

**UNIVERSITAT DE  
VALÈNCIA**



**FACULTAT DE  
FARMÀCIA**

---

**T E S I S   D O C T O R A L**

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA  
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

---

**Programa de Doctorado en Enfermedades Infecciosas**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA BIOLOGIA DE LOS  
LYMNAEIDOS VECTORES DE LA FASCIOLIASIS  
HUMANA Y ANIMAL**

por

**ROSMARY FLORES MANCILLA**

**Directores**

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

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

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

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

Valencia, Octubre de 2015



---

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.<sup>a</sup> Dra. MARIA DOLORES BARGUES CASTELLO, Catedrático de Parasitología del citado Departamento, por la presente:

**CERTIFICAN:**

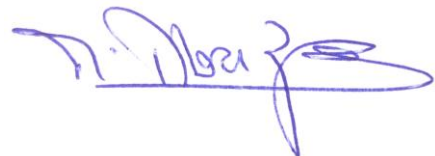
Que Doña ROSMARY FLORES MANCILLA ha realizado íntegramente el trabajo titulado "Estudio Experimental de la Biología de los Lymnaeidos Vectores Principales de la Fascioliasis Humana y Animal" en el laboratorio del Departamento antedicho en la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València bajo su 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 20 de Octubre de 2015



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



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



**FLORES MANCILLA (ROSMARY), 2015.- ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA BIOLOGÍA DE LOS LYMNAEIDOS VECTORES DE LA FASCIOLIASIS HUMANA Y ANIMAL. FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (DIRECTORES: S. MAS-COMA & M.D. BARGUES).**

Fascioliasis is a parasitic disease caused by trematodes of two species of *Fasciola*, *F. hepatica* and *F. gigantica*. This distomatosis has always been considered of great veterinary interest due to the losses it causes in husbandry. Moreover, in the last two decades it has proven to be of high public health importance owing to the human endemic areas known in the Latin America, Europe, Africa and Asia, the increasing number of human case reports, the affection of children, and its great pathogenicity in both the acute and chronic phases, including great morbidity, important sequelae and even patient mortality. Of worldwide distribution, this disease is transmitted by gastropod molluscan vectors of the family Lymnaeidae, presenting strict specificity according to each fasciolid causal agent. Recent studies have demonstrated that this disease is very heterogeneous from the transmission and epidemiological points of view, with different transmission patterns and epidemiological situations related to different lymnaeid vector species showing different capacities of transmission to humans and animals, up to a level in which the lymnaeid vectors may be considered as priority markers to assess the local characteristics of the disease, to ascertain its spreading capacity and to design the control measures appropriate for each endemic area. Given the aforementioned applied importance of lymnaeid snails, the present study aims to contribute new knowledge on the biological characteristics of selected lymnaeid species collected in human and animal fascioliasis areas located in different continents. The lymnaeid species studied belong to different groups of the family Lymnaeidae, including vector species of both fasciolid species and related to completely different transmission patterns and epidemiological situations. All aspects have been analyzed in experimental assays made with lymnaeid species cultured in the laboratory under standard conditions, as to allow for significant comparisons. The experimental results obtained are compared with literature data on the same or similar characteristics if available. Among the phenotypic characteristics studied, emphasis has been given to traits showing usefulness for vector species differentiation, fascioliasis transmission capacity and disease spreading power. Additionally, results obtained prove to be of interest for the design of disease control measures at both local and regional levels.

**Key Words:** Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, humans, livestock, Lymnaeidae, vectors, biological characterization, ethology, selfing, growth, colonization capacity, disease spread.



# INDICE

- AGRADECIMIENTOS .....	9
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
1.1.- Enfermedades transmitida por moluscos, Trematodiasis y Fascioliasis .....	19
1.2.- La problemática de la clasificación de los Lymnaeidos .....	21
1.3.- Situación actual de la Fascioliasis .....	23
1.4.- Importancia y relevancia del estudio .....	25
1.5.- Objetivos .....	29
1.5.1.- Objetivos generales .....	29
1.5.2.- Objetivos específicos .....	30
<b>2.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>33</b>
2.1.- La Fascioliasis .....	35
2.1.1.- Etiología .....	36
2.1.2.- Descripción de la estructura y morfología del parásito causante de la Fascioliasis .....	37
2.1.2.1.- Descripción de la duela .....	37
2.1.2.2.- Descripción de los huevos de Fasciola .....	38
2.1.3.- Descripción del ciclo biológico .....	39
2.1.3.1.- Hospedadores definitivos .....	41
2.1.3.2.- Hospedadores intermediarios o vectores .....	42
2.1.4.- Epidemiología .....	43
2.1.4.1.- Heterogeneidad epidemiológica de la Fascioliasis humana ...	45
2.1.4.2.- Patrones de transmisión .....	46
2.1.5.- Características clínicas de la enfermedad .....	47
2.1.6.- Diagnóstico .....	49
2.1.7.- Tratamiento y profilaxis .....	50
2.2.- Aspectos generales de los Lymnaeidos hospedadores Intermediarios o vectores de la Fascioliasis .....	51
2.2.1.- Filogenia de los Lymnaeidae .....	51
2.2.2.- Descripción general de la estructura y biología de	

los Lymnaeidos .....	53
2.2.2.1.- Descripción de la concha.....	53
2.2.2.2.- Descripción de las partes blandas .....	53
A) Sistema digestivo .....	54
B) Manto del molusco .....	55
C) Sistema excretor .....	56
D) Sistema respiratorio .....	56
E) Sistema circulatorio .....	56
F) Sistema nervioso .....	57
G) Órganos de los sentidos .....	57
2.2.2.3.- Aparato reproductor.....	57
A) Reproducción por cruzamiento.....	59
B) Reproducción por autofecundación .....	59
2.2.3.- Desarrollo post-embionario.....	60
A) Alimentación y hábitat .....	60
2.2.4.- Control de caracoles de agua dulce.....	61
2.2.4.1.- Control cultural.....	61
2.2.4.2.- Control químico.....	61
2.3.- Principales Lymnaeidae transmisores de la Fascioliasis.....	62
2.3.1.- Controversia en la identificación de los Lymnaeidos .....	63
2.3.2.- Importancia de estudiar a los Lymnaeidos por continentes .....	64
2.3.3.- Distribución de los Lymnaeidos principales hospedadores intermediarios de la Fascioliasis.....	66
2.3.3.1.- Distribución en América.....	66
2.3.3.2.- Distribución en Europa .....	69
2.3.3.3.- Distribución en Asia .....	71
2.3.3.4.- Distribución en África.....	73
2.4.- Diferencias epidemiológicas de la Fascioliasis humana por los continentes .....	74
2.4.1.- Asia.....	74
2.4.2.- Oceanía .....	82
2.4.3.- América.....	83
2.4.4.- África.....	86
2.4.5.- Europa .....	86



<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	89
3.1.- Materiales.....	91
3.1.1.- Poblaciones y especies de Lymnaeidos estudiadas .....	91
3.2.- Métodos y técnicas experimentales .....	92
3.2.1.- Recolección de Lymnaeidos en la naturaleza .....	92
3.2.2.- Transporte de Lymnaeidos al laboratorio.....	94
3.2.3.- Verificación de la ausencia de infección .....	95
3.2.4.- Inicio de la adaptación a condiciones experimentales .....	95
3.2.5.- Lanzamiento de los cultivos experimentales.....	96
3.2.6.- Seguimiento cronológico de características a estudiar .....	96
3.3.- Métodos morfométricos de fenotipaje .....	97
3.3.1.- Medición mediante Computer Image Analysis System (CIAS) .....	98
3.3.2.- Conservación de conchas de Lymnaeidos.....	98
3.3.3.- Medición de conchas mediante CIAS .....	99
3.3.4.- Medición de clusters y huevos de Lymnaeidos obtenidos en cultivos puros.....	101
3.3.5.- Métodos estadísticos .....	102
<b>4.- RESULTADOS</b> .....	103
4.1.- Lymnaea sch. P1 .....	105
4.1.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	105
4.1.2.- Estudio de autofecundación.....	106
4.1.3.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	107
4.1.4.- Estudios sobre las primeras puestas .....	108
4.2.- Lymnaea sch. P2 .....	110
4.2.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	110
4.2.2.- Estudio de autofecundación.....	111
4.2.3.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	112
4.2.4.- Estudios sobre las primeras puestas .....	113
4.3.- Lymnaea v. tipo P3 .....	115
4.3.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	115
4.3.2.- Estudio de autofecundación.....	117
4.3.3.- Estudios cronológicos de puestas.....	118
4.3.4.- Estudios cuantitativos de puestas.....	118
4.3.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	119

4.3.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	121
4.4.- <i>Lymnaea</i> v. toro P4 .....	123
4.4.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	123
4.4.2.- Estudio de autofecundación.....	125
4.4.3.- Estudio cronológico de puestas .....	126
4.4.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	126
4.4.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	127
4.4.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	129
4.5.- <i>Lymnaea</i> sw. P5.....	131
4.5.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	131
4.5.2.- Estudio de autofecundación.....	133
4.5.3.- Estudio cronológico de puestas .....	134
4.5.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	134
4.5.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	135
4.5.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	137
4.6.- <i>Lymnaea</i> radix P6 .....	138
4.6.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	138
4.6.2.- Estudio de autofecundación.....	140
4.6.3.- Estudio cronológico de puestas .....	141
4.6.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	141
4.6.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	142
4.6.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	144
4.7.- <i>Lymnaea</i> sp. naua P7.....	145
4.7.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	145
4.7.2.- Estudio de autofecundación.....	147
4.7.3.- Estudio cronológico de puestas .....	148
4.7.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	148
4.7.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	149
4.7.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	151
4.8.- <i>Lymnaea</i> sp. mineria P8.....	152
4.8.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	152
4.8.2.- Estudio de autofecundación.....	154
4.8.3.- Estudio cronológico de puestas .....	155
4.8.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	155
4.8.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	156

4.8.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	158
4.9.- Lymnaea ub. P9 .....	159
4.9.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	159
4.9.2.- Estudio de autofecundación.....	161
4.9.3.- Estudio cronológico de puestas .....	162
4.9.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	162
4.9.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	163
4.9.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos.....	165
<b>5.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>167</b>
5.1.- Análisis morfológico comparado de las poblaciones.....	169
5.1.1.- Caracterización de las conchas .....	169
5.1.2.- Caracterización de los clusters .....	170
5.1.3.- Caracterización de los huevos .....	171
5.2.- Análisis biológico comparado de las poblaciones .....	172
5.2.1.- Caracterización de la autofecundación .....	172
5.2.2.- Caracterización de la cronología de las puestas.....	172
5.2.3.- Caracterización cuantitativa de las puestas .....	173
5.2.4.- Caracterización de la viabilidad de la progenie.....	174
5.3.- Aplicabilidad de los estudios efectuados.....	174
5.3.1.- Interés en sistemática .....	174
5.3.1.1.- Diferenciación de poblaciones y especies .....	176
5.3.2.- Interés en epidemiología y control .....	177
5.3.2.1.- Aspectos relacionados con expansión geográfica.....	178
5.3.2.2.- Aspectos relacionados con epidemias.....	179
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>183</b>
6.1.- Conclusiones.....	185
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>189</b>
<b>8.- PUBLICACIONES POR ORDEN DE RELACIÓN CON EL TEMA DE ESTA MEMORIA .....</b>	<b>225</b>

8.1.- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), FLORES (R.), GLÖER (P.), ROJAS-GARCIA (R.), ASHRAFI (K.), FALKNER (G.) & MAS-COMA (S.), 2011.- *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) (doi:10.1371/journal.pone.0024567).

8.2. - ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), FLORES (R.), URREA (F.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2009. - Presence of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in wild populations of *Galba truncatula*, main vector of fascioliasis in Europe. In: *6th International Symposium on Limnology and Aquatic Birds: Monitoring, Modelling and Management* (Huesca, Spain, 27-30 October 2009), International Society of Limnology (SIL), Pyrenean Institute of Ecology (CSIC), Proceedings: 76-78.

8.3.- AGRAMUNT (V.H.), LATORRE (J.M.), FLORES (R.M.), MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 2012.- Cambios climático y global en la introducción de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas en Europa. *Boletín del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Castellón*, Vol. 4: 20-23.

## **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

La confección de la presente Memoria ha sido posible gracias a la contribución de muchos especialistas en diferentes aspectos tanto de las prospecciones llevadas a cabo en áreas de endemia de Fascioliasis en varios países de diferentes continentes, como en estudios realizados experimentalmente en el laboratorio de la Unidad de Parasitología Sanitaria del Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (WHO CC SPA-37) sobre "Fascioliasis y Sus Caracoles Vectores" y del Centro de Referencia de FAO/Naciones Unidas sobre Enfermedades Parasitarias Zoonóticas de la Universidad de Valencia. Es un verdadero placer proceder, en las líneas que siguen, a enumerarlos a todos y cada uno de ellos.

Tenemos que nombrar en primer lugar 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 a su través. Tuve ya la suerte de poder realizar mi Tesis de Maestría, también sobre vectores, bajo su batuta hace años y darme cuenta de la enorme importancia de los invertebrados en la transmisión, epidemiología y control de las enfermedades parasitarias. La puerta que en su día me abriera el Prof. Mas-Coma 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. No hay palabras para agradecer toda la formación, ayuda y apoyo que el Prof. Mas-Coma no paró de brindarme continuamente a lo largo de los años de desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Que quede aquí patente todo este sentimiento de agradecimiento y respeto que por su valía científica le profeso.

Quisiera manifestar en segundo lugar 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 de Parásitos y Vectores, esencialmente en aspectos moleculares. 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.

Fueron precisamente el Prof. Santiago Mas-Coma y la Prof. María Dolores Bargues quienes recolectaron los caracoles en las distintas áreas de endemia de los varios países en cuestión y que, luego tras transportarlos vivos hasta Valencia, dieron lugar a las adaptaciones y lanzamientos de sendos cultivos experimentales de cada una de las especies que se han podido estudiar en este Tesis Doctoral.

En tercer lugar, quiero hacer una mención especial a la Profesora Titular de Parasitología 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.

El Dr. Messaoud Khoubbane, del mismo Equipo del Departament de Parasitología i Biología Cel·lular, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, merece una referencia especial 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.

Al Dr. Patricio Artigas Bascur queremos agradecerle su inestimable colaboración personal y participación en nuestra formación en métodos y técnicas de laboratorio, 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 Doctoral pudiera llegar a término.

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

Al Prof. Felipe Guhl, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias y Director del Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT) de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, sin cuya ayuda no se hubiese podido recolectar la especie de Lymnaeido procedente de Colombia.

Al Prof. Dr. R.P.V. Jayanthe Rajapakse, Profesor de Parasitología del Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Peradeniya, Sri Lanka, cuya inestimable colaboración tanto en Sri Lanka como durante sus dos estancias en nuestro Centro de Valencia, resultaron decisivas para la obtención de las poblaciones de Lymnaeidos de Sri Lanka.

Al Dr. Antonio Montresor y al Dr. Albis Francesco Gabrielli, ambos Medical Officers, Preventive Chemotherapy and Transmission Control, Department of Control of



Neglected Tropical Diseases, World Health Organization (WHO), Geneva, Suiza, por su participación y colaboración en la expedición a Vietnam que habría de permitir la recolección de las diferentes poblaciones de Lymnaeidos en varias partes de dicho país asiático.

En Irán, nuestro agradecimiento va para el Dr. Gholamreza Mowlavi, Profesor Asociado del Department of Medical Parasitology & Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Teheran, y para el Dr. Keyhan Ashrafi, Profesor Asociado del Department of Medical Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, sin cuya colaboración no se hubiera podido efectuar la expedición al área endémica de Guilán y la recolección de moluscos en la misma.

En Egipto, nuestro reconocimiento va dirigido al Dr. Filippo Curtale, Directorate General for Development Cooperation (DGCS), Ministry of Foreign Affairs, Roma, Italia, al Dr. Mohamed Mostafa Youssef, Director General for Schistosomiasis and Intestinal Parasites Control, Ministry of Health and Population (MoHP), El Cairo, y al Dr. Aly Abd El Wahed El Wakeel, Egyptian Italian Cooperation Coordinator, Schistosomiasis and Intestinal Parasites Control Director, Regional Health Office, MoHP, Damanshour, Behera Governorate. Sus inestimables colaboraciones, pero también la de otros muchos miembros de sus respectivos equipos, resultaron decisivas para el buen desarrollo de las varias expediciones durante las cuales se recolectaron Lymnaeidos en la zona endémica del Delta del Nilo que posteriormente habrían de ser adaptados y cultivados en nuestro Centro de Valencia y ulteriormente permitir la realización de esta Tesis Doctoral.

Y en México, al Prof. Dr. José Lino Zumaquero-Ríos y al Dr. Raúl Rojas- García, ambos del Laboratorio de Parasitología y Vectores, Facultad de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Estado de Puebla, porque su participación y colaboración hubo de posibilitar la recolección de Lymnaeidos en el área de endemia humana de Atlixco.

También, expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros y amigos del laboratorio en el Centro Colaborador de la OMS y Centro de Referencia de FAO/Naciones Unidas en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, muy especialmente a la Dra. Verónica Hernández, Raquel Peixoto, Lucía Mateo, Vivian Chagas, María Irisarri, Sonia Adams, María A. Martínez, Carla Quesada y Alba Cortes por su comprensión, amistad e inestimable ayuda en cualquier ocasión.

Sería imposible realizar tarea alguna, sin la labor del personal del Departament de

Biología Celular I Parasitología de la Universitat de València, el Administrativo D. Clemente Bañuls y la Técnico de Laboratorio Dña. Araceli Terrones por la colaboración brindada, dispuestos a echar una mano en su momento y desde su posición al buen desarrollo de esta Tesis.

A los compañeros del Máster Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales (XIX edición) por los inolvidables momentos y largas horas juntos. A todos y cada uno de ellos, gracias por amenizar el trabajo de laboratorio, por compartir sus experiencias profesionales y personal. Destacar a los Profesores del Máster: Dr. Antonio Marcilla, Dra- María Trelis, Dra. Teresa Galán, Dr. Màrius Fuentes, Dr. Guillermo Esteban, Dra. Carla Muñoz y Rafael Toledo. Gracias por los conocimientos trasmitidos.

Gracias a mi familia, a mis padres Severina y Marcos (*in memóriam*), a mis hermanos Eliza y Wily Marco por tener fe en mí y brindarme su apoyo incondicional a pesar de la distancia. A Avelina Catán, Andrés y Antonio Galindo que me han recibido como uno más de su familia, brindándome su cariño y ayuda incondicional.

Para la realización de esta Tesis Doctoral he tenido la ocasión de contar con una ayuda de la Sociedad Española de Parasitología a través de su Presidente el Prof. Dr. Pablo Díaz Baños de Lugo, para la digitalización de la revista de la sociedad "Research and Reviews in Parasitology" en sus volúmenes del periodo 1991-2000.

Tanto los trabajos de campo efectuados formando parte de expediciones a los países 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 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).

4) 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).

5) 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) y la Activity 2 (Molecular, Genetic and Malacological Characterization of Lymnaeid Snails), 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.



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOLUSCOS, TREMATODIASIS Y FASCIOLIASIS

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria, causada por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) y *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855), conocida durante muchos años, principalmente por las incidencias veterinarias y accidentalmente humanas, hasta la década de los noventa.

Por el escaso número de reportes en personas afectadas en el mundo, esta parasitosis fue considerada una enfermedad secundaria, entre 1970-1990 con 2500 casos (CHEN & MOTT, 1990). Posteriormente los reportes de casos humanos han aumentado en los 5 continentes desde la década de los noventa (OMS, 1995; ESTEBAN et al., 1998), de 2 millones (LAMER et al., 1994; RIM et al., 1994) a 17 millones (HOPKINS, 1992) de personas infectados por *Fasciola*, pasando a ser considerada como una enfermedad parasitaria importante (ASHRAFI & MAS-COMA, 2014).

Es así, que esta trematodiasis comienza a cambiar en la primera década de los noventa, a raíz de los trabajos iniciados por el Equipo de Expertos de la Universidad de Valencia dirigido por el Profesor Santiago Mas-Coma en colaboración con la Schistosomiasis and Other Trematode Infections Unit formando parte del Parasitic Diseases Programme de la Sede Central de la Organización Mundial de la Salud (OMS & OPS, 2007) de Ginebra (Suiza). Por aquel entonces se publicaron descripciones importantes desconocidas relacionadas con áreas de endemia humana, en países como Bolivia y Perú (MAS-COMA, 1996, 1998; MAS-COMA et al., 1999c) o con situaciones peculiares como en la isla francesa de Córcega, en el Mediterráneo occidental. Desde 1974 a 1999, se recopilaron reportes de casos humanos: América (3267), Asia (354), África (487), Europa (2951), y Oceanía (12) (MAS-COMA et al., 1999a).

En el transcurso de estos años, la heterogeneidad detectada en esta trematodiasis ha conllevado la necesidad de una propuesta de nueva clasificación epidemiológica de la Fascioliasis humana:

- Una clasificación epidemiológica distinguiendo las siguientes modalidades: a) casos importados; b) casos autóctonos, aislados y no constantes; c) endémica dentro de la cual se distingue tres tipos de situación: hipoendémica, mesoendémica, y hiperendémica; y d) epidémica, diferenciándose entre

situaciones de epidemia humana en áreas de endemia humana y en áreas de endemia animal (MAS-COMA et al., 1999a, 2009).

- Una serie de patrones diferentes de transmisión dentro de las distintas áreas endémicas humana: 1) patrón a muy alta altitud, típica de Países Andinos y dentro de la cual se distinguen dos sub-patrones: (i) patrón altiplánico de transmisión permanente como en el Altiplano de Bolivia y Perú, (ii) patrón de valle con transmisión estacional como en los valles de Perú; 2) patrón caribeño donde se dan epidemias repetidas como en el caso de Cuba; 3) patrón de zonas de bajas altitudes, como por ejemplo en África mediterránea en el caso de Egipto por el solapamiento existente entre *F. hepatica* y *F. gigantica*; 4) un patrón del Próximo Oriente donde se dan grandes epidemias en situaciones de hipoendemia humanas permanente, como es el caso de Irán; y 5) patrón detectado en Vietnam, en el sudeste de Asia, que concierne las áreas bajas en expansión esencialmente por *F. gigantica* (MAS-COMA, 2005; MAS-COMA et al., 2009b).

Esta repercusión da un nuevo panorama a la enfermedad de la Fascioliasis y se ponen en marcha instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la concerniente a Trematodiasis de Transmisión Alimentaria (TTA), el Medio Ambiente y Desarrollo (MAD), y la referente a las Zoonosis Transmitidas Por Agua. Así como la Fascioliasis pasa a integrarse dentro de las denominadas “Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs) o “Enfermedades Infecciosas Desatendidas (NIDs).

En 2012, las Naciones Unidas (ONU), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS, en la reunión sobre Comida y Agricultura, reporta 80 diferentes especies de trematodos de transmisión alimentaria (CHAI, 2007; FURST et al., 2012). Se calcula que hay unos 56 millones de personas en el mundo que padecen una o varias trematodiasis de transmisión alimentaria y alcanzan su mayor prevalencia en Asia y América Latina (FURST et al., 2012; OMS, 2014). Todas estas comisiones recalcan la importancia indispensable en hacer una revisión sistemática, establecer un orden de prioridad para prevenir y combatir estas enfermedades y llevar a cabo las primeras fases de la planificación de proyectos.

Las especies de trematodos que afectan a los seres humanos a través de la ingesta de plantas son 6 conocidas, dos son exclusivamente hepáticas, *F. hepatica* y *F. gigantica*, y cuatro son especies parasitas del intestino, *Fasciolopsis buski*, *Gastrodiscoides huminis*, *Watsonius watsoni* y *Fischoederius elongatus*, especies conocidas que afectan a los seres humanos (MAS-COMA et al., 2005; 2007 y 2009a; WHO, 2013). Entre las duelas hepáticas, *F. hepatica* se extiende por Europa, Norte,



Centro y Sud América y Oceanía, mientras que *F. gigantica* y *F. hepatica*, se encuentran solapadas en partes de África y Asia (MAS-COMA et al., 2009a).

En la Fascioliasis, la amplitud de hospedadores definitivos es muy extensa, incluyendo desde mamíferos herbívoros como vacunos, ovinos, caprinos, bóvidos, camélidos, marsupiales y también omnívoros. Tras la domesticación de los animales en el transcurso del tiempo, inadvertidamente el hombre se ve involucrado en el ciclo de vida del parásito, conllevando ello su dispersión mundial mediante el transporte de ganado a otras regiones a consecuencia del comercio (BORAY, 1982; CHEN & MOTT, 1990; MAS-COMA & BARGUES, 1997; MAS-COMA et al., 1999, 2005, 2014). Con respecto a la distribución geográfica de la Fascioliasis humana, una extensa lista de países se va sumando a medida que pasan los años, gracias progresivos descubrimientos e investigaciones, todo ello planteando la necesidad de diseñar nuevas medidas en el control de la transmisión de esta enfermedad altamente patógena.

Los hospedadores intermediarios, también denominados vectores según la terminología inglesa, son especies de caracoles dulceacuícolas de la familia Lymnaeidae (Gastropoda: Basommatophora) (MAS-COMA, 2004, 2007; POULIN, 2006). Estos hospedadores intermediarios, así como otros vectores de otras enfermedades, producen una enorme carga económica y social en la población mundial en riesgo.

## 1.2.- LA PROBLEMÁTICA DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS LYMNAEIDOS

La familia Lymnaeidae incluye muchas especies que actúan como hospedadores intermediarios o vectores de numerosas especies de trematodos digénidos. De hecho sirven como hospedadores intermediarios de por lo menos 71 especies de trematodos distribuidos entre 13 familias (DAWES, 1968; BARGUES et al., 2001), incluyendo algunas especies de *Schistosoma* y Echinostomatidae con implicaciones para la salud humana (GRACZYK & FRIED, 1998; HORÁK & KOLÁROVÁ, 2001; WHO, 2013). Sin duda el caso más emblemático de parásitos transmitidos por Lymnaeidos es la Fascioliasis (MAS-COMA & BARGUES, 1997; BARGUES et al., 2001; MAS-COMA et al., 2014a, b).

Los Lymnaeidos están distribuidos por todo el planeta, abarcando desde climas fríos hasta medios calientes. El grupo *Galba/Fossaria* incluye hospedadores intermediarios transmisores de *F. hepatica* (BARGUES et al., 2007a), mientras que el grupo *Radix* es

el principal responsable de transmitir *F. gigantica*. La transmisión de esta última se restringe al África, Próximo Oriente, y sur de la cordillera del Himalaya hasta el lejano Oriente, así como varias islas del Pacífico como las Filipinas y Hawai (GLÖER & MEIER-BROOK, 1998). Existe una superposición de ambas especies y vectores Lymnaeidos en el Este de África y gran parte de Asia (MAS-COMA, 2010). Otros grupos como los Stagnicolinos y *Pseudosuccinea* pueden actuar de hospedadores secundarios en ausencia de especies de representantes de los grupos *Galba/Fossaria* y *Radix* (GLÖER & MEIER-BROOK, 1998; BARGUES et al., 2003, 2011a; MAS-COMA et al., 2014a, b).

En general, un gran número de Lymnaeidos han sido estudiados debido a la importancia del papel que desempeñan como hospedadores intermediarios o vectores de trematodos, si bien para ello resulta necesario un marco filogenético sólido de los Lymnaeidos. Una correcta identificación ayudaría a caracterizar las zonas de riesgo epidemiológico y aumentar la comprensión de la evolución de la interacción mamífero-parásito-Lymnaeido. Por otro lado, estudios sobre el comportamiento de los Lymnaeidos en su hábitat también revelarían ciertas incógnitas, como el tiempo de vida, la capacidad reproductiva de los moluscos, la capacidad de autoreproducirse por ser hermafroditas, el impacto del medio ambiente, la capacidad de supervivencia a las condiciones del medio ambiente y la interacción en un mismo hábitat de dos o más moluscos diferentes dulceacuícolas transmisores de la Fascioliasis y, más aún, donde ambas especies de duelas coexistan en un mismo hábitat.

Ahora bien no todas las especies de Lymnaeidos son igualmente susceptibles al parásito de la Fascioliasis. Tanto los factores extrínsecos (condiciones ambientales de cada zona), como los intrínsecos (estado nutricional, tamaño, madurez sexual, etc.) influyen en el rol de cada especie como vector.

Los estudios morfométricos de la concha son una herramienta complementaria para poder definir las especies de Lymnaeidos. La estructura anatómica, como los órganos reproductivos resultaron ser de mucho valor taxonómico en el pasado, encontrándose 11 especies de Lymnaeidos en el continente europeo (JACKIEWICZ, 1998). La rádula de los Lymnaeidos carece de valor diagnóstico para identificar especies, aunque algunas diferencias pueden encontrarse en el número y tamaño de la cúspide de los dientes laterales. Así hay muchos problemas en la clasificación de especímenes, sobre todo relacionados con especies de grupo *Radix*, *Galba/Fossaria* y otros.

