitosis Humanas* Buenos Aires, Argentina: Editorial Beta; 1965, 1-656.
108. Mascheroni HA: **Colecistitis parasitaria: sobre un caso de distomatosis por Fasciola hepatica.** *Rev Méd Quir Patol Fem* 1933, 2:710.
109. Cuenya C: **Parasitosis raras en el Norte Argentino: Fasciola hepatica (L.).** *Arch Farm. Bioquím Tucumán* 1944, 1:235-239.
110. Ahualli A, Arias E: **Fasciola hepatica.** *Rev Fac Medicina Tucumán* 1961, **3**:105-118.
111. Urrutia JM, Ferraris LV: **Distomatosis del hepatocolédoco. Importancia de la colangiografía operatoria.** *Primera Conferencia Nacional de Anatomía Normal y Patológica, Histología, Embriología y Técnica Quirúrgica* Córdoba; 1962.
112. Cornejo JA, Castillo E: **Mioglobinemia secundaria a distomatosis por Fasciola.** *Rev Fac Med Tucumán* 1964, **7**:241-257.
113. Cañas RF, Escola MA, Rossini AP: **Distomatosis hepatobiliar por Fasciola hepatica.** *Prensa Méd Arg* 1964, **51**:590-595.
114. Sosa MA, Romero AE: **Distomatosis hepática.** *Acta Méd Córdoba* 1967, **12**(2):78-83.
115. Ale D, Merciai G, Gil Echevarria M: **Fasciola hepatica, intensificación de su búsqueda en pacientes con eosinofilia y epidemiología positiva.** *III Congreso Argentino de Parasitología: 1-4 November 2000* Mar del Plata, Argentina, Libro de Resúmenes; 2000, 421.
116. Malandrini JB, Soria CC, Foresi I, Correa S: **Fasciolosis en Catamarca. Primeros resultados.** *La Investigación Científica en la Facultad de Ciencias de la Salud, en los Umbrales del Siglo XXI* Catamarca: Editorial Universitaria; 2002, 287-293.

doi:10.1186/1756-3305-4-104

Cite this article as: Mera y Sierra et al.: Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasites & Vectors* 2011 **4**:104.

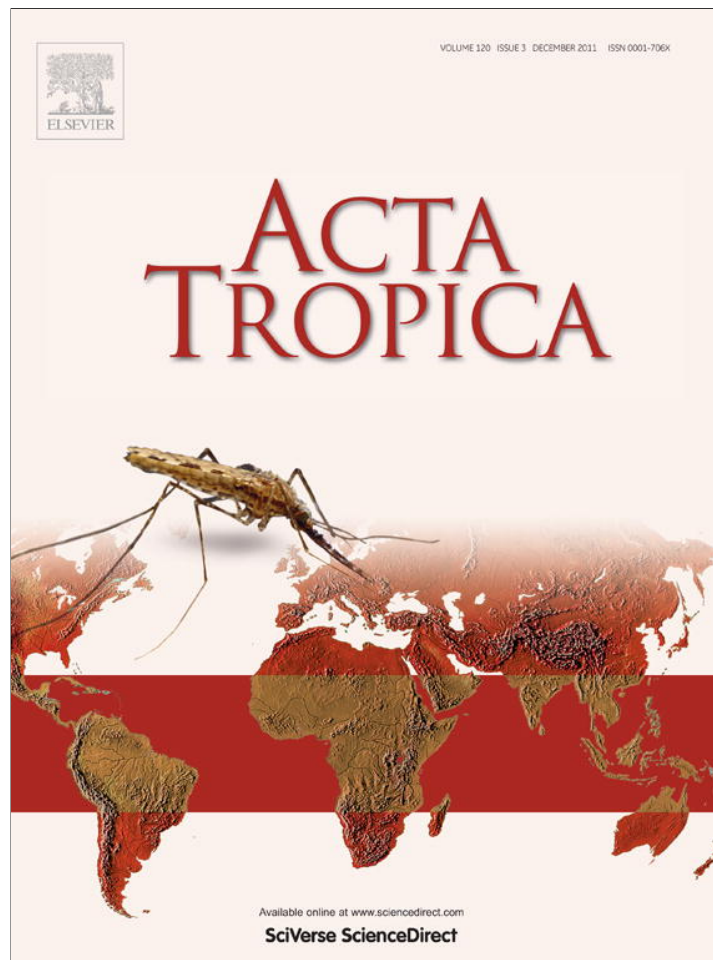
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*

Patricio Artigas<sup>a</sup>, M. Dolores Bargues<sup>a</sup>, Roberto L. Mera y Sierra<sup>b</sup>, Veronica H. Agramunt<sup>a</sup>, Santiago Mas-Coma<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad J.A. Maza, Av. de Acceso Este - Lateral Sur 2245, S. José, Guaymallén, Mendoza, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 June 2011

Received in revised form 5 September 2011

Accepted 7 September 2011

Available online 14 September 2011

#### Keywords:

Lymnaeidae

Intermediate hosts

rDNA

mtDNA

Fascioliasis

Chile

### ABSTRACT

In South America, *Fasciola hepatica* infection poses serious health problems in both humans and livestock. In Chile, the medical impact appears yearly stable and mainly concentrated in central regions, where the veterinary problem is highlighted by higher animal prevalences. Studies were undertaken by rDNA ITS-2 and ITS-1 and mtDNA *cox1* sequencing to clarify the specific status of the lymnaeids, their geographical distribution and fascioliasis transmission capacity in Chile, by comparison with other American countries and continents. Results change the lymnaeid scenario known so far. The lymnaeid fauna of mainland Chile shows to be poor, including only two autochthonous species, *Lymnaea viator* and *Pectinidens diaphana*, and a third introduced species of Palaearctic origin *Galba truncatula*. Both *Lymnaea lebruni* and *Lymnaea patagonica* proved to be synonyms of *P. diaphana*. *G. truncatula* appears to have always been confused with *L. viator* and seems distributed from Región VI to Región IX, overlapping with human endemic areas. DNA sequencing results suggest that the absence of correlation between remote sensing data and disease prevalences could be due to transmission capacity differences between *L. viator* and *G. truncatula*. Results furnish a new baseline on which to undertake future appropriate studies on transmission, epidemiology and control.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Freshwater lymnaeid snails transmit fascioliasis, a highly pathogenic liver parasitosis caused by trematode species of the genus *Fasciola* which affects humans and livestock species almost everywhere (Mas-Coma et al., 2009a). Distribution, both in space (latitudinal, longitudinal and altitudinal) and time (seasonal, yearly), of fascioliasis depends on the presence and population dynamics of the specific intermediate host species in its turn linked to the presence of the appropriate water bodies and on adequate climate characteristics enabling fluke development. In the last two decades, this disease is emerging in many countries of Latin America, Europe, Africa and Asia. This emergence phenomenon has partly been related to climate change, given the high dependence of both fasciolid larval stages and their freshwater lymnaeid snail hosts on

climatic and environmental characteristics (Mas-Coma et al., 2008, 2009b). The increasing importance of human fascioliasis also relies on recent results showing a great morbidity impact on children in long-term infection (Valero et al., 2003, 2006, 2008).

Within the several human fascioliasis hotspot regions known, South America stands out due to the human hyperendemic areas caused by *Fasciola hepatica* in many Andean countries, such as Bolivia (Esteban et al., 1997, 1999) and Peru (Esteban et al., 2002; Gonzalez et al., 2011). In Argentina the human fascioliasis situation seems to be underestimated (Mera y Sierra et al., 2011), in Colombia appropriate studies are still pending (Bargues et al., 2011a), and in Venezuela a potential underestimation of the situation has recently been highlighted (Bargues et al., in press-a).

In Chile, human fascioliasis reports have been numerous, including individual case descriptions (e.g., Venturelli et al., 2003; Lopez et al., 2004; Rosas et al., 2008; Morales et al., 2009), epidemic situations and familiar outbreaks (Subercaseaux et al., 1985; Borie et al., 1990), and even studies on human fascioliasis endemic areas (Apt et al., 1992, 1993). A large random survey in the provinces of Curico, Talca and Linares showed prevalences of 0.6%, 0.75% and 0.71%, respectively, with an estimation of 2000 people infected in the area analysed (Apt et al., 1993). Only in the capital Santiago,

**Abbreviations:** rDNA, nuclear ribosomal DNA; mtDNA, mitochondrial DNA; ITS-1, first internal transcribed spacer; ITS-2, second internal transcribed spacer; COX1, cytochrome c oxidase subunit I nucleotide sequence (*cox1*) and amino acid sequence.

\* Corresponding author. Tel.: +34 96 3544905; fax: +34 96 3544769.

E-mail address: [S.Mas.Coma@uv.es](mailto:S.Mas.Coma@uv.es) (S. Mas-Coma).



between 20 and 30 liver fluke infected patients were diagnosed yearly and this only concerned symptomatic subjects (Apt, 1987; Alcaino and Apt, 1989).

Fascioliasis is also a great veterinary problem in Chile (Alcaino and Apt, 1989; Morales and Luengo, 1995; Alcaino and Gorman, 1999). Official data from slaughterhouses indicate that the disease affects livestock in all regions, with countrywide high yearly prevalences in cattle (28.5–31.8%, mean 30.1%), sheep (1.8–2.75, mean 1.9%), goats (11.2–18.3%, mean 14.0%), pigs (1.0–2.1%, mean 1.4%), equines (9.1–14.1%, mean) and camelids (0.03–8.37%, mean 0.99%) according to data from the 1989 to 1995 period (Morales et al., 2000).

Despite the importance of fascioliasis in Chile, lymnaeid snails have been only the focus of a very few studies in that country. A total of seven lymnaeid species have been described or noted to be present in Chile (Hubendick, 1951; Paraense, 1982, 1984; Sielfeld, 2001; Valdovinos, 2006):

- *Lymnaea diaphana* King and Broderip, 1832: originally described from Cape Gregory, Strait of Magallanes (King and Broderip, 1832) and later also cited from Argentina and Peru (Bargues et al., in press-b); the genus *Pectinidens* proposed by Pilsbry (1911) for *diaphana* as type species has recently been molecularly demonstrated to be valid (Bargues et al., in press-b);
- *L. viator* D'Orbigny, 1835 (= *L. viatrix sensu* Paraense, 1976): originally described under var. A *ventricosa* from Rio Negro in Argentina as well as surrounding Santiago and Casablanca in Chile, and under var. B *elongata* from Rimac river canals around Callao and Lima in Peru (D'Orbigny, 1835, 1837; Paraense, 1976; Bargues et al., 2007a);
- *Lymnaea chilensis* Beck, 1838: originally noted from Chile without further geographical detail (Beck, 1838);
- *Lymnaea lebruni* Mabilille, 1884: originally described from Punta Arenas, Patagonia (Región XII) (Mabilille, 1884);
- *Lymnaea pictonica* Rochebrune and Mabilille, 1885: originally described from Isla Picton (Rochebrune and Mabilille, 1885);
- *Lymnaea cousini* Jousseau, 1887: cited once in Valdivia (Hubendick, 1951), but originally described from Ecuador and later also from Colombia (Bargues et al., 2011a);
- *L. patagonica* Strebel, 1907: originally described from Agua Fresca, Strait of Magallanes (Strebel, 1907).