Con todo lo antedicho, las herramientas moleculares parecen estar en la vanguardia en la determinación de los patrones de transmisión, las fuentes de infección humana y animal, y las situaciones epidemiológicas, así como para el establecimiento de las

estrategias globales correspondientes y las medidas locales de control. La magnitud que ha alcanzado estas técnicas moleculares para la caracterización genética de las especies, a través de la expresión génica, la base para los análisis fenotípicos de la amplia gama de enfermedades que aquejan a los seres humanos y en general seres vivos. Es así como los trematodos Fasciólidos y los caracoles Lymnaeidos están siendo de una gran ayuda al esclarecimiento de la epidemiología, la transmisión, la adaptación al medio ambiente y el control de la Fascioliasis.

Es importante recordar, si bien es ampliamente conocido, que la infección por parásitos trematodos provoca daños en los moluscos hospedadores intermediarios. Algunos autores han mostrado como estos parásitos llegan a disminuir la supervivencia y la fecundidad de los moluscos, incluso castrando a los caracoles (ANDERSON & CROMBIE, 1984; MINCHELLA, 1985; WOOLHOUSE & CHANDIWANA, 1989), y al mismo tiempo, induciendo un rápido crecimiento corporal del Lymnaeido (JONGBRINK, 1990), así como una diferencia en la producción de huevos durante el ciclo de vida de moluscos expuestos al parásito (GUTIERREZ et al., 2000).

### **1.3.- SITUACIÓN ACTUAL DE LA FASCIOLIASIS**

En Europa, es concretamente Francia el país que reporta más datos sobre la Fascioliasis humana. Ya entre 1950 y 1983 reportaron un total de 3297 casos (GAILLET et al., 1983), pero en otro informe en tan sólo 9 hospitales entre 1970 y 1982 se registraron 5863 casos (DANIS et al., 1985), lo que revela la poca importancia que se le daba en esos tiempos a esta enfermedad. En Portugal si bien la Fascioliasis animal está extendida de Norte a Sur, los casos humanos son escasos. En 1991 en los meses de Febrero y Marzo, se informaron 190 casos, indicando probable infección en Noviembre del año anterior (ROMBERT & GRÁCIO, 1990; ROMBERT et al., 1991). La zona de Oporto, también en Portugal, fue un área marcada como endémica entre 1970 y 1992, donde se notificaron 1011 casos diagnosticados (SAMPAIO-SILVA et al., 1996). Otro país que parece ser subestimado es España, con una distribución en la zona norte con casos importados (SORRIBES et al., 1990; TURRIENTES et al., 2004), mientras en las zonas templadas y meridionales de España, como también de Francia, han sido habituales los pequeños brotes (MILLES et al., 2002).

América y Asia son dos continentes que presentan una complejidad preocupante, por los casos de trematodiasis transmitida por los alimentos. Se estima que más del 10% de la población mundial esta potencialmente en riesgo de trematodiasis

transmitida por los alimentos y más de 100 millones de personas están infectadas con una o más parásitos de esta índole (KHURANA & MALLA, 2014). Si en 2005 había 56 millones de personas infectadas y más de 7000 habían muerto a causa de la infección por trematodos de transmisión alimentaria, hoy se estiman 50 millones infectados por trematodos de los cuales, 17 millones infectados por *Fasciola* sp. (FÜRST et al., 2012; WHO, 2013) a nivel global.

En Asia, las zonas con más reportes humanos son los países del Próximo Oriente, como es el caso de Irán y Turquía, con importantes epidemias durante la década de los 80 y 90 y recientemente con otros informes aludiendo a casos humanos (MASSOUD, 1990; ASHRAFI et al., 2004; MOGHADDAM et al., 2004). De igual manera en Turquía, se han descrito situaciones con prevalencias de 1,8% (YILMAZ & GÖDEKMERDAN, 2004). En otros países asiáticos como Japón y Corea los casos son en cambio esporádicos. Al Norte y Noreste de la India, la situación se ha limitado a unos pocos casos con hallazgos accidentales clínicos, sin que haya datos concretos sobre la situación general en cuanto a su prevalencia (RAMACHANDRAN et al., 2012).

También en Asia, la situación de Pakistán resalta por la existencia de formas intermedias de Fasciolidos (AFSHAN et al., 2014b), lo que recuerda la situación previamente descrita en Egipto, en el Norte de África (PERIAGO, 2006; MAS-COMA et al., 2009b). Por otro lado, existe una situación de desconocimiento en países como Sri Lanka, Malasia y otras islas entre el Océano Índico y Océano Pacífico, mientras que en países como China, Tailandia, Filipinas, Indonesia, India y Japón se informa del hallazgo de duelas con formas grandes y pequeñas.

En Vietnam, la situación durante los últimos años es de lo más singular, con únicamente dos casos reportados en todo el siglo pasado hasta 1998, cuando comienza un incremento progresivo incesante de casos que pasa por unos 500 pacientes en 2001 (TRAN et al., 2001; DE et al., 2003; MAS-COMA et al., 2007), paralelo a prevalencias entre el 28% y el 50% en el ganado en que destaca al búfalo en el Norte de Vietnam (BUI et al., 2003; GEURDEN et al., 2008), hasta valores anuales mayores en años recientes (NGUYEN et al., 2011). Sin embargo, hay poca información disponible sobre caracoles Lymnaeidos existentes en la zona endémica, restringida esencialmente a las dos especies *Lymnaea viridis* y *Lymnaea swinhoi* con parasitaciones naturales de 0,95% y 0,62%, respectivamente (PHAM & PHAN, 2000). Estos valores pueden estar subestimados y todavía no están claros del todo puesto que cada caracol puede emitir hasta 4 mil metacercarias (ANDREW, 1999). Es de resaltar que existen grandes cultivos de arroz en toda la zona vietnamita, al igual que es común en varios países de Asia desde hace miles de años, junto con el habitual uso

de los animales para arar los campos de arroz es un punto de inflexión. Ello sugiere que estos hábitats pueden presentar un mayor potencial de riesgo de infección para los seres humanos (NGUYEN et al., 2012).

En América del Sur, la Fascioliasis se extiende desde el extremo Norte de Colombia y Venezuela hasta el extremo Sur de Chile y Argentina. Perú es sin duda el país más afectado, con muchos casos humanos y una gran extensión de las áreas de endemia humana (ESTEBAN et al., 2002; MARCOS & TERASHIMA, 2007; GONZÁLEZ et al., 2011). Entre las áreas donde la Fascioliasis humana es hiperendémica, el Altiplano Norte Boliviano muestra las más altas prevalencias de hasta el 72% por coprología y el 100% por serología en algunas comunidades estudiadas (HILLYER et al., 1992; MAS-COMA et al., 1995; ESTEBAN et al., 1997a; MAS-COMA et al., 1999c) y con una intensidad entre 5000 a 8000 huevos por gramos de heces (hpg) en niños (ESTEBAN et al., 1997b; MAS-COMA et al., 2009b). Hay pocos casos humanos reportados en Uruguay y Brasil (MAS-COMA et al., 1999b), y del mismo modo en Chile y Argentina (APT et al., 1988, 1992; ARTIGAS et al., 2011; MERA & SIERRA et al., 2011). En Cuba anualmente se diagnostican casos humanos en forma de brotes o casos esporádicos desde 1931 hasta hoy (MARTÍNEZ et al., 2012). En México, aparece de forma esporádica en los últimos años (ALVARES et al., 1992; VAZQUEZ et al., 2007), si bien recientemente se ha descrito un área de endemia humana con prevalencias locales de tipo hiperendemia humana y que sugiere que la situación en este país está subestimada (ZUMAQUERO et al., 2012). En países como Colombia la Fascioliasis humana es poco común, habiéndose informado prevalencias humanas en Quindío del 0,38% (RECALDE-REYES et al., 2014) y en el ganado un 90% de infección (CANO & VELASQUEZ, 2004).

#### **1.4.- IMPORTANCIA Y RELEVANCIA DEL ESTUDIO**

Los conceptos sobre Fascioliasis humana han cambiado completamente en los últimos años, esencialmente a raíz de los estudios efectuados por el equipo del Centro Colaborador de la OMS en Valencia en América Latina, África y Asia. Así, son de destacar los nuevos conocimientos que indican que la Fascioliasis muestra diferentes fases dentro de una enorme complejidad de transmisión y epidemiología, que a su vez se traslada a unas muy pronunciadas dificultades en lucha y control al tener que considerar diferentes escenarios según las diferentes regiones, zonas y áreas de

endemia. El conjunto vislumbra un cuadro global que recuerda la problemática de la Malaria a lo amplio de todo el mundo.

En este sentido, uno de los nuevos conocimientos más significativos estriba en las relaciones demostradas entre los patrones de transmisión y las situaciones de epidemiología de la enfermedad con las especies de Lymnaeidos vectores involucradas. Estas relaciones delinean una gran heterogeneidad, incluso dentro de un mismo país (BARGUES et al., 2011). A destacar, además, que todo ello se ve aumentando en cuanto a complejidad debido a los impactos que el cambio climático y el cambio global ejercen sobre la Fascioliasis, los estadios larvarios del parásito, los moluscos vectores y los estadios adultos dentro de los animales reservorios, en mayor o menor grado según los diferentes lugares, latitudes y altitudes.

Características específicas como la velocidad de crecimiento y maduración de una especie, así como la dinámica poblacional de la misma, incluyendo una, dos o más generaciones al año según las características de cada especie según su crecimiento y maduración, habrán de ser fundamentales para permitir uno u otro patrón de transmisión de la enfermedad, tales como transmisión permanente todo el año, transmisión monoestacional o transmisión biestacional.

Las características antedichas la velocidad de crecimiento y maduración de una especie, pero esencialmente la capacidad reproductiva, y sobre todo la capacidad de autofecundación, a partir de cuándo y hasta cuando a lo largo de la vida de la especie de Lymnaeido, resultan ser elementos de gran valor con respecto a tres aspectos cruciales para la enfermedad:

- (i) Una precocidad en efectuar puestas, unida a una gran producción de clusters y alto número de huevos por cluster y unidad de tiempo, son factores primordiales para una especie vectora capaz de participar y permitir la aparición de epidemias después de un evento catastrófico ya sea climático (huracanes, tifones, inundaciones, etc.), ya sea antropogénico (construcción de embalses y canalizaciones de regadío, irrigación estacional de campos de cultivo, etc.);
- (ii) Una gran capacidad de autofecundación facilita enormemente la capacidad de difusión geográfica de la enfermedad, dado que el transporte pasiva de un único individuo a un lugar diferente, más o menos distante, resulta más que suficiente para rápidamente disparar una nueva población de vectores colonizadores del nuevo hábitat y, consecuentemente, la posibilidad de que la enfermedad amplíe su distribución geográfica a ese nuevo enclave o área; dicho transporte pasivo plantea el gran problema de poder tener lugar en muy

poco espacio de tiempo y debido tanto a factores naturales como a factores ligados al comportamiento humano; así, un incremento de lluvias entraña la subida de los márgenes de los ríos y el consiguiente arrastre de individuos de Lymnaeidos cuenca bajo, permitiendo la expansión geográfica; algo parecido sucede cuando se abren las compuertas de los canales de irrigación; también es de importante consideración el transporte pasivo de individuos de Lymnaeidos adheridos a las patas de animales domésticos tanto ganado (ovino, bovino, caprino, etc.) en el pastoreo como animales de carga (caballos, asnos, camellos, dromedarios, etc.) utilizados para el transporte de todo tipo de enseres; ni que decir tiene que el transporte pasivo de Lymnaeidos pueda tener lugar también por animales silvestres y, más aún, por aves, en un fenómeno de transporte conducente a ampliación de distribución geográfica de la especie de caracol y consecuentemente también de la enfermedad (al transportarse las Fasciolas infectando a los animales domésticos antedichos, que evidentemente no por las aves) que a veces incluso representa transporte entre diferentes continentes por aves migratorias, al igual que por importación/exportación de ganado entre diferentes países (MAS-COMA et al., 2009);

- (iii) En lo concerniente al punto anterior, cabe hacer hincapié en que especies con capacidad de autofecundación y además gran capacidad de puesta son aquellas que más antropófilas se muestran, al ser aquellas capaces de aprovechar mejor el transporte pasivo ligado al manejo del ganado y animales de carga por parte del hombre; el caso de *Galba truncatula* es un perfecto ejemplo (BARGUES et al., 2011); son además estas especies más antropófilas, aquellas que son precisamente las especies de Lymnaeidos próximas al hombre y consecuentemente las que suelen estar ligadas a la transmisión de la fascioliasis humana y animal.

Los antedichos aspectos, reconocidos por su gran importancia en la Fascioliasis en la actualidad, siempre habían sido considerados muy secundariamente en análisis sobre transmisión y epidemiología de la Fascioliasis, por lo menos hasta el año 2003 (MAS-COMA et al., 2003). Hoy en día, estos aspectos han cobrado más relieve aún si cabe por los efectos ya indudables del cambio climático (esencialmente modificaciones de temperatura y pluviometría) y del cambio global (incluyendo tanto modificaciones antropogénicas del medio como los regadíos, etc., como el incremento de viajes en emigración/inmigración y la exportación/importación de ganado).

Desgraciadamente, los estudios sobre las características vitales de diferentes espe-

cies de Lymnaeidos desde los puntos de vista antes anotados han sido escasísimos y en muchas especies de Lymnaeidos brillan por su total ausencia. La explicación de esta falta de conocimiento sobre aspectos tan cruciales puede resultar sorprendente a primera vista, pero pasa a entenderse fácilmente con solamente pensar en los muy largos periodos de muchos meses de experimentación necesarios para poder sacar conclusiones significativas, en las enormes dificultades y costes económicos excesivos ligados al cultivo experimental de los Lymnaeidos y disponibilidad de cámaras climáticas de alta sensibilidad y rendimiento, así como también la gran dificultad de poder tener vivas tantas diferentes especies de diferentes continentes y además la necesidad de poder hacer los estudios experimentales bajo las mismas condiciones estandarizadas que permitan obtener resultados significativos. Nuestro estudio es, pues, en este sentido, relativamente pionero en su finalidad y objetivos.

Los comentarios anteriores destacan la importancia de los Lymnaeidos vectores en la Fascioliasis y la importancia en distinguir cual especie o cuales especies están involucradas en la transmisión de la enfermedad en una determinada área de endemia. Desgraciadamente, la identificación de los Lymnaeidos mediante métodos malacológicos tradicionales como son la morfología y las dimensiones de la coquilla y las características de la morfoanatomía interna, esencialmente la perteneciente al aparato genital, es en general de poca utilidad para la clasificación de especímenes, dada la gran variabilidad intraespecífica de todas estas características fenotípicas. Estas pronunciadas dificultades de clasificación de especímenes se dan precisamente dentro de los dos géneros de mayor importancia en la transmisión de la Fascioliasis: el grupo conflictivo *Galba/Fossaria* que incluye las especies vectoras por excelencia de la especie *F. hepatica* en Europa, América, África, Asia y Oceanía, y el otro grupo conflictivo *Radix*, que incluye las especies transmisoras de *F. gigantica* en África y Asia.

En los años recientes, concretamente a partir del primer artículo de BARGUES et al. (2001), irrumpen las técnicas de biología Molecular, entre las cuales la secuenciación nucleotídicas de marcadores del ADN ribosomal nuclear y del ADN mitocondrial vienen a demostrar hasta qué punto los malacólogos se equivocan en las clasificaciones de las especies de esta familia de moluscos gasterópodos. Un buen ejemplo es Venezuela, donde malacólogos expertos habían trabajado durante muchos años y publicando varios artículos esgrimiendo siempre la única presencia de sólo 2 especies distintas, hasta la llegada del equipo del Centro Colaborador de



la OMS que vino a demostrar que en realidad había 6 especies diferentes de Lymnaeidos (BARGUES et al., 2011).

No obstante, es evidente que no se puede exigir a los responsables en salud encargados de los programas de control de la enfermedad que se dediquen a secuenciar el ADN de cada espécimen de Lymnaeido que encuentren en el área de endemia. Ello es impracticable y excesivamente costoso desde el punto de vista económico. Hay, pues, que procurar proporcionar a dichos responsables las herramientas necesarias para la distinción de especies en cada zona de endemia en la que trabajan. Estas herramientas tienen que ser sencillas, fáciles de realizar en el laboratorio con un simple microscopio calibrado.

Nuestro estudio tiene por finalidad, también, contribuir en este último sentido mediante la caracterización fenotípica de la variabilidad intraespecífica de los clusters y de los huevos de cada una de las especies objeto de estudio en la presente Memoria y al subsiguiente análisis comparado con el fin de aportar nuevos marcadores que ayuden a facilitar la dilucidación de especies en estos dos grupos conflictivos.

## **1.5.- OBJETIVOS**

### **1.5.1.- OBJETIVO GENERAL**

Para los fines científicos antes mencionados, el objetivo general de nuestro trabajo es la caracterización biológica de los aspectos del desarrollo de los Lymnaeidos que incidan en las capacidades de modificación de los patrones de transmisión y situaciones epidemiológicas y/o dispersión de la Fascioliasis humana y animal, y además aportar nuevas herramientas fenotípicas a nivel de adulto, clusters y huevos que pueda ser de ayuda adicional en la clasificación de especímenes dentro de géneros conflictivos sistemática- y taxonómicamente, así como también a estudios de dinámica poblacional de estos moluscos vectores. Para tener un alcance más amplio, para la realización de los estudios y obtención de conclusiones del máximo interés se seleccionaron diferentes especies de Lymnaeidos representando los tres géneros de mayor importancia en la transmisión de esta enfermedad: el género *Galba/Fossaria*, el género *Radix* y el género *Pseudosuccinea*. El origen de las poblaciones experimentalmente estudiadas fue a partir de áreas endémicas de Fascioliasis, incluyendo América, Asia, Europa y África.

### 1.5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para el objetivo general antedicho, se diseñaron un total de 5 objetivos específicos concretos:

A) Estudio cronológico del crecimiento de la concha: Este estudio se ha realizado desde el mismo momento del nacimiento de cada individuo a partir del huevo eclosionado, mediante un seguimiento periódico de individuos de cada especie debidamente aislados y bajo condiciones standard idénticas de temperatura, humedad relativa y horario día/noche, con alimentación apropiada al libitum, y digitalización de los especímenes para fenotipaje morfométrico mediante Computer Image Analysis System (CIAS). Este fenotipaje permite el establecimiento de la variabilidad intraespecífica de la morfometría de la concha del adulto de cada especie y consecuentemente la posible distinción de especies entre ellas, además de permitir dilucidar cuantas generaciones de cada especie se dan anualmente en el área de endemia en cuestión y por tanto la dinámica poblacional de cada Lymnaeido.

B) Estudio cronológico de la autofecundación: La detección de la capacidad de autofecundación de cada especie en cuestión se ha efectuado por aislamiento de los especímenes vivos inmediatamente a partir del momento de su nacimiento por eclosión del huevo. Cada espécimen ha sido seguido periódicamente para establecer si era capaz de producir clusters de huevos, a partir de qué momento de su vida y hasta que momento de la misma. Esta característica se antoja crucial para dilucidar cuales especies están más o menos ligadas a epidemias y a la colonización de nuevos lugares.

C) Capacidad de puesta y estudio cronológico de las puestas, incluyendo número y emisión de los clusters según el tiempo, además de establecimiento de la duración del periodo de puesta y el número total de puestas por espécimen, y el número de huevos por cluster a lo largo del tiempo.

D) Características morfométricas de los clusters, incluyendo forma y tamaño de los clusters, su variación a lo largo del tiempo y el establecimiento de los rangos de variabilidad intraespecífica, todo ello con vistas a su utilidad en la diferenciación de especies y por tanto en sistemática.

E) Características morfométricas de los huevos, incluyendo forma y tamaño de los huevos, y el establecimiento de los rangos de variabilidad intraespecífica, también con vistas a su utilidad en la diferenciación de especies y por tanto en sistemática.

F) Análisis comparado de los todos los resultados fenotípicos y biológicos antedichos con el fin de dilucidar su utilidad como herramientas en estudios de clasificación de especímenes y trabajos de índole epidemiológica y de control de la enfermedad.

Para los objetivos generales y específicos antes citados, hemos organizado la exposición de la presente Memoria en 8 diferentes capítulos. En el Primer Capítulo de la Introducción se expone un resumen de las enfermedades transmitidas por moluscos, con énfasis en las Trematodiasis y muy especialmente en la Fascioliasis por ser el objeto de nuestro estudio, así como también un análisis de la problemática de la clasificación de los Lymnaeidos hoy en día, y finalmente una sucinta visión de la situación actual de la Fascioliasis. La importancia y relevancia de nuestro estudio preceden a la enumeración del objetivo general y los objetivos específicos de nuestro trabajo y la presente Memoria.

A continuación 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 la descripción de la estructura y morfología del parásito adulto y sus huevos, seguido de (ii) una exposición del ciclo, la epidemiología y la transmisión de la Fascioliasis humana, y breves reseñas sobre clínica, diagnóstico, tratamiento y profilaxis. A continuación tratamos (iii) los aspectos generales de los Lymnaeidos hospedadores intermediarios o vectores de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, incluyendo descripciones de su concha y de sus partes blandas, además de referencia a (iv) el control de estos importantes caracoles en salud. El capítulo se continua con (v) el análisis de los principales Lymnaeidae transmisores de la Fascioliasis y la trascendencia de su estudio, (vi) diferenciando según continentes y luego estableciendo (vii) las diferencias epidemiológicas de la Fascioliasis humana en Asia, Oceanía, América, África y Europa.

El Tercer Capítulo incluye los aspectos de Material y Métodos. En este capítulo se aborda, dentro del apartado de Materiales, las prospecciones realizadas en los diferentes continentes para la recolección de especímenes de Lymnaeidos en zonas de endemia de Fascioliasis y las poblaciones y especies de Lymnaeidos que hemos utilizado para nuestros estudios. La obtención de especímenes de Lymnaeidos por cultivo en el laboratorio forma la parte final de este subcapítulo. Los métodos de cultivo de especímenes vivos, mediante cámaras climáticas y surtido de alimentación estandarizada, ha sido una parte esencial de nuestro trabajo. Las técnicas y métodos empleados para nuestros varios y diferentes estudios experimentales, comprendiendo

los métodos morfométricos de fenotipaje mediante CIAS (Computer Image Analysis System), culminan este capítulo.

El Cuarto Capítulo se destina a la exposición de los Resultados, distinguiendo según resultados pormenorizados obtenidos para cada uno de los tipos de estudios experimentales efectuados sobre la biología de las diferentes especies de Lymnaeidos en cuestión. Dentro de cada uno de estos apartados, distinguimos además según cada una de las especies siguiendo siempre un mismo orden de exposición.

El Capítulo Quinto se dedica a la Discusión, comprendiendo los apartados de estudios de cada uno de los aspectos biológicos y fenotípicos estudiados, mediante análisis comparado entre las diferentes especies sometidas a estudio experimental. Este es además el capítulo destinado a la comparación de nuestros resultados con los obtenidos sobre los mismos o semejantes aspectos por otros autores y disponibles en la bibliografía.

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, en la que también incluimos una actualización de las publicaciones del Centro Colaborador de la OMS y del Centro de Referencia de FAO/Naciones Unidas de Valencia sobre Fascioliasis y sus moluscos vectores. Y por último, se procede a incluir un Octavo Capítulo para adjuntar las publicaciones efectuadas por la Doctoranda de la presente Memoria durante su periodo de formación en Doctorado y de investigación en el campo de la Fascioliasis, sus Lymnaeidos transmisores y otros vectores.

## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**



## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- LA FASCIOLIASIS

En las infecciones humanas se han registrado más de 80 especies diferentes de trematodos digénidos transmitidos por los alimentos (CHAI, 2007; OMS, 2008). A nivel mundial, alrededor de 56 millones de personas estaban infectadas con trematodos transmitidas por los alimentos (incluyendo la Fascioliasis), en 2005, con casi 8 millones que presentan secuelas graves y otros 7 millones habiendo fallecido (FÜRST et al., 2012).

La fascioliasis ocasionada por especies de Trematodos hepáticos del género *Fasciola*, ha demostrado que es un importante problema de salud pública (CHEN & MOTT, 1990; WHO, 1995; MAS-COMA et al., 1995; MAS-COMA & BARGUES, 1996; MAS-COMA et al., 1999b, 2005, 2007; MAS-COMA et al., 2014a, b), con *F. hepatica* distribuido por todo el mundo y *F. gigantica* limitada a África y Asia (MAS-COMA, 2004).

Muchas especies de animales domésticos y algún otro animal silvestre albergan el parásito en su forma adulta. Para adquirir esta enfermedad hay que ingerir hojas de berros y otras vegetales en contacto con el agua de las praderas, que es donde se encuentra la metacercaria adherida, procedente de una serie de moluscos hospedadores intermediarios.

Es importante mencionar la distribución de los Trematodos pertenecientes al género *Fasciola* y moluscos dulceacuícolas Lymnaeidos, desde grandes altitudes, a 3500-4200 m s. n. m. en las regiones Andinas de Bolivia y Perú, hasta los -27 metros por debajo del nivel del mar (MAS-COMA et al., 1999b, MAS-COMA et al., 2001), evidenciando así la gran capacidad de adaptación del parásito y el hospedador intermediario.

De igual manera esta parasitosis perjudica al ámbito veterinario, afectando a las ovejas, cabras, bovino y demás el ganado, principalmente en los conductos biliares, donde las secuelas patogénicas más importantes son las lesiones y la fibrosis hepática y la inflamación crónica de las vías biliares (MAS-COMA et al., 1999a, 2005). Por tanto la Fascioliasis además de ser una zoonosis parasitaria producida por el trematodo, según la dinámica de transmisión se considera una zooantroponosis puesto que es común en animales herbívoros y puede ser adquirida por el hombre (BECERRIL, 2014).

Por ser procesos dinámicos y cambiantes, el comportamiento de la transmisión de esta enfermedad está fuertemente influenciado por la altitud, la temperatura, la humedad relativa y la pluviosidad. En escenarios con desigualdades se reflejan en las condiciones y la calidad de vida de las poblaciones más afectadas. Por ello la aparición de la Fasciolosis parece ser en parte relacionada con el cambio climático, donde las modificaciones antropogénicas principalmente del medio ambiente han aumentado el rango geográfico de los hospedadores intermediarios (caracoles dulceacuícolas) y la ganadería (OMS, 1995; MAS-COMA et al., 2009). La Organización Mundial de la Salud incluye la Fasciolosis humana en su lista de prioridades entre las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD - NTD en inglés) (OMS, 2008).

### 2.1.1.- ETIOLOGÍA

Los agentes etiológicos de la Fascioliasis son dos: la *Fasciola hepatica* y la *Fasciola gigantica*, Trematodos que se localizan en los canalículos biliares.

Jean de Brie en 1379 describe en Francia por primera vez a la *F. hepatica*, en 1760 Pallas reporta el primer caso en humanos y en 1758 Carlos Linnaeus dio a este Trematodo el nombre genérico de *Fasciola*. En 1883, Leuckart en Alemania y Thomas, en Inglaterra, describieron el ciclo biológico. En el transcurso de esos años también se reportaron que los hospedadores definitivos de esta parasitosis eran los borregos. Fue en 1914 cuando Dimitri Sinitri logró completar el ciclo biológico de la Fasciolosis identificando su ubicación final en huésped definitivo y la respectiva emisión de huevos por las heces (BECERRIL, 2014).

La *Fasciola gigantica* fue descrita por primera vez por Cobbold en 1855 en una muestra obtenida de una jirafa con destino a Inglaterra. En 1895 encontraron duelas en una matanza de ganados en Senegal, África, y fue Railliet quien describe bajo el nombre de *Fasciola hepatica augusta* y en Egipto es descrito por Loos en ganado y búfalos dándole el nombre de *Distomum hepaticum* var. *aegyptiaca*. Esta subespecie es considerada por hoy como idéntica a *F. gigantica* (ALICATA, 1938). Cabe comentar que entre 1892 y 1894 se recolectaron duelas en ovejas y caballos en Honolulu, identificándose como *F. hepatica* aunque luego este error fue rectificado (ALICATA, 1938).

Los agentes causales la fascioliasis se clasifican como:

Phylum: Platyhelminthes  
SuperClase: Trematoda (Van Beneden, 1858)  
Clase: Digenea



Superorden: Anepitheliocystidia (La Rue, 1957)  
Orden: Echinostomatida  
Suborden: Prosostomata (Odhner, 1905)  
Familia: Fasciolidae (Railliet, 1895)  
Subfamilia: Fasciolinae (Stiles & Hassal, 1898)  
Género: *Fasciola* (Linnaeus, 1758)  
Especie: *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

Europa es desde donde se difundió la *F. hepatica* (BARGUES et al., 2011a), hasta llegar a circular el parásito a nivel mundial gracias el comercio ganadero, así como también los caracoles vectores en sus pezuñas. La *F. gigantica* se transmite en África y Asia y y algunas islas del pacífico (BARGUES et al., 2011a).

## **2.1.2.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO CAUSANTE DE LA FASCIOLIASIS**

### **2.1.2.1.- DESCRIPCIÓN DE LA DUELA**

La *F. hepatica* es un helminto de cuerpo ancho y aplanado dorsoventralmente en forma de hoja que mide 2,9 cm x 1,4 cm, gris claro, opaco, con dos bandas laterales más oscuras. En la parte anterior del cuerpo existe una proyección cónica seguida de un par hombros a los lados que convergen caudalmente. La *F. gigantica* es más grande, alcanzando 5,2 cm x 1,2 cm, además de ser más larga y estrecha, con los ciegos más ramificados, principalmente aquellos hacia la línea media del cuerpo, y las ramas del ovario más numerosos y con el cono apical más pequeño (MAS-COMA et al., 2014a, b).

Especímenes híbridas podrían dar lugar a formas intermedias en aquellas áreas endémicas donde las dos especies están superpuestas (MAS-COMA et al., 2009a, 2014; MARTÍNEZ et al., 2012).

El parásito adulto ubicado en los canales biliares del hospedador definitivo, ya sea un mamífero o humano, posee dos ventosas muy próximas, una ventosa oral y una ventosa ventral o acetábulo; ésta es más grande y se sitúa a nivel de la parte alargada del cuerpo a la altura de los hombros, que le sirve para fijarse. Los órganos internos como el aparato digestivo y reproductor son muy ramificados.

La duela ingiere sangre y desechos tisulares provocados al desgarrar el epitelio superficial del conducto biliar hipertrofiado del hospedador. El alimento pasa desde la boca a través de una faringe corta y muscular a un esófago y después a un intestino

que se divide espacialmente en dos ciegos, que son largos y ramificados con numerosos divertículos laterales, característica que está relacionada con la forma de alimentación del parásito, que es hematófago. Estos parásitos también son hermafroditas, al poseer órganos masculinos y femeninos.

El aparato reproductor masculino se compone de dos testículos muy ramificados, que ocupan la parte media corporal, con canal eferente, canal deferente y un cirro bien desarrollado. La bolsa del cirro (órgano copulador) incluye también a la próstata y la vesícula seminal. El aparato reproductor femenino consta de un ovario y un corto útero localizados anteriormente a los testículos. Las glándulas vitelógenas, formadas por finos folículos ramificados, ocupan los márgenes laterales del trematodo. Los conductos de los folículos se unen formando dos conductos transversales que drenan en la glándula de Mehlis, desde la cual comunican con el ootipo. El útero se encuentra delante de los testículos (KASSAI, 1998; MAS-COMA et al., 2014a, b).

El sistema nervioso es sencillo, el esófago está rodeado de fibras y ganglios, los cuales se dirigen hacia adelante y atrás descendiendo por cada lado a los diversos órganos (LEVINE, 1978; KASSAI, 1998).

El tegumento está cubierto por numerosas espinas epidérmicas dirigidas hacia atrás, más abundantes en la porción ventral o anterior del helminto, en la que se localiza la ventosa ventral. La cubierta superficial del tegumento, denominada glucocáliz, que aparentemente protege al parásito contra el sistema de defensa del hospedador, se mantiene en las fases juveniles, durante toda su migración a través de la cavidad peritoneal y el hígado, hasta que llega a un medio ambiente relativamente seguro en los conductos biliares (EUZEBY, 2001; CARRADA-BRAVO & ESCAMILLA, 2005; MAS-COMA et al., 2007).

### **2.1.2.2.- DESCRIPCIÓN DE LOS HUEVOS DE *FASCIOLA***

Los huevos de *F. hepatica* y *F. gigantica* tienen doble cubierta, son ovoides, amarillos, operculados y no embrionados cuando son eliminados con las heces. Tradicionalmente se ha dicho que el huevo de la *F. hepatica* mide aproximadamente entre 130 a 150 x 60 a 90  $\mu\text{m}$ , pueden ser observados por la lupa (SOULSBY, 1982; MARTÍNEZ et al., 2012; ROMERO, 1999; BECERRIL, 2014) y que los huevos de *F. gigantica* presentan igual aspecto sólo que miden entre 156 a 197  $\mu\text{m}$  y podría haber diferencias imperceptibles. Sin embargo, unos estudios exhaustivos de nuestro equipo han demostrado que estos conocimientos estaban lejos de la realidad. Así, un estudio

amplio mundial ha demostrado que la variabilidad de los huevos de cada una de estas dos especies difiere según el hospedador definitivo en cuestión y que además hay diferencias evidentes entre los que eliminan los animales y los que eliminan los humanos, con lo que las dimensiones antes citadas ya no deben ser consideradas y deben considerarse las nuevas, las cuales plantean un problema de solapación entre los huevos mayores de *F. hepatica* con los huevos menores de *F. gigantica* que dificultan la diferenciación de ambas especies en el diagnóstico (véase dimensiones exactas en VALERO et al., 2009; MAS-COMA et al., 2009, 2014a, b).

Se ha podido revelar que las especies hospedadoras definitivas influyen decisivamente en el tamaño de la *F. hepatica* adulta y sus huevos, y estas influencias no permanece en un modelo experimental de roedores hospederos definitivos en las cuales se utilizó cepas de parásito de diferentes hospedadores naturales (VALERO et al., 2001).

Los huevos salen al intestino y son eliminados con la materia fecal. Es importante que caiga al agua en donde se dará la formación de la primera forma larvaria que es el miracidio.

La tasa de desarrollo de los huevos aumenta con la temperatura entre 10°C a 30°C, tardando 6 meses a 10°C, 2-3 meses a 16°C-24°C y 8 días a 30°C. Por encima de este valor se inhiben significativamente, aumentando su mortalidad total a los 37°C (ROWCLIFE & OLLERENSHAW, 1960; ADREWS, 1999), y a medida que va incrementándose la temperatura por arriba de los 10°C va acelerando ligeramente la embrionación, pero no influye en el porcentaje de embrionación (KHOUBBANE, 2002). Los huevos sobreviven en heces húmedas hasta 10 semanas en verano y 6 meses en invierno, pero en ausencia de agua mueren (ADREWS, 1999). Boray mantuvo huevos de *F. hepatica* 2 años a 4°C lo cuales aún eran viables (BORAY, 1969). Y a una refrigeración previa de los huevos a 4°C se analizaron muestras con 347 y 546 días conservados en la nevera, antes de su embrionación aún presentaban viabilidad al estadio de miracidio (KHOUBBANE, 2002).

### **2.1.3.- DESCRIPCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO**

Las duelas adultas eliminan sus huevos no embrionados desde los conductos biliares y salen del hospedador con las heces al exterior. El huevo es metabólicamente bastante activo, puesto que el contenido de glucógeno de los huevos de *Fasciola*, mantenidos a 25°C decrece durante el desarrollo del miracidio,

lo que indica que éste utiliza hidratos de carbono y lípidos como fuente de energía. Además, se produce un aumento del consumo de oxígeno.

Una vez en el exterior, los huevos iniciarán su embrionación enfrentándose a los factores ambientales. Si lo logran saldrán los miracidios. Esta larva posee una pequeña protuberancia papiliforme en la parte anterior, tegumento ciliado, que le permiten nadar o desplazarse en el agua, hasta encontrar un caracol del género *Lymnaea*, penetrando activamente, perdiendo la cubierta ciliada y dando a lugar a esporocistos jóvenes. Los esporocistos, que es una estructura alargada o a veces semiesféricas, se encuentran en la región periesofágico del molusco y en su interior aproximadamente a los 15 días se forman estructuras llamadas redias, longitudinales y en cuyo interior generan nuevas estructuras llamadas cercarías y redias hijas (ROMERO, 1999; MARTINEZ et al., 2012).

Las redias pueden alimentarse activamente de los tejidos del molusco hospedador, tomando hemolinfa y tejidos, especialmente de las células glandulares digestivas, por lo que disponen de los hidratos de carbono y las proteínas que necesitan. Las cercarías tienen cierto parecido con los adultos. Su estructura mayor se llama cabeza, tiene forma de hoja y empiezan a aparecer las ventosas u órganos de fijación y de ingestión, que pueden ser la ventosa oral o ventral hacia la parte central o acetábulo; una de las situaciones únicas para este estadio es que tienen una prolongación denominada cauda o cola, la cual les da un gran movimiento o agilidad que les permite nadar perfectamente en el agua. Cuando las cercarías pierden la cola, cambian su forma hacia una estructura redondeada liberando un producto pegajoso, adherente y mucilaginoso que las cubre formando una cubierta de resistencia a manera de quiste, para que queden adheridas en una superficie como en la hierba o piedra. Esta fase se denomina metacercaria, de aproximadamente 0,5 mm, y es la forma infectante para los hospedadores definitivos. El número de cercarías en cada caracol es muy variable y no depende del número de miracidios, alcanzando 10 a 4 mil cercarías (ANDREW, 1999). El desarrollo dentro el molusco requiere entre 8-10 semanas. La viabilidad de la metacercaria depende del hospedador definitivo, es sensibles a altas temperaturas y desecación del medio ambiente pero soporta bien bajas temperaturas (KASSAI, 1998; ROMERO, 1999).

Cuando el hospedador definitivo, en este caso los rumiantes y el hombre, ingieren vegetales, como lechugas, berros o agua contaminados con la forma infectiva, las metacercarias atraviesan dos fases. La primera acontece en el rumen del animal y tubo digestivo en el humano, que se enfrenta a altas concentraciones de dióxido de carbono y temperaturas de 39°C. La segunda ocurre en el intestino delgado, por debajo de la

desembocadura del conducto colédoco por la acción de la bilis y el parásito, pierden su envoltura quística liberando *Fasciolas* jóvenes, que atraviesan la pared intestinal, pasan la cavidad peritoneal y se dirigen hacia el hígado, tras perforar la cápsula de Glisson; aquí miden ya 1-2 mm y ya son de forma lanceolada. Durante menos de 2 meses emigra por el parénquima hepático hasta los canalículos biliares alcanzando la madures sexual (ROMERO, 1999; ROJO & FERRE, 1999; EUZEBY, 2001).

El ciclo biológico de ambas duelas es el mismo y toma cerca de 14-23 semanas (MAS-COMA et al., 2003). Según MAS-COMA & BARGUES (1997), comprende 4 fases: a) el hospedador definitivo alberga a la duela, esta produce y elimina huevos al exterior pasando por la bilis e intestino; el hospedador definitivo es infectado por la metacercaria y llegan a la madures sexual en 3-4 meses llegando a vivir entre 9 y 13 años; b) el tránsito entre hospedador definitivo y hospedador intermediario incluido la larga resistencia del huevo y corta actividad del miracidio; los huevos embrionan en agua dulce bajo condiciones físico químicas apropiadas entre 15-25°C; c) el desarrollo del parásito en el caracol desde el miracidio hasta la emisión de cercarías en el agua; esta fase es el periodo prepatente de entre 38-86 días, depende de la temperatura, y a altas temperatura se reduce; d) el tránsito entre el caracol y el hospedador definitivo incluye: (i) una fase corta, donde la cercaria nada activamente en el agua un corto tiempo hasta contactar con un soporte sólido, debajo la línea del agua se adhiere y enquista, situación que ocurre en 24 horas entre 9°C y 26°C, independientemente de la luz u oscuridad; (ii) una fase larga una vez que la cercaria se enquista llamada metacercaria, entra a una forma infectante latente en espera de ser ingerida por un animal (MAS-COMA et al., 2014a, b).

### **2.1.3.1- HOSPEDADORES DEFINITIVOS**

Las duelas adultas parasitan los grandes conductos biliares y la vesícula biliar de los rumiantes, principalmente ovejas, cabras, vacas y muchos otros herbívoros domésticos y animales silvestres, incluyendo caballos, burros, mulas, como en el Antiguo Mundo y camélidos del Nuevo Mundo. Búfalo, ciervos, muflones, jabalíes, diversos marsupiales, conejo, liebre y nutria son también hospedadores susceptibles. Los asnos y cerdos domésticos también pueden estar infectados (MAS-COMA et al., 1997), *Rattus rattus* también desempeña un papel importante como reservorio y difusión geográfica de la enfermedad (MAS-COMA et al., 1990; 1999a). También estudiaron experimentalmente

en monos Macaca, los cuales a pesar de estar infectados no mostraron ser un rasgo característico de la Fascioliasis (TAKEMOTO et al., 1977).

Los ovinos y los bovinos son las especies más infectadas por *F. hepatica*, mientras que el búfalo parece ser el hospedador definitivo más importante para *F. gigantica*. También los cerdos salvajes en Europa para *F. hepatica*, parece estar menos adaptados al corzo (*Capreolus capreolus*) en comparación con otros ciervos (rojo y gamo), y la nutria introducida (*Myocastor coypus*) se ha convertido en un importante reservorio en Francia, al igual que los marsupiales en Australia (MAS-COMA et al., 2003). En Venezuela se ha encontrado duelas en capibara y ratas (MAS-COMA et al., 2014b). Esta trematodiasis ha sido tradicionalmente considerada de importancia veterinaria en Venezuela con grandes pérdidas económicas por disminución en la producción láctea, cárnica y reproductiva, con casos fortuitos en comunidades rurales localizadas entre los 1210 y 2893 m de altitud en la región Andina venezolana.

Aunque es verdad que ningún continente queda libre de la Fascioliasis, la falta actual de datos detallados, apunta con toda probabilidad que la extensión geográfica de la enfermedad sería mayor de lo que aparenta hoy en día.

### **2.1.3.2.- HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS O VECTORES**

Varias especies dulceacuícolas de Lymnaeidos son hospedadores intermediarios de la Fascioliasis. En general se puede decir que *F. hepatica* está transmitida por especies pequeñas de *Galba/Fossaria*, mientras que *F. gigantica* lo es por especies en general mayores del género *Radix*. *Pseudosuccinea columella* ha sido descrita con capacidad de transmitir ambas especies y algunas pocas especies de Lymnaeidos Stagnicolinos son capaces de participar en la transmisión de *F. hepatica* en ausencia de especies de *Galba/Fossaria*, si bien muy esporádicamente (BARGUES et al., 2001; MAS-COMA et al., 2009). Existen trabajos en las cuales informan la visualización de parásitos en moluscos en áreas naturales, como también en situaciones experimentales una vez infectados.

Fases experimentales en el laboratorio, donde se observa la entrada del miracidio y luego de un seguimiento, revelan la no susceptibilidad al parásito o por el contrario un alto potencial de reproducción sería observada. Estos estudios con el tiempo cobran importancia en el comportamiento del parásito en el molusco. Es el caso de *Lymnaea attenuata* (Say, 1829), en que sólo observaron la entrada del parásito y no hicieron el seguimiento, cuarenta años después se confirmó que este molusco no era susceptible,

tras la infección con miracidios de *F. hepatica* (AGUIRRE, 1939; LANDEROS et al., 1980; CRUZ, 1982). Posteriormente se confirmó como hospedadores intermediarios, al lograr observar la emisión de parásitos y ser por ende transmisores a *L. obrussa* (Say, 1825) y *L. humilis* (Say, 1822) (MAZZOTTI, 1955; 1956). *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839) alcanza un 95,5% de infección (GOMEZ et al., 1978) y *L. bullimoides* (Lea, 1841) se comportaba también como un hospedador intermediario (LANDEROS et al., 1980).

Otros trabajos investigan a otros parásitos transmitidos por los moluscos, es el caso por ejemplo de *Echinostoma revolutum* en dos moluscos *L. attenuata* y *Physa occulans* en México (CABALLERO Y CABALLERO & LARIOS, 1940).

#### **2.1.4.- EPIDEMIOLOGÍA**

Dos trematodos causan la Fascioliasis, la *F. hepatica* y la *F. gigantica*. En el pasado, se limitaba a lugares específicos, pero hoy se evidencian casos humanos con más frecuencia en todo el mundo. La Fascioliasis humana debe ser considerada de gran importancia mundial. Los moluscos son parte trascendental para la continuidad del ciclo, al presentar una amplia distribución en todos los continentes por su capacidad adaptativa y su propagación. La distribución geográfica que ha alcanzado la enfermedad evidencia la marcada adaptación del parásito y el Lymnaeido.

Existen zonas endémicas cuya transmisión es continua durante todo el año y por consecuencia también los Lymnaeidos, que habitan medios acuáticos permanentes, aguas estacionales y reanudación de las vertientes. Es el caso más notable de la Fascioliasis humana en el Altiplano Norte Boliviano con prevalencias altas (MAS-COMA, 1997; ESTEBAN et al., 1999), bajo condiciones ambientales en el día de 28°C y la noche que puede llegar a bajar a 0°C en el medio ambiente y 5°C en el agua, a una altitud de 3800-4100 m s. n. m. (MAS-COMA et al., 1999c; FUENTES et al., 1999a) que es el caso de *G. truncatula* presente en la región que resiste en ese medio. En Córcega la Fascioliasis humana es rara, con una temperatura media anual de 12°C y una media estival de 25°C, a una altitud de 1500 m s. n. m., situación que favorecería el hábitat de *G. truncatula* permanentemente durante todo el año, con situaciones que contribuirían a la distribución de esta enfermedad junto a la capacidad de adaptación del molusco, bajo condiciones extremas.

Otra de las condiciones importantes es que la *Fasciola* requiere de condiciones favorables como es la humedad para la multiplicación, la supervivencia y emisión de cercarías de los caracoles y conservación de las metacercarias forma infectante. Su

supervivencia está relacionada con la humedad y temperatura entre 25°C a 35°C, bajando la viabilidad a medida que avanza el tiempo de conservación. Las metacercarias son sensibles a temperaturas por encima de 25°C, pero pueden sobrevivir a bajas temperatura como es el caso del Altiplano Boliviano. En los países cálidos de Asia, los campos de arroz son cultivados hasta tres veces al año, donde los ganados son los principales instrumentos para arar los campos de arroz. Los búfalos a su vez se alimentan de los tallos contaminados con metacercarias, cuyas heces son utilizadas para abono de los campo, un ambiente óptimo para el hábitat de los Lymnaeidos. Factores como el agua y la humedad son esenciales para la supervivencia de las metacercarias. En Francia la Fascioliasis es más frecuente en años de mayor precipitación fluvial (RIPERT et al., 1988). Los huevos de la *Fasciola* para su embrionación y eclosión necesitan un medio húmedo, aunque si el material fecal se seca puede haber algún huevo viable.

En los países afectados, la transmisión suele circunscribirse a ciertas zonas y se relaciona con factores conductuales y ambientales, como los hábitos alimenticios de las personas, los métodos de producción y preparación de alimentos e ingerir agua contaminada con metacercarias flotantes (BARGUES et al., 1996a; OMS, 2014). La ingestión de parásitos puede ocurrir durante el lavado de utensilios de cocina en la cuales la metacercarias se pegan, como es el caso en China (CHEN & MOTT, 1990). Esta viabilidad de los huevos ya fue demostrado en estudios experimentales, con huevos de pacientes de Bolivia en el laboratorio (BARGUES et al., 1996b; VALERO & MAS-COMA, 2000).

Los animales domésticos representan un papel importante en culminar el ciclo en áreas de endemia humana. Lo son los bovinos y ovinos principalmente, como también caprinos, porcinos, équidos, camélidos y bóvidos, característicos de cada país en cada continente, por la emisión de huevos en las heces. Se ha calculado en bóvidos, entre 4 mil y 5 mil huevos por parásito y entre 8 mil y 25 mil por hospedador definitivo a los 9-12 meses (DAWES & HUGHES, 1964; BORAY, 1969), sin dejar de mencionar a roedores silvestres como *Rattus rattus* que jugaría un importante papel en la expansión y transmisión de la enfermedad (MAS-COMA et al., 1988, 1990; VALERO et al., 1992, 1998a).

El comportamiento humano podría ser un factor determinante en la transmisión de esta enfermedad con respecto al consumo de vegetales crudos (MAS-COMA & BRAGUES, 1997). El problema de la pobreza, la contaminación, el crecimiento demográfico y el cambio climático cambia los patrones epidemiológicos. Además es preciso que hayan ciertas condiciones para que se dé el ciclo biológico completo y la



presencia de agua dulce donde los hospedadores definitivos y hospedadores intermediarios cohabiten junto a la *Fasciola*. También tiene que ver mucho el clima si se ve afectado por el calentamiento global, para lo cual cabe tomar medidas utilizando modelos matemáticos de predicción y los Sistemas de Información Geográfico (SIG), que si bien no han sido de gran utilidad para otros estudios, para este problema sí sería crucial para las estrategias de control (MAS-COMA et al., 2009b).

#### **2.1.4.1.- HETEROGENEIDAD EPIDEMIOLÓGICA DE LA FASCIOLIASIS HUMANA**

Debido a la complejidad que presenta esta enfermedad tan divergente en cada continente, y poder definir la situación y las medidas pertinentes en diversos escenarios epidemiológicos, Santiago Mas-Coma y su equipo propusieron una clasificación básica de las diferentes situaciones epidemiológicas (MAS-COMA et al., 1999):

- *Casos autóctonos, aislados, no constantes.* Personas que han contraído la infección en la zona en la cual viven, en cuyo lugar también existe fascioliasis animal. Esos casos humanos aparecen esporádicamente, sin constancia alguna.
- *Casos importados.* Casos humanos diagnosticados en una zona carente de Fascioliasis (ni siquiera entre los animales), pero infectados en una zona de transmisión.
- *Endémica.* Pueden distinguirse tres tipos de situaciones de endemidad según la prevalencia en la población total obtenida por diagnóstico coprológico (la prevalencia estimada a partir de pruebas serológicas puede ser algo más alta):
  1. hipoendémica: prevalencia menor a 1%; media aritmética de la intensidad menor de 50 hpg; altos niveles de hpg sólo en casos esporádicos; la intervención humana en la transmisión mediante la expulsión de huevos quizá no ha recibido la debida atención; el saneamiento suele incluir letrinas y sistemas de eliminación de desecho o aguas residuales; la defecación al aire libre no se practica comúnmente.
  2. mesoendémica: prevalencia entre 1%-10%; los niños de 5 a 15 años de edad pueden presentar prevalencias más altas (holoendemicidad); la media aritmética de la intensidad en comunidades humanas suele ser de 50-300 hpg; los niveles de hpg pueden ser altos, aunque las intensidades superiores a 1000 hpg son raras; los humanos pueden intervenir y puede haber casos de defecación al aire libre.

3. hiperendémica: prevalencia mayor a 10%; los niños de 5 a 15 años suelen presentar prevalencias más altas (holoendemicidad); media aritmética de la intensidad en comunidades humanas suele ser mayor a 300 hpg; se encuentra casos de niveles de hpg muy altos, siendo relativamente frecuentes las intensidades mayores a 1000 hpg; los casos humanos intervienen de modo significativo en la transmisión mediante la expulsión de huevos; el saneamiento no incluye el uso de letrinas y de instalaciones apropiadas de eliminación de desechos o aguas residuales; la defecación indiscriminada es una práctica común.
- *Epidémicas*: hay dos distintos tipos de brotes según la situación endémica de la zona:
1. epidemias en zonas donde la fascioliasis es endémica en animales pero no en seres humanos: los brotes aparecen en zonas donde las notificaciones anteriores de casos humanos siempre han sido aisladas y esporádicas; esos brotes suelen afectar a muy pocos individuos, que resultan infectados a partir de la misma fuente de contaminación (familia o pequeños grupos; berros u otras hortalizas silvestres, de cultivo doméstico o comercializadas, portadoras de metacercarias).
  2. epidemias en zonas endémicas humanas: brotes en zonas donde la enfermedad es endémica en el ser humano; puede estar afectado un número mucho mayor de individuos; por lo general guarda relación con condiciones climáticas favorables tanto para el parásito como para el molusco; las epidemias pueden producirse en zonas hipoendémicas, mesoendémicas o hiperendémicas (MAS-COMA et al., 1999; MAS-COMA et al., 2009b, 2014a, b).

#### **2.1.4.2.- PATRONES DE TRANSMISIÓN**

Las investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado diferentes patrones de transmisión dentro de las distintas áreas endémicas humana (MAS-COMA, 2005)

1. Un patrón de muy alta altitud relacionada con sólo *F. hepatica* transmitida por *G. truncatula* en las zonas andinas transmitidas todo el año; dentro de esta categoría se distinguen dos sub-patrones que se distinguen de acuerdo a las características fisiogeográficas y estacionales:

- a. El patrón altiplánico, con transmisiones a lo largo del todo el año (Altiplano Norte de Bolivia, y el Altiplano de Perú).
- b. El patrón valle, estacional por temporadas y las prevalencias e intensidades están relacionadas con la altitud (valles de Cajamarca y Mantaro, Perú).
2. Un patrón del Caribe insular, con brotes reducidos pero repetidos en áreas hipoendémicas humanas y otras especies de Lymnaeidos involucrados en la transmisión (en Pinar del Río, Cuba).
3. Un patrón relacionado con las tierra bajas Afro-mediterráneas, incluyendo la superposición de *F. hepatica* y *F. gigantica* y varios Lymnaeidos *Galba/Fossaria* y *Radix* junto con *Pseudosuccinea* transmisor secundario, donde la estación es típica (Gobernación de Behera en la región del Delta del Nilo en Egipto).
4. Un patrón que ocurre en las zonas que rodea al Mar Caspio, incluyendo las áreas hiperendémicas humanas en el que se producen grandes epidemias, de vez en cuando la participación de hasta 10 mil personas y con superposición de *F. hepatica* y *F. gigantica* y varios Lymnaeidos *Galba/Fossaria*, *Radix* y stagnicolino (el área de Rasht y Bandar-e Anzali en la provincia de Guilán en Irán).

Las características de la situación de la Fascioliasis humana en Vietnam (DE et al., 2006; LE et al., 2008) merece un nuevo patrón:

5. Un patrón recientemente detectado en Vietnam, es lo que queda por establecer y tal vez se pueda extrapolar a otros países asiáticos vecinos. La información preliminar sugiere que se trata de zonas bajas, es capaz de dar lugar a grandes epidemias humanas, y está relacionada solo y principalmente con *F. gigantica* y un Lymnaeido del grupo *Radix* (MAS-COMA, 2005; MAS-COMA et al., 2009b).

### 2.1.5.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La patología en el hombre depende del número de parásitos que logran desplazarse, causando daño durante su migración hasta establecerse en los conductos biliares. No siempre se expresa en signos y síntomas clínicos. En este periodo el parásito al atravesar la pared intestinal, los vasos y tejidos serán dañados por la lisis provocada, y también habrá daño en los tejidos hepáticos lesionándolos; junto a estos se activan fenómenos inmunológicos e inflamatorios y al establecerse en los conductos biliares provoca obstrucción biliar (ROJO et al., 1999; EUZEBY, 2001; BECERRIL, 2014; MAS-COMA et al., 2014b). Un daño importante es a nivel hepático cuando

atraviesa la cápsula de Glisson, porque puede producir dolor por ser un tejido innervado (ROMERO, 1999). Tenemos también las localizaciones ectópicas que ocurren durante la migración al cerebro, la órbita, al pulmón, al apéndice, tejido subcutáneo y otras localizaciones (MAS-COMA *et al.*, 2013, 2014c).

Los periodos de infección se clasifican en tres:

1) *Aguda*: Dura de dos a cuatro meses; comienza cuando la duela inmadura penetra la barrera intestinal a través de una serie de membrana que rodea los órganos internos. De allí, perfora la superficie del hígado y sigue comiendo los tejidos hasta que llegan a los conductos biliares. Este viaje mata las células del hígado y causan hemorragias severas, provocando la muerte en los animales, por una complicación toxinfeciosa (EUZEBY, 2001).

Los síntomas típicos de esta fase incluyen fiebre, náuseas, un hígado hinchado y dolor abdominal grave. Es posible hacer una prueba de sangre sencilla que se puede llevar a cabo al nivel del distrito: si se encuentra un número elevado de un tipo de células llamadas eosinófilos, se debe sospechar de Fascioliasis. Y en áreas endémicas la parasitación es repetitiva, desencadenando una enfermedad crónica con manifestaciones de fiebre, dolor abdominal, alteraciones gastrointestinales, diarrea y pérdida de apetito (BECERRIL, 2014; MAS-COMA *et al.*, 2014b).

2) *Latente*: Puede durar meses o años, lo definen como el periodo entre la entrada de los parásitos a los conductos biliares y el inicio de la ovipostura (BECERRIL, 2014) y generalmente es asintomático.

3) *Obstruictiva*: Empiezan a producir huevos y llegan a obstruir los conductos ya sea por el tamaño y la cantidad de parásitos provocando cólicos biliares, dolor epigástrico, dolor abdominal en cuadrante superior derecho con irradiación hacia el hombro del mismo lado, ictericia y anemia. Entonces se puede complicar el cuadro clínico con pancreatitis, colangitis, colecistitis e infecciones bacterianas severas (MAS-COMA *et al.*, 2014b, c). En pacientes con infecciones crónicas, el hígado empieza a endurecer, proceso llamado fibrosis como consecuencia de la inflamación a largo plazo, dilatación y engrosamiento de los canales del hígado y fibrosis que se difunde por los canales biliares (EUZEBY, 2001; BECERRIL, 2014; MAS-COMA *et al.*, 2014b, c). En los niños infectados, una de las señales de infección es que empiezan a presentar retraso en el crecimiento, lo que pasa desapercibido por la escasa sintomatología y un desvío en el diagnóstico.