However, *L. chilensis* may be deleted from that list because neither a description nor a locality were provided by Beck (1838: species name noted as "*L. Chilensis* B. – Chili" in page 112 but without description in the Appendix where the descriptions of all the new species were included), so that it is taxonomically considered a *nomen nudum*, as already stated by Hubendick (1951). Moreover, different synonymies have been proposed between these species, authors sometimes not in agreement one another. For instance, *L. lebruni* is considered a synonym of *L. diaphana* by Pilsbry (1911) because Mabilille (1884) overlooked the article of King and Broderip (1832). *Lymnaea patagonica* is considered a synonym of *L. pictonica* by Hubendick (1951), whereas *L. patagonica* is a valid species according to Malek (1985).

The species noted to be involved in fascioliasis transmission in Chile is *L. viator*, specimens of which collected from Macul and Bucalemu proved to be susceptible to experimental infection already long ago (Tagle, 1944).

The classification of individual lymnaeids poses serious difficulties when only applying malacological methods, due to anatomic similarities and large intraspecific variation of shell shape and size (Bargues et al., 2001; Bargues and Mas-Coma, 2005). Although shell shape may help in particular species and populations (Samadi et al., 2000), there are groups, as the "fossarine" or *Galba/Fossaria* group, in which specimen classification may be very difficult when based

only on phenotype, as is the case of the aforementioned *L. viator* and *L. cousini* (Bargues et al., 2007a, 2011a,b, in press-a, in press-b). The implications of lymnaeids for fascioliasis transmission, epidemiology and control urged to develop new tools to facilitate specimen classification, genetic characterisation of natural populations and laboratory strains, and to elucidate the systematics and taxonomy of the Lymnaeidae. This is the purpose of the worldwide lymnaeid molecular characterisation initiative (Mas-Coma et al., 2009a). Nuclear ribosomal DNA (rDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) markers proved to be useful for this endeavour in invertebrates in general, although disadvantages and limitations depending on each marker should be taken into account (Mas-Coma and Bargues, 2009). Their application also showed their usefulness in lymnaeid snails for specific, generic and suprageneric taxon levels (Bargues and Mas-Coma, 2005).

The internal transcribed spacers of the rDNA, mainly ITS-2 and secondarily ITS-1, are the most useful sequences for lymnaeid species classification (Bargues and Mas-Coma, 2005). A fragment of the cytochrome c oxidase subunit I gene (*cox1*) of mtDNA also proved to be useful in lymnaeids (Bargues et al., 2007a), although mtDNA markers should be used with great caution in lymnaeids (Bargues et al., 2011b), due to (i) problems of nucleotide saturation making it inappropriate for comparison of genera and even well separated species within the same genus and (ii) biased information furnished by only a gene fragment (Mas-Coma and Bargues, 2009).

The aim of the present article is to expose the results of ITS-2, ITS-1 and *cox1* sequencing of lymnaeid species present in Chile and to ascertain their systematic status. The final analysis has the purpose to offer a new baseline on which to design and launch further lymnaeid studies and appropriate assessments on human and animal fascioliasis in Chile from now on. The implications of the new intermediate host scenario on the disease in that country are finally discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Lymnaeid snail materials

The snail specimens studied were collected in the field, from lymnaeid populations present in geographical areas with human infection and/or animal fascioliasis endemicity. In order to be systematically conclusive, sequenced specimens of the species *L. diaphana*, *L. viator*, *L. lebruni*, and *L. patagonica* were from their respective type localities. Unfortunately, the present impossibility to visit Picton island due to the distribution of anti-personnel mines throughout the island did not allow for the collection of *L. pictonica*. An effort to find *L. cousini* was made in Valdivia and its surroundings. Localities and their coordinates and altitudes furnishing the lymnaeid specimens sequenced are noted in Table 1 and Fig. 1. The number of specimens analysed for each species is noted in Table 1.

### 2.2. Molecular techniques

#### 2.2.1. DNA extraction

DNA was extracted from more than one specimen of a given population when this was deemed necessary for sequence verification. DNA was only isolated from the foot of each snail (Bargues et al., 1997, 2007a). Snail feet fixed in 70% ethanol were used for DNA extraction procedures. After dissection under a microscope, half of the foot was suspended in 400 µl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate SDS) containing 500 µg/ml Proteinase K (Promega, Madison, WI, USA) and digested for 2 h at 55 °C with alternate shaking each 15 min. Total DNA was isolated according to the

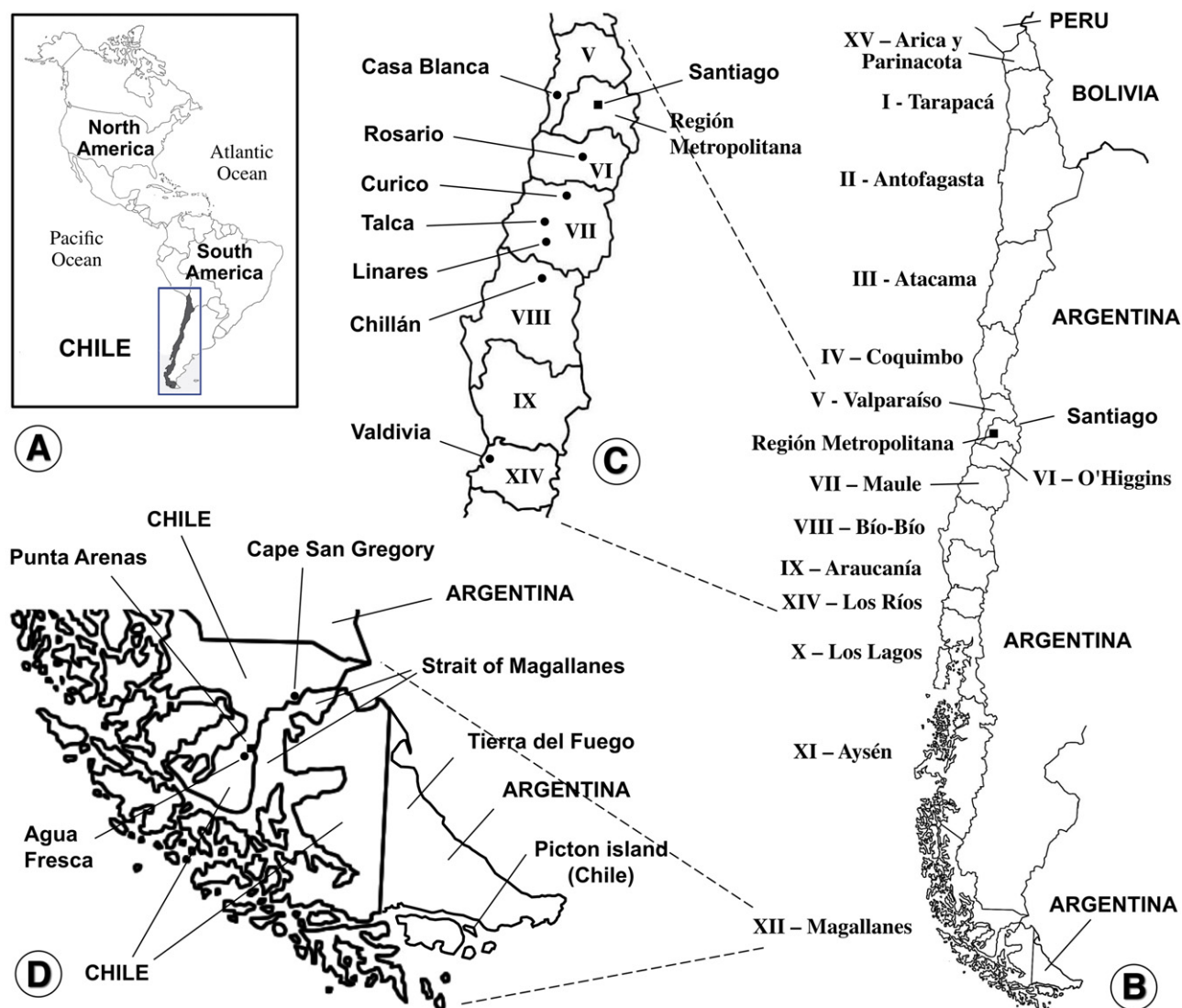
**Table 1**  
Nuclear ribosomal and mitochondrial DNA haplotype code identification for lymnaeid species and populations studied from Chile.

Preliminary classification (n = collected/sequenced)	Populations				rDNA ITS-2		rDNA ITS-1		mtDNA cox1		Definitive classification	
	Locality	Coordinates	Altitude	Region	H	Acc. No.	H	Acc. No.	H <sup>b</sup>	Acc. No.	Species	Combined H nomenclature
<i>L. viator</i> (n = 15/4)	Casa Blanca	S 33° 19' 12.9" W 71° 24' 47.8"	270 m	V Valparaíso	2 <sup>a</sup>	JN051366	B <sup>a</sup>	JN051368	b <sup>a</sup>	JN051373	<i>L. viator</i>	L.via-2B.cox1b
<i>L. viator</i> (n = 8/2)	Casa Blanca	S 33° 19' 12.9" W 71° 24' 47.8"	270 m	V Valparaíso	2 <sup>a</sup>	JN051366	B <sup>a</sup>	JN051368	c <sup>a</sup>	JN051374	<i>L. viator</i>	L.via-2B.cox1c
<i>L. viator</i> (n = 52/6)	Rosario (Sector Rengo)	S 34° 22' 35.0" W 70° 51' 31.3"	320 m	VI O'Higgins	3	AJ272051	C	AJ272052	c <sup>a</sup>	JN051372	<i>G. truncatula</i>	G.tru-3C.cox1c
<i>L. viator</i> (n = 47/4)	Chillán (Sector Alazán)	S 36° 32' 42.6" W 71° 46' 24.2"	250 m	VIII Bío-Bío	3	AJ272051	C	AJ272052	c <sup>a</sup>	JN051372	<i>G. truncatula</i>	G.tru-3C.cox1c
<i>L. viator</i> (n = 4/2)	Isla Teja, Granja UACH	S 39° 48' 10.4" W 73° 15' 05.2"	10 m	XIV Los Ríos	3	AJ272051	C	AJ272052	c <sup>a</sup>	JN051372	<i>G. truncatula</i>	G.tru-3C.cox1c
<i>L. diaphana</i> (n = 27/5)	Cape San Gregory (vegas bajas)	S 52° 37' 52.3" W 70° 15' 18.0"	2–5 m	XII Magallanes	1	JF909498	A	JF909499	a	JF909501	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1A.cox1a
<i>L. diaphana</i> (n = 23/4)	Cape San Gregory (vegas bajas)	S 52° 37' 52.3" W 70° 15' 18.0"	2–5 m	XII Magallanes	1	JF909498	A	JF909499	b <sup>a</sup>	JN051375	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1A.cox1b
<i>L. diaphana</i> (n = 18/4)	Cape San Gregory (vegas bajas)	S 52° 37' 52.3" W 70° 15' 18.0"	2–5 m	XII Magallanes	1	JF909498	A	JF909499	d <sup>a</sup>	JN051377	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1A.cox1d
<i>L. diaphana</i> (n = 11/3)	Cape San Gregory (vegas altas)	S 52° 34' 02.4" W 70° 12' 05.9"	21 m	XII Magallanes	1	JF909498	B <sup>b</sup>	JN051369	c <sup>a</sup>	JN051376	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1B.cox1c
<i>L. patagonica</i> (n = 31/5)	Agua Fresca	S 53° 23' 58.8" W 71° 07' 08.6"	157 m	XII Magallanes	1	JF909498	C <sup>a</sup>	JN051370	e <sup>a</sup>	JN051378	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1C.cox1e
<i>L. patagonica</i> (n = 25/3)	Agua Fresca	S 53° 23' 58.8" W 71° 07' 08.6"	157 m	XII Magallanes	1	JF909498	C <sup>a</sup>	JN051370	f <sup>a</sup>	JN051379	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1C.cox1f
<i>L. patagonica</i> (n = 19/2)	Agua Fresca	S 53° 23' 58.8" W 71° 07' 08.6"	157 m	XII Magallanes	1	JF909498	C <sup>a</sup>	JN051370	g <sup>a</sup>	JN051380	<i>P. diaphana</i>	L.dia-1C.cox1g
<i>L. lebruni</i> (n = 7/2)	Punta Arenas	S 53° 24' 25.1" W 71° 15' 45.7"	296 m	XII Magallanes	2 <sup>a</sup>	JN051367	D <sup>a</sup>	JN051371	h <sup>b</sup>	JN051381	<i>P. diaphana</i>	L.dia-2D.cox1h
<i>L. cousinsi</i> (n = 5/3)	Isla Teja, Río Cau-Cau	S 39° 48' 05.3" W 73° 15' 09.4"	7 m	XIV Los Ríos	–	–	–	–	a <sup>a</sup>	JN051382	<i>Chilina</i> sp.	C.sp.-cox1a