A medida que se han realizado estudios sobre esta enfermedad y el conocimiento de su expansión, también se ha identificado otros efectos patológicos importantes (MAS-COMA & BARGUES, 1997; MAS-COMA *et al.*, 2000, 2014c), incorporando

nuevas características patológicas antes ignoradas como la litiasis (VALERO et al., 2003), la bacteriemia (VALERO et al., 2006) y la anemia (VALERO et al., 2008), desarrollando en todas las fases un efecto inmunosupresor que coincide con otras infecciones parasitarias (MAS-COMA, 2004a, c; MAS-COMA et al., 2005; GIRONES et al., 2007).

Esta enfermedad resulta ser muy compleja pues el paciente puede llegar a tener deterioro marcado con secuelas graves e incluso a la muerte. Todos estos efectos debidos a los recientes datos epidemiológicos y estudios de interés mundial de esta enfermedad, van de la mano con el cambio climático (MAS-COMA et al., 2009b; AFSHAN & MAS-COMA, 2014; AFSHAN et al., 2014).

### **2.1.6.- DIAGNÓSTICO**

El Equipo de Valencia ha efectuado muy recientemente una puesta a punto del diagnóstico de esta enfermedad para todo tipo de situaciones a nivel mundial, desde para pacientes individuales hasta para áreas de endemia humana (MAS-COMA et al., 2014b). La sensibilidad es muy importante para el diagnóstico, utilizando técnicas corrientes, como la sedimentación o técnicas modificadas de frotis grueso llamada técnica Kato-Katz, métodos sencillos y duplicables para detectar huevos de los trematodos. En la fase aguda es imposible un análisis coprológico porque no hay emisión de huevos aún sólo una sospecha. En la fase crónica si existen muchas técnicas, pero el diagnóstico de huevos en las heces en casos sospechosos, el análisis coprológico es el más económico en lugares donde la enfermedad afecta a poblaciones del tercer mundo donde no siempre tiene accesibilidad a otras técnicas de costo mayor (MAS-COMA et al., 2014b).

Otros exámenes son por sondeo duodenal en la bilis (KASSAI, 1998; CARRADA & ESCAMILLA, 2005).

Las pruebas de diagnóstico fecales y serológicos también son empleadas en diagnósticos clínicos (MAS-COMA et al., 2014b). Como en la detección de antígenos por técnicas serológicas de precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, etc. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es la técnica más difundida y la fijación del complemento para el diagnóstico de la Fascioliasis en sangre, orina y heces.

En la actualidad la biología molecular ha evolucionado rápidamente en los últimos tiempos y ha contribuido decisivamente en la evaluación y control de las enfermedades zoonóticas. La caracterización de genes de *Fasciola* por biología molecular es uno de ellos junto a otros parásitos. Es una herramienta importante en la epidemiología que ha

permitido distinguir diferentes agentes causales, hospedadores intermediarios, así como la capacidad de dilucidar su distribución geográfica y capacidad de dispersión.

Las técnicas de inmunodiagnóstico pueden detectar la infección por *Fasciola* durante el periodo prepatente (MAS-COMA et al., 2014b) y el diagnóstico patológico por medio de la biopsia (ACHA et al., 1986; ROJO et al., 1999). Las técnicas no invasivas incluyen la ultrasonografía y la tomografía computarizada, pero sin examinar su sensibilidad ni especificidad (MAS-COMA et al., 2014a).

### **2.1.7.- TRATAMIENTO Y PROFILAXIS**

El triclabendazol es el fármaco de preferencia para el tratamiento de la *F. hepatica* y *F. gigantica* (WHO, 1995, 2006; OMS & FAO, 2007; WHO, 2009, 2013), y se incluye en la lista de medicamentos esenciales de la OMS a partir del 2008. Los representantes del gobiernos de Bolivia y Perú permitieron el inicio de un plan piloto de desparasitación, al percatarse del alto riesgo en la que se encontraban sus poblaciones (WHO, 2013). La dosis se calcula en función del peso corporal de la persona (10 mg/kg) y los comprimidos se administran en una sola toma. Para facilitar la administración, se pueden utilizar agrupaciones por peso corporal (WHO, 2006). Este fármaco antihelmíntico a base de benzimidazol es efectivo no sólo contra los parásitos adultos alojados en los conductos biliares, sino también contra duelas inmaduras que migran a través del parénquima hepático (WHO, 1995, 2006, 2013).

Se ha demostrado la ineficacia de fármacos como el albendazol, levamisol mebendazol y prazicuantel contra la *Fasciola* durante la epidemia en la República Islámica de Irán en 1989 (OMS, 1989). Existen otros fármacos utilizados contra las *Fasciolas* adultas como clorsulón, closantel, sulfóxido de bitionol, brotiana, nitroxinil y oxiclozanida. Sin embargo, alguno de ellos presenta cierta toxicidad y son poco activos en *Fasciolas* inmaduras (ACHA et al., 1986; KASSAI, 1998; ROJO et al., 1999). La oxiclozanida es el único fasciolicida prescrito durante la lactancia (ROJO et al., 1999).

Es evidente que si bien se desea controlar esta parasitosis, existen desavenencias políticas o económicas como es el caso sobre el cual la OMS informa en el año 2012 anotando que más de 608 mil habitantes de países endémicos habían recibido tratamiento contra la trematodiasis de transmisión alimentaria y el informe del año siguiente esta cifra fue menos de la mitad, indicando demoras en la aplicación y reprogramación (OMS, 2014).

Aunque es difícil erradicar la Fascioliasis por su amplia distribución, se puede controlar, con la combinación de tratamientos antihelmínticos con medidas higiénicas y control del pastoreo. Otras medidas como eliminación de los parásitos en los hospedadores definitivos, bajar el nivel de infección y reducir a los hospedadores intermediarios o vectores (molusco), con toda la información de la epidemiología de cada localidad que es afectada de diferente forma de acuerdo al medio climático y forma de vida.

## **2.2.- ASPECTOS GENERALES DE LOS LYMNAEIDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS O VECTORES DE LA FASCIOLIASIS**

### **2.2.1.- FILOGENIA DE LOS LYMNAEIDAE**

El Phylum Mollusca es el segundo grupo de animales más grandes de acuerdo al número de especies pertenecientes, después del Phylum de los insectos. El Phylum Mollusca lo constituye alrededor de 93 mil especies por el momento (BRUSCA & BRUSCA, 2003; BRUSCA et al., 2005) y ZHI-QIANG (2011) estima más de 117 mil las especies descritas. Se divide en 8 clases, de las cuales 4 denominadas clases menores: Solenogastres, Caudofoveata, Monoplacophora y Scaphopoda, las dos primeras agrupadas como Aplacophora y las denominadas clases mayores: Polyplacophora, Gastropoda, Bivalvia y Cephalopoda, mientras que las clases extinta son Rostroconchia probable ancestro de bivalvos y los Helcionelloida (BERG, 1994; CASTILLO-RODRÍGUEZ, 2014, BRUSCA et al., 2005).

La clase Gastropoda, uno de los mayores grupos de caracoles y babosas con aproximadamente 130 mil especies en el mundo (GEIGER, 2006) a 110 mil como indican BROWN & LYDEARD (2010) debido a ciertas agrupaciones en el transcurso del tiempo. Comprende con 60 mil sin concha, 13 mil son marinos y en especies se estima entre 40 mil y 100 mil (BOSS, 1971; BEILER, 1992; PONDER & LINDBERG, 1997; BRUSCA & BRUSCA, 2005; GEIGER, 2006).

En la clase Gastropoda existen tres subclases en referencia a la posición del aparato respiratorio: en los Prosobranchia (incluye 53% de las especies) el órgano respiratorio o branquia está situado al frente del corazón; en los Opisthobranchia (4%) está detrás del corazón; y en los Pulmonata (43%) han sustituido la branquia por un pulmón vascular que puede respirar aire o agua dependiendo de la especie (BOSS, 1971; BEILER, 1992; BROWN, 2001; JARNE, 2010). Los caracoles Pulmonata están

divididos en tres grupos u órdenes: Stylommatophora, Systellommatophora y Basommatophora (BEILER, 1992). Los Stylommatophora ó Geophila es el grupo más grande de caracoles y babosas terrestres y se caracteriza por tener los ojos en la punta del par de tentáculos superiores y retráctiles. Systellommatophora o Gymnophila comprende un pequeño grupo de babosas con ojos en las puntas del par superior en los tentáculos contráctiles. Los caracoles pulmonados de agua dulce tales como Acroloxidae, Chilinidae, Lymnaeidae, Physidae y Planorbidae (JARNE, 2010) también tienen tentáculos contráctiles, pero los ojos están situados en su base. Estos caracoles están clasificados en el Orden Basommatophora o Limnophila (BERG, 1994).

Los Basommatophora (Gastropoda: Pulmonata) comprenden todos los gasterópodos pulmonados que viven en agua dulce, abarcando un grupo de 300 especies. Han sido ampliamente estudiados por su implicación en la transmisión de parásitos de importancia humana y veterinaria, como por ejemplo *Fasciola* y *Schistosoma*. Sus hospedadores intermediarios son: Lymnaeidae, Physidae y Planorbidae que es el 90% de las especies Basommatophora (STRONG, 2008). La filogenia de los dos últimos está relativamente establecido y no así en los Lymnaeidos pues las opiniones de muchos malacólogos son discrepantes planteando otras opiniones sobre la taxonomía pero junto a estudios moleculares se van ordenando y clasificando (BOSS, 1971; BEILER, 1992; BERG, 1994; MAS-COMA et al., 2009b; MAS-COMA et al., 2014a, b).

Los caracoles de la familia Lymnaeidae hoy en día presentan sinonimias (BEILER, 1992; JARNE, 2010) y se ha compilado un gran número de especies. Por la convergencia que tienen en su estructura anatómica, estudios inmunológicos, citogenéticos, métodos moleculares y la morfología de la concha han sido motivo de controversia (BEILER, 1992; BARGUES & MAS-COMA, 1997a, b; BARGUES et al., 2001). Hoy en día menos de 100 especies podrían ser aceptadas (STRONG et al., 2008; JARNE, 2010; BROWN & LYDEARD, 2010). Otros indican menos de 250 especies existentes (KRUGLOV, 2005). Y no hay un acuerdo común entre la sistemática sobre cómo muchas especies y taxones superiores (género y subgénero) deben ser reconocidos dentro de la familia. Los que se encuentran en esta familia Lymnaeidae (Geyer, 1927) son los siguientes géneros: *Lymnaea* (Lamarck, 1927), *Pseudosuccinea*, *Galba* (Schrank, 1803), *Myxas* (Sowerby, 1822), *Radix* (Montfort, 1810) y *Stagnicola* (Leach, 1830) (DILLON, 2000). GLÖER (2002) no nombra a *Pseudosuccinea* y VINARSKI (2013) las incluye en un solo género *Lymnaea*.



## **2.2.2.- DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DE LOS LYMNAEIDOS**

### **2.2.2.1.- DESCRIPCIÓN DE LA CONCHA**

En el cuerpo de los Lymnaeidos, su masa visceral está cubierta con una concha calcárea que asegura su protección. Estos retraen su cabeza y los pies en la concha cuando hay sequía o están en peligro. Las conchas de los Lymnaeidos son variables en forma y tamaño, siendo dextro y helicoidal o espiral. El número de espirales varía de 4 a 8, separados por una sutura a medida que el desarrollo va progresando sufriendo una torsión de la concha. Lo que forma el ápice de la concha son los primeros verticilos, llamada concha embrionaria (protoconcha). La espiral más grande siempre es la más joven y con frecuencia es más grande que todas las vueltas anteriores, la última vuelta terminando con la abertura, por lo general tiene forma ovoide. El margen de la abertura externa es fuerte, por la cual se asoma el pie y la cabeza. La pared interna de la concha enrollada en espiral a lo largo del eje principal crea la columna axial llamada columela. El lumen de esta columna es pequeña y se abre en una estrecha grieta axial llamado ombligo. Este pliegue es más fino, de color más claro que la cáscara y cerca del margen columelar de la abertura de la concha (JACKIEWICZ, 1998; BROWN, 2001; BROWN & LYDEARD, 2010).

La parte de la cubierta sobre la abertura se denomina espira. Si bien parece que las conchas de Lymnaeidos se caracterizan por tener una estructura simple, presentan una amplia variabilidad intraespecífica tanto dentro de las poblaciones y entre ellos. Además las conchas de diferentes especies pueden ser muy similares o incluso idénticas como es el caso entre *Lymnaea palustris* y *Lymnaea turricula* (JACKIEWICZ, 1998). Las conchas pueden ser largas, delgadas, cortas y anchas, y la espira puede estar incorporada más o menos a la última vuelta, incluso llegando a cubrirla totalmente y la abertura puede quedar reducida (BRUSCA & BRUSCA, 2003).

La superficie de la concha se compone de varias filas de laminillas, que se separan la una de la otra con ranuras de diferente anchura y profundidad. La longitud y espesor y curvatura de estas laminillas son características de especies particulares (JACKIEWICZ, 1998).

### **2.2.2.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS PARTES BLANDAS**

El cuerpo de Lymnaeidos es blando y está conformado por una cabeza, un pie mus-

cular, una masa visceral que contiene la mayor parte de los órganos, y el manto carnososo que secreta la concha calcárea.

La cabeza lleva un par de tentáculos triangulares, y los ojos están en situados en su base. La boca localizada ventralmente entre ellos, es pequeña y triangular ligeramente alargada. El gonoporo masculino se encuentra en el cuello cerca del tentáculo derecho. El gonoporo femenino también se encuentra en el lado derecho, justo cerca de la base del cuello del manto.

El pie es bastante grande, interrumpido por el frente y redondeado en la parte posterior. La adhesividad de su planta al sustrato se incrementa al caminar. Está compuesto por un sistema muscular del pie, que actúa de manera coordinada para elevar y bajar, acortar o alargar longitudinalmente o transversalmente de manera coordinada y movimientos hacia adelante y atrás.

La masa visceral en espiral enrollada se cubre con una túnica de piel y en la última vuelta esta túnica se vuelve más gruesa creando el manto (pallium o palio) que se convierte en un gran pliegue llamado el cuello del manto. Hay manchas que suelen mostrar una gran diversidad de pigmentos oscuros en todo el armazón, que suelen ser similares entre especies, y por ende presenta poco valor taxonómico. La cabeza y el pie son de color homogéneo gris a amarillo pálido (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

## **A) SISTEMA DIGESTIVO**

Es similar al de otros caracoles pulmonados Basommatophora, aunque es relativamente más corto. El orificio de la boca conduce a una cavidad oral, conformada por la mandíbula que utiliza sobre todo para cortar fragmentos grandes de alimentos. La mandíbula compuesto de una placa superior gruesa con tres protuberancias cortantes y dos placas laterales estrechas a cada lado. La cavidad oral se expande en forma de un barril bucal (faringe), fuertemente musculado. El lumen de la masa bucal está formado por un canal central grande que se divide en varias bifurcaciones más pequeñas en ambos extremos. La lengua está situado dentro de la masa bucal. Varios músculos vinculados a la lengua permiten los movimientos en diferentes direcciones. La lengua está cubierta con una rádula o membrana radular alrededor hacia la cavidad oral.

La rádula está revestida por una membrana conocida como lámina basal o membrana radular, cubierta con muchos dientes quitinosos, y se extiende desde la faringe hasta cavidad bucal. La membrana radular es movida hacia adelante y atrás. Los dientes funcionan como un raspador para arrancar las partículas alimenticias que van a ser ingeridas con dichos movimientos. La rádula se va renovando y va formando dientes nuevos para sustituir tal erosión durante la alimentación. Las características de los dientes centrales y dos laterales son características en su forma y tamaño y varía desde unos pocos a varios millares (JACKIEWICZ, 1998; BROWN, 2001; BRUSCA & BRUSCA, 2003; BROWN & LYDEARD, 2010).

Dos grandes glándulas salivales se encuentran cerca de la masa bucal y producen el moco que es secretado por la cavidad bucal, a través de los conductos tubulares largos de las glándulas salivales.

El conducto esofágico es tubular delgado, rodeado ligeramente por el ganglio cerebral. La parte terminal del esófago se ensancha y conduce al estómago. El estómago es grande y musculado. La pared interior del estómago está cubierta por epitelio ciliado. Una gran glándula digestiva se llama hígado, de tono marrón- verde. La digestión y absorción de alimentos se llevan a cabo en ella, y está formado de dos lóbulos, uno pequeño y el otro grande, este último enrollado en espiral alrededor de la glándula hermafrodita y alcanzando al vértice de la masa visceral, ambas glándulas lobulares abiertas por un conducto común en la parte posterior del estómago, que conducen al ciego e intestino.

El ciego o apéndice de función desconocida, está cerca del hígado. El intestino delgado es un conducto largo y delgado que se separa del estómago y va rodeando al estómago e hígado y se dobla sobre sí misma como un gran lazo y va pasando a un ancho recto y termina en el ano (COLLINS, 1911; JACKIEWICZ, 1998).

## **B) MANTO DEL MOLUSCO**

El llamado manto es una cubierta de tegumento delgado que cubre y sitúa uno junto a otro los siguientes órganos: un pulmón, un corazón, un riñón y las partes terminales del aparato digestivo y reproductivo. Se tiene también la cavidad paleal que es como un extenso manto donde cabe el manto y el cuerpo del caracol. Cerca del poro respiratorio (pneumostoma) está la abertura del recto y el osfradio, donde se encuentra incrustado en el tejido del manto.

### **C) SISTEMA EXCRETOR**

Constituido por el riñón, un gran órgano en forma de saco esponjoso y numerosos pliegues de fácil visibilidad a través del tegumento y que está junto al pulmón y pericardio de la última vuelta de la masa visceral. Su poro es grande, cerca del poro respiratorio frente al ano. La pared del conducto renal está cerca del poro blanquecino, formando una papilla clara (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

### **D) SISTEMA RESPIRATORIO**

Conformado por un pulmón, de manera que la cavidad del manto se ha convertido en una cavidad pulmonar. Existe una hendidura pequeña en el lado derecho, que lo utiliza como una abertura respiratoria llamada pneumostoma. Cuando el caracol tiene que ascender a la superficie del agua, el intercambio de gases entre el aire y la cavidad del pulmón tiene lugar a través de esta abertura. Los pulmones están en la cavidad pulmonar bajo el manto, es triangular, relativamente pequeño y se extiende a lo largo del riñón. Existen divergencias en el intercambio de gases a través de la piel por la necesidad de oxígeno. La respiración por la piel por sí sola es suficiente, sólo en Lymnaeidos en aguas bien oxigenadas (BOETTGER, 1944). Otros viven permanentemente en aguas profundas y toman oxígeno del agua que llena su cavidad pulmonar (ROSZKOWSKI, 1914a; JACKIEWICZ, 1998).

### **E) SISTEMA CIRCULATORIO**

Se compone de un corazón, que es el órgano central por donde circula la hemolinfa repartiendo a diferentes órganos a través de los vasos sanguíneos, se oxigena así en los pulmones y luego regresa al corazón. Se encuentra en el lado izquierdo del cuerpo del caracol entre el riñón y la parte anterior del pulmón. El corazón es visible desde el exterior.

La hemolinfa es responsable de recoger los productos de la digestión, de los sitios en que se produce la absorción y de distribuir estos alimentos al resto del cuerpo. Por otro lado (COLLINS, 1911), las pulsaciones del corazón entre los especímenes de

mayor tamaño se vio que era menor, mientras que en los pequeños su pulsación era mayor (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

## **F) SISTEMA NERVIOSO**

El sistema nervioso central de los Lymnaeidos se compone de un ganglio cerebral, el cual inerva por nervios periféricos a los tentáculos, ojos, en general la cabeza, así como los ganglios bucales, en los que se encuentran unos centros especiales para el control de la región de la boca, rádula y esófago. Desde los ganglios pleurales salen los nervios viscerales, que se extienden hacia atrás y dan origen a los nervios periféricos que se dirigen a las vísceras y al manto. Los nervios viscerales están conectados con un par de ganglios parietales (intestinales o paleales) y terminan en un par de ganglios viscerales. Los ganglios viscerales corresponden a la masa visceral. De los ganglios pedios también salen los correspondientes nervios pedios, que se extienden hacia el extremo posterior y dan origen a los nervios que se dirigen a los músculos del pie (JACKIEWICZ, 1998).

## **G) ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS**

El órgano sensorial de los Lymnaeidos está constituido por dos estatocistos, contenidos en una caja de tejido conectivo, situados en la parte inferior del ganglio pedio, pero inervados por el ganglio cerebral.

El osfradio (Osphradium) es el órgano olfativo, está conectado al órgano respiratorio, se encuentra cerca del pneumostoma. Se encarga de percibir mediante los quimiorreceptores para su alimentación y el sentido de orientación. Los ojos situados en la base de los tentáculos, son pequeñas en forma de pera lisa de color oscuro rodeado externamente de tejido conectivo. El nervio óptico es una rama del nervio del tentáculo que sale del ganglio cerebral. Está constituido por una cornea externa e interna, una retina que ocupa la mayor parte del ojo. El ojo está conformado de dos tipos de células: las visuales y los de apoyo, además de una lente que refracta los rayos de luz fuertemente (JACKIEWICZ, 1998).

### **2.2.2.3.- APARATO REPRODUCTOR**

El aparato reproductor comienza con una glándula hermafrodita llamada también

gónada. La glándula es grande que consta de sacos o lóbulos (ácinos). El conducto eferentes o vasos eferentes están conectados con el conducto hermafrodita, y en la parte media se depositan las vesículas seminales. Cerca de la base del útero y la glándula de la albumina y justo cerca de la salida del conducto hermafrodita hay un pequeño bolsa de fertilización; éste es el lugar donde se fertilizan los huevos. (JACKIEWICZ, 1998).

Los órganos reproductores femeninos comienzan con un largo útero fuertemente plegado. Sus pliegues están cerca de la glándula de la albúmina, que se abre a través de un conducto muy corto en el útero. La glándula de la albúmina es muy grande con la forma de un frijol. El útero pasa a un conducto tubular corta que forma la parte proximal del oviducto (oviducto I). La glándula nidamental es redonda y se abre en este lugar, más adelante el oviducto va ampliándose más, formando el cuerpo piriforme. Este órgano es grande, ovalado pasando claramente a una parte distal del oviducto II. Esta parte del oviducto tiene una forma diferente en cada especie en particular. La vagina es una parte final de los órganos reproductores femeninos, y en cuanto a su forma y tamaño pueden variar. A través de un conducto espermático comunica la espermateca con la vagina, pudiendo ser largo y delgado o corto y amplio. La espermateca (bolsa copulatrix) es frecuentemente larga, esférica o de forma ovoide raramente más alargada, generalmente en color naranja brillante. Una sustancia gelatinosa que contiene espermatozoides de la pareja de apareamiento llega a la espermateca durante la cópula. Se queda un tiempo, la secreción espermática activa a los espermatozoides y sube a la bolsa de inseminación, donde se fertilizan los huevos. La vagina termina en un gonoporo femenino, situado en una pequeña papilla (sarcobelum) próximo al pneumostoma, en la base del collar del manto del Lymnaeido a la derecha del cuerpo del caracol (COLLINS, 1911; JACKIEWICZ, 1998).

En el aparato reproductor masculino, la próstata es la primera parte de los órganos, los espermatozoides llegan aquí desde la gónada a través del conducto hermafrodita. La estructura de la próstata es característica de cada especie de Lymnaeido. Su parte proximal suele ser más estrecha y la distal ensanchada. Se pliega dentro la próstata por lo general en su parte más amplia. Un largo conducto (vasos deferentes) sale de la próstata en su lado apical, se extiende a través del cuerpo del caracol llegando al preaputium de donde sale del cuerpo del caracol, el gonoporo masculino. Entonces forma varios bucles y continúa la vaina del pene. La vaina del pene es variable en algunas especies de Lymnaeidos y es donde se deposita el pene. Este sistema masculino está innervado por un nervio del ganglio cerebral que tiene dos ramas, una

extiende la cabeza del pene y el otro inerva el pene. La eversión del pene es el resultado de un aumento en la presión de los fluidos corporales del caracol. Existen unos músculos fibrosos especiales unidos a la vaina del pene y preaputium llamados retractores, que son gruesos, finos o largos y se unen al músculo columelar. El gonoporo macho se encuentra al lado derecho del cuerpo del caracol cerca de la base del tentáculo (COLLINS, 1911; GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

## **A) REPRODUCCIÓN POR CRUZAMIENTO**

La reproducción en los Lymnaeidos es larga. Se inicia en la primavera (marzo-abril) dura hasta finales de verano, con hasta tres generaciones en un año. Los Lymnaeidos son hermafroditas y también se aparean donde uno de ellos se comporta como macho y el otro como hembra. Se indica que la autofecundación es muy rara ya que se caracteriza por una fecundación interna (JACKIEWICZ, 1998).

Durante la cópula, los espermatozoides se colocan en los órganos reproductores femeninos de su pareja. El esperma se transfiere en forma de líquido pero bastante cohesivo o adherente (JACKIEWICZ, 1986b). La fertilización se lleva a cabo en la bolsa de la inseminación. El óvulo fertilizado (zigoto) contiene sustancias nutritivas producidas por la glándula de la albumina. Está rodeada de una membrana interna y una externa en cuyo interior presenta una sustancia gelatinosa. Esta sustancia forma parte del interior encapsulando a los huevos. La capsula de los huevos (cluster) es generalmente cilíndrica o esférica, con una forma que es característica de cada especie. Además el número de huevos varía. Las cápsulas o clusters de huevos son depositadas adheridas a las plantas, piedras u otros objetos. Además el desarrollo de los huevos depende de la temperatura, con una duración en general entre 2-4 semanas en promedio (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

## **B) REPRODUCCIÓN POR AUTOFECUNDACIÓN**

Los Lymnaeidos son hermafroditas, aunque la copulación es un fenómeno no considerado normal. Cada ejemplar contiene un conjunto completo de los dos órganos reproductores masculinos y femeninos, y generalmente muestran poca diferencia entre especies. Se encuentra entre el tejido hepático y la parte anterior de la masa visceral (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).

Este tipo de reproducción es importante por el carácter biológico en los Lymnaeidos en la naturaleza. Un solo individuo puede dar lugar a toda una generación. Se ha demostrado en varias especies de *Lymnaea* que pueden reproducir a sí mismo sin fertilización cruzada. Muchos autores ha experimentado tal hecho, como ejemplo tenemos: *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), puede multiplicarse por autofecundación durante tres veces (HOLZFUSS, 1914). *Lymnaea columella* (Say, 1817) (COLTON & PENNYPARKER, 1934; HUBENDICK, 1951), *Lymnaea cubensis* (Pfeiffer, 1839) (SANCHEZ et al., 1995), todos indican que las características físicas y morfológicas son similares a los progenitores.

En un trabajo se mostró un bajo polimorfismo entre poblaciones del Viejo Mundo (Marruecos, Francia y Portugal) y Sud América (Altiplano de Bolivia), la autofecundación lleva a la pérdida de variabilidad (MEUNIER et al., 2001).

### **2.2.3.- DESARROLLO POST-EMBRIONARIO**

Los caracoles maduran más o menos en tres meses antes de completar su crecimiento de la concha. El sistema reproductivo del Lymnaeido en las primeras etapas es débilmente desarrollado y va gradualmente a medida que llega a la etapa adulta. Cabe destacar que en especímenes jóvenes ambos órganos reproductivos desarrollan a la misma velocidad, más tarde los órganos masculinos se desarrollan más rápido que los órganos femeninos, y en consecuencia pequeños caracoles tomaran un rol masculino. Otro punto importante es la regeneración de la concha, en caso de haberse producido un daño pero aquellas muy dañadas, la regeneración no es posible (JACKIEWICZ, 1998; BROWN & LYDEARD, 2010).

### **A) ALIMENTACIÓN Y HÁBITAT**

Los Lymnaeidos se alimentan de plantas acuáticas, tejidos macerados por su valor nutritivo debido al desarrollo de bacterias y hongos, algas, polen diatomeas, animales en descomposición, cápsulas de huevos e incluso de su propia especie. Los Lymnaeidos pueden vivir hasta 5 años resistentes a la falta de alimento al entrar en un estado llamado anabiótico o diapausa por varios meses. El calcio juega un papel importante principalmente en la formación de la concha y se ingiere con la comida y puede tolerar en aguas de pH 5.6- 8.5 (GIROD et al., 1980; JACKIEWICZ, 1998).



Los moluscos dulceacuícolas habitan entre las raíces de las plantas acuáticas y rocas de estanques superficial, y también en cuerpos de agua temporales cerca de la orilla corriente ligera pequeñas grandes y rápidas (GARCÍA, 2003).