n, number of specimens collected and malacologically studied for classification/number of specimens sequenced; H, haplotype.

<sup>a</sup> New haplotypes for the corresponding lymnaeid species.

<sup>b</sup> Only preliminary haplotypes due to incomplete gene sequence.



**Fig. 1.** Map of Chile showing localities where lymnaeids were collected: (A) location of Chile in South America; (B) division of country in 15 political regions; (C) central regions showing lymnaeid sampling localities (Casa Blanca, Rosario, Chillán and Valdivia) and localities where high human prevalences were described (Curico, Talca and Linares); (D) Región XII of Magallanes showing lymnaeid sampling localities (Cape San Gregory, Punta Arenas and Agua Fresca); note location of Picton island.

phenol–chloroform extraction and ethanol precipitation method. The procedure steps were performed according to methods outlined previously (Bargues and Mas-Coma, 1997; Bargues et al., 2001, 2007a). The pellet was dried and resuspended in 30  $\mu$ l sterile TE buffer (pH 8.0). This suspension was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

#### 2.2.2. DNA sequence amplification

Each one of the three DNA markers were PCR amplified independently for each lymnaeid specimen and each PCR product was sequenced for a bona-fide haplotype characterisation. The rDNA spacers ITS-2 and ITS-1 were amplified using primers previously described (Bargues et al., 2001, 2006a, 2007a; Mas-Coma et al., 2001). A mitochondrial DNA *cox1* gene fragment was amplified using universal primers (Folmer et al., 1994). Amplifications were generated in a Mastercycle *epgradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany) using 4–6  $\mu$ l of genomic DNA for each 50  $\mu$ l PCR reaction. PCR conditions were 30 cycles of 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $50^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , preceded by 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$  and followed by 7 min at  $72^{\circ}\text{C}$  for ITS-2 and ITS-1, and by 40 cycles of 30 s at  $90^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $48^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , preceded by 2.5 min at  $94^{\circ}\text{C}$  and followed by

10 min at  $72^{\circ}\text{C}$  for *cox1*. Ten  $\mu$ l of each PCR product was checked by staining with ethidium bromide on 1% Nusieve<sup>®</sup> GTG agarose (FMC) gel electrophoresis, using the Molecular Weight Marker VI (Boehringer Mannheim) at 0.1  $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$  as control.

#### 2.2.3. Purification and quantification of PCR products

Primers and nucleotides were removed from PCR products by purification on Wizard<sup>™</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol and resuspended in 50  $\mu$ l of 10 mM TE buffer (pH 7.6). The final DNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 and 280 nm.

#### 2.2.4. DNA sequencing

The sequencing of the complete rDNA ITS-2 and ITS-1 and the fragment of the mtDNA *cox1* gene was performed on both strands by the dideoxy chain-termination method (Sanger et al., 1977). It was carried out with the Taq dye-terminator chemistry kit for ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using PCR primers.

### 2.2.5. Sequence alignments

Sequences were aligned using CLUSTAL-W version 1.8 (Thompson et al., 1994) and MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). Subsequently, minor corrections were manually introduced for a better fit of nucleotide correspondences in microsatellite sequence regions. Homologies were performed using the BLASTN programme from the National Center for Biotechnology information web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 2.2.6. DNA haplotype nomenclature

The codes for the sequences obtained follow the standard nomenclature proposed for lymnaeid snails previously (Bargues and Mas-Coma, 2005; Bargues et al., 2006a; Mas-Coma et al., 2009a). It shall be noted that haplotype codes are only definitive in the case of complete sequences. When dealing with fragments or incomplete sequences, haplotype codes are provisional, as is the case here of the mtDNA *cox1* fragment obtained.

### 2.2.7. Sequence comparisons

The following sequences from GenBank-EMBL have been used for comparison and/or phylogenetic analyses (species names as noted in respective articles):

- rDNA ITS-2: *Galba truncatula* H1 (AJ296271), H2 (AJ243017) and H3 (= *Lymnaea viatrix sensu* Ueno et al., 1975; = *L. cubensis sensu* Ueno et al., 1975) (AJ272051) (Bargues et al., 2001; Mas-Coma et al., 2001; Bargues et al., 2007a); *L. cubensis* H1 (AM412223), H2 (FN182200), H3 (FN182201) and H4 (JF514088) (Bargues et al., 2007a, 2011b, in press-a), *L. viatrix* H1 (type locality Rio Negro, Argentina) (AM412224) (Bargues et al., 2007a), *L. neotropica* H1 (AM412225) and H2 (JF514089) (Bargues et al., 2007a, in press-a), *L. humilis* H1 (FN182191) and H2 (FN182192) (Bargues et al., 2011b), *L. diaphana* H1 (JF909498) (Bargues et al., in press-b); and *Pseudosuccinea columella* H1 (FN598155) and H2 (FN598156) (Bargues et al., 2011a).
- rDNA ITS-1: *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), HC (= *L. viatrix sensu* Ueno et al., 1975; = *L. cubensis sensu* Ueno et al., 1975) (AJ272052) and HD (JF514090) (Mas-Coma et al., 2001; Bargues et al., 2001, 2006a, 2007a, in press-a); *L. cubensis* HA (AM412226), HB (FN182202) and HC (FN182203) (Bargues et al., 2007a, 2011b), *L. viatrix* HA (type locality Rio Negro, Argentina) (AM412227) (Bargues et al., 2007a), *L. neotropica* (AM412228) (Bargues et al., 2007a), *L. humilis* HA (FN182193) and HB (FN18219) (Bargues et al., 2011b), *L. diaphana* HA (JF909499) (Bargues et al., in press-b); and *P. columella* HA (FN598160) (Bargues et al., 2011a).
- mtDNA *cox1* gene: *G. truncatula* *cox1a* (AM494011), *cox1b* (JF461487) (Bargues et al., 2007a, in press-a) and *G. truncatula* (EU818799) (Albrecht et al., 2008); *L. cubensis* *cox1a* (AM494009) and *cox1b* (FN182205), *L. viatrix* *cox1a* (type locality Rio Negro, Argentina) (AM494010) (Bargues et al., 2007a), *L. neotropica* *cox1a* (AM494008), *cox1b* (FN356741), *cox1c* (JF461485) and *cox1d* (JF461486) (Bargues et al., 2007a, 2011b, in press-a; Mera y Sierra et al., 2009), *L. humilis* *cox1a*, *cox1b* and *cox1c* (FN182197-9) (Bargues et al., 2011b), *L. diaphana* *cox1a* (JF909501) (Bargues et al., in press-b); *P. columella* (FN598165) (Bargues et al., 2011a) and *P. columella* (AY227366) (Remigio and Hebert, 2003).

### 2.3. Phylogenetic inference

Phylogenetic analysis of ITS-2 and ITS-1 combined haplotypes was reconstructed using the Maximum Likelihood (ML) method implemented in PAUP version 4.0b10 and PhyML program version 3.0 aLRT. ML parameters and the evolutionary model best fitting our dataset were determined using Akaike and Bayesian information criteria (AIC and BIC) (Akaike, 1974; Posada and Buckley, 2004), implemented in jModeltest version 0.1.1 (Posada, 2008). Starting

branch lengths were obtained using the least-squares method with ML distances.

To provide an assessment of the reliability of the nodes in the ML tree, three methods were used. First, a distance-based phylogeny using the neighbor-joining (NJ) algorithm (Saitou and Nei, 1987) with the ML pairwise distances was obtained and statistical support for the nodes was evaluated with 1000 bootstrap replicates, with and without removal of gapped positions, in PAUP. Second, a bootstrap analysis using 1000 replicates was made by using branch-swapping algorithm (tree-bisection-reconnection TBR) with full heuristic search in PAUP. Third, a Bayesian phylogeny reconstruction procedure was applied to obtain posterior probabilities (BPP) for the nodes in the ML tree, by using the same evolutionary model as above, implemented in MrBayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Four Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chains were run for 10,000 generations, sampling every 100 generations, with the first 100 sampled trees discarded as “burn-in”. Finally, a 50% majority rule consensus tree was constructed. Reliability for internal branches in the PhyML tree was also assessed using the aLRT test (SH-Like) for comparative purposes.

Phylogenetic analyses were performed after adding the following reference sequences of rDNA ITS-2 and ITS-1 of lymnaeids stored in the GenBank database: *L. (Stagnicola) palustris palustris* (AJ319620, AJ626849); *L. (S.) fuscus* (AJ319621, AJ626856) (Bargues et al., 2001); *Catascopia catascopium* (AF013143, AF013143); *Hinkleyia caperata* (AF013139, AF013139) (Remigio and Blair, 1997); *Radix auricularia* (AJ319628, JF922878); *R. balthica* (= *R. peregra*) (AJ319633, JF922879) (Bargues et al., 2001, in press-a). The intergenic region sequence (AY030361) including both ITSs of the planorbid species *Biomphalaria pfeifferi* (De Jong et al., 2001) was used as outgroup.

## 3. Results

Nuclear rDNA ITS-2 and ITS-1 and mtDNA *cox1* nucleotide sequence data reported in this article are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers noted in Table 1.

### 3.1. *Lymnaea viator*

Snail specimens collected from Valle Casa Blanca, Valparaiso, preliminarily classified as *L. viatrix*, proved to have been well identified after rDNA and mtDNA marker sequencing (Table 1).