## **2.2.4.- CONTROL DE CARACOLES DE AGUA DULCE**

### **2.2.4.1.- CONTROL CULTURAL**

Se han aplicado el drenaje, desecado y relleno de sus hábitats, retiro de la vegetación, inundación y multiplicación de predadores, y si bien han sido exitosos en áreas limitadas durante periodos cortos, no son prácticas en lagos grandes y corrientes. Alternativamente el uso de mamíferos pequeños, aves anfibios, peces o algunas larvas de insectos se alimentan de caracoles de agua dulce. Cuando las condiciones son favorables, los depredadores y poblaciones de caracoles se multiplicarán rápidamente manteniendo un equilibrio, pero puede desplazarse significativamente como cuando se cría patos y gansos de manera exagerada en Alemania para el control de la *F. hepatica* (LEVINE, 1970). Pero esto tendría otras consecuencias, una sobrepoblación de aves llevaría a una contaminación del agua y transmisión de otras infecciones. Los efectos de bacterias, hongos y virus no han tenido mucha atención (BERG, 1994). En una investigación en Israel se ha registrado depredadores sobre *Pseudosuccinea columella*, la sanguijuela americana *Helobdella triseriata* y también aves acuática *Gallinula chropus* and *Tringa achropus* (MIENIS & RITTNER, 2012).

### **2.2.4.2.- CONTROL QUÍMICO**

La gran gama involucra productos químicos y en consecuencia mucha inversión de dineros e investigación. El sulfato de cobre más utilizado, mata los caracoles, es barato y tóxico, pero afecta seriamente a la mayoría de los otros organismos de agua dulce, excepto algas verdes. Otros molusquicidas son pentaclorofenato de sodio, pentaclorofenato de cobre y dinitrito-orto-ciclohexilfenol (BERG, 1994).

Otros molusquicidas como la *Piqueria trinervia* fueron probados en varios Lymnaeidos como *Fossaria humilis* (Westerlund, 1885), *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) y *Stagnicola attenuata* (Say, 1829), demostrando su eficacia en

concentraciones de 50, 25 y 5 ppm. Sin embargo se recuperaron después de ser expuestos a 6 y 24 horas en las dos últimas concentraciones (CRUZ REYES et al., 1989).

En una región de Gabaldón de Nueva Éjica en Filipinas se evidenció casos de Fascioliasis y monitoreo de Lymnaeidos en campos de arroz, demostrando tras un experimento con el extracto de semilla de árbol de Neem 1:20, que puede ser una alternativa molusquicida más segura y que era comparable a la acción de la niclosamida, un producto sintético (DOMINGO, 2013).

### **2.3.- PRINCIPALES LYMNAEIDOS TRANSMISORES DE LA FASCIOLIASIS**

Los Lymnaeidos son una familia de Gasterópodos que junto con los Planorbidae son los hospedadores intermediarios de mayor importancia en la transmisión de la Trematodiasis de humanos y animales. Tienen la capacidad de transmitir a especies de Fasciolidae, Schistosomatidae y Echinostomatidae (BARGUES et al., 2001). Estos moluscos están distribuidos por todo el mundo, extendiéndose por lo climas fríos y cálidos (HUBENDICK, 1951).

Los canales, vías de agua, zanjas y conductos de desagüe ahogados por la vegetación proporcionan el medio perfecto para la proliferación de los caracoles, mientras que la corriente periódica del agua proporciona los medios que permiten la rápida diseminación de los caracoles por todo el sistema de irrigación, pudiéndose establecer a través de esas vías, nuevos focos de transmisión si las condiciones ambientales son favorables. Las mismas condiciones pueden aplicarse también al traslado de poblaciones de caracoles a nuevas zonas de colonización. Pero no se reconoce que es precisamente el hombre y todo lo que trae consigo, el que con frecuencia crearía las condiciones básicas para la multiplicación de los criaderos de Lymnaeidos transmisores de esta enfermedad.

Los Lymnaeidae comprenden un gran número de especies y géneros. Cabe destacar la relevante especificidad con las dos especies de Fasciolidae respecto a la particularidad con especies de Lymnaeidos. La *F. hepática* es transmitida por especies del grupo *Galba/Fossaria* y la *F. gigantica* lo es por especies del género *Radix*. Los Stagnicolinos y *Pseudosuccinea* pueden asumir el papel de hospedador intermediario en ausencia del principal Lymnaeido transmisor de esta enfermedad (BARGUES et al., 2001).

Entre los caracoles que participa en la transmisión de la *F. hepatica*, el principal pertenece al grupo *Galba/Fossaria*: *Galba truncatula* está África, Asia, Europa y América del Sur; *Lymnaea humilis* (Say, 1822), *L. bulimoides* (Lea, 1841) y *L. cubensis* (Peiffer, 1839) en Norte América; *L. cubensis* en el Caribe; *L. neotropica* (Bargues et al, 2007), *L. cousini* (Jousseume, 1887) y *L. viator* (D`Orbigny, 1835) en Sud América; y *L. tormentosa* en Australia. En cuanto a *F. gigantica* tenemos al género *Radix*: *R. natalensis* (Krauss, 1848) en África, *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) y *R. viridis* (QUOY & Gaimard, 1833) en Asia (MAS-COMA et al., 2014). El descubrimiento reciente de *L. schirazensis*, especie del grupo *Galba/Fossaria* que por sus características morfológicas fue confundida siempre con *G. truncatula* y otras especies de Lymnaeidos parecidos, en América de Norte, América del Sur, Asia, África, Caribe, podría llevar a revisar la distribución geográfica y epidemiológica de esas zonas (BARGUES et al., 2011a).

Una marcada e importante característica es que estos Lymnaeidos albergan al parásito y su ausencia rompe el ciclo de las fases larvianas transmisoras de la Fascioliasis. Es por eso que las características de la clasificación de los Lymnaeidos son relevantes en zonas de endemia, ya que está en relación con la Fascioliasis, llegando a ser un marcador para los estudios epidemiológicos y las estrategias de control (MAS-COMA, 2005).

### **2.3.1.- CONTROVERSIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE LOS LYMNAEIDAE**

Por muchos años se han descrito un sinnúmero de especies por todos los continentes debido probablemente a la falta de métodos más convenientes, llevando probablemente a sinonimias. Los malacólogos aún a pesar de hoy tienen ciertas diferencias en las clasificaciones de los Lymnaeidos en su morfoanatomía de las partes blandas y características de las conchas (BARGUES et al., 2001).

Debido a esta confusión y con el propósito de distinguir, caracterizar estos moluscos transmisores de esta enfermedad, se lanzó una iniciativa y fue demostrado por BARGUES & MAS-COMA (1997) que mediante la obtención de las secuencias completas del gen de la subunidad pequeña del operón ribosomal o gen 18S del ARNr, era posible distinguir entre ciertas especies europeas mostrando las relaciones supraespecífica entre especies de Lymnaeidae (BARGUES et al., 1997). Así también la caracterización por métodos moleculares, basándose en el segundo espaciador transcrito interno ITS-2 del ADNr de una gama de 66 poblaciones de Lymnaeidos, 13

europas y 1 especie norteamericana, que llegó a demostrar la existencia de 4 subtipos: *Lymnaea*, *Radix* y *Galba* en Europa y *Stagnicola* en Norte América. Demostrando que es posible usar como marcador de interés con relación a la especificidad Lymnaeidos-Trematodos (BARGUES et al., 2001; MAS-COMA et al., 2009). Más tarde, varios trabajos con las secuencias completas del espaciador transcrito interno ITS-1 (BARGUES et al., 2005, 2006, 2007b), evidenciaron la separación filogenética de las especies de estos moluscos. Los marcadores del ADNmt (mitocondriales) aún no se muestran propicios para la diferenciación taxonómica de los Lymnaeidae, aunque serán de gran utilidad futura (MAS-COMA et al., 2009).

### 2.3.2.- IMPORTANCIA DE ESTUDIAR A LOS LYMNAEIDOS POR CONTINENTES

Los estudios moleculares realizados por BARGUES et al. (2001) empezaron a constatar las confusiones en la sistemática y taxonomía de los moluscos. Los estudios moleculares demostraron en Bolivia la identificación de *G. truncatula* (MAS-COMA et al., 1999c, 2001), pues antes de estos años los expertos indicaban la presencia de dos especies *L. viatrix* y *L. cubensis* (BARGUES & MAS-COMA, 1997; BARGUES et al., 1997). De igual manera, otro estudio indicaba que una población de *L. viatrix* en la zona de Mendoza resultaba ser en realidad *Galba truncatula*, con el mismo haplotipo de Altiplano de Bolivia (BARGUES et al., 2006, 2007b).

También por métodos moleculares, se evidenció que este grupo *Galba/Fossaria* es el principal hospedador intermediario de *F. hepatica* y con una única especie *G. truncatula* en Europa, aunque también está distribuida por Norte, Centro y América del Sur, África, Próximo Oriente y Norte de Asia, donde está presente (BARGUES et al., 2011a; MAS-COMA et al., 2014).

El género *Radix* se encuentra bien individualizado en todas las filogenias y al parecer no ha podido salir de Europa, África y Asia (BARGUES et al., 2001), y explicaría la restricción de *F. gigantica* a sólo los dos continentes de África y Asia (MAS-COMA et al., 2009). Tenemos principalmente *Radix natalensis* en África y variedades de *R. auricularia* y *R. viridis* en Asia (BARGUES et al., 2001).

Los Stagnicolinos se muestra morfológicamente homogéneos pero filogenéticamente separados (MAS-COMA et al., 2009) de Europa y Norte América. *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) a pesar de su distribución por todos los continentes, no muestra casi ninguna variabilidad intraespecífica y sugiere una expansión reciente (MAS-COMA et al., 2009). Se originó en América Central, el Caribe,

la parte meridional de América del Norte, y fue extendiendo por América del Sur, Europa, África, Australia, Nueva Zelanda, Tahití (MAS-COMA, 2005). En Cuba detectaron cepas de *P. columella* resistente a *F. hepatica*, donde la Fascioliasis es transmitida por *Fossaria cubensis* y *P. columella* (GUTIERREZ et al., 2003b; FERNANDEZ CALIENES et al., 2004). Además, parece capaz de transmitir ambas especies de *Fasciola* (BARGUES et al., 2011b; MAS-COMA et al., 2014). Si bien tiene la característica de ser una especie acuática con un ámbito anfibio, existe un registro en Israel continente Asiático, en los años 1965 y 1967 un estudiante llamado Daniel Gold (GOLD, 1972), informa en su tesis de doctorado la presencia de *F. hepatica* en Israel y localiza al Lymnaeido en una pequeña estanque en la Universidad de Tel Aviv en Abu Kabir, prediciendo su propagación en todo el país es este molusco (MIENIS & RITTNER, 2012). En consecuencia predicen la interacción que podría existir entre el parásito y el molusco en un futuro (MIENIS & RITTNER, 2012).

*Lymnaea cousini* descrito en Ecuador y Colombia emparentado con el grupo *Galba/Fossaria*, que constituye un buen hospedador intermedio de la Fascioliasis (MAS-COMA, 2007b), pertenece al grupo *Galba/Fossaria* lo que explicaría su transmisión de la enfermedad.

Otras tres especies son consideradas válidas en América del Sur: *Lymnaea diaphana* (King, 1830) en estrecho de Magallanes Chile, *L. cousini* a 10 km de Quito-Ecuador y *Lymnaea rupertris* (Paraense, 1982) en Santa Catarina- Brasil (DURAND et al., 2002).

Experimentalmente también por biología molecular se pudo identificar como *L. auricularia gedrosiana* (Annandale & Prashad, 1919) (ASHRAFI & MAS-COMA, 2014) a la antes referida como *L. gedrosiana* (ARFAA et al., 1969; MASSOUD & SADJADI, 1980). Moluscos recolectados en Guilán, Irán, demostraron que pertenecen a *R. auricularia*, su compatibilidad parásito-hospedador y adaptación se dio por un extenso tiempo con *F. gigantica* (ASHRAFI & MAS-COMA, 2014). Este Lymnaeido tiene la capacidad de transmitir *F. hepatica* en bajos porcentajes con diferencia a la *F. gigantica* que pasa a ser el principal agente causal (ASHRAFI et al., 2004). Ahora bien, la amplia distribución de *Radix* por esta región y los grandes tamaños de los Fasciolidos identificados en los rumiantes, sugieren ser *F. gigantica* (ASHRAFI et al., 2004). Otro Lymnaeido presente es *G. truncatula*, con muy baja tasa de infección con *F. hepatica* en estos moluscos. *G. truncatula* es genéticamente idéntico al haplotipo H-2 conocido en Portugal, España, Francia y Los Países Bajos (ASHRAFI et al., 2007). Pero es ponderable destacar la existencia *L. schirazensis* (Küster, 1863) especie atribuida como *G. truncatula* (BARGUES et al., 2011a) (BARGUES et al., 2007),

morfológicamente semejante a *G. truncatula* (BARGUES et al., 2011a). En China luego de una pesquisa debido a un brote recolectaron moluscos del lugar identifican tres géneros *Radix*, *Physa* y *Galba* con emisión de *Fasciola* spp. Pero cuando analizaron por métodos moleculares a los pacientes, animales y un único caracol obtuvieron dos clados el mayor cayó en *F. gigantica* y el menor en *F. hepatica* (CHEN et al., 2013).

### **2.3.3.- DISTRIBUCIÓN DE LOS LYMNAEIDOS PRINCIPALES HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE LA FASCIOLIASIS**

#### **2.3.3.1.- DISTRIBUCIÓN EN AMÉRICA**

En América del Sur, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Uruguay, Chile, Bolivia y Brasil son considerados países de mayor importancia en la Fascioliasis humana (BARGUES et al., 2011a, b, c). Se confirma la presencia de 9 especies de Lymnaeidos, de las cuales seis son transmisores de *Fasciola hepatica*: *L. cubensis*, *L. cousini*, *L. viator*, *L. neotropica*, *Galba truncatula* y *Pseudosuccinea columella*, y dos de las cuales hay que ampliar los estudios para confirmar su papel en la transmisión de la enfermedad como: *L. meridensis* (Bargues et al., 2011) y *Pectinidens diaphana*, *Lymnaea schirazensis* no tiene la capacidad de transmitir la *Fasciola* (BARGUES et al., 2011a, b, c) pero es confundida por su morfología y su hábitat con *Galba truncatula* (BARGUES et al., 2011a; ARTIGAS, 2012).

Cinco especies de América del Sur pueden ser confundidos por su similitud morfológica, cuando estos son jóvenes: *L. neotropica*, *L. cubensis*, *G. truncatula*, *L. schirazensis* y *L. meridensis* (BARGUES et al., 2011b, c). En numerosos estudios se ha comprobado que ciertas especies que asumían un nombre como hospedador intermediario al ser analizados por biología molecular no eran así. Es el caso de *L. schirazensis* que fue confundida por su aspecto similar anatómico y su concha con *G. truncatula*, siendo este último el responsable de albergar al parásito de *Fasciola hepatica* y no así *L. schirazensis* (BARGUES et al., 2011a). También es el caso de *L. bogotensis* y *L. ubaquensis* que eran sinónimos de *L. cousini* y *P. columella* respectivamente (VELASQUEZ, 2006; BARGUES et al., 2011c). Esta confusión no sería la única, pues tal vez podría extenderse por África, Europa, Asia, América Central y América del Sur.

En Colombia, *L. neotropica* es conocida por primera vez como transmisor de la Fascioliasis. También dicha especie se ha descrito en Perú y Argentina (BARGUES et

al., 2007a; MERA Y SIERRA et al., 2009). Hasta ahora no está claro del todo si *L. neotropica* es responsable de endemia animal o humana (ARTIGAS, 2012). *Lymnaea neotropica* y *P. columella* resultarían ser más bien hospedadores intermediarios, ligados a zonas de endemia animal y nada se sabe hasta ahora sobre su participación en la transmisión de la Fascioliasis humana.

*L. meridensis* y *L. cousini* son dos especies que se añade a la lista de Lymnaeidos en América del Sur (BARGUES et al., 2011b), concretamente en Venezuela. Pero se desconoce el potencial de transmisión de *L. meridensis*.

En la Región del Caribe, *P. columella* y *L. cubensis* son muy conocidas como hospedadores intermediarios en Cuba y sólo *L. cubensis* en Haití afectando al ganado en todo el país (AGNAMEY et al., 2012; DIEGUEZ et al., 2012). La Fascioliasis en sentido general y sobre todo en Cuba, no ha recibido una importante atención. A pesar que tiene una marcada influencia ambiental que puede favorecer el incremento del riesgo de la Fascioliasis en particular a vacas y carneros (DIEGUEZ et al., 2012).

En América del Norte a lo largo de la Costa del Pacífico, Estados Unidos y Canadá se hallan distribuidos los grupos *Pseudosuccinea*, *Stagnicola*, *Galba/ Fossaria*, *Buliminea* y *Acella*, y las más representativas son *L. stagnalis*, *P. columella* (BORAY, 1982; BROWN & LYDEARD, 2010), *S. caperata* y *S. montanensis* (BORAY, 1982; OPS & OMS, 2003).

*Galba truncatula* es una especie conocida por su gran capacidad de transmisión de la Fascioliasis por todos los continentes. Responsable de la hiperendemia de Fascioliasis humana en el Altiplano Norte Boliviano (ESTEBAN et al., 1997a, b; MAS-COMA et al., 1999c) junto a la adaptación de este Lymnaeido y el parásito concretamente *F. hepatica* bajo condiciones extremas a 3800-4100 m s. n. m., con una preservación continua de las poblaciones combinado a lechos de aguas permanentes (MAS-COMA et al., 1999c). Y en consecuencia elevadas probabilidades de transmisión humana con reinfecciones en los niños (VALERO et al., 2003). En Perú, *G. truncatula* podría ser confundido como *L. viatrix*, de igual manera sucede en Bolivia, confundido con *L. viatrix* y *L. cubensis* (UENO et al., 1975), lo cual fue demostrado posteriormente y evidenciado por biología molecular como *G. truncatula* (BARGUES & MAS-COMA, 1997, 2005; MAS-COMA et al., 2001; BARGUES & MAS-COMA, 2005). Con igualdad genética se muestran las poblaciones de Bolivia, Chile (ARTIGAS et al., 2011) y Argentina. O por el contrario especímenes de *G. truncatula* de Europa y Bolivia no había diferencia genética por muy alejados que se encontraban, de igual manera en moluscos de *L. cubensis* de México y la Isla Caribeña de Guadalupe (BARGUES et al., 1997b; BARGUES & MAS-COMA, 2005).

*Galba truncatula* es un hospedador importante para la continuidad de la existencia de áreas de endemia humana (MERA Y SIERRA., 2009).

*Lymnaea cubensis* y *L. neotropica* han sido relacionadas en la infección humana por *F. hepatica*. *Lymnaea cubensis* está distribuida por Cuba (MAS-COMA, 2005), Haití (AGNAMEY et al., 2012), México (BIAGI et al., 1958), Venezuela en los llanos silvestres (MORALES et al., 1986; MELENDEZ et al., 1983). También se ha descrito en zonas de elevada altitud, como es el caso del Estado de Mérida 2000 m s. n. m., donde se ha reportado infecciones humanas (ALARCON DE NOYA et al., 2007). Han sido descritos estos moluscos desde mediados del siglo pasado, relacionadas con las infecciones en el ganado (VERGANI, 1911; MARTÍNEZ & MIRANDA, 1968; BARGUES et al., 2011b) y también infección humana (RAMIREZ-VILLAMEDIANA & VERGANI, 1949; BRICEÑO, 1950).

*Lymnaea neotropica* es una especie transmisora en la naturaleza (MERA & SIERRA et al., 2009). Se ha reportado en Venezuela en áreas de baja altitud como Falcón y Estado de Carabobo donde la infección humana parece ser esporádica (INCANI et al., 2003). Se reconoce que se encuentra también en Perú (BARGUES et al., 2007a), Argentina (MERA Y SIERRA et al., 2009), ahora Colombia (ARTIGAS, 2012), valles de Cajamarca del Perú y ocasionalmente en los valles de Tarija Bolivia. Es un Lymnaeido responsable de infección animal (BARGUES et al., 2007a; 2012; MERA Y SIERRA et al., 2009). *Lymnaea neotropica* genéticamente presenta similitudes con especímenes de Perú y Argentina, se caracteriza por ser una especie anfibia y recién introducida en esas áreas (BARGUES et al., 2011b; ARTIGAS, 2012). En Argentina dicha especie parece ser transmisora de la Fascioliasis en la naturaleza (MERA Y SIERRA et al., 2009).

*Pseudosuccinea columella* es otro hospedador intermediario y relacionado con infecciones en el ganado, dentro de un rango de altitud de 63-1929 m s. n. m., y es sinónima de *L. ubaquensis* (Piaget, 1914) (BARGUES et al., 2011c). Distribuidos por Venezuela, Colombia con la peculiaridad de que antes era conocida solamente en la Laguna Ubaque, Cundinamarca (HUBENDICK, 1951; VELASQUEZ, 2006; MAS-COMA, 2007), en Perú se encontraría ocasionalmente y Bolivia en tierra bajas y cálidas transmisor de la enfermedad en el ganado (BARGUES et al., 2011c). En Brasil y Argentina, *P. columella* parece ser hospedador intermediario secundario de importancia (BALDOCK & ARTHUR, 1985; PREPELITC et al., 2003; CUCHER et al 2006; MORIENA et al., 2009). Esta sinonimia se ha comprobado con especímenes, de Colombia denominada *L. ubaquensis* y de Puerto Rico como



*P. columella*, viéndose que pertenecen de hecho a la misma especie, de igual manera los de Ecuador, Argentina y Venezuela están involucrados genéticamente (BARGUES et al., 2011c). Este Lymnaeido es una especie peculiar, que se cree originaria de la región de América Central, el Caribe de la parte meridional de América del Norte (HUBENDICK, 1951), y se ha descrito en Europa (POINTIER et al., 2007), África (BROWN, 1994), Australia, Nueva Zelanda y Tahití (BALDOCK & ARTHUR, 1985; MAS-COMA et al., 2003).

*Lymnaea schirazensis* se ha descrito en Perú, República Dominicana, Venezuela, México, Ecuador, Egipto, Irán y España y no juega ningún papel en la transmisión de la Fascioliasis (BARGUES et al., 2011a).

*Lymnaea cousini* es confundida con *L bogotensis* reportadas como tal en Colombia (HUBENDICK, 1951; MALECK, 1985; MAS-COMA, 2007; BARGUES et al., 2011c) y sobre todo con ejemplares jóvenes (BARGUES et al., 2007). Su hábitat es sobre el lodo, alrededor de pequeñas colecciones de canales, colecciones de agua entre los cultivos y pasto en la Sabana de Bogotá (BRUMPT et al., 1939). Hace 50 años estos Lymnaeidos presentaban bajos porcentajes de infección del 1,64% con *F. hepatica* como hospedador intermediario secundario, y de igual manera en experiencias de laboratorio con 0.6% (MUÑOS-RIVAS, 1953). Recientemente se han logrado altos porcentajes de infestación experimental en roedores (PULS-VAN KAMP & JANSEN, 1974; VILLAVICENCIO & CARVALHO DE VASCONCELLOS, 2005). En Bogotá informes con unas tasas de infección de 34%, 39% y 60% obtenidos experimentalmente en los caracoles (SALAZAR et al., 2006), indican su importancia como un potencial hospedador intermediario. Pero los casos humanos en Ecuador parecen ser esporádicos y entonces es necesario definir el papel que desempeña como hospedador intermediario.

*Lymnaea viator* se ha demostrado su capacidad de transmisión de la infección en animales en Chile y Argentina (VENTURINI & VALENZUELA, 1985a; ROSSANIGO et al., 1983; KLEIMAN et al., 2007) y ahora se ha vuelto a reportar en Chile (ARTIGAS, 2012). Esta más involucrada en la naturaleza como se vio en el laboratorio (BACIGALUPO, 1930).

*L. diaphana* pertenece al grupo de los Stagnicolinos (BARGUES et al., 2012) y ha sido descrito en zonas de baja altitud y su participación en la transmisión de la enfermedad como en Chile, Argentina y Perú.

### **2.3.3.2.- DISTRIBUCIÓN EN EUROPA**

Los moluscos de la familia Lymnaeidae están ampliamente distribuidos en todo el

continente Europeo con una amplia gama, si bien no todos participan como hospedadores intermediarios de la Fascioliasis humana y animal. La *Fasciola hepatica* tiene un caracol de preferencia en este continente que es *Galba truncatula*, así como en América del Sur, es el principal hospedador transmisor de la Fascioliasis. Hay otros géneros de Lymnaeidos europeos: *Lymnaea sensu stricto* (s. str.), *Stagnicola* Europea y *Omphiscola* y otros taxones más antiguas a *Radix* y *Galba* propiamente (BARGUES et al., 2001, MAS-COMA et al., 2009b). Entre estos están: *Lymnaea (Lymnaea) stagnalis* (Linnaeus, 1758), *L. (Stagnicola) palustris* (Müller, 1774), *O. glabra*, *R. auricularia*, *R. peregra* (*R. balthica* y *R. ovata* son sinónimos) (BARGUES et al., 2001; MAS-COMA, 2005; MAS-COMA et al., 2009).

*Galba truncatula* se ha extendido entre las regiones templadas y frías de Europa, Oriente Próximo y el Himalaya por el Norte de Asia (ASHRAFI et al., 2007; BARGUES et al., 2001; KRUGLOV, 2005). Esta *Galba* ha evidenciado la capacidad de adaptarse a extremas condiciones físicas y químicas. El caso de Córcega es otro de los lugares donde participa este Lymnaeido ligado en la transmisión de la *Fasciola hepatica* (OVIEDO et al., 1996).

Recientemente se reclasificaron cuatro taxones: *Lymnaea palustris* (anteriormente *S. palustris* y *S. turricula*), *L. fuscus* (Pfeiffer, 1821), *L. corvus* (Gmelin, 1791), *Catascopia terebra* (antes *S. occulta*) (BARGUES et al., 2001; MEIER-BROOK & BARGUES, 2002). Todas estas especies de stagnicolinos excepto *C. terebra*, están presentes en Europa, que comparten el hábitat con *G. truncatula*. Pero aun así se desconoce la participación de la *F. hepatica* a pesar de las pruebas en las cuales no son muy evidentes.

*Lymnaea palustris* y *L. fuscus* son miembros de las Stagnicolinos europeos (Gastropoda: Lymnaeidae), cuyo papel transmisor se ha evaluado concluyendo que *L. palustris* probablemente podría cumplir un papel transmisor mucho menor que *G. truncatula* y no así *L. fuscus* (OVIEDO et al., 1996; DREYFUSS et al., 2000; NOVOBILSKY et al., 2013). Los Stagnicolinos norteamericanos y los europeos no pertenecen al mismo clado (BARGUES et al., 2001; MEIER-BROK & BARGUES, 2002). Lymnaeidos como *L. stagnalis* se ha evidenciado su extensión por Europa, una parte del Norte de África, Asia Menor (Turquía), Siria, Irán e incluso América del Norte, con una cercana relación con *L. luteola* de la India. *L. palustris* se extiende de igual manera que *L. stagnalis* y más al norte de China y Noreste de Rusia (Kamchatka) (HUBENDICK, 1951).

En América como en Europa, la Fascioliasis sólo es causada por *F. hepatica*. La ausencia de *F. gigantica* en este continente europeo es evidente a pesar de la existencia de *R. auricularia* (BARGUES et al., 2001; MAS-COMA et al., 2009b).

Seis especies de *Radix* europea se han destacado: *R. ampla*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* (llamada *R. ovata* ó *R. balthica*) y *R. auricularia* (BARGUES et al., 2001). Esta última se ha encontrado en Norte de África, Asia, Norte América y *R. peregra* en Europa y Asia septentrional (HUBENDICK, 1951, BECH et al., 2003).

### 2.3.3.3.- DISTRIBUCIÓN EN ASIA

*Radix auricularia* y otros *Radix* sp. se hallan extendidas por todos los países asiáticos. Se tiene conocimiento que de alguna manera las Cordillera del Himalaya podría haber actuado como un muro en la bioecología de este molusco. Ya que parece que al norte su distribución es más restringido que en el sur donde el clima es más permisivo (MAS-COMA et al., 2009b). Este género *Radix* se ha extendido por Europa, África y Asia y no parece haber salido de estos continentes. Por ello se explicaría que la responsable de la transmisión de *F. gigantica* fuese el molusco *R. natalensis* (MAS-COMA et al., 2009a).

Dentro del género *Radix* existe un gran problema, debido a la plasticidad morfológica entre ellas, que lleva a confusiones muchas veces. Y por el contrario otras, es posibles diferenciarlas, como es el caso de *R. ampla* (Hartmann, 1821) y *R. auricularia* es distinguible por la forma de la conchas. Para ello es necesario nuevas revisiones junto a técnicas moleculares para su identificación definitiva y no seguir teniendo confusiones en su taxonomía. En Irán se dice que existen poblaciones de *R. persica* (Issel, 1865) conocida como *Lymnaea auricularia* var. *persica* o *Lymnaea persica*, *R. auricularia* (Linnaeus, 1758), *R. bactriana* (Annandale & Prashad, 1919), *R. iranica* (Annandale & Prashad, 1919), *R. gedrosiana gedrosiana* (Annandale & Prashad, 1919) o conocida como *L. auricularia gedrosiana*, *Radix gedrosiana rectilabrum* (Annandale & Prashad, 1919), *R. bordeum* (Mousson, 1874), *R. lagotis* (Schrak, 1803); *R. labiata* (Rossmassler, 1835). El género *Stagnicola* comprende *S. palustris* (Müller, 1774) y el Lymnaeido *L. stagnalis* (Linnaeus, 1758) (GLÖER & PESIC, 2012). De igual manera respecto de los diferentes géneros de Lymnaeidos en Kirguistán, se destaca la colección de *R. auricularia*, *L. stagnalis*, y *G. truncatula* (GLÖER et al., 2014). En la India se destaca *L. auricularia* (GARG et al., 2009), en

Indonesia *L. rubiginosa* (Michelin, 1831) (SUHARDONO et al., 2006) y en Japón *L. ollula* (Gould, 1859) (YOSHIHARA & UENO, 2004).