- **rDNA ITS-2.** All the specimens analysed presented the same ITS-2 sequence, of 444 bp and 53.9% GC content. When compared to the ITS-2 haplotype of *L. viatrix* from Rio Negro, Argentina, available in GenBank (*L.via*-H1: AM412224), it proved to be different in one mutation (transition C/T in H1/H2) in position 414 and in 8 polymorphic sites corresponding to 8 indels related to a different number of repeats in the microsatellites GCTT and GCTC, being (GCTT)<sub>4</sub> and (GCTC)<sub>1</sub> in Casa Blanca whereas (GCTT)<sub>5</sub> and (GCTC)<sub>2</sub> in Rio Negro (Table 2). The code H2 has been ascribed to this new haplotype (Table 1).
- **rDNA ITS-1.** All the lymnaeid individuals showed identical ITS-1 sequence, of 574 bp long and 54.0% GC content. When compared to the ITS-1 haplotype of *L. viatrix* from Rio Negro (*L.via*-HA: AM412227), it proved to be different in 10 polymorphic sites corresponding to two mutations, one tetranucleotide repeat and four insertion/deletions (Table 2). The code HB has been ascribed to this new haplotype (Table 1).
- **mtDNA *cox1*.** Two different nucleotide sequences were found, both of 672 bp but with different biased AT content of 69.4% and 69.5%. These haplotypes differ in only one mutation in position



**Table 2**  
Nucleotide differences and microsatellite repeats found in the ITS-2 and ITS-1 rDNA haplotypes of *Lymanaea viator* from Casa Blanca, Chile, and Rio Negro, Argentina.

ITS-2 rDNA	positions	
	microsatellite repeats	
	53-68	69-76
<i>L. viator</i> H1** (Rio Negro, Argentina)	(GCTT) <sub>5</sub>	(GCTC) <sub>2</sub>
<i>L. viator</i> H2 (Casa Blanca, Chile)	(GCTT) <sub>4</sub>	(GCTC) <sub>1</sub>

ITS-1 rDNA	positions	
	microsatellite repeats	
	111122224 3000027779 9345627897	103-106
<i>L. viator</i> HA* (Rio Negro, Argentina)	G---C---A	(ATTG) <sub>1</sub>
<i>L. viator</i> HB (Casa Blanca, Chile)	AATTGTTGA-	(ATTG) <sub>2</sub>

Positions refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0 and CLUSTALW 1.8.  
\* AM412227.  
\*\* AM412224.

488 of their alignment, which represent one amino acid change (Table 3). When both haplotypes are compared with *cox1a* haplotype of *L. viatrix* from Rio Negro (AM494010), a total of 13 variable positions appear, all of them singleton sites (Table 3). The codes *cox1b* and *cox1c* have been ascribed to these new haplotypes (Table 1). Interestingly, nucleotide differences give rise to three amino acid differences between the Chilean and Argentinian haplotypes of *L. viator* (Table 3).

### 3.2. *Galba truncatula*

Specimens from the localities of Rosario, Chillán and Isla Teja, Valdivia, preliminarily classified as *L. viatrix*, proved to be *G. truncatula* by rDNA and mtDNA sequences (Table 1).

- **rDNA ITS-2.** Specimens studied showed the same ITS-2 sequence, of 401 bp and 58.6% GC content. When compared with the three ITS-2 haplotypes of *G. truncatula* (H1, H2, H3), the sequence from Chile proved to be identical to the haplotype H3 (AJ272051).
- **rDNA ITS-1.** All specimens analysed presented the same ITS-1 sequence, of 504 bp and 57.5% GC content. When compared with the four ITS-1 haplotypes of *G. truncatula* available (HA, HB, HC and HD), it proved to be identical to the haplotype HC (AJ272052).
- **mtDNA *cox1*.** Only one haplotype was detected, of 672 bp and 68.6% AT content. This haplotype proved to be different from the previously described haplotypes *cox1a* and *cox1b* for this species. Hence, the provisional code *G.tru-cox1c* has been assigned (Table 1). In a 672 bp-long alignment, including *cox1a-c* haplotypes of *G. truncatula* and *cox1* sequence of *G. truncat-*

*ula* from Germany (EU818799), a total of 30 variable positions appeared, including 1 parsimony informative position and 29 singleton sites (Table 4). The *cox1c* haplotype of *G. truncatula* of Chile differs by only one amino acid change in position 16 when compared with *cox1a* and *cox1b* amino acid haplotypes (Table 4).

### 3.3. *Pectinidens diaphana*

Specimens from Cape San Gregory, Magallanes, preliminarily classified as *L. diaphana*, proved to be correctly classified by rDNA and mtDNA sequences (Table 1).

- **rDNA ITS-2.** All specimens studied presented the same ITS-2 sequence of 495 bp and 57.0% GC content. This sequence was compared with the ITS-2 haplotype of *L. diaphana* available in GenBank (L.dia-H1) and proved to be identical.
- **rDNA ITS-1.** The specimens analysed presented two different ITS-1 sequences, one of 520 bp and 54.0% GC content found close to the Magallanes Strait (“vegas bajas”) and the other of 524 bp and 54.0% GC content found somewhat more northward (“vegas altas”). The first is identical to the haplotype L.dia-HA of topotypic specimens of *L. diaphana* (JF909499). Consequently, the new code HB has been assigned to the second one (Table 1). Nucleotide differences between both HA and HB haplotypes concern a different number of repeats of the microsatellites CAGT, CTAG and TCAG, being (CAGT)<sub>5</sub>, (CTAG)<sub>3</sub> and (TCAG)<sub>2</sub> in HA, and (CAGT)<sub>6</sub>, (CTAG)<sub>4</sub> and (TCAG)<sub>1</sub> in HB (Table 5).
- **mtDNA *cox1*.** Four different haplotypes were detected in the specimens studied, with a length of 672 bp and an AT content of

**Table 3**  
Nucleotide (Nt) and amino acid (Aa) differences found in the mtDNA *cox1* gene sequence of *L. viator* populations studied from Chile and Argentina.

	Nt	Aa
	22344445556	11
	1913926884882	769
	3946608081341	935
<i>L. viator cox1a</i> (Rio Negro, Argentina)*	CCCGTTCTCTCTT	STL
<i>L. viator cox1b</i> (Casa Blanca, Chile)	TTTACCTC.CTGC	K.C
<i>L. viator cox1c</i> (Casa Blanca, Chile)	TTTACCTCTCTGC	KIC

Position, numbers (to be read in vertical) refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0; = identical; haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene.  
\* AM494010.

**Table 4**

Nucleotide (Nt) and amino acid (Aa) differences found in the mtDNA *cox1* gene sequence of *Galba truncatula* populations studied from Chile and other countries.

	Nt	Aa
	111112222333333334445566666	
	478113881133122456790681702235	1
	687175096917814579506803004707	6
<i>G. truncatula cox1a</i> *	GGAACAAAATAGAGCCCCCTCGATACGT	V
<i>G. truncatula cox1b</i> **	.AGGTGGGGCCGAGATTTT.TCTAG.GTCC	.
<i>G. truncatula</i> Germany***	.....G.....A-	.
<i>G. truncatula cox1c</i> (Chile)	A.....T.....C....	I

Position = numbers (to be read in vertical) refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0; = identical; -= indel; haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene.

\* AM494011.  
 \*\* JF461487.  
 \*\*\* EU818799.

69.4%, 69.6%, 69.8% and 69.3%. The first is identical to the haplotype *cox1a* of topotypic specimens of *L. diaphana* (JF909501). The codes *cox1b*, *cox1c* and *cox1d* have been ascribed to the three new ones (Table 1). Nucleotide and amino acid differences between the four detected *cox1* haplotypes are listed in Table 6. In the amino acidic sequence alignment (224 aa long), *cox1a*, *cox1b* and *cox1d* haplotypes appear to be identical. Amino acidic differences detected between the four *L. diaphana cox1* haplotypes only concern one amino acid change, generated by the haplotype *cox1c* in position 133 (Table 6).

### 3.4. *Lymnaea patagonica*

Specimens from Agua Fresca, Magallanes, originally ascribed to *L. patagonica* and corresponding to the type locality of that species, proved in fact to be *L. diaphana* by rDNA and mtDNA (Table 1).

- **rDNA ITS-2.** One haplotype was found in the specimens studied. Their length and GC content was 495 bp and 57.0%, respectively. This sequence fits exactly with the topotypic haplotype L.dia-H1 of the species *L. diaphana* (JF909498).
- **rDNA ITS-1.** The specimens from this type locality presented one ITS-1 sequence of 516 bp and 54.0% GC content. When comparing with haplotypes HA and HB of *L. diaphana*, nucleotide differences only concerned a different number of repeats of the microsatellites CAGT, CTAG and TCAG. Consequently, the sequence of *L. patagonica* was assigned a new haplotype for *L. diaphana* and deposited under the code L.dia-HC (Table 1). Differences between

microsatellite repeats and their position in the alignment of *L. diaphana* (= *L. patagonica*) haplotypes are shown in Table 5.

- **mtDNA *cox1*.** Three different haplotypes were detected in the specimens from Agua Fresca, with a length of 672 bp and an AT content of 69.5%, 69.6% and 69.2%. When comparing these *L. patagonica cox1* haplotypes with those known in *L. diaphana*, the three proved to be new and hence the codes *cox1e*, *cox1f* and *cox1g* were respectively assigned (Table 1). Only a very few nucleotide differences appear when comparing *L. patagonica* and *L. diaphana* haplotypes. The three sequences of *L. patagonica* give rise to only one COX1 amino acid sequence, which appears to be identical to the one corresponding to *cox1a* of *L. diaphana* topotypic specimens (Table 6).

### 3.5. *Lymnaea lebruni*

Specimens from Punta Arenas, Magallanes, originally ascribed to *L. lebruni* and corresponding to the type locality of that species, proved in fact to be *L. diaphana* by rDNA and mtDNA (Table 1).

- **rDNA ITS-2.** One haplotypes of a length of 498 bp and a GC content of 56.8% was found in the specimens studied. Nucleotide differences between this haplotype and L.dia-H1 (JF909498) were very few, including only one transversion (C/A in *patagonica/lebruni* haplotypes) in position 63 of their respective alignment and a different number of repeats in the microsatellite CGT, being (CGT)<sub>2</sub> in the first and (CGT)<sub>3</sub> in the second (Table 5). The code L.dia-H2 has been assigned to the latter (Table 1).

**Table 5**

Nucleotide differences and microsatellite repeats found in the ITS-2 and ITS-1 rDNA haplotypes of *Lymnaea diaphana* and *L. patagonica* from Chile.

ITS-2 rDNA	Position		
	Tv	Microsatellite repeats	
	63	86-94	
<i>L. diaphana</i> H1 (= <i>L. patagonica</i> )	C	(CGT) <sub>2</sub>	
<i>L. diaphana</i> H2 (= <i>L. lebruni</i> )	A	(CGT) <sub>3</sub>	
ITS-1 rDNA	Position		
	Microsatellite repeats		
	42-65	222-241	
<i>L. diaphana</i> HA	(CAGT) <sub>5</sub>	(CTAG) <sub>3</sub>	(TCAG) <sub>2</sub>
<i>L. diaphana</i> HB	(CAGT) <sub>6</sub>	(CTAG) <sub>4</sub>	(TCAG) <sub>1</sub>
<i>L. diaphana</i> HC (= <i>L. patagonica</i> )	(CAGT) <sub>4</sub>	(CTAG) <sub>3</sub>	(TCAG) <sub>2</sub>
<i>L. diaphana</i> HD (= <i>L. lebruni</i> )	(CAGT) <sub>6</sub>	(CTAG) <sub>3</sub>	(TCAG) <sub>1</sub>

Positions refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0 and CLUSTALW 1.8; Tv, Transversion.

**Table 6**

Nucleotide (Nt) and amino acid (Aa) differences found in the mtDNA *cox1* gene sequence of *Lymnaea diaphana* and *L. patagonica* populations studied from Chile.

	Nt	Aa
	23334445666	1
	5634691685236	3
	7718074808160	3
<i>L. diaphana cox1a</i> *	ACTGTAGCTTTGG	I
<i>L. diaphana cox1b</i>	C..A.....A.	.
<i>L. diaphana cox1c</i>	CT.A.GA....A.	V
<i>L. diaphana cox1d</i>	C..A.....CCA.	.
<i>L. diaphana cox1e</i> (= <i>L. patagonica</i> )	C.CA...T.C.A.	.
<i>L. diaphana cox1f</i> (= <i>L. patagonica</i> )	C..A...T.C.A.	.
<i>L. diaphana cox1g</i> (= <i>L. patagonica</i> )	C..AC...CC.A.	.
<i>L. diaphana cox1h</i> (= <i>L. lebruni</i> )	C.CA...T.C.AA	.

Position = numbers (to be read in vertical) refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0.; = identical; - = indel; haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene.

\* JF909501.

- **rDNA ITS-1.** The specimens from Punta Arenas type locality showed an ITS-1 sequence of 520 bp and 54.0% GC content. Nucleotide differences with regard to haplotype L.dia-HC of *L. diaphana* (= *L. patagonica*) also concerned a different number of repeats of the microsatellites CAGT and TCAG, being (CAGT)<sub>4</sub> and (TCAG)<sub>2</sub> in the first, and (CAGT)<sub>6</sub> and (TCAG)<sub>1</sub> in the second. When comparing with haplotypes HA and HB of *L. diaphana*, nucleotide differences only concerned a different number of the same microsatellite repeats. Hence, the sequence of *L. lebruni* was assigned new haplotype for *L. diaphana* and deposited under the code L.dia-HD (Table 1). Differences between microsatellite repeats and their position in the alignment of *L. diaphana* (= *L. lebruni*) haplotypes are shown in Table 5.
- **mtDNA *cox1*.** One haplotype was found in the specimens from Punta Arenas, with a length of 672 bp and an AT content of 69.6%. When comparing this *L. lebruni cox1* haplotype with those known in *L. diaphana*, it proved to be new and therefore the code *cox1h* was assigned (Table 1). Nucleotide differences between *L. lebruni*, *L. patagonica* and *L. diaphana* haplotypes were only a very few, including 13 variable positions in the 672 bp-long alignment, of which 3 parsimony informative positions and 10 singleton sites. In the amino acid sequence alignment (224 aa long), *L. lebruni* shows no difference regarding *L. patagonica* and is thus also identical to the one corresponding to L.dia-cox1a (Table 6).

### 3.6. *Chilina* sp.

The small specimens from Isla Teja, Río Cau-Cau, in Valdivia, preliminarily identified as *L. cousini* according to shell shape, proved to belong to the family Chiliniidae after the BLASTn comparison performed by using the mtDNA *cox1* sequence obtained (no ITS sequences could be obtained).

### 3.7. Phylogenetic analysis

The ML model best fitting the ITS-1 and ITS-2 combined haplotype dataset was found to be HKY85+G+I, using a ts/tv ratio of 1.44 ( $\kappa = 2.8353224$ ), base frequencies for A, C, G and T of 0.224205, 0.263705, 0.230633 and 0.281457, respectively, gamma (continuous) with shape parameter alpha of 0.75, and a proportion of invariable sites equal to 0.036 ( $-\ln L 9206.34542$ ).

The combination of the two internal transcribed spacers in a single dataset generated a robust tree, indicating phylogenetic accordance between the two spacers in the ML tree obtained (Fig. 2).

The monophyly of the ITSs haplotypes of the five lymnaeid species of the *Galba/Fossaria* group, which comprises the *F. hepatica* main intermediate host species, was strongly supported (100/100/100 in NJ/ML/BPP). In this clade, the haplotypes of *L. viator* and *G. truncatula* detected in Chile appear clustering together with other previously described haplotypes of the same species, respectively. Concerning the four combined haplotypes of *P. diaphana*, all of them cluster together in a monophyletic branch included in the same clade comprising the North American stagnicolines, with a very high bootstrap support of 96%, 97% and 100% with NJ/ML/BPP algorithms, respectively. The only difference detected in the topologies obtained with PAUP, PhyML and MrBayes, concerns *P. columella*, appearing as a basal branch of stagnicoles and *Galba/Fossaria* groups in ML trees obtained in PAUP and PhyML (73/56 of support in NJ/ML), whereas appearing as a sister group within the *L. diaphana*-American stagnicolines clade in the ML tree obtained with MrBayes (100% support). Moreover, the ingroup branches including *Pseudosuccinea*, *Galba/Fossaria* and stagnicolines appears well separated from the *Radix* branch, with high supports (86/65–88/100 in NJ/ML/BPP).

## 4. Discussion

### 4.1. Lymnaeid species analyses

*Lymnaea viator* specimens collected in the second type locality Casa Blanca, Valparaíso, have proved to be unexpectedly different from topotypic specimens of the same species from Rio Negro, Argentina, at the level of the three markers analysed. Although nucleotide differences in the species level markers ITS-2 and ITS-1 do not justify two different species (most differences related to different microsatellite repeat numbers), according to interspecific genetic distances known in invertebrates (Mas-Coma and Bargues, 2009) and also in Lymnaeidae (Bargues et al., 2001), these few ITS differences together with the nucleotide and amino acid differences in *cox1* suggest a relatively old divergence of these *L. viator* populations from one and another side of the Andean chain. Additionally, it should be remembered that the masculine spelling *viator* used by D'Orbigny (1835) when originally describing the species within the genus *Lymnaeus* Lamarck, 1799, was later modified to the feminine spelling *viatrix* to use it with the feminine *Lymnaea* by Paraense (1976). However, this does not fit articles 31.2.1 and 34.2.1 of the International Code of Zoological Nomenclature. Hence, the correct species name for the specimens from Casa Blanca is *Lymnaea viator* D'Orbigny, 1835.





*L. lebruni* specimens from the type locality of the species, Punta Arenas in Magallanes, showed morphological features of the shell in agreement with the original description of Mabilie (1884) and slightly different from the *L. patagonica* topotypic specimens found. Nucleotide differences between both at the level of all markers may be related to that phenotypic difference. However, these differences regarding *L. patagonica* as well as *P. diaphana* are too few to consider it a different taxon, whether at species or at subspecies level. Hence, it additionally supports the aforementioned conclusions on *P. diaphana*.

#### 4.2. Characterisation of the lymnaeid fauna from Chile

According to the DNA sequencing results and the taxonomic synonymies, the lymnaeid fauna of Chile originally including seven species should be reduced to the following only three valid species: *L. viator*, *G. truncatula* and *P. diaphana* (= *L. patagonica*; = *L. lebruni*).

The quotation of *L. cousini* in Valdivia, Chile by Hubendick (1951) represents the southernmost report of this species and poses acceptance problems already highlighted (Paraense, 1995). This species is hitherto only known in Ecuador and Colombia (Bargues et al., 2011a) and its presence in such a southern locality as Valdivia is surprising. The brief description of the shell and the male copulatory organ made by Hubendick (1951) is insufficient to draw clear conclusions on the correct classification of the Chilean specimen. Although the climate of the lowland of Valdivia is of temperate type and thus not so different from the environmental characteristics of the high altitude in the Andean areas of Ecuador and Colombia, such a southern isolated location becomes bewildering and should be verified (Bargues et al., 2011a). We were unfortunately unable to find it.

The molecular and phylogenetic data prove that *L. patagonica* is not a valid species, as argued by Malek (1985), but a synonym of *P. diaphana*. Similarly, the probable synonymy of *L. lebruni*, from Punta Arenas as type locality, with *P. diaphana* proposed by Pilsbry (1911) may be considered definitive according to the DNA sequencing results obtained. And finally, *L. chilensis* is taxonomically considered a *nomen nudum* (Hubendick, 1951) and may therefore be excluded.

Thus, the lymnaeid fauna of mainland Chile appears composed by two autochthonous species, *L. viator* and *P. diaphana*, and a third introduced species of Palaearctic origin *G. truncatula*. It could be highlighted that *L. viator* and *G. truncatula* belong both to the *Galba/Fossaria* group of lymnaeid intermediate hosts, a group within which specimen classification is usually very difficult due to the pronounced morphological similarity between species. In the case of *P. diaphana*, the phylogenetic analysis shows that it is not a *Galba/Fossaria* member but rather a stagnicoline (Fig. 2), as already emphasized very recently (Bargues et al., in press-b). However, this does not mean that this species may be very easily confused with both *L. viator* and *G. truncatula* when only basing on shell characteristics (see Paraense, 1984), mainly when dealing with small-medium-sized specimens. The great lymnaeid similarity problem is undoubtedly the responsible for the overlook of the presence of *G. truncatula* in Chile up to the present. Hence the usefulness of the DNA markers here furnished to help in both field and laboratory studies on disease transmission, epidemiology and control of fascioliasis in Chile from now on.

The presence of *G. truncatula* should consequently be added to the list of seven exotic freshwater snail species already described in Chile (Letelier et al., 2007). The introduction success of these snail invaders in Chile appears to be related to increasing commercial activities and trade in the south-eastern Pacific, and their subsequent mainland spread to given global environmental and climate changes or the rises in temperature produced in the Chilean coastal areas by the oceanographic El Niño events. Several of these exotic species registered in Chile are unfortunately well known due to

their capacity to transmit helminthic diseases, such as *Melanoides tuberculata* and *Pomacea* spp. (Letelier et al., 2007).

#### 4.3. Implications for human and animal fascioliasis epidemiology

Although there are only three species of lymnaeid snails in mainland Chile, from the public health point of view the problem lies in the fascioliasis transmission capacity of all of them. Whereas in Chile the transmission of the liver fluke has only been demonstrated in the case of *L. viator* so far (Tagle, 1944), this lymnaeid species has repeatedly proved to be involved in similar latitudes in Argentina (Venturini, 1978; Rossanigo et al., 1983; Kleiman et al., 2004). *Pectinidens diaphana* has also been reported to participate in the transmission, at least in Peru (Cordova et al., 1961; Santa Cruz, 1979; Larrea et al., 1994), and its phylogenetic relationship with stagnicolines (Fig. 2) suggests an intermediate host capacity of secondary level (Bargues et al., in press-b). Finally, *G. truncatula* is known as both the original and main intermediate host of *F. hepatica* wherever this lymnaeid species is present, including a very large body of literature from throughout (see reviews in Bargues et al., 2001; Mas-Coma et al., 2009a) and has also proved to be the responsible for fascioliasis transmission in South America (Mas-Coma et al., 2001).