En Vietnam, sólo hay dos Lymnaeidos son conocidos por el Sureste de Asia en zonas de transmisión de la Fascioliasis, concretamente *R. viridis* y *R. swinhoei* (HUBENDICK, 1951; TROPMED TECHNICAL GROUP, 1986). Posteriormente se añadió *R. auricularia* y *Austropeplea ollula* (WOODRUFF & UPATHAM, 1992) por su morfología. Hasta ahora tres especies son incluidos como hospedadores intermediarios, identificados por biología molecular: *Austropeplea viridis* (morfológicamente identificado como *L. viridis*), *R. auricularia* (morfológicamente identificado como *L. swinhoei*) y *R. rubiginosa* (morfológicamente identificado como *Lymnaea* sp.) (THANH & HAI, 2010; DUNG et al., 2013). La transmisión por *F. hepatica* y *F. gigantica* (ANDERSON et al., 1999) también ha sido reportada. Pero reportes recientes indican formas híbridas, la semejanza próxima a ambas duelas en su morfología y estudio molecular (PERIAGO et al., 2006; PERIAGO, 2008; LE et al., 2008) indicarían la cercanía que pudieran tener. Este acontecimiento se explicaría por el movimiento de ganados de un lugar a otro en busca de alimento, al comercio de ganados, junto a ellos el hombre. Se van sucediendo la dispersión del parásito y el molusco por doquier.

*Lymnaea gedrosiana* ha sido reportada como otro molusco que es transmisor de la *F. gigantica* en Guilán, Irán, pero una población estudiada e identificada como tal fue analizada por procesos moleculares, demostrando una sinonimia de *R. auricularia* (ASHARAFI et al., 2014). Otros estudios también la reconocieron como una subespecie llamado *L. (a.) gedrosiana*. (MANSOORIAN, 2001).

*Galba truncatula* y *Radix* son moluscos que portan el parásito, pero no todos los Lymnaeidos albergan al parásito. *Galba truncatula* transmisor de *F. hepatica*, presentan tendencias anfibias, en hábitat de pequeñas y grandes fuentes de agua lentas o rápidas, con mucha o poca vegetación de acuerdo al clima al cual se desarrolla y dependiendo de la lluvias estacionales. Pero los Lymnaeidos de la *Fasciola gigantica* como es el caso de *Radix*, prefieren aguas más profundas y permanentes ricas en vegetación. Por lo cual parece que pudiera haber una separación en su hábitat entre estos moluscos. En regiones de Vietnam (MAS-COMA et al., 2009b), Irán y Pakistán se ha visto duelas que parecen tener formas híbridas (AFSHAN et al., 2014; ASHRAFI & MAS-COMA, 2014).

Por el mar Caspio se han notificado zonas hipoendémicas humanas, con la participación de *F. hepatica* y *F. gigantica* y entre los Lymnaeidos varios del grupos *Galba/Fossaria*, *Radix*, *Pseudosuccinea* como transmisor secundario y un Stagnicolino

(MAS-COMA et al., 2003; ASHRAFI et al., 2004) que participarían en diferentes patrones de transmisión y epidemiología.

*Galba truncatula* se ha destacado principalmente en las zonas montañosas, mientras *R. auricularia* aparece restringida a las tierras bajas más cálidas. En Guilán Irán, *G. truncatula* es frecuente en las Montañas de Talesh en Guilán donde se ha confirmado la transmisión de *F. hepatica* en la naturaleza (ASHRAFI et al., 2007), mientras que *R. gedrosiana* está bien distribuida en las tierras bajas y no aparece en las zonas altas (ASHRAFI et al., 2004). Esto explica porque *F. gigantica* es la especie más frecuente con 91% en el área endémica humana en torno a las ciudades de Rasht y Bandar-e Anzali, mientras que la escases de *F. hepatica* en los animales en estas tierras bajas 8,9%, podría ser la consecuencia de *F. hepatica* infectadas, por el transporte de animales desde las tierra altas a las bajas o ser híbridos intermedio desde hace mucho tiempo (ASHRAFI et al., 2006b).

Es de destacar el éxito de la adaptación de *F. hepatica* a diferentes Lymnaeidos autóctonos de estos continentes, como es el caso de *L. tomentosa* (Pfeiffer, 1855) en Australia y Nueva Zelanda (BORAY, 1969a, BORAY et al., 1969b), *Galba/ Fossaria* en América Latina (BARGUES et al., 2007b), así como la introducción de *L. columella* en Australia (BORAY, 1978), *G. truncatula* en Nueva Zelanda (Boray, 1978) y Sud América (MAS-COMA, 2001; 2005; MAS-COMA et al., 2007; BARGUES et al., 2011a), junto a la exitosa adaptación en los órganos hepáticos del canguro en Australia y camélidos en América de Sur.

#### **2.3.3.4.- DISTRIBUCIÓN EN ÁFRICA**

En África noroccidental (Marruecos, Argelia y Túnez), *G. truncatula* se encuentra ampliamente distribuido por las zonas templadas durante ciertas estaciones y por la altitud de las Montañas (BROWN, 1994; GOUMGHAR et al., 2004). Por la región occidental del Sahara y centro de África, está distribuida *R. natalensis* y por el Delta del Nilo de Egipto, Kenia y Tanzania, con focos aislados de Fascioliasis, se encuentra *G. truncatula* junto a *Pseudosuccinea columella* como transmisores de esta enfermedad (BROWN, 1994).

En el Delta del Nilo se encuentra *R. natalensis caillaudi* y *G. truncatula* con la particularidad que si bien están en un mismo hábitat y lo comparten en determinado tiempo, la temperatura influiría mucho, con tiempos favorables de suave invierno para *Galba* y *F. hepatica* y el verano y otoño sería apropiado para el desarrollo de *R.*

*natalensis caillaudi* y *F. gigantica* compartiendo un mismo huésped definitivo (MAS-COMA et al., 2009a). *L. caillaudi* es un sinónimo de *R. natalensis* y *R. natalensis caillaudi* (BROWN et al., 1984; BROWN, 1994; VAN SOMEREN, 1946). Está ampliamente extendido hacia el norte y el este de África por el norte de Egipto. En Madagascar, sugieren que la introducción de la *F. gigantica* fue reciente (TOURATIER, 1988) y con la participación de *L. natalensis* donde se propicia el ciclo evolutivo de este parásito (STOTHARD et al., 2000).

*Fasciola gigantica* se ha extendido por todo el oeste de África, al sur y este del Sahara, como también el Lymnaeido que participa en la transmisión *R. natalensis*. Otras especies existentes al sur de África son *G. truncatula* y *P. columella* que son el resultado de introducciones recientes (BROWN, 1994). Pero también se ha detectado *F. hepatica* y una superposición entre ellas, con umbrales de temperatura mínimas de desarrollo de 10°C para *F. hepatica* y 16°C para *F. gigantica* (MALONE et al., 1998; YILMA & MALONE, 1998) esa situación explicaría la distribución de áreas templadas para *F. hepatica* y más cálidas para *F. gigantica*. Asimismo la existencia de ganado, cabras y los rumiantes salvajes pequeños y grandes como la jirafa de África participan como hospedadores definitivos y con ellos las grandes migraciones iniciadas por los animales (MAS-COMA et al., 2009a).

## **2.4.- DIFERENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA FASCIOLIASIS HUMANA POR LOS CONTINENTES**

### **2.4.1.- ASIA**

Hasta 1995 la OMS hace hincapié en parásitos que afectan a los habitantes de la región asiática, centrando su preocupación basado en datos epidemiológicos de las Trematodiasis de transmisión alimentaria como el parásito *Opisthorchis viverrini*. Desde 1989 inician un programa de lucha contra *Schistosoma mekongi* y *Opisthorchiasis*, con buenos resultados después del tratamiento en República Democrática Popular Lao.

El dilema de este continente donde hay muchas problemáticas sociales y estructurales, entre ellas el área de la salud, la alta gama de vectores que transmiten enfermedades como la malaria, dengue, la encefalitis japonesa, la filariasis linfática, las enfermedades transmitidas por flebótomos y caracoles, ocupa gran parte de su interés a los científicos (WHO, 2014), dejando de lado otras que están solapadas como las Trematodiasis. Así en la India en la actualidad se reportó más de un millón de casos de

malaria en 2014 (NVBDPC, 2014) y una reducción en la filariasis linfática de 1,24% en 2004 a 0,29% en 2013, dos problemáticas de salud en que India está inmerso (NVBDPC, 2013), mientras que la Fascioliasis y otras enfermedades no parecen ser importantes.

El monitoreo de los animales en Vietnam tubo también inconvenientes, recién en el año 2000 mostraron información al respecto de las enfermedades que adolecían sus animales. A partir del 2003 los datos son evidentes en cuanto a la vigilancia e información sobre enfermedades parasitarias en general. En 2008 la FAO inicia en Vietnam, junto con otras Instituciones una campaña información referente a enfermedades zoonóticas con importancia en la fiebre aftosa y peste porcina (FAO, 2011).

Otro gran problema añadido es la existencia de duelas con formas intermedias en áreas donde *F. hepatica* y *F. gigantica* viven en simpatria como es el caso de África y Asia. Se han descrito en países como India, Irán Japón, China, Vietnam, Tailandia y Filipinas. Se ha verificado este hecho midiendo las duelas procedentes de Irán, por morfometría y posteriormente por métodos moleculares (PERIAGO, 2006; MAS-COMA et al., 2009b; AFSHAN et al., 2014b).

Los hábitos en las regiones rurales, como beber agua de los alrededores, comer vegetales acuáticos y carne no tratada incluye el hígado. Por otro el ganado vacuno y búfalos viven próximos, el estiércol y las heces humanas son utilizadas para fertilizar los cultivos (campos de arroz) y además se da el medio ambiente propicio para una continua contaminación con los huevos donde persiste la infección humana.

En 1990, en Vietnam, informaron de una repentina notificación de casos de Fascioliasis. Ya en año 2004 y 2006 existe un incremento de la donación de tabletas de triclabendazol, notificando 2 mil casos humanos probablemente por *F. gigantica* (WHO, 2006). Estos datos procedían de un reducido número de centros médicos que disponen de tratamiento. No está claro su distribución, para evaluar esta enfermedad. Por otro lado la presencia de *F. hepatica* en esta región no se puede confirmar aún (WHO, 2006). El caso de un pueblo llamado Hai Boi en la provincia de Hanoi, en el año 2000 informa un 22% de prevalencia en los ganados menores de 2 años., contrariamente (HOLLAND et al., 2000) ya que 1999 en los mataderos alrededor de Hanói era del 78% la prevalencia (ANDERSON et al., 1999). Como resultado de la campaña iniciada en el 2004 que incluía equipamiento en los hospitales, formación al personal de salud, implementación de mejoras a los laboratorios de diagnóstico y tratamiento las denuncias de casos en Vietnam han ido en aumento en año 2007, 2008 y 2009 con 1600, 2250 y 4300 casos respectivamente (WHO, 2010).

Existen estudios en el noreste de Vietnam en un número grande de familias, donde midieron la prevalencias parasitarias sin detectar ningún huevo de duelas de *F. gigantica* y *F. hepatica* (VERLE et al., 2003) aunque existe un reporte con prevalencias del 30% en ganado bovino y búfalo (KHUONG et al., 2001) y 50% en las regiones costeras por Fascioliasis (BUI et al., 2003). En el norte de Vietnam, Hanói, en una ganadería concreta evalúan su parasitación, entre otros parásitos se informa de un 28% y 39% de acuerdo al grupo de edad en los ganados infectados con *Fasciola* y no es comparable a otros valores y tampoco indican el tipo de duela presente (GEURDEN et al., 2008). Hay regiones en la cual la tasa de infección en el ganado son altísimas, de hasta 98% en los búfalos, 71% en las cabras y 31% en el ganado (WHO, 2010).

Está claro que hacen falta más datos acerca de la prevalencias relativas de ambas duelas y evidenciar su presencia. Es así que en una paciente mujer de 48 años detectan Fascioliasis cutánea después de muchas evaluaciones y por medio de diagnósticos moleculares identifican como *F. gigantica* en año 2005 (LE et al., 2007). Morfológicamente, los trematodos adultos se encuentran en animales y pacientes humanos y si bien se tipifica como *F. gigantica* hay otra que denominan parecida a *F. hepatica* indicando posibles híbridos que ocurre en Vietnam (LE et al., 2008). De igual manera a pesar de analizarlos por métodos moleculares no pueden confirmar la presencia de posible duelas híbridas (NGUYEN et al., 2009). Estudios posteriores van confirmando la propagación de Fascioliasis en humanos y animales sugiriendo riesgos potenciales de infección para el hombre con una prevalencia global en animales del 45,3 % (NGUYEN et al., 2012). Las infecciones son adquiridas, ingiriendo alimentos crudos contaminados es evidente, pero hace falta trabajar en el control de la transmisión con la colaboración de profesionales, agricultores y además métodos técnicos como el tratamiento de aguas, desparasitación, y hay que trabajar con esos modelos para controlar la infección.

Según la OMS, China presentó datos epidemiológicos muy importantes para iniciar la lucha contra la trematodiasis de transmisión alimentaria en 1995. Ya desde 1930 informaron del primer foco endémico de *Paragonimus wesermani* y en 1988 y 1992 la Clonorchiasis también afecta a las provincias de China y junto al Ministerio de Salud Pública, consiguieron bajar la prevalencia inicial para 1995 (OMS, 1995). Hoy las cifras transmitidas por Trematodiasis es más del 5% según (YANG et al., 2014). La Fascioliasis humana también ha sido reportada como tal en 1990 con 44 casos (CHEN, 1991). En una encuesta nacional entre 1988 y 1992 reveló que 148 personas portaban *F. hepatica* y 9 personas *F. gigantica* (XIANG et al., 2003) por identificación morfológica, en 1992 sobre 120 mil casos estimación de una primera encuesta pero



documentados un total de 204 casos humanos (XU et al., 1999). La atención a este problema es muy poca, llena de vacíos de conocimiento en materia de vigilancia y respuesta a las enfermedades transmitidas por los alimentos y uno que otro informe de brote. En una encuesta en un matadero de Zhuang se detectó un 50% en bovino y 54% en búfalos infectados con *F. gigantica* (WANG et al., 2006). Pero un año antes en Yunnan se reportó 15 casos de *F. hepatica* y 29 casos de *F. gigantica* en 2012 (XIANG et al., 2003; ZOU et al., 2012). Desde mediados de 2011 las autoridades de salud gestionaron tres hospitales y un centro para el diagnóstico de enfermedades parasitarias. En 2011 se detectó un brote familiar por consumo de vegetales acuáticos, los cuales fueron sometidos a análisis inmunológico y detección de huevos en heces diagnosticando como *Fasciola* sp. Pero junto ello se analizaron también al ganado con un 28% y caprino con un 26% todos del lugar informando la presencia de *F. gigantica* y *F. hepatica*. (CHEN et al., 2013). Dentro de la ganadería, también hay que destacar a los búfalos, los cebúes y el yak utilizados como animales de carga con desplazamientos largos y cortos. En los búfalos indican una prevalencia de trematodos y nematodos bastante severa, con un 44.7% para *F. hepatica* y 24.9 % para *F. gigantica* en un matadero en Provincia de Hunan (LIU et al., 2009). Hoy China está dirigiendo su mirada a la transmisión de Trematodiasis por la ingesta de alimentos crudos o poco preparados pues existen datos del 2008 indicando que la salida de productos acuáticos estaba cerca de 49 millones de toneladas (YANG et al., 2014), lo cual indicaría un gran riesgo a medida que pasa el tiempo.

En Corea del Sur en 1956 reportaron huevos cuyas características se asemejaba a *Fasciolopsis buski* (Barlow, 1925) o *F. hepatica* (CROSS, 1970). En 1958 confirman la existencia de *F. buski* junto a otros Trematodos (KUNTZ et al., 1958). En Corea del Sur, un estudio coprológico realizado por el Seul National University Hospital entre los años 1968 a 1977 de 285 personas no identificaron huevos de *Fasciola*, otros 10 años posteriores hasta 1987 sólo 2 casos con *Fasciola* de 581 pacientes y llevándose la corona la Cisticercosis, la Paragonimiasis y Clonorchis (CHI et al., 1988), coincidiendo con otros autores (KIM et al., 1994). Hasta que en 1976 en que se reporta un caso donde por casualidad encuentran una *Fasciola* sp. en el conducto biliar (CHO et al., 1976). Un segundo caso en 1979, en un paciente es detectado en el intestino una duela e indican con ciertas dudas y extrañeza de ser una *Fasciola* migratoria (LEE et al., 1982). También detectan otro caso de Fasciolosis intraocular, identificándolo con una serie de análisis para su confirmación (CHO et al., 1994). Cuatro casos son reportados detectando múltiples lesiones hepáticas y por ensayo inmunoenzimático sólo 3 dieron reacción positiva a *F. hepatica* (KIM et al., 2005) y así ingresos

hospitalarios puntuales, a través de pruebas serológicas, se informan como *F. hepatica* (LEE & KIM, 2006). Los investigadores la indican como infección muy rara en el país, pero los análisis son más determinantes. En un paciente se hizo el diagnóstico por tomografía de vías biliares, serología y examen de heces para Fascioliasis y Clonorchiasis (KIM et al., 2014). Existen muchos informes parecidos pero no se han evidenciado la verdadera situación en la que se encuentra este país.

Lamentablemente se desconoce la situación de Corea del Norte, llamada también República Popular Democrática de Corea del Norte

Sobre Filipinas, en 1910 existen reportes de residentes chinos y no así en gente autóctona del país. En Laos y Camboya desde 1965 y 1968 no existe reportes evidentes (CROSS, 1970). Después de una década, se vislumbra zonas endémicas en Filipinas, con un 35% a 100% de incidencia (TONGSON, 1978), nombrando como agentes causales *F. gigantica* y *F. hepatica* principales agentes de esta enfermedad (MOLINA et al., 2005), considerándose la principal causa de morbilidad y mortalidad en los rumiantes, y la más frecuente con 6 mil reportes y más de 200 mil durante los años de 1997 a 2004 (EAHMI, 2008). En el Municipio de Gabaldon, Filipinas resultó con una prevalencia del 15% en los rumiantes de *F. hepatica* con una asociación significativa (DOMINGO, 2013). Entre los 2005 a 2010 existe una ausencia de comunicación referente a la Fascioliasis.

Desde 1951 se inicia en Tailandia un programa de lucha y educación contra la Opisthorchiasis. En 1992 se inicia junto al Plan Nacional de Fomento de la Salud Pública, si bien hasta 1995 se había reducido a consecuencia de la desparasitación. Posteriormente surgieron problemas por una inadecuada preparación a la comunidad, falta de métodos y poco compromiso por parte de los funcionarios de la región, aunque en cierta manera se vio una cierta tendencia a alejarse del consumo de alimentos de alto riesgo, como el pescado crudo, ensaladas de pescado fresco y pescados semifermentados. El interés al que se deben entre otros problemas de salud está *F. buski* y otros parásitos donde presentan altas prevalencias en humanos y animales en muchas regiones, sólo observaron un caso humano positivo de *Fasciola hepatica* (MANNING et al., 1968). Otros sondeos en 28 provincias de las cuales reconocen a *F. buski*, Ancylostomideos, *Echinostoma Schistosoma* y *Opisthorchis* entre 1978 a 1979 (VIBOOLYAVATANA et al., 1981) y *L. (Radix) auricularia rubiginosa* como transmisor del parásito junto a otros moluscos encontrados. Posteriormente, reportan una prevalencia en bovinos y búfalos del 11,8% en 1989 por *F. gigantica* (SUKHAPESNA et al., 1989). En 1991 existen reportes desde 0 a 85% de prevalencia de *F. gigantica* en el ganado y búfalos. Entre 1971 y 1989 existen reportes de casos humanos en total 12,

que indican entre *F. gigantica* y *F. hepatica* (NITHIUTHAI et al., 2004) aunque no confirman con claridad a la duela. En un análisis serológico de 204 pacientes sólo 13 personas estaban infectadas con *F. gigantica* (TANTRAWATPAN et al., 2005). Son casos en los cuales los pacientes se presentan a centro médicos con molestias insoportables que les empujan a acudir por los síntomas cuyo diagnóstico indica *Fasciola* sp. o *F. gigantica* (AROONROCH et al., 2006; KANOKSIL et al., 2006).

Son pocos los casos de Fascioliasis humana en la India, hallazgos accidentales, principalmente del norte al noreste (RAMACHANDRAN et al., 2012). Llegan a los centros con malestares de fiebre y luego de ser sometidos a diagnósticos visualizan a los Trematodos adultos en los conductos biliares y análisis serológicos. Casos en pacientes en el cual identificaron a las duelas por ecografía y radiología, revelaron a la responsable *F. hepatica* o simplemente *Fasciola* sp. (KUMAR et al., 1995; NARAIN et al., 1997). Existen casos de fascioliasis ectópica medular de la columna y en la pared abdominal cerca del ombligo logrando identificarlas como *F. hepatica* (DEVENDRA et al., 2006; GHILDIYAL et al., 2014), del mismo modo. Otros tres casos en diferente tiempo por hallazgos radiológicos y ecografía, que condujo a extraerlo y por métodos morfométricos fue identificado como *F. gigantica* o un probable híbrido (GANDHI et al., 2010; RAMACHANDRAN et al., 2012). Se ha informado la existencia de especies híbridas en regiones donde las dos especies están presentes (MAS-COMA et al., 2009a) por métodos morfométricos de los óvulos de las duelas procedentes de varias continentes (VALERO et al., 2009) proponiendo rangos únicos para cada especie en cada región con aquellas especies superpuestas de otros continentes. En el Norte de India en Tarai, se llevó a cabo un estudio epidemiológico entre el 2001 a 2004, y observaron que la prevalencia en el ganado bovino era del 15,5 % en invierno, y en verano con lluvias y caso inverso ocurría con las ovejas y cabras llegando a 4,6% (GARG et al., 2009). Al revisar las literaturas no existen datos epidemiológicos sobre la prevalencia o no están disponibles.

En Laos existe casi un total desconocimiento en la infección humana aunque el modo de vida es similar a estos países fronterizos, y por tanto existe un riesgo potencial en contraer la Fascioliasis, junto a otros parásitos que también ocupa la atención de este país. En 2004 en unas aldeas del Sur de Laos informan la prevalencia de Fascioliasis humana de 2,4% en heces y 13,8% en pruebas serológicas. Y en algunos mataderos osciló entre el 17% a 57% en el ganado en general y con un 75% a 100% en los búfalos (QUANG et al., 2008). En 2010 en las provincias de norte de Laos existe otro estudio en los mataderos y en el campo, notificando una prevalencia de 34% y un 17% para el año 2011, identificados como *Fasciola* sp. Y con un 70% con

lesiones en los conductos biliares e hígado identificados como *F. gigantica*, con unas tasas de 95,5% en búfalos y 40% en el ganado (RAST et al., 2013). En humanos describen un 16% para *F. gigantica* y 12% para *F. buski* (QUANG et al., 2008).

El entorno de Indonesia como en todo el continente es propicio para la existencia de la infección con *Fasciola* y es común en esta región en bovinos y búfalos en estas zonas de arroz y uno de los problemas que es igual en todos, es el alto costo del tratamiento a sus animales, de un elevado coste para los habitantes del lugar. Hasta 1970 no existe ninguna referencia más que un atisbo de interés que esta enfermedad está restringida a familias de las inmediaciones de sus plantaciones y debe darse importancia sólo a los cerdos y los caracoles de la región (CROSS, 1970), cuyo interés se refiere a *F. buski*. En 1996 se lanzó una estrategia de control de la Fascioliasis y para el año 2000 no se había producido ningún resultado a pesar de toda una llamarada de información a los agricultores. Las razones fueron faltas de interés y aprendizaje de todas las partes (MARTINDAH et al., 1998; SUHARDONO & COPEMAN, 2008). No es el único caso, ocurrió también en 1982. En los años posteriores el interés se encuentra en los bovinos y búfalos que se encuentran infectados con *F. gigantica* en un 80% (SUHARDONO et al., 1997) de enero a junio, a causa de la ingesta de forrajes de tallos de arroz contaminadas con metacercarias, forma infectante de la Fascioliasis, junto otros vegetales acuáticos de la región (UENO & YOSHIHARA, 1974; SUHARDONO et al., 2006). Estos estudios indicaban que las metacercarias se encontraban a 10 cm de la parte inferior del tallo de arroz. Hoy una de las miradas que más se centran, es en la capacidad inmunológica de cierta raza de ovejas que presenta una cierta resistencia a estas duelas (PLEASANCEA et al., 2011).

En lo que se refiere al Cercano Oriente, parece tratarse de un importante foco de infección humana. Una situación complicada surge en la provincia Guilán, al presentarse *F. gigantica*, *F. hepatica* y formas intermedias, una situación compleja donde las tasas de infección humana son altas en Irán (ASHRAFI et al., 2006b, 2015) y no sólo es este caso, sino también en otros países asiáticos como en el norte de Punjab en Pakistán. Este país asiático atraviesa altas prevalencias de Fascioliasis con especiales preocupaciones en el ganado, los búfalos, ovejas y cabras que van desde 10,48% a 40,3% afectando a la producción económica (IRFAN, 1984; SIDDIQI & SHAH, 1984; MAQBOOL et al., 2002; KHAN et al., 2010; AFSHAN et al., 2014b). Se hizo un seguimiento en varios distritos a los búfalos de diferentes edades entre octubre 2004 a septiembre 2005 y determinaron una prevalencia por Fascioliasis del 42% a 53% encontrando infectados por *F. gigantica* (BHUTTO et al., 2012). Además, los casos humanos de Fascioliasis han sido reportados en 6

zonas rurales de Lahore (QURESHI et al., 2005) por análisis coprológico con prevalencias 0,3% en dos años de seguimiento. En la Provincia de Khyber Pakhtunkhwa, realizaron una colecta de agua de diferentes fuentes (estanques, drenajes), identificando protozoos en un 65.5%, otros como Giardia y Cryptosporidium en un 18.5% y 19.5% e identificaron huevos de *Fasciola* en un 4.8% que concuerda con otras investigaciones anteriores (AYAZ et al., 2011). Si bien hubo reportes con altas prevalencias en infecciones parasitarias y algún caso positivo de fascioliasis, no se identificó a cuál de las dos especies pertenecen. Existe un único caso positivo como *F. hepatica* en Swat, Pakistán de más de mil heces de humano analizados coprológicamente, área por cierto montañosa (KHAN et al., 2014). Al parecer Pakistán así como en las montañas y lugares cálidos no está libre de la Fascioliasis y por la observación del comportamiento alimenticio humano, es necesario realizar un análisis serológico extenso para poder mostrar la verdadera situación epidemiológica humana.

En Cambodia el principal problema es la práctica de pastoreo de los rumiantes, a consecuencia de las plantas acuática (arrozales) con las que se alimentan, con frecuencia contaminada con metacercarias y junto a la competitividad existente con otros parásitos, recientemente dan importancia a este complejo hecho (GRAY & COPLAND, 2008). Por otro lado la *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa* es uno de los hospedadores intermediarios presentes en la región donde no han podido identificar a la *Fasciola* pero si a otros Trematodos (NGOEN-KLAN et al., 2010) demostrando así que existen muchos huecos por tapar. En un estudio en Cambodia los rumiantes presentaban un 24,5% de infección (SOTHOEUN et al., 2006) y en Bangladés un 22,5% en búfalos (AHMEDULLAH et al., 2007). Ahora bien, son muy pocos los casos humanos reportados, como son los casos de Singapur, Malasia, Bangladés (KANG et al., 2008) y casi nada se sabe de otros países asiáticos como es el caso también de Birmania o Taiwán, si bien todos ellos presentan condiciones favorables para el desarrollo de este parásito. Y no debemos olvidar la inmigración que existe entre estos países, las grandes exportaciones de alimentos y animales a causa de gran movimiento económico. Los programas de desparasitación iniciados por WHO, UNICEF y otros en el continente asiático con campañas y tratamientos con antihelmínticos llegan también a países menos desarrollados como es el caso de Cambodia con 67 mil personas en 2012 y 23 mil en 2013 (WHO, 2015).

En Japón también se presenta el mismo problema de la alimentación contaminada con metacercarias de *Fasciola* en los tallos de arroz principalmente, y otras plantas. Por ello son endémicas en las granjas por *F. hepatica* y *F. gigantica*.

En un matadero en Tokio se observaron duelas en la vesícula biliar de los bovinos y por el tamaño los identificaron como *F. gigantica* (YOSHIHARA & UENO, 2004). La Fascioliasis en este país es considerada una enfermedad rara. Al parecer en 1992 hubo un reporte de 100 casos de Fascioliasis, y se han añadido otros casos con los años (KAGEI, 1993; MARUYAMA et al., 1996; KODAMA, 1997; ISHII et al., 2002; ADACHI et al., 2005) y después tratamientos ineficaces. Afortunadamente desde el año 2001 el triclabendazol es el fármaco autorizado por el Ministerio de Salud y Bienestar japonés (ISHII et al., 2002). En Japón las enfermedades parasitarias han sido consideradas por ser controladas con éxito en los últimos 30 años pero han surgido reemergencias. Desafortunadamente los numerosos casos de enfermedades parasitarias en Japón son sombríos, debido a la falta de un registro permanente. Dado que los síntomas y los patrones de imágenes de diagnóstico de enfermedades parasitarias no son específicas o tienen similitud con otras enfermedades infecciosas o cáncer, las enfermedades parasitarias a veces se pasan por alto por un mal diagnóstico.

En 1961 es reportado por primera vez en Sri Lanka la presencia de *Fasciola jacksoni* (Cobbold, 1869), hallado en el hígado de los elefantes muertos y así una sucesión de informes hasta hoy (ALAHAKONN, 1994; HUFFMAN, 2014) en países de la región asiática. Recientemente se ha sugerido reclasificar esta especie como *Fascioloides jacksoni* comb. nov. (HENEBERG, 2013), enfermedad animal en la que el hombre no se ve afectado. A partir de 2009, Sri Lanka inicia un plan de reconstruir el sistema sanitario tan pronto como sea posible, luego de una guerra civil más de 30 años y una serie de desastres naturales en gran parte del país que hace difícil todo seguimiento en todos los aspectos sanitarios principalmente, con un fuerte compromiso del Gobierno por una “visión para el futuro”. Tienen una serie de programas entre ellos a Malaria una enfermedad que castigo al país, y ahora no constituye un problema importante, con intenciones serias de eliminarlo para este año. Desean mantener este proceso de seguimientos continuo, junto a la evolución de los conocimientos, las prácticas de atención médica y estrategias e intervenciones organizadas para que se logre llegar a sus objetivos. Con tratamientos antihelmínticos de amplio espectro son tratados los niños en un 75% (WHO, 2012).

#### **2.4.2.- OCEANÍA**

En el oeste de Australia en los años ochenta y noventa se dieron brotes por *F. hepatica* pero a partir de 1991 se inician controles y seguimientos exhaustivos de todo

animal que ingresa al país (ovejas, vacas y caballos) y del país, con tratamientos antiparasitarios y cuarentenas de 100 días (PALMER et al., 2014). Se reportan casos humanos puntuales como la Fascioliasis migratoria en ganglio linfático cervical que contenía una *Fasciola hepatica* madura y otro confundido como quiste sebáceo (PROCIV et al., 1992), pero actualmente se dice que es una enfermedad rara. En el este de Nueva Gales del Sur debida a las frecuentes precipitaciones fluviales y hábitos de pastoreo, el ganado a menudo se alimenta por las zonas pantanosas húmedas, favoreciendo al ciclo de la *Fasciola*. La infección es endémica en los animales de crianza con problemas en el tratamiento debido a la resistencia al medicamento, por lo que se plantean el empleo de nuevos medicamentos y estrategias antiparasitarias en tiempo y estación (BORAY, 2007).

### **2.4.3.- AMÉRICA**

En América del Sur este problema de salud se extiende principalmente en las zonas Andina del altiplano de Bolivia, con prevalencias del 72% y 100% en muestra coprológicas y serológicas (MAS-COMA et al., 1995, 1999, 2009a, b; ESTEBAN et al., 1997a, b, 1999). Estos estudios en el transcurso de estos años fueron los primeros pasos de lo que más tarde se convirtió en una iniciativa mundial contra la Fascioliasis humana y la preocupación de la OMS. Con resultados esperanzadores en el 2008 se han administrado más de 680 mil dosis de triclabendazol y 155 mil personas atendidas para el 2013, con una disminución del 90% en prevalencia de la infección por *F. hepatica* (WHO, 2015).

De igual manera aunque con menor intensidad pero más amplitud geográfica, Perú es otra región que mereció la atención de la OMS, 17 mil personas fueron tratadas en el 2012 y 7 mil en 2013 (WHO, 2015). Es importante mencionar que gracias a las contribuciones y estudios hacen conocer la actual situación de la Fascioliasis humana en Perú. En Puno con una prevalencia del 15,7% (SÁNCHEZ et al., 1993; MAS-COMA et al., 1999a), 9 años más tarde en la misma zona las prevalencias locales oscilaba entre el 18,8% y 31,3% (ESTEBAN et al, 2002). Casos como en 1973 en Junín-Perú presentaba una prevalencia del 34% de fascioliasis humana, 31 años después en el mismo lugar no había cambiado mucho este valor (STORK et al, 1973; MARCOS et al, 2004), donde los niños de edad escolar son los más afectados, junto a importantes pérdidas económicas en la ganadería.

La Fascioliasis se ha descrito también en las zonas altas de Ecuador, pero sigue siendo incierto pues la región Andina es el área endémica de *F. hepatica*, donde la

prevalencia de la infección en el ganado va del 20% a 60% y en las personas con un 24% a 53% hace referencia el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA, 2003). Sin embargo en la misma región Andina aparecen prevalencias bajas de 6% (TRUEBA et al., 2000) por análisis serológico y se da casos esporádicos del 0,5% en heces (GOZALBO et al., 2004). Si la *F. hepatica* en estos dos países Perú y Ecuador fue en principio sólo un problema en la infección del ganado que se extendía en región montañosa de los Andes, Bolivia ya en 1995 presentaba el principal foco de infección humana en el Altiplano alcanzando altas prevalencias (OMS, 1995).

En Colombia, los casos de Fascioliasis humana son poco comunes, pero los informes de infecciones en el ganado data desde 1914, gracias a la política sanitaria iniciada en los mataderos (ESTRADA et al., 2006), en este país reconocen la existencia de áreas endémicas de Fascioliasis en ganado como en el caso de Boyacá, Nariño, Cundinamarca y Antioquia (ESTRADA et al., 2006; URIBE & GARCÍA, 2013). En San Nicolás de Antioquia, 61 pacientes fueron analizados por pruebas serológicas dando una prevalencia del 4,9% por fascioliasis (WHILCHES et al., 2009), cuya región informo prevalencia en el ganado del 90% de infección por *Fasciola hepatica* (CANO & VELÁSQUEZ, 2004), de igual manera que en otras regiones como Quindío con prevalencias humanas del 0,38% (RECALDE-REYES et al., 2014).

En Venezuela son muy escasos los casos de Fascioliasis (RISQUEZ, 1929; RODRÍQUEZ & GONZÁLES, 1975; SCORZA et al., 1999; INCANI et al., 2002; ALARCON DE NOYA et al., 2006) todos ellos en las regiones andinas. En el estado de Mérida, se detectó una infección en 4 niñas hermanas de un total de 9 pacientes diagnosticados con fascioliasis y otros parásitos, dando un 8% de huevos de *F. hepatica* en heces (ALARCON DE NOYA et al., 2007). Recientemente en Argentina se ha hecho una retrospectiva (MERA Y SIERRA et al., 2011) en la cual se pone de manifiesto que la Fascioliasis humana puede haber pasado desapercibido en el pasado y hacen hincapié a la situación actual, para proporcionar información y diseñar estudios que ayuden a evaluar áreas que pueden representar un problema de salud en Argentina. Son pocas áreas endémicas de zonas montañosas de los vales andinos de Córdoba, Catamarca, San Luis y Mendoza. Del mismo modo también revelan la elevada prevalencia de infección por *F. hepatica* en los Lymnaeidos de la región y en los animales como el ganado, cabras, caballos, burros y llamas en la región de Mendoza. Se ha informado como potenciales hospedadores intermediarios de la *Fasciola*, a *G. truncatula* y a *L. neotropica*, caracoles a los que debe otorgarse una atención importancia en la transmisión (BARGUEZ et al., 2006, 2007a, 2011b; MERA Y SIERRA et al., 2009). En Chile de igual manera existen referencias puntuales en



centros médicos cuyos diagnósticos han sido casuales (LÓPEZ et al., 2004; ROSAS et al., 2008; MORALES et al., 2009). Existe una encuesta en las tres provincias chilenas de Curicó, Talca y Linares con prevalencias en los humanos de 0,7%, 0,6% y 0,7% respectivamente y los animales con prevalencias de infección en caballos de 13,5%, conejos con 6,1% y 20,6% en cerdos entre 1986 a 1990 (APT et al., 1993). La Fascioliasis ganadera es un problema en Ecuador, Colombia y Venezuela donde se han efectuado estudios de los moluscos presentes en la región (ARTIGAS et al., 2011; BARGUEZ et al., 2011c) y de igual manera en Chile y Argentina (MAS-COMA et al., 2014a).

En México la infección por Fascioliasis humana es ocasional ya desde 1895 hasta la fecha (SÁNCHEZ- SOSA et al., 2000; MARTÍNEZ-BEBERT et al., 2002; CRUZ-LÓPEZ et al., 2006). Existen registros de varios estados de México en personas mayores en general. A una latitud de 1840 m s. n. m., un total de 865 niños de una Población de Atlixo de varias localidades se determinó una prevalencia global de 5,8%, que oscilaban de entre 2.9% y 13,3% junto a otros parásitos identificados (ZUMAQUEROS-RÍOS et al., 2013) e indican que esta área es mesoendémica, con focos aislados hiperendémicos. De igual manera los ganados eran afectados según los reportes de los ochenta en Chilapa, Puebla, Chipancingo, Quechultenango y Tixtla con un 13,8% de duelas en el hígado y un 16,6% de huevos positivos en heces (MILIAN et al., 1989). Toros procedentes de 11 ganaderías de diferentes estados fueron analizados minuciosamente y todos los animales resultaron positivos a alguna de las técnicas empleadas para el diagnóstico (MORAN et al., 1993) y así se suman otros reportes en animales con similares resultados. Pero en realidad no parece conocerse con precisión la epidemiología y la zoonosis parasitaria, si bien el problema existe. Reportes de Fascioliasis en Canadá y Estados Unidos son informados de inmigrantes mexicanos (CHEUNG et al., 2005; ALATOOM et al., 2008).

Formando parte del Caribe, en Cuba la enfermedad es endémica en el ganado con grandes pérdidas (ANURACPREEDA et al., 2008; BRITO et al., 2010) y se presenta en humanos en forma de casos aislados y brotes (MILLÁN et al., 2000; MAS-COMA et al., 2005b). En Costa Rica existen menciones de algún brote en el poblado y algún reporte clínico en personas mayores y un niño de 9 años Turrialba (ARROYO et al., 1979; ARROYO et al., 1986). Puerto Rico a pesar de la situación epidemiológica de brotes y altos prevalencias en el ganado en el pasado, hay que estar atento (BENDEZÚ et al., 1982). Haití se ha informado de casos humanos (AGNAMEY et al., 2012), pero aún se necesita estudios en terreno sobre la incidencia y epidemiología de la Fascioliasis humana y los moluscos que están interviniendo. En Guatemala existe alguna

inspección en mataderos con prevalencias de 3% Y 6% (VILLATORO, 2008). A pesar de haberse realizado una convenciones de gran interés, en cuanto a enfermedades desatendidas, en un reporte de la OPS, ni siquiera es mencionada la Trematodiasis en general que implica países como son Honduras, Guatemala, República Dominicana y El Salvador (OPS, 2011).

#### **2.4.4.- ÁFRICA**

Los mayores problemas de casos humanos se han detectado en Egipto (CURTALE et al., 2000; 2003a, b; HASEEB et al., 2002; ESTEBAN et al., 2003). Estimaciones iniciales de 830 mil personas afectados en la región del Delta de Nilo (WHO, 1995) han originado las actividades de control de Fascioliasis hasta la fecha de 60 mil niños, donde 2 mil han resultado positivos y recibido tratamiento, logrando bajar del 6% de prevalencia de la infección en niños hasta 1% desde 1998 al 2007 respectivamente (OMS & OPS, 2007). Y de 553 niños tratados en 2011 ha bajado a 195 niños en 2013 (WHO, 2015). Es importante no subestimar el problema pues hay que tomar en cuenta las altas prevalencias de 18%-19% en poblaciones concretas (ESTEBAN et al., 2003; MAS-COMA et al., 2005). En África junto con Asia son los continentes donde se encuentra un gran desconocimiento con la situación de la Fascioliasis humana.

#### **2.4.5.- EUROPA**

Francia es el área endémica donde se han reportado un mayor número de casos humanos (ANONYMOUS, 1888). La primera gran epidemia moderna de la Fascioliasis humana se produjo en ese país en 1956 (COUDERT & TRIOZON, 1958). Entre 1950 y 1983, un total de 3297 casos de informes publicados fueron catalogados (GAILLET et al., 1983). La mayoría de los casos se registraron en las áreas de Lyon, Bretagne Norte-Paso de Calais y Sud-Ouest. Más recientes informes sobre Sud-Ouest France se refieren a más de 300 casos (GIAP, 1987; RIPERT et al., 1988). Informes sobre 5863 casos humanos se registraron a partir de sólo nueve hospitales entre 1970 y 1982 (DANIS et al., 1985), lo que demuestra que los datos publicados estaban subestimando en gran medida la situación real. La enfermedad también es importante en Portugal, con la parte norte del país como una zona endémica marcado, incluyendo 1011 casos diagnosticados en Oporto entre 1970 y 1992 (SAMPAIO-SILVA et al., 1996). En

España, la Fascioliasis humana parece ser subestimada y distribuida principalmente en la zona norte (SORRIBES et al., 1990) por el País Vasco, Castilla-León, Cantabria, Navarra y La rioja (TURRIENTES et al., 2004) y con casos importados recientemente añadido a los autóctonos (TURRIENTES et al., 2004). En otras partes de Europa, la infección humana parece ser esporádica (ESTEBAN et al., 1998). En Francia en la Isla de Córcega se detectó una baja hipoendemia humana (GIL-BENITO et al., 1991), peculiarmente se observó la capacidad adaptativa del hospedador definitivo en ratas negras del lugar (VALERO et al., 1998; 2002; MAS-COMA, 2005) y en Francia se detectó en nutrias (MENARD et al., 2001).



# **CAPÍTULO III**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- MATERIALES

##### 3.1.1.- POBLACIONES Y ESPECIES DE LYMNAEIDOS ESTUDIADAS

Con el fin de obtener resultados lo más significativos posible en lo que concierne a los objetivos aplicados en el campo sanitario de la Fascioliasis antes enumerados en la Introducción de esta Memoria, se seleccionaron diferentes áreas de endemia con características de transmisión y epidemiología diferentes, comprendiendo especies tanto de *Galba/Fossaria* como de *Radix* y *Pseudosuccinea*.

Las zonas de endemia seleccionadas cubren así el amplio abanico de transmisión de *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* y también *Fasciola jacksoni*. Desde el punto de vista epidemiológico, las poblaciones de los Lymnaeidos en cuestión abarcan asimismo zonas de endemia en tierras continentales y en tierras insulares, y zonas de endemia propiamente dicha y zonas de epidemia actual.

Adicionalmente, en los casos de determinadas especies de Lymnaeidos se procedió a analizar más de una población, con el fin de dilucidar la variabilidad intraespecífica además de la interespecífica.

En total se han estudiado 9 poblaciones de Lymnaeidos diferentes, de las cuales una de Europa (P1), una de África (P2), seis de Asia (P3 a P8) y una de América (P9). Las denominaciones utilizadas para estas poblaciones son las siguientes:

- Lymnaea sch. P1
- Lymnaea sch. P2
- Lymnaea v.tipo P3
- Lymnaea v.toro P4
- Lymnaea sw P5
- Lymnaea radix P6
- Lymnaea sp. naula P7
- Lymnaea sp. mineria P8
- Lymnaea ub P9

Hasta la fecha, la clasificación sistemática definitiva solamente se ha podido establecer en los casos de las poblaciones de Lymnaea sch. P1 y P2, cuyas secuencias del ADN ribosomal nuclear y del ADN mitocondrial demostraron pertenecer a la especie *Lymnaea schirazensis* Küster, 1862 del grupo *Galba/Fossaria*, sin que los análisis filogenéticos respectivos efectuados mediante diferentes métodos y marcadores ofrecieran una coherencia suficiente como para otorgar esta especie a uno

u otro género (BARGUES et al., 2011), motivo por el cual dejamos aquí a la especie en cuestión dentro del género *Lymnaea sensu lato*.

En los casos de las demás poblaciones, la clasificación definitiva en una u otra especie sigue pendiente, aún y a pesar de haberse obtenido ya las pertinentes secuencias de diferentes marcadores seleccionados del ADN ribosomal nuclear y del ADN mitocondrial. Esto es debido a la ausencia de secuencias de materiales apropiados de otros países en donde especies similares fueron descritas hace uno o dos siglos. La imposibilidad de hacer las comparaciones necesarias impide pues llegar a conclusiones significativas sobre una clasificación definitiva de esas poblaciones. Van a precisarse varias expediciones adicionales para la recolección de materiales adecuados para ello, algunas de dichas expediciones habiendo sido realizadas recientemente ya, pero quedando pendientes aún algunas decisivas.

### **3.2.- MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

#### **3.2.1.- RECOLECCIÓN DE LYMNAEIDOS EN LA NATURALEZA**

En lo que se refiere a la recolección de especímenes en las zonas de endemia, 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 zonas de endemia de Vietnam, Sri Lanka, Colombia, Egipto y España. 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 biótupos 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 biótupo. 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.

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).

### **3.2.2.- TRANSPORTE DE LYMNAEIDOS AL LABORATORIO**

En el terreno, la recolección de moluscos 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 estos 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.

### **3.2.3.- VERIFICACIÓN DE LA AUSENCIA DE INFECCIÓN**

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.

### **3.2.4.- INICIO DE LA ADAPTACIÓN A CONDICIONES EXPERIMENTALES**

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 20° C, 90% de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

### **3.2.5.- LANZAMIENTO DE LOS CULTIVOS EXPERIMENTALES**

Una vez finalizada la fase de aclimatación, los moluscos eran separados por especies y en función de su origen geográfico, colocándolos en recipientes de plásticos transparentes y cerrados herméticamente con una adecuada oxigenación. Cada uno de los recipientes fue debidamente etiquetado, indicando el número de ejemplares existentes, su biótomo 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 desechado se recicla para posteriores usos mediante el empleo de una autoclave.

### **3.2.6.- SEGUIMIENTO CRONOLÓGICO DE CARACTERÍSTICAS A ESTUDIAR**

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 Vietnam y Sri Lanka, y también de Colombia en América, Egipto y de España en Europa, 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.

Como sea que el estudio que planteaba una mayor problemática era el referente a la autofecundación, se diseñaron estrategias experimentales especiales con este fin que además permitieran efectuar el subsiguiente seguimiento cronológico del crecimiento de la concha, las puestas de clusters según el tiempo y también el conteo y caracterización de los huevos de acuerdo con el avance del experimento.

Para asegurar que las puestas eran consecuencia de autofecundación y no fecundación cruzada, cada individuo, hasta un número mínimo de 35 por cada población y especie, era simultáneamente ubicado aisladamente en una pequeña cápsula de Petri, con provisión de alimento ad libitum, algas al principio y progresivo adicionamiento de lechuga con el tiempo. El aislamiento de cada individuo se realizaba inmediatamente después de la eclosión del huevo, para así impedir contacto alguno con otros individuos. El número mínimo de 35 se estableció siempre que fue posible, según la disponibilidad de los cultivos. Este número no fue diseñado únicamente por motivos de significancia estadística en los resultados iniciales, sino teniendo además en cuenta la relativa frecuencia de mortalidad de los especímenes cuando se trabaja con individuos de tan corta edad. Así, aunque hubiera una relativamente alta mortalidad durante el experimento, el número de especímenes que llegaba a alcanzar la culminación del experimento era más que suficiente. Como culminación del experimento se consideró ya la finalización de la realización de puestas por un individuo, ya la muerte del mismo.

Finalmente, cabe no olvidar la necesidad del adecuado etiquetaje, tanto de tubos, como placas y containers, para evitar contaminaciones en el manejo experimental diario de tantos caracoles.

### **3.3.- MÉTODOS MORFOMÉTRICOS 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.- MEDICIÓN 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 conchas, clusters y huevos de las poblaciones y especies de Lymnaeidos de Vietnam, Sri Lanka, Colombia, Egipto y España dentro de la presente Tesis Doctoral.

### **3.3.2.- CONSERVACIÓN 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 más 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 conquiliología 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.- MEDICIÓN DE CONCHAS MEDIANTE CIAS**

Para realizar el análisis morfométrico de las conchas de las poblaciones de caracoles recolectados y los cultivados en el laboratorio se utilizó un sistema de análisis de imagen computarizado (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 1. La longitud de la concha (LC) 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 abertura (LA), anchura de la abertura (AA), y la longitud de la última espira (LUE) se toman en base a líneas perpendiculares o paralelas a la línea de medición del caracol.

Las medidas del ángulo de la espira (AEC) se midieron con un medidor especial de ángulos de dos ramas según la Figura 1. Estas dos ramas fueron fijadas en dos puntos: una en la última espira y la otra en el peristoma que está en el nivel de máxima 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 abertura. En este momento, hay tres puntos de contacto de la concha con las ramas del ángulo medidor, que inmoviliza la concha permitiendo una medida estandarizada del ángulo.

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.

Las mediciones efectuadas están ya estandarizadas, de manera que permiten la consecución de estudios comparados significativos con otras poblaciones de la misma o diferentes especies, hecho fundamental para poder permitir diferenciaciones rápidas y sencillas, realizables incluso por personal no necesariamente especialista en el tema pero que en un momento dado pueden requerir efectuar análisis de este tipo, como es el caso por ejemplo de oficiales de salud trabajando para organismos ministeriales encargados de realizar campañas de estudio epidemiológico y/o de control.



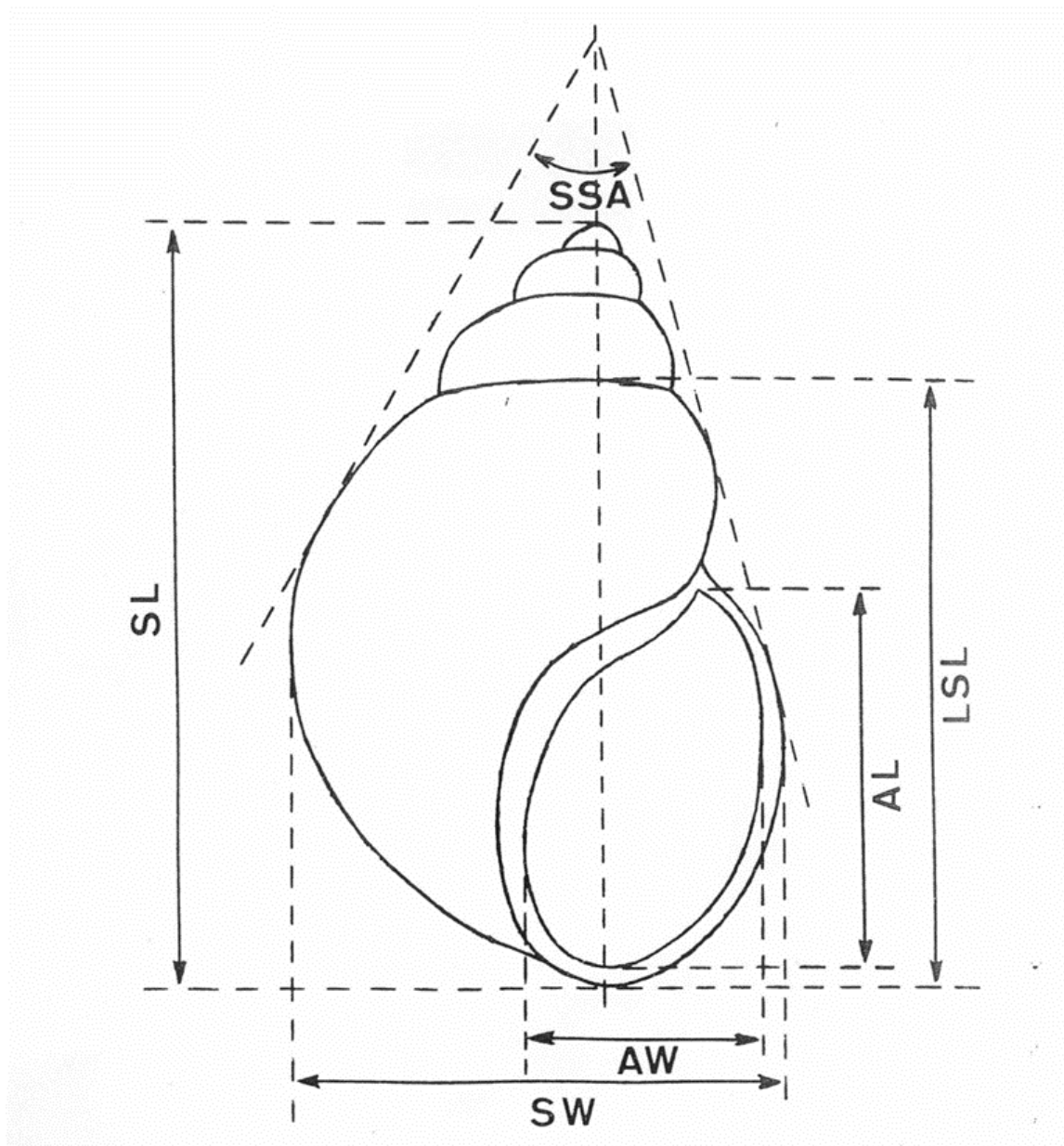


Figura 1.- Esquema de las medidas de la concha de los Lymnaeidos realizadas para el análisis de la variabilidad. SL (LC) = longitud de la concha; SW (AC) = anchura de la concha; AL (LA) = longitud de la apertura; AW (AA) = anchura de la apertura; LSL (LUE) = longitud de la última espira; SSA (AEC) = ángulo de la concha.

### 3.3.4.- MEDICIÓN 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.

### **3.3.5.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de Image-Pro® Plus se exportó 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 del laboratorio se realizó un análisis multivariable de componentes principales (ACP) utilizando los programas BAC v.4 y el PAD v. 0.82 (DUJARDIN, 2002).

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**



## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- LYMNAEA SCH. P1

Esta población de Lymnaeido *Lymnaea* sch. P1, al igual que la siguiente *Lymnaea* sch. P2, fueron las primeras en que realizamos este tipo de estudios, con motivo de la necesidad de llevar a cabo una publicación que demostrara la existencia de una especie de Lymnaeido morfológicamente indiferenciable de *Galba truncatula*, el mejor vector conocido de la Fascioliasis en todo el mundo (BARGUES et al., 2011). La urgencia de la necesidad de llevar a cabo esta publicación no permitió efectuar todo tipo de estudios ni tampoco realizar un análisis cronológico pormenorizado de las puestas consecuencia de la autofecundación a lo largo de toda la vida de los especímenes. Es por este motivo, que tanto en *Lymnaea* sch. P1 como en la siguiente *Lymnaea* sch. P2 no se incluyen determinados análisis que posteriormente sí pudimos efectuar y oportunamente detallamos en las restantes siete poblaciones objeto de la presente Tesis Doctoral.

#### 4.1.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 30 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población recolectada en la naturaleza. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	4.27	2.52	1.94	1.87	3.48	30.63
Máximo	7.42	4.02	3.39	2.37	5.52	57.17
Promedio	5.89	3.28	2.75	1.79	4.57	46.30
D. estándar	0.61	0.34	0.30	0.22	0.42	5.54

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No. de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	n.m.	n.m.	4	1.59	1.90	1.21
Máximo	n.m.	n.m.	5	2.01	2.53	1.36
Promedio	n.m.	n.m.	4.17	1.80	2.15	1.29
D. estándar	n.m.	n.m.	0.38	0.09	0.13	0.04

**Tabla 1.-** Características de la concha de la población de *Lymnaea sch.* P1.  
n.m. = no medido (medidas no efectuadas).