The combined ITS-2-ITS-1 haplotype G.tru-H3C found in Chile merits additional comments, as it is the same as the one responsible for the disease transmission in the endemic area of fascioliasis with the highest prevalences and intensities known in humans: the Northern Bolivian Altiplano. In this area, prevalences detected in some communities were of up to 72% and 100% in coprological and serological surveys, respectively, and intensities reached up to more than 8000 eggs per gram (epg) in children (Esteban et al., 1997, 1999; Mas-Coma et al., 2009a). Although this human fascioliasis hyperendemic area is located at 3800–4100 m altitude and hence environmental conditions and climatic variables evidently differ from the pronouncedly lower altitudes where *G. truncatula* has been collected in Chile, temperatures may be similar because of the most southern latitude (Fuentes et al., 1999). Indeed, studies on the influences of temperature and rainfall on *F. hepatica* egg development have shown how the liver fluke is able to be transmitted in given seasons even in southern areas as Valdivia and Temuco (Valenzuela, 1979), under environmental characteristics which are similar to those where *G. truncatula* plays its intermediate host role in Europe.

Moreover, two other aspects shall be considered. First, the wide ecological features of *G. truncatula* do allow it to come close to human settings. This freshwater snail species may be even found in polluted waters such as those present in villages, as detected in the Northern Bolivian Altiplano (Mas-Coma et al., 1999). This anthropophilic ecology enables this lymnaeid to be in the background of many human infections. Second, *G. truncatula* is markedly linked to areas where livestock is present. This allows it to be passively transported by domestic animals as sheep or cattle from one place to another and explains the great spreading power of this lymnaeid (Mas-Coma et al., 2009a). This suggests a high liver fluke infection risk for both humans and animals in those areas of Chile where this intermediate host may be present.

In Chile, prevalence data differ according to domestic animal host species and regions. The higher prevalences in cattle are found in Región VII (85.7%), followed by Región VIII (66.8%), Región VI (50.5%) and Región IV (44.7%). In sheep, the highest prevalences are in Región VIII (17.9%), followed by Region IV (15.2%), Region III (15.1%) and Region IX (13.9%). In goats, the highest prevalences are in Región IV (20.9%), followed by Región II (19.9%), Región VII (14.6%) and Región VI (10.6%). In pigs, the highest prevalences are in Región VII (16.4%), followed by Región VIII (8.0%), Región II (9.6%) and Región IV (5.9%). In equines, the highest prevalences are in

Región VII (37.3%), followed by Región III (24.1%), Región IV (15.7%) and Región II (13.3%) (Morales et al., 2000). The high prevalence data from regions IV, VII and VIII should be highlighted, as in their slaughterhouses mainly animals from their respective regions are slaughtered (Alcaino and Apt, 1989). The Región VII has been the objective of particular studies due to its high prevalences (Gorman et al., 1979; Alcaino and Mozo, 1983; Alcaino et al., 1993).

An annual risk map was created for fascioliasis in the central regions of Chile by using both a climatic index and NDVI (normalized difference vegetation index) values as valid forecasting tools to assess disease transmission risk based on satellite remote sensing data (Fuentes and Malone, 1999). Despite the usefulness of these indexes previously verified in the human endemic area of Bolivia (Fuentes et al., 1999, 2001), final results obtained suggested transmission risk values which did not correlate cattle prevalence data for high endemic regions as Región VI and Región VII. Factors other than natural climate were highlighted to explain the lack of fit, such as irrigation practices and the effect of irregular topography on availability of springs, seeps and water collection sites that keep habitats wet through part of the dry season, thus extending the suitable transmission period (Fuentes and Malone, 1999). DNA sequencing results suggest that the absence of correlation between remote sensing data and bovine prevalences could also, or perhaps mainly, be due to differences of geographical distribution, ecological preferences, population dynamics and liver fluke infection suitability of each lymnaeid intermediate host species, *L. viator* and *G. truncatula*. Indeed, the endemic area in Bolivia where such methods proved to be useful is caused by only one lymnaeid species, *G. truncatula* (Mas-Coma et al., 2001).

A patchy distribution of infection is typical within fascioliasis endemic areas given its water-borne transmission linked to freshwater lymnaeid intermediate hosts (Mas-Coma et al., 1999). Within this patchy epidemiological frame, and considering that the infectivity of the metacercarial stage from different livestock species isolates has shown to be similar (Valero and Mas-Coma, 2000; Valero et al., 2001), domestic animal prevalence data alone do not explain why human infection data appears so high in the provinces of Curico, Talca and Linares in Región VII (Apt et al., 1992, 1993). Indeed, geographical distribution, prevalences and intensities of both human and animal infection are known to pronouncedly depend on the lymnaeid species involved in the local transmission and on characteristics such as their population dynamics, anthropophilic characteristics, type of water bodies, etc. (Bargues and Mas-Coma, 2005).

All in all, results of DNA sequencing of lymnaeid snails suggest an hypothesis for Chile of three lymnaeid intermediate hosts presenting different geographical distributions and transmission capacities: (i) *G. truncatula*, as introduced species, would be the responsible for most of the human infection cases throughout a more or less large area restricted to central regions of the country, (ii) *L. viator* would be the main intermediate host involved in animal infection, mainly in areas which *G. truncatula* has not yet have the time to colonise, and (iii) *P. diaphana* may play a secondary intermediate host role in southern latitudes if overlapped with *L. viator* and/or *G. truncatula* or be the only transmitter in the most extreme southern areas of the country where it is the only lymnaeid present. The DNA sequencing results here exposed furnish a new baseline on which to undertake future appropriate studies on transmission, epidemiology and control of both human and animal fascioliasis in Chile. Elucidating the detailed geographical distribution of each one of the aforementioned lymnaeid intermediate hosts becomes crucial. Only after obtaining sufficient knowledge on intermediate host species distribution by using DNA markers could useful tools for disease assessment and control, as mathematical modelling based on climatic data and remote sensing and geographical information systems, be developed for Chile.

## Acknowledgements

Studies funded by Projects No. SAF2006-09278 and SAF No. 2010-20805 of the Ministry of Education and Ministry of Science and Innovation, Madrid; and by the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Projects No. CO3/04, No. ISCH2005-PI050574 and No. ISCH2005-RETIC RD06/0021/0017 of the Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RETICS/FEDER), FIS, Ministry of Health, Madrid, Spain.

Part of this work was made thanks to a personal fellowship funded to P. Artigas from Chile by the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), Ministry of Foreign Affairs, Madrid, Spain. Thanks are given to Dr. Gerhard Falkner (Stuttgart, Germany) for taxonomic information furnished concerning the old original descriptions of *L. viator* and *L. diaphana*. The donation of freshwater snail material from Isla Teja, Valdivia, by Lic. Pablo Cuervo (Mendoza, Argentina) is greatly acknowledged.

Field work activities performed within the worldwide initiative of WHO (Headquarters Geneva, Switzerland) against human fascioliasis. Technical support provided by the Servicio Central de Secuenciación para la Investigación Experimental (SCSIE) of the Universidad de Valencia (Dr. A. Martínez).

## References

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans. Automat. Constr. 19, 716–723.
- Albrecht, C., Wolf, C., Glöer, P., Wilke, T., 2008. Concurrent evolution of ancient sister lakes and sister species: the freshwater gastropod genus *Radix* in lakes Ohrid and Prespa. Hydrobiologia 615, 157–167.
- Alcaino, H., Apt, W., 1989. Algunos antecedentes sobre la fascioliasis animal y humana. Monogr. Med. Vet. 11, 14–29.
- Alcaino, H., Gorman, T., 1999. Parásitos de los animales domésticos en Chile. Parasitol. Día 23, 33–41.
- Alcaino, H., Mozo, P., 1983. Antecedentes sobre el parasitismo en bovinos de la provincia de Linares (VII Región de Chile). Parasitol. Día 7, 108–112.
- Alcaino, H., Vega, F., Gorman, T., 1993. Epidemiología de la fascioliasis hepática en la VII Región, Chile. Parasitol. Día 17, 99–106.
- Apt, W., 1987. Parasitic disease in Chile. Trop. Dis. Bull. 84, 2–11.
- Apt, W., Aguilera, X., Vega, F., Zulantay, I., Retamal, C., Apt, P., Sandoval, J., 1992. Fascioliasis en la población rural de las provincias de Curico, Talca y Linares. Rev. Med. Chile 120, 621–626.
- Apt, W., Aguilera, X., Vega, F., Alcaino, H., Zulantay, I., Apt, P., Gonzalez, V., Retamal, C., Rodriguez, J., Sandoval, J., 1993. Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres en tres provincias de Chile. Bol. Of. Sanit. Panam. 115, 405–414.
- Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. Mol. Biol. Evol. 14, 569–577.
- Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. J. Helminthol. 79, 257–267.
- Bargues, M.D., Mangold, A.J., Muñoz-Antoli, C., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. J. Parasitol. 83, 1086–1092.
- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Inf. Gen. Evol. 1, 85–107.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Jackiewicz, M., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 2006a. Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda). Helderia. München 6, 29–40.
- Bargues, M.D., Mera-y-Sierra, R., Gomez, H.G., Artigas, P., Mas-Coma, S., 2006b. Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) and its potential impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. Anim. Biodivers. Conserv. 29, 191–194.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Mera-y-Sierra, R.L., Pointier, J.P., Mas-Coma, S., 2007a. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. Ann. Trop. Med. Parasitol. 101, 621–641.
- Bargues, M.D., Mera y Sierra, R., Gomez, H.G., Artigas, P., Mas-Coma, S., 2007b. Caracterización molecular de *Galba truncatula*, vector principal de la Fascioliasis, en Argentina. Implicaciones en salud pública. Enf. Emerg., Barcelona 9, 77–82.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Mas-Coma, S., 2011a. DNA sequence characterization and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *Lymnaea meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). Parasite Vector 4, 132.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Flores, R., Glöer, P., Rojas, G., Garcia, R., Ashrafi, K., Falkner, G., Mas-Coma, S., 2011b. *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail

- distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. PLoS ONE, doi:10.1371/journal.pone.0024567.
- Bargues, M.D., Gonzalez, L.C., Artigas, P., Mas-Coma, S., in press-a. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. Parasite Vector.
- Bargues, M.D., Mera y Sierra, R.L., Artigas, P., Mas-Coma, S., in press-b. DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). Mem. Inst. Osw. Cruz. 106.
- Beck, H., 1838. Index molluscorum praesentis aevi musei Principis Augustissimi Christiani Frederici. Appendix: Specierum novarum in indice molluscorum praesentis aevi musei Principis Christiani Frederici ab autore propositarum characteres breves. Hafniae 1, 1–124 + 1–8.
- Borie, C., Corona, S., Garin, A., Olea, P., Salcedo, M., Perez, C., Apt, W., 1990. Brote familiar de fascioliasis hepática aguda. Rev. Méd. Chile 118, 67–72.
- Cordova, E., Naquira, F., Naquira, C., 1961. *Lymnaea diaphana* King como huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en Arequipa (Perú). Arch. Peru Pathol. Clin. 15, 165–172.
- D'Orbigny, A., 1835. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per Americam Meridionalem itinere collectorum. Mag. Zool. 5, Classe 5 (61–62), 1–44.
- D'Orbigny, A., 1837. Voyage dans l'Amérique Méridionale, Vol. 5, 3ème Partie: Mollusques. P. Bertrand, Paris.
- De Jong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, W.L., Pointier, J.P., Amarista, M., Aye-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Bremond, Ph., Canese, A.P., Pereira de Souza, C., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J.S., Mimpfoundri, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Velasquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. Mol. Biol. Evol. 18, 2225–2239.
- Esteban, J.G., Flores, A., Angles, R., Strauss, W., Aguirre, C., Mas-Coma, S., 1997. A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano. Trop. Med. Int. Health 2, 695–699.
- Esteban, J.G., Flores, A., Angles, R., Mas-Coma, S., 1999. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93, 151–156.
- Esteban, J.G., Gonzalez, C., Bargues, M.D., Angles, R., Sanchez, C., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2002. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. Trop. Med. Int. Health 7, 339–348.
- Folmer, O., Black, M., Hoch, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299.
- Fuentes, M.V., Malone, J.B., 1999. Development of a forecast system for fascioliasis in central Chile using remote sensing and climatic data in a Geographic Information System. Res. Rev. Parasitol. 59, 129–134.
- Fuentes, M.V., Valero, M.A., Bargues, M.D., Esteban, J.G., Angles, R., Mas-Coma, S., 1999. Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude. Ann. Trop. Med. Parasitol. 93, 835–850.
- Fuentes, M.V., Malone, J.B., Mas-Coma, S., 2001. Validation of a mapping and predicting model for human fascioliasis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. Acta Trop. 79, 87–95.
- Gonzalez, L.C., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Valero, M.A., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: an altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. Acta Trop. 120, 119–129.
- Gorman, T., Alcaïno, H., Vidal, E., Berardi, L., 1979. Prevalencias y tendencias de la distomatosis y triquinosis en la VII Región. Arch. Med. Vet. (Suppl. 1), 123–128.
- Hubendick, B., 1951. Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution. Kungliga Svenska Vetenskapsakademien Handlingar. Fjärde Serien, 3, 1–223 + 5 pl.
- King, P.P., Broderip, W.J., 1832. Description of the Cistrrhipeda Conchifera and Mollusca, in a collection formed by the Officers of H.M.S. Adventure and Beagle employed between the years 1826 and 1830 in surveying the Southern Coasts of South America, including the Straits of Magalhaens and the Coast of Tierra del Fuego. Zool. J. 5 (19), 332–349, No. 47.
- Kleiman, F., Pietrovsky, S., Paraense, W.L., Wisnivesky-Colli, C., 2004. Southernmost finding of *Lymnaea viatrix* Orbigny 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in urban and rural areas of Patagonia, Argentina. Mem. Inst. Osw. Cruz 99, 23–24.
- Larrea, H., Oviedo, M.L., Huaman, P., 1994. Estudio anatómico de *Lymnaea diaphana* King, 1830, agente transmisor de la fascioliasis en la zona Sur del Perú. Bol. Lima 16 (91–96), 95–100.
- Letelier, S., Ramos, A.M., Huaquin, L.G., 2007. Molluscos dulceacuícolas exóticos en Chile. Rev. Mex. Biodiv. 78 (Suppl.), 9–13.
- Lopez, A., Silva, C., Busel, D., 2004. Fascioliasis hepática: reporte de un caso y revisión de la literatura. Rev. Chile Radiol. 10, 118–123.
- Mabille, M.J., 1884. Notices malacologiques. Bull. Soc. Philomath. Paris 7ème Série 8, 39–49.
- Malek, E.A., 1985. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Pan American Health Organization, Washington, Scientific Publication No. 478, 325 pp.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Acta Trop. 110, 112–136.
- Mas-Coma, S., Angles, R., Esteban, J.G., Bargues, M.D., Buchon, P., Franken, M., Strauss, W., 1999. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. Trop. Med. Int. Health 4, 454–467.
- Mas-Coma, S., Funatsu, I.R., Bargues, M.D., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology 123, S115–S127.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. Rev. Sci. Technol. OIE 27 (2), 443–457.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009a. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. Adv. Parasitol. 69, 41–146.
- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009b. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. Vet. Parasitol. 163, 264–280.
- Mera y Sierra, R., Artigas, P., Cuervo, P., Deis, E., Sidoti, L., Mas-Coma, S., Bargues, M.D., 2009. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. Vet. Parasitol. 166, 73–79.
- Mera y Sierra, R., Agramunt, V.H., Cuervo, P., Mas-Coma, S., 2011. Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. Parasite Vector 4, 104.
- Morales, J.L., Arriagada, R., Salas, L., Morales, C., Fuentes, F., Santana, R., 2009. Hematoma subcapsular por fascioliasis. Rev. Chile Cirugía 61, 73–77.
- Morales, E.A., Luengo, J., 1995. Beneficio y causas de decomiso de ovinos, porcinos, equinos, caprinos y camélidos en Chile. Avances Cienc. Vet. 11, 136–146.
- Morales, M.A., Luengo, J., Vasquez, O., 2000. Distribución y tendencia de la fascioliasis en el ganado de abasto en Chile, 1989–1995. Parasitol. Día 24, 115–118.
- Paraense, W.L., 1976. *Lymnaea viatrix*: a study of topotypic specimens (Mollusca: Lymnaeidae). Rev. Bras. Biol. 36, 419–428.
- Paraense, W.L., 1982. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the Neotropical region: a distributional outline. Mem. Inst. Osw. Cruz 77, 181–188.
- Paraense, W.L., 1984. *Lymnaea diaphana*: a study of topotypic specimens (Pulmonata: Lymnaeidae). Mem. Inst. Osw. Cruz 79, 75–81.
- Paraense, W.L., 1995. *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 from Ecuador (Gastropoda: Lymnaeidae). Mem. Inst. Osw. Cruz 90, 605–609.
- Pilsbry, H.A., 1911. Non-marine mollusca of Patagonia. Reports of Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896–1899, 3 (5), 513–633.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. 25, 1253–1256.
- Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst. Biol. 53, 793–808.
- Remigio, E.A., Blair, D., 1997. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Can. J. Zool. 75, 1540–1545.
- Remigio, E.A., Hebert, P.D., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. Mol. Phylogenet. Evol. 29, 641–647.
- Rochebrune, A.-T., de Mabile, J., 1885. Diagnoses de Mollusques nouveaux, recueillis par les membres de la mission du Cap Horn et M Lebrun, Préparateur au Muséum, chargé d'une mission à Santa-Cruz de Patagonie. Bull. Soc. Philomath. Paris 7ème Série 9, 100–111.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572–1574.
- Rosas, H., Fiestas, C., Torres, R., Aita, G., Lozada, D., 2008. Hematoma subcapsular hepático por Fascioliasis. Rev. Chile Radiol. 14, 20–24.
- Rossanigo, C.E., Avila, J.D., Vasquez, R., Sager, R.L., 1983. Incidencia, distribución e identificación del huésped intermediario de la distomatosis bovina en la provincia de San Luis. Gaceta Vet., Buenos Aires 45 (382), 739–749.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Samadi, S., Roumegoux, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Yong, M., Pointier, J.P., 2000. Morphological studies of lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. J. Mollus. Stud. 66, 31–44.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.
- Santa Cruz, A.C.M., 1979. Comportamiento de *Limnaea diaphana* King en condiciones de laboratorio. Veterinaria 3, 29–40.
- Sielfeld, W., 2001. Phylum Mollusca. Guías de Identificación y Biodiversidad. Fauna Chilena. Apuntes de Zoología. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile, 15 pp.
- Strebel, H., 1907. Beiträge zur Kenntnis der Molluskenfauna der Magalhaen-Provinz. No. 5. Mit Tafel 1–8 und 6 Abbildungen im Text. Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere, Verlag Von Gustav Fischer, Jena, 25 (1, 29 August 1907), 79–196+8 figure plates.
- Subercaseaux, B., Tapia, S., Guglielmetti, A., Stanley, W., Muñoz, N., 1985. Brote epidémico de fascioliasis hepática humana en Valparaíso. Parasitol. Día 9, 10–14.
- Tagle, I., 1944. Observaciones sobre la evolución de la *Fasciola hepatica* Linneo 1758. Comprobación del huésped intermediario en Chile. Rev. Chile Hist. Nat. 46/47, 232–241.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M.B., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.

- Valdovinos, C., 2006. Estado de conocimiento de los gastropodos dulceaquícolas de Chile. *Gayana* 70, 88–95.
- Valenzuela, G., 1979. Estudio epidemiológico acerca del desarrollo de huevos de *Fasciola hepatica* en el medio ambiente en Valdivia. *Chile Bol. Chil. Parasitol.* 34, 31–35.
- Valero, M.A., Mas-Coma, S., 2000. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol.* 47, 17–22.
- Valero, M.A., Darce, N.A., Panova, M., Mas-Coma, S., 2001. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Vet. Parasitol.* 102, 85–100.
- Valero, M.A., Santana, M., Morales, M., Hernandez, J.L., Mas-Coma, S., 2003. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J. Infect. Dis.* 188, 787–793.
- Valero, M.A., Navarro, M., Garcia-Bodelon, M.A., Marcilla, A., Morales, M., Garcia, J.E., Hernandez, J.L., Mas-Coma, S., 2006. High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Trop.* 100, 17–23.
- Valero, M.A., Girones, N., Garcia-Bodelon, M.A., Periago, M.V., Chico-Calero, I., Khoubbane, M., Fresno, M., Mas-Coma, S., 2008. Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Trop.* 108, 35–43.
- Venturelli, A., Monje, M., Assef, V., Venturelli, F., 2003. Fascioliasis hepática. *Cuad. Cir.* 17, 43–46.
- Venturini, L., 1978. Revisión del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. *Analecta Vet.* 10, 13–20.



## Direct and indirect affection of the central nervous system by *Fasciola* infection

SANTIAGO MAS-COMA\*, VERONICA H. AGRAMUNT, AND M. ADELA VALERO  
Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain

s0005

### INTRODUCTION

p0005 Fascioliasis is a zoonotic, water-borne, snail-transmitted parasitic disease caused by two liver helminth species of trematodes: *Fasciola hepatica* in Europe, Africa, Asia, the Americas and Oceania, and *Fasciola gigantica*, restricted to Africa and Asia. Although the veterinary impact of both fasciolids has been known for a long time, human fascioliasis was traditionally considered a secondary disease. The description of many human endemic areas and the emergence of human reports in many countries, including both prevalence and intensity increases and geographical expansion, have drastically changed the global scenario from the mid-1990s. Fascioliasis is at present known to be the vector-borne disease presenting the widest latitudinal, longitudinal, and altitudinal distribution known (Mas-Coma et al., 2005, 2009). The global estimation of 17 million people infected may be an underestimation due to the hitherto unknown situations in many countries (Mas-Coma, 2004).

p0010 The increasing importance of human fascioliasis also relies on pathogenicity, this disease appearing with greater impact in long-term infection than what was previously believed. All this led the World Health Organization (WHO) to include this disease within the neglected tropical diseases and launch a worldwide initiative (WHO, 2007), taking into account the great heterogeneity of its epidemiological situations and transmission patterns.

### HUMAN FASCIOLIASIS

s0010

#### Transmission, epidemiology, and infection sources

s0015

The adult stage (Fig. 24.1A, B), measuring up to 29 by 14 mm in *F. hepatica* and 52 by 12 mm in *F. gigantica*, parasitizes the large biliary passages and the gallbladder. *Fasciola hepatica* is a common parasite of ruminants, especially sheep, goats, cattle, horses, donkeys, and mules. *Fasciola gigantica* is common in sheep, goats, cattle, and buffalo (Mas-Coma, 2004).

p0015

Both *Fasciola* species use specific freshwater snails of the family Lymnaeidae as intermediate hosts in their transmission. The two-host life cycle takes about 14–23 weeks. It comprises four phases (Mas-Coma, 2004):

p0020

1. The definitive host harbors fluke adults producing eggs which reach the external milieu via bile and intestine; the definitive host is infected by ingestion of metacercariae. o0005
2. The transit between mammal and intermediate hosts includes the resistance phase of egg and the short swimming miracidium; eggs shed with mammal feces continue their development in freshwater. o0010
3. The intramolluscan development includes miracidium penetration, sporocyst, redial generations, production of cercariae, and shedding of the latter into water; the prepatent period (38–86 days) is dependent on temperature. o0015

\*Correspondence to: Prof. Dr. Santiago Mas-Coma, Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andres Estelles s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel: +34-96-354-42-98, Fax +34-96-354-47-69, E-mail: S.Mas.Coma@uv.es



although it was reported to be effective in one patient (Ayadi et al., 1991). Other neurological cases in which cure was reported when using praziquantel concern patients in whom the fluke was recovered from the eye (Cheng et al., 2007; Ying et al., 2007; Zhou et al., 2008), and it is probable that recovery was due to the extraction of a sole infecting worm than to drug therapy.

p0535 Triclabendazole is the present drug of choice (WHO, 2007). Triclabendazole is active in acute and chronic phases, which for neurological ectopic infection is of great value. The recommended dosage is two separate doses of 10 mg/kg. Failure cases respond to a third dose. Known triclabendazole resistance in animals should be considered where present: Australia, Ireland, Scotland, the Netherlands, Spain, and very recently also in Brazil, Argentina, and Peru.

p0540 Nitazoxanide is an alternative drug. Its long treatment course (500 mg every 12 hours for 7 days) makes its application somewhat difficult, particularly in remote rural areas.

p0545 Most reports refer to a complete cure and recovery from the neurological symptoms. However, in several patients the following sequelae were noted to persist despite treatment: paresthesia of upper left limb (Lunedei and Rosselli del Turco, 1934); pascence, insomnia, and dyspnea when walking (Dejean, 1960); amaurosis linked to ophthalmoneuritis (Becquet and Delassus, 1961); very long duration of neurological disorders and imperfect regression 8 months after its appearance despite two fasciolicide treatments, including persistence of finger articulation pain, phalange aspect modification, and electrical signs linked to the abducens cranial nerve VI (Coulaud et al., 1970); right hemiparesis and bilateral pyramidal syndrome (Berenger, 1984); left hyperreflexivity (Domart et al., 1967); bilateral pyramidal syndrome (Bothier et al., 1968); and right Achille's tendon reflex abolished (Lesecq et al., 1972). Sometimes these sequelae were important (Bothier et al., 1968; Berenger, 1984), even impeding the patient's ability to work (Saimot et al., 1971). Limb sequelae sometimes remain when the picture was markedly close to a pyramidal syndrome of the four limbs.

p0550 An evolution toward death was noted in two cases. A patient died 2 days after the surgical intervention (Ruggieri et al., 1967), and another died due to a complication during the resuscitation process (Berenger, 1984).

s0140

## CONCLUSION

p0555 The importance of the neurological complications of fascioliasis is greater than previously believed. In the last two decades such complications probably did not receive the appropriate publishing focus. Their impact on patients' health may be of such a level that efforts are

needed for further assessing their characteristics and frequency. It is questionable how many such patients remain misdiagnosed, due to their pronounced clinical polymorphism and confusing variable manifestations, often unknown to physicians.

Direct or indirect affection of the central nervous system by *Fasciola* has been reported from so many countries that we should henceforth include possible neurological complications within the general frame of fascioliasis. p0560

All neurological reports concern patients who are diagnosed in well-equipped hospitals, but this may not reflect the real situation of neurological fascioliasis in human endemic areas. In such remote zones, rural health centers and small hospitals do not possess the appropriate equipment for neurological analyses. Moreover, physicians may lack the knowledge about a potential relationship between fascioliasis and neurological manifestations, and such cases may therefore be misdiagnosed. Interestingly, neurological case reports in countries with human hyperendemic areas are very rare (e.g., Egypt), often only referring to minor symptoms (Peru), or are even absent (Bolivia). This is surprising when compared to a country such as France where many such cases have been diagnosed. p0565

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support by Project No. SAF2010-20805, Ministry of Science and Innovation, Madrid, and Red RICET (Grant No. ISCIII-RETIC-RD06/0021/0017, Programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RETICS/FEDER), FIS, Ministry of Health, Madrid, Spain. p0570

## REFERENCES

- Aguirre C, Merino J, Flores M et al. (1981). Formas aberrantes de *Fasciola hepatica*. Estudio de dos casos. *Med Clín* 76: 125–128.
- Aimard G, Henry E, Neuschwander PH (1984). Encéphalopathie au cours d'une distomatose. *Rev Neurol* 140: 222–223.
- Arias M, Dapena D, Lema M et al. (1986). Fasciolosis ectópica múltiple: descripción de un caso con afección pulmonar, meningoencefálica y orbitaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 4: 250–251.
- Aubertin E, Aubertin J, Aparicio M (1966). Forme neurologique de la distomatose. *J Méd Bordeaux* 143: 1751–1756.
- Ayadi A, Sellami H, Dani A et al. (1991). Les manifestations neurologiques de la distomatose hépatique a *Fasciola hepatica*. *Arch Inst Pasteur Tunis* 68: 275–283.
- Becquet R, Delassus P (1961). Particularités évolutives et thérapeutiques d'une observation de distomatose hépatique a *Fasciola hepatica*. *J Soc Med Lille* 79: 503–516. [TS1]

## Neurological and ocular fascioliasis in humans

**Santiago Mas-Coma, Veronica H. Agramunt, and María Adela Valero**

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia,  
Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

---

### Contents

1. Introduction
2. Human fascioliasis
  - 2.1. Parasites, their life cycles, reservoirs and snail hosts
  - 2.2. Human infection sources
  - 2.3. Intraorganic migration and life span
  - 2.4. Pathology
  - 2.5. Clinical presentations
    - 2.5.1. Acute phase
    - 2.5.2. Latent phase
    - 2.5.3. Chronic phase
  - 2.6. Clinical laboratory signs
  - 2.7. Definitive host microhabitat finding and ectopic fascioliasis
3. Fascioliasis affecting the central nervous system
  - 3.1. Distribution and frequency of cases reported
  - 3.2. Types of cases reported
4. Intracranial invasion by migrating flukes
  - 4.1. Cerebral fascioliasis
  - 4.2. Flukes in related or close organs
    - 4.2.1. The first reports of a human ocular infection
    - 4.2.2. Recent ocular reports
    - 4.2.3. Other reports
5. Neurologic impact of liver fascioliasis
  - 5.1. Minor and major symptoms
  - 5.2. Polymorphism of neurologic manifestations
    - 5.2.1. Neurologic symptoms described
    - 5.2.2. Accompanying ophthalmologic disorders
    - 5.2.3. Paraclinical examinations
  - 5.3. Physiopathogenic mechanisms
    - 5.3.1. Ectopic localization of a migratory worm
    - 5.3.2. Toxic and allergic-immunological effects on the central nervous system caused by flukes in the liver: hepatic encephalopathy
6. Diagnosis of neurologic fascioliasis
  - 6.1. Clinical and paraclinical diagnosis
  - 6.2. Differential diagnosis from other parasitic infections



- In neurologic fascioliasis caused by direct affection of the central nervous system, main questions to be solved refer to (i) the proportion of *Fasciola* juveniles which may reach an intracranial location, (ii) the route followed for that access, (iii) is there any reason for a juvenile *Fasciola* to undertake a migration until such a distant location of the central nervous system or it is only a consequence of hazard, (iv) whether mature but still small worms may re-enter an ectopic migration from the normal hepatic microhabitat or (v) how and when an immature juvenile may become mature and lay eggs within the brain.

In neurologic fascioliasis related to an indirect affection of the central nervous system caused by *Fasciola* worms in the bile ducts, main questions to be solved refer to (i) why only a small proportion of patients develop such neurologic manifestations if *Fasciola* has a proven specific capacity to modulate the brain at distance, to (ii) whether in several patients in whom indirect important neurologic disorders are found in fact one or more unnoticed migrating juveniles could be in the background of the impressive manifestations observed and thus not all neurologic repercussions be caused by worms in the liver, to (iii) whether a immunological impact on a juvenile *Fasciola* at the occasion of a reinfection in a previously sensitized patient may be in the background, and to whether (iv) the usual reinfection of subjects in high risk human hyperendemic areas may be causing misdiagnosed when not overlooked neurologic cases, perhaps even in relatively high proportions.

Neither direct nor indirect neurologic repercussions of fascioliasis in humans were included in the expert main and most used reviews on the pathology and clinics of this diseases (e.g., [Chen and Mott, 1990](#); [Mas-Coma et al., 1999a, 2000](#)), not even in a review of aberrant forms of human fascioliasis in developed countries ([Arjona et al., 1995](#)), and consequently they were not considered in subsequent local reviews, based on the aforementioned ones, either.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support obtained by Projects No. SAF2006-0927 and No. SAF2010-20805 of the Spanish Ministry of Science and Innovation, Madrid, Spain, and the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales–RICET (Grants No. ISCIII-RETIC-RD06/0021/0017 of the Programme of Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RETICS/FEDER), FIS, Spanish Ministry of Health, Madrid, Spain. Literature search and review partially funded by the Global Burden of Foodborne Disease Initiative of the Department of Food Safety Zoonoses and Foodborne Diseases (FOS) at the World Health Organization (WHO Headquarters Geneva) in relationship with the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG).

## REFERENCES

- AGUIRRE ERRASTI (C.), MERINO ANGULO (J.), FLORES TORRES (M.) & DE LOS RIOS (A.), 1981.- Formas aberrantes de *Fasciola hepatica*. Estudio de dos casos. *Medicina Clínica, Barcelona*, 76 (3): 125-128.
- AHUALLI (A.) & ARIAS (E.), 1961.- *Fasciola hepatica*. *Revista de la Facultad de Medicina de Tucumán*, 3: 105-118.
- AIMARD (G.), HENRY (E.) & NEUSCHWANDER (P.H.), 1984.- Encéphalopathie au cours d'une distomatose. *Revue Neurologique, Paris*, 140 (3): 222-223.
- ARIAS (M.), DAPENA (D.), LEMA (M.) & NOYA (M.), 1986.- Fasciolosis ectópica múltiple: descripción de un caso con afección pulmonar, meningoencefálica y orbitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 4: 250-251.
- ARJONA (R.), RIANCHO (J.A.), AGUADO (J.M.), SALESA (R.) & GONZALEZ-MACIAS (J.), 1995.- Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine, Baltimore*, 74 (1): 13-23.
- AUBERTIN (E.), AUBERTIN (J.) & APARICIO (M.), 1966.- Forme neurologique de la distomatose. *Journal de Médecine de Bordeaux*, 143 (11): 1751-1756.