El estudio de la variabilidad de la longitud de la concha en 10 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)
Mínimo	4.46
Máximo	5.82
Promedio	5.05
D. estándar	0.41

**Tabla 2.-** Características de la longitud de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea sch.* P1.

#### 4.1.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 10 ejemplares. Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	157	25	100	38
Máximo	205	44	161	70
Promedio	181.40	37.40	133.70	51.50
D. estándar	16.59	6.48	20.20	12.62

Característica	Capacidad total de puesta (No. Clusters/periodo de vida total)	Taza de puesta en el periodo sexual (No. clusters/ periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.20	0.26	37	0
Máximo	0.43	0.60	66	7
Promedio	0.29	0.40	48.00	1.90
D. estándar	0.07	0.12	10.00	2.02

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post.-puesta (días)
Mínimo	0	49	6	1
Máximo	0	112	34	33
Promedio	0	84.00	17.00	12.00
D. estándar	0	23.00	11.00	10.00

**Tabla 3.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea sch. P1*.

#### 4.1.3.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para hacerse alargados e incurvados cuando mayores y conteniendo un número mayor de huevos, si bien pocos en número comparado con otras especies de *Lymnaeidos*. El cluster típico muestra una forma incurvada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, con centro más ancho y extremos atenuados. Los huevos no muestran tendencia a ubicarse según filas longitudinales.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Características	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
<b>Mínimo</b>	4.55	1.23	2.81	1.94	1.19	6	1.32
<b>Máximo</b>	12.72	2.21	6.07	3.78	2.14	23	2.48
<b>Promedio</b>	7.77	1.70	4.33	2.61	1.68	14.00	1.78
<b>D. estándar</b>	1.89	0.23	0.70	0.49	0.26	4.63	0.27

**Tabla 4.-** Características de los clusters (n = 30) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sch. P1*.

Características	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.63	0.52	1.11
Máximo (i)	0.82	0.65	1.35
Promedio (i)	0.72	0.59	1.21
D. estándar (i)	0.04	0.03	0.05

**Tabla 5.-** Características de los huevos (n = 195) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sch.* P1.

#### 4.1.4.- ESTUDIO SOBRE LAS PRIMERAS PUESTAS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio de las características del primer y de los cinco primeros clusters, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
<b>CLUSTER 1:</b>							
Mínimo	3.93	1.24	2.87	1.64	1.54	2	1.50
Máximo	7.11	2.36	4.69	2.40	2.09	10	2.35
Promedio	5.13	1.52	3.44	1.99	1.73	7.40	1.45
D. estándar	1.24	0.37	0.59	0.25	0.16	2.76	0.53
<b>CLUSTERS 1-5:</b>							
Mínimo	2.89	1.16	2.34	1.49	1.27	2	0.50
Máximo	8.10	2.36	5.09	2.42	2.10	17	3.68
Promedio	5.00	1.45	3.38	1.95	1.73	8.91	1.86
D. estándar	1.29	0.21	0.56	0.23	0.16	2.87	0.68

**Tabla 6.-** Características de los primeros clusters puestos por 10 ejemplares autofecundados de la población de *Lymnaea sch.* P1.





**Figura 2.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea sch.*  
P1 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

## 4.2.- LYMNAEA SCH. P2

Para esta población de Lymnaeido se llevaron a cabo los mismos estudios que para la precedente Lymnaea sch. P1 por los motivos y premuras antes aludidos relacionados con nuestra publicación (BARGUES et al., 2011) y es por ello que no se incluyen ciertos estudios más profundos que sí pudimos realizar en las siete poblaciones de Lymnaeidos P3 a P9 que se exponen después.

### 4.2.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 30 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población recolectada en la naturaleza. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfológico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	5.45	2.87	2.33	1.45	4.21	34.36
Máximo	7.21	4.03	3.63	2.66	5.89	56.55
Promedio	6.40	3.50	3.02	2.03	5.03	46.89
D. estándar	0.49	0.31	0.28	0.29	0.44	5.32

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	n.m.	n.m.	4	1.63	1.91	1.22
Máximo	n.m.	n.m.	5	2.13	2.42	1.37
Promedio	n.m.	n.m.	4.03	1.84	2.12	1.27
D. estándar	n.m.	n.m.	0.18	0.10	0.12	0.03

**Tabla 7.-** Características de la concha de la población de Lymnaea sch. P2.

n.m. = no medido (medidas no efectuadas).

El estudio de la variabilidad de la longitud de la concha en 10 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)
Mínimo	2.89
Máximo	3.91
Promedio	3.45
D. estándar	0.30

**Tabla 8.-** Características de la longitud de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea sch.* P2.

#### 4.2.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 10 ejemplares que permitieron un análisis suficiente del patrón de la población.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla referentes a todas las características.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	102	35	51	23
Máximo	198	50	136	54
Promedio	138.80	44.30	78.90	34.80
D. estándar	33.88	5.54	26.61	10.18

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.12	0.21	23	0
Máximo	0.45	0.72	46	4
Promedio	0.27	0.48	32.00	1.50
D. estándar	0.11	0.18	7.00	1.65

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	23	2	6
Máximo	0	101	36	37
Promedio	0	46.00	12.00	17.00
D. estándar	0	28.00	12.00	11.00

**Tabla 9.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea sch.* P2.

#### 4.2.3.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para hacerse alargados e incurvados cuando mayores y conteniendo un número mayor de huevos, si bien pocos en número comparado con otras especies de *Lymnaeidos*. Su patrón morfológico demostró ser igual que el de la población precedente *Lymnaea sch.* P1.

El cluster típico muestra una forma incurvada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, con centro más ancho y extremos atenuados. Los huevos no muestran tendencia a ubicarse según filas longitudinales.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Características	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/cluster (CEN)	Ratio GEN/CA
Mínimo	4.77	1.46	3.34	1.96	1.08	6	1.02
Máximo	13.27	3.63	6.88	4.33	2.52	19	2.10
Promedio	8.31	2.22	4.74	3.01	1.61	11.50	1.40
D. estándar	2.14	0.53	0.94	0.65	0.32	3.30	0.28

**Tabla 10.-** Características de los clusters (n = 30) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sch.* P2.

Características	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.62	0.53	1.08
Máximo (i)	0.87	0.72	1.41
Promedio (i)	0.72	0.61	1.18
D. estándar (i)	0.04	0.03	0.06

**Tabla 11.-** Características de los huevos (n = 189) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sch. P2*.

#### 4.2.4.- ESTUDIO SOBRE LAS PRIMERAS PUESTAS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio de las características del primer y de los cinco primeros clusters, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
<b>CLUSTER 1:</b>							
Mínimo	3.79	1.26	2.74	1.83	1.09	2	0.44
Máximo	7.98	2.62	4.77	2.91	1.75	12	2.06
Promedio	5.94	1.93	3.79	2.41	1.58	6.40	1.08
D. estándar	1.47	0.46	0.66	0.28	0.22	3.17	0.50
<b>CLUSTERS 1-5:</b>							
Mínimo	0.69	1.26	1.67	0.66	1.09	1	0.39
Máximo	10.91	4.38	4.92	3.23	2.62	14	6.04
Promedio	4.43	2.15	3.25	2.08	1.64	5.23	1.35
D. estándar	2.31	0.67	0.86	0.67	0.36	3.33	0.05

**Tabla 12.-** Características de los primeros clusters puestos por 10 ejemplares autofecundados de la población de *Lymnaea sch. P2*.



**Figura 3.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea sch. P2* en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

### 4.3.- LYMNAEA V. TIPO P3

#### 4.3.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	3.36	2.04	2.11	1.19	2.90	58.63
Máximo	12.42	7.49	8.65	4.85	11.06	88.65
Promedio	8.67	5.31	5.47	3.14	7.32	70.37
D. estándar	2.30	1.40	1.55	0.90	1.98	8.14

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	45.55	1.03	3	1.48	1.44	1.12
Máximo	92.38	4.04	5	1.77	1.77	1.27
Promedio	70.04	2.62	4.11	1.63	1.60	1.19
D. estándar	11.78	0.72	0.47	0.08	0.09	0.04

**Tabla 13.-** Características de la concha de la población de Lymnaea v. tipo P3.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 46 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.70	0.51	42.23	1	1.16
Máximo	0.94	0.71	96.15	1	1.51
Promedio	0.81	0.61	64.89	1	1.32
D. estándar	0.06	0.04	13.34	0	0.09

**Tabla 14.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de Lymnaea v. tipo P3.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 40 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	6.42	3.93	53.33	3	1.54
Máximo	13.36	7.28	78.21	4	1.85
Promedio	8.43	4.98	64.77	3.20	1.69
D. estándar	1.67	0.92	6.02	0.41	0.08

**Tabla 15.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea* v. tipo P3.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 46 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	7.52	4.32	4.44	2.31	5.93	50.46
Máximo	14.16	9.16	9.32	5.46	12.66	92.57
Promedio	10.59	6.69	6.66	3.86	9.17	65.49
D. estándar	1.60	1.03	1.10	0.64	1.50	9.22

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	53.57	2.11	3	1.44	1.35	1.10
Máximo	83.39	4.47	5	1.83	1.81	1.27
Promedio	70.58	3.27	3.96	1.59	1.60	1.16
D. estándar	6.38	0.57	0.29	0.09	0.09	0.03

**Tabla 16.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3 al final de su vida.



#### 4.3.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 46 ejemplares, de los que dos ejemplares sólo vivieron 50 y 53 días respectivamente, por lo que no cabe contar con estos dos para los análisis.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	50	42	1	1
Máximo	328	113	197	94
Promedio	188.13	77.93	88.18	37.68
D. estándar	60.26	17.55	57.26	27.85

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.01	0.03	1	0
Máximo	0.37	1.00	91	7
Promedio	0.18	0.48	35.40	1.10
D. estándar	0.11	0.24	26.65	1.71

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	0	0	1
Máximo	1	133	93	110
Promedio	0.02	51.65	12.78	27.45
D. estándar	0.15	37.42	16.48	32.92

**Tabla 17.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3.

### 4.3.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 39 ejemplares que se autofecundaron permitió detectar la puesta de clusters con huevos a lo largo de 211 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue menor de 10 hasta el día 9, para posteriormente incrementarse con máximos superiores a 20 clusters entre los días 22 al 43. Subsiguientemente, el número de clusters/día pasa a decrecer de manera gradual, para a partir de día 100 pasar de nuevo a ser inferior a 10 clusters/día y apareciendo los primeros días sin emisión alguna a partir del día 139. En los últimos días las emisiones de clusters son nulas con irrupción de algún día entremedio con emisión de un solo cluster.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de cluster			
	Total de cluster/días	Máximo de cluster/día	Mínimo cluster	Promedio de cluster/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	25	3	1	1.29
Promedio	7.14	1.06	0.86	0.88
D. estándar	6.20	0.59	0.35	0.36

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	423	87	20	28.71
Promedio	89.93	22.06	3.06	10.00
D. estándar	94.72	18.90	3.60	6.53

**Tabla 18.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 39 ejemplares autofecundados a lo largo de 211 días en la población de *Lymnaea* v. tipo P3.

### 4.3.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 39 ejemplares que se autofecundaron de un

total de 46 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	1	1	1	1.00
Máximo	94	3	1	1.15
Promedio	38.62	1.54	1	1.03
D. estándar	27.59	0.55	0	0.04

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	1	1	1	1.00
Máximo	1299	87	10	23.04
Promedio	486.54	33.79	1.67	11.40
D. estándar	372.61	23.21	1.77	6.09

**Tabla 19.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 39 estudiados de la población de *Lymnaea* v. tipo P3.

#### 4.3.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados e incurvados cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma incurvada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, con centro más ancho y extremos atenuados.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	3.66	1.15	2.76	1.74	1.41	1	0.24
Máximo (i)	52.30	4.21	15.84	8.34	2.89	22	1.35
Promedio (i)	14.77	1.72	6.18	3.14	1.93	9.70	0.73
D. estándar (i)	13.13	0.64	3.37	1.51	0.42	7.21	0.35
Mínimo (ii)	4.69	1.29	3.14	2.09	1.50	1	0.21
Máximo (ii)	74.50	6.12	21.69	13.69	2.45	72	1.86
Promedio (ii)	20.52	2.07	7.95	4.15	1.99	21.80	1.04
D. estándar (ii)	20.14	1.46	5.23	3.41	0.31	19.90	0.40
Mínimo (m)	7.00	1.17	3.67	2.50	1.33	3	0.25
Máximo (m)	52.34	2.30	15.30	7.27	3.01	53	1.51
Promedio (m)	17.46	1.55	6.76	3.41	1.99	16.18	0.92
D. estándar (m)	10.13	0.26	2.35	0.98	0.42	10.65	0.32
Mínimo (if)	9.46	1.27	4.95	2.70	1.74	7	0.74
Máximo (if)	44.20	2.49	13.41	6.15	2.59	41	1.82
Promedio (if)	20.85	1.70	8.03	3.61	2.21	23.90	1.17
D. estándar (if)	9.85	0.40	2.62	1.05	0.27	9.83	0.33
Mínimo (f)	5.42	1.19	3.39	1.85	1.31	3	0.27
Máximo (f)	25.37	4.77	11.39	5.02	2.42	20	1.52
Promedio (f)	13.63	1.63	5.95	3.14	1.89	9.45	0.69
D. estándar (f)	5.89	0.76	1.97	0.79	0.33	6.13	0.34

**Tabla 20.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.64	0.46	1.03
Máximo (i)	0.96	0.77	1.49
Promedio (i)	0.78	0.60	1.30
D. estándar (i)	0.09	0.07	0.13
Mínimo (ii)	0.65	0.56	1.16
Máximo (ii)	0.91	0.74	1.35
Promedio (ii)	0.81	0.64	1.27
D. estándar (ii)	0.08	0.06	0.06
Mínimo (m)	0.68	0.54	1.17
Máximo (m)	0.96	0.78	1.43
Promedio (m)	0.82	0.65	1.26
D. estándar (m)	0.07	0.06	0.06
Mínimo (if)	0.75	0.58	1.17
Máximo (if)	1.05	0.76	1.37
Promedio (if)	0.83	0.65	1.28
D. estándar (if)	0.09	0.05	0.07
Mínimo (f)	0.71	0.54	1.09
Máximo (f)	0.96	0.82	1.45
Promedio (f)	0.81	0.66	1.25
D. estándar (f)	0.07	0.08	0.09

**Tabla 21.-** Características de los huevos (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3 sometidos a autofecundación.

#### 4.3.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	No clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	4	1	2	11	1	0
Máximo	16	5	101	14	81	39
Promedio	9.77	2.40	26.26	12.80	17.23	9.03
D. estándar	3.07	1.12	26.79	0.80	19.91	10.92

**Tabla 22.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3 sometidos a autofecundación.



**Figura 4.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea* v. tipo P3 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

#### 4.4.- LYMNAEA V. TORO P4

##### 4.4.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	3.58	2.25	2.45	1.34	3.13	44.14
Máximo	12.90	7.54	7.77	4.31	10.64	75.62
Promedio	9.15	5.42	5.51	3.09	7.45	62.67
D. estándar	2.09	1.22	1.30	0.69	1.72	6.51

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	47.02	1.05	3	1.51	1.46	1.14
Máximo	91.00	4.37	5	1.84	1.86	1.32
Promedio	63.82	3.12	4.31	1.69	1.67	1.23
D. estándar	8.74	0.75	0.58	0.08	0.09	0.04

**Tabla 23.-** Características de la concha de la población de Lymnaea v. toro P4.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 44 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.72	0.53	48.42	1	1.21
Máximo	0.93	0.73	95.21	1	1.45
Promedio	0.83	0.64	69.45	1	1.32
D. estándar	0.05	0.05	12.03	0	0.06

**Tabla 24.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de Lymnaea v. toro P4.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 38 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	6.41	3.62	47.77	3	1.48
Máximo	11.01	6.79	75.24	4	1.86
Promedio	8.33	4.99	60.53	3.45	1.68
D. estándar	1.26	0.88	6.70	0.50	0.10

**Tabla 25.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea* v. toro P4.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 42 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	7.66	4.82	4.79	2.58	6.43	45.87
Máximo	14.98	9.17	9.00	5.37	12.88	81.42
Promedio	10.63	6.56	6.32	3.69	9.13	58.37
D. estándar	1.35	0.92	0.77	0.58	1.18	7.90

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	51.66	2.04	3.00	1.45	1.49	1.10
Máximo	94.89	5.02	5.00	1.83	1.86	1.23
Promedio	71.31	3.59	4.12	1.63	1.68	1.17
D. estándar	9.49	0.66	0.50	0.10	0.09	0.03

**Tabla 26.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea* v. toro P4 al final de su vida.



#### 4.4.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 42 ejemplares, de los que dos ejemplares vivieron muy poco y otros dos no se autofecundaron, por lo que no cabe contar con estos para los análisis.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	87	44	1	1
Máximo	425	106	321	114
Promedio	210.26	77.18	119.66	54.84
D. estándar	87.82	17.55	74.47	34.20

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.01	0.20	1	0
Máximo	0.38	1.00	111	9
Promedio	0.23	0.47	51.42	1.71
D. estándar	0.10	0.14	31.56	2.58

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	0	0	1
Máximo	0	219	30	90
Promedio	0	66.53	8.92	22.13
D. estándar	0	45.61	5.56	21.74

**Tabla 27.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea* v. toro P4.

#### 4.4.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 38 ejemplares que se autofecundaron permitió detectar la puesta de clusters con huevos a lo largo de 339 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue menor de 10 hasta el día 7-10, para posteriormente incrementarse con máximos superiores a 20 clusters entre los días 17 al 48. Subsiguientemente, el número de clusters/día pasa a decrecer de manera gradual, para a partir del día 140 pasar de nuevo a ser inferior a 10 clusters/día y apareciendo los primeros días sin emisión alguna a partir del día 174. En los últimos días las emisiones de clusters son nulas con irrupción de algún día entremedio con emisión de 1-2 clusters.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	27	11	2	4.33
Promedio	6.19	0.91	0.71	0.74
D. estándar	6.79	0.86	0.46	0.51

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	573	76	76	76
Promedio	109.09	23.86	6.38	13.47
D. estándar	130.20	20.72	12.23	13.00

**Tabla 28.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 38 ejemplares autofecundados a lo largo de 339 días en la población de *Lymnaea* v. toro P4.

#### 4.4.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 38 ejemplares que se autofecundaron de un

total de 42 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0.00
Máximo	114	11	1	1.17
Promedio	49.95	1.52	0.90	0.93
D. estándar	36.82	1.63	0.30	0.31

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	0	0	0	0.00
Máximo	3101	76	7	34.03
Promedio	880.71	37.83	1.62	15.69
D. estándar	729.64	19.63	1.51	8.42

**Tabla 29.** - Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 38 estudiados de la población de *Lymnaea* v. toro P4.

#### 4.4.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados e incurvados cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma incurvada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, con centro más ancho y extremos atenuados.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	2.25	1.20	2.23	1.47	1.25	1	0.33
Máximo (i)	24.13	2.21	7.77	4.55	2.75	24	1.77
Promedio (i)	12.58	1.44	5.43	3.07	1.78	13.55	1.05
D. estándar (i)	5.24	0.22	1.39	0.72	0.34	7.07	0.41
Mínimo (ii)	8.55	1.17	3.91	2.99	1.18	6	0.70
Máximo (ii)	27.77	1.58	9.06	4.36	2.24	44	1.65
Promedio (ii)	16.78	1.30	5.92	3.65	1.61	20.10	1.13
D. estándar (ii)	6.64	0.15	1.75	0.50	0.35	12.00	0.34
Mínimo (m)	9.85	1.17	3.78	2.97	1.06	5	0.32
Máximo (m)	44.12	3.04	13.15	7.54	2.84	62	1.80
Promedio (m)	21.55	1.50	7.20	4.10	1.74	26.10	1.18
D. estándar (m)	9.47	0.43	2.47	0.95	0.38	14.65	0.36
Mínimo (if)	12.22	1.16	4.19	3.32	1.09	6	0.49
Máximo (if)	29.39	1.81	9.25	4.77	2.22	55	1.87
Promedio (if)	20.57	1.39	7.00	4.04	1.73	26.60	1.21
D. estándar (if)	5.54	0.22	1.64	0.52	0.32	15.58	0.46
Mínimo (f)	4.42	1.05	2.67	2.25	1.04	1	0.23
Máximo (f)	32.25	1.52	8.42	4.87	2.26	34	1.47
Promedio (f)	15.30	1.33	5.59	3.54	1.59	12.25	0.72
D. estándar (f)	6.74	0.13	1.61	0.75	0.36	9.22	0.38

**Tabla 30.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. toro P4 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.66	0.52	1.18
Máximo (i)	0.84	0.72	1.39
Promedio (i)	0.76	0.60	1.27
D. estándar (i)	0.05	0.04	0.06
Mínimo (ii)	0.71	0.53	1.18
Máximo (ii)	0.89	0.73	1.38
Promedio (ii)	0.81	0.65	1.25
D. estándar (ii)	0.05	0.06	0.07
Mínimo (m)	0.68	0.55	1.16
Máximo (m)	0.94	0.75	1.39
Promedio (m)	0.81	0.65	1.24
D. estándar (m)	0.06	0.04	0.06
Mínimo (if)	0.72	0.59	1.14
Máximo (if)	0.89	0.69	1.37
Promedio (if)	0.81	0.64	1.27
D. estándar (if)	0.05	0.04	0.08
Mínimo (f)	0.71	0.58	1.04
Máximo (f)	0.93	0.84	1.31
Promedio (f)	0.82	0.67	1.23
D. estándar (f)	0.05	0.06	0.06

**Tabla 31.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. toro P4 sometidos a autofecundación.

#### 4.4.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	No clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	1	1	2	12	1	1
Máximo	5	5	95	13	52	75
Promedio	2.61	2.61	32.83	12.35	10.43	22.39
D. estándar	1.31	1.31	26.86	0.49	13.61	18.86

**Tabla 32.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* v. toro P4 sometidos a autofecundación.



**Figura 5.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea v. toro* P4 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

## 4.5.- LYMNAEA SW. P5

### 4.5.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	3.97	2.20	2.74	1.45	3.64	53.90
Máximo	26.57	15.18	18.37	10.39	23.31	89.25
Promedio	13.18	7.83	9.13	5.32	11.84	71.39
D. estándar	5.50	3.30	3.94	2.35	4.87	7.25

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	52.61	1.01	2	1.56	1.37	1.09
Máximo	92.75	6.40	4	1.82	1.55	1.14
Promedio	67.70	3.14	3.2	1.69	1.45	1.11
D. estándar	9.21	1.18	0.47	0.06	0.05	0.01

**Tabla 33.-** Características de la concha de la población de *Lymnaea sw.* P5.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 46 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.81	0.59	48.10	1	1.28
Máximo	0.99	0.73	88.50	1	1.60
Promedio	0.90	0.64	63.30	1	1.41
D. estándar	0.04	0.03	9.81	0	0.06

**Tabla 34.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de *Lymnaea sw.* P5.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 25 ejemplares en el primer día de puesta (únicos que se autofecundaron de un total de 46) proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	14.35	9.37	58.72	3	1.35
Máximo	19.38	12.30	97.37	3	1.79
Promedio	16.60	10.64	80.33	3	1.56
D. estándar	1.15	0.74	8.50	0	0.10

**Tabla 35.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea sw.* P5.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 46 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	12.86	7.63	8.94	5.23	11.62	62.95
Máximo	20.49	13.35	15.20	9.94	18.62	91.94
Promedio	17.74	11.36	12.83	8.05	16.34	78.29
D. estándar	1.62	1.26	1.38	0.99	1.58	6.60

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	54.50	2.32	3	1.43	1.27	1.04
Máximo	98.08	5.13	3	1.73	1.59	1.14
Promedio	71.44	3.65	3	1.57	1.39	1.09
D. estándar	10.66	0.67	0	0.08	0.07	0.02

**Tabla 36.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5 al final de su vida.



#### 4.5.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 46 ejemplares, de los que sobrevivieron todos.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	136	109	8	2
Máximo	406	218	157	64
Promedio	265.57	155.16	74.00	25.80
D. estándar	53.87	33.19	36.82	14.18

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.006	0.17	2	0
Máximo	0.203	0.75	62	2
Promedio	0.09	0.37	25.32	0.24
D. estándar	0.05	0.12	14.06	0.52

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	6	1	8
Máximo	0	99	31	162
Promedio	0	48.44	11.96	52.84
D. estándar	0	25.64	9.09	43.67

**Tabla 37.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5.

#### 4.5.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 25 ejemplares que se autofecundaron, de un total de 46 ensayados, permitió hacer el seguimiento de la puesta de clusters con huevos a lo largo de 297 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue siempre bajo, de como máximo 15 clusters/día a lo largo de todo el periodo de puesta. Subsiguientemente, el número de clusters/día pasa a decrecer a 3 o por debajo de 3 a partir del día 116 y apareciendo los primeros días sin emisión alguna a partir del día 96. A partir del día 158 y hasta el final de los 297 días no hubo ni una sola puesta.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	15	2	1	1.25
Promedio	4.11	0.92	0.89	0.89
D. estándar	3.61	0.38	0.32	0.32

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	409	112	28	43.63
Promedio	66.28	24.04	3.79	11.42
D. estándar	80.21	23.86	4.79	9.05

**Tabla 38.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 25 ejemplares autofecundados a lo largo de 297 días en la población de *Lymnaea sw.* P5.

#### 4.5.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 25 ejemplares que se autofecundaron de un total de 46 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	2	1	1	1
Máximo	64	2	1	1.11
Promedio	25.80	1.20	1.00	1.01
D. estándar	14.18	0.41	0.00	0.03

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	8	5	1	2.27
Máximo	1050	112	4	45.65
Promedio	416.24	39.08	1.68	15.02
D. estándar	331.99	26.59	0.95	10.45

**Tabla 39.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 25 estudiados de la población de *Lymnaea sw.* P5.

#### 4.5.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados y sin tendencia a incurvarse cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma alargada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, de anchura más o menos uniforme a todo lo largo y extremos redondeados. La tendencia de los huevos a distribuirse en 3 hileras (aunque a veces en manera algo desordenada) es de destacar.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	6.60	1.16	3.31	2.35	1.28	1	0.09
Máximo (i)	51.25	3.29	16.27	5.23	3.80	57	1.11
Promedio (i)	22.45	1.72	8.39	3.51	2.34	11.30	0.42
D. estándar (i)	12.15	0.50	3.66	0.77	0.79	13.31	0.29
Mínimo (ii)	17.68	1.04	4.90	3.13	1.09	2	0.11
Máximo (ii)	95.54	3.04	26.33	5.11	5.15	52	0.84
Promedio (ii)	41.76	1.75	12.35	4.15	2.96	24.50	0.55
D. estándar (ii)	21.82	0.54	5.81	0.56	1.14	15.63	0.21
Mínimo (m)	22.91	1.15	7.59	3.19	1.60	4	0.16
Máximo (m)	101.14	4.13	32.46	6.38	5.79	112	1.21
Promedio (m)	45.91	1.93	13.65	4.50	3.02	30.55	0.59
D. estándar (m)	18.48	0.72	6.02	0.68	1.15	24.79	0.24
Mínimo (if)	12.16	1.22	4.80	3.40	1.36	1	0.08
Máximo (if)	79.21	3.04	24.45	5.19	6.47	70	0.88
Promedio (if)	34.59	1.54	9.96	4.23	2.40	18.20	0.45
D. estándar (if)	18.85	0.54	5.47	0.65	1.48	19.23	0.22
Mínimo (f)	11.42	1.15	4.12	3.21	1.12	1	0.09
Máximo (f)	48.79	2.20	15.82	5.02	4.17	29	0.72
Promedio (f)	27.27	1.52	8.68	4.06	2.16	11.85	0.38
D. estándar (f)	10.49	0.33	3.17	0.57	0.83	9.31	0.20

**Tabla 40.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.82	0.50	1.19
Máximo (i)	1.04	0.79	1.81
Promedio (i)	0.93	0.62	1.51
D. estándar (i)	0.06	0.08	0.14
Mínimo (ii)	0.86	0.59	1.33
Máximo (ii)	1.06	0.78	1.69
Promedio (ii)	0.98	0.66	1.48
D. estándar (ii)	0.07	0.06	0.11
Mínimo (m)	0.87	0.57	1.20
Máximo (m)	1.16	0.79	1.81
Promedio (m)	0.99	0.67	1.48
D. estándar (m)	0.06	0.05	0.11
Mínimo (if)	0.87	0.62	1.41
Máximo (if)	1.17	0.78	1.60
Promedio (if)	1.03	0.69	1.50
D. estándar (if)	0.08	0.05	0.06
Mínimo (f)	0.83	0.53	1.38
Máximo (f)	1.10	0.78	1.84
Promedio (f)	1.00	0.66	1.51
D. estándar (f)	0.06	0.06	0.11

**Tabla 41.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5 sometidos a autofecundación.

#### 4.5.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No. de cluster puesto en ese día	No. clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	1	1	6	11	1	1
Máximo	7	7	245	14	146	99
Promedio	3.42	3.27	83.63	12.22	51.17	32.47
D. estándar	1.71	1.57	55.36	0.72	36.64	23.29

**Tabla 42.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5 sometidos a autofecundación.



**Figura 6.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea sw.* P5 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

## 4.6.- LYMNAEA RADIX P6

### 4.6.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	2.97	1.85	1.87	1.19	2.77	47.04
Máximo	25.63	14.49	17.23	10.29	22.00	79.11
Promedio	12.33	7.14	7.92	4.75	10.78	64.56
D. estándar	5.42	3.21	3.66	2.16	4.73	8.76

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	46.69	0.94	2	1.59	1.44	1.07
Máximo	100.95	6.67	4	1.85	1.77	1.20
Promedio	68.92	3.53	3.51	1.73	1.57	1.14
D. estándar	10.78	1.41	0.61	0.07	0.09	0.03

**Tabla 43.-** Características de la concha de la población de *Lymnaea radix* P6.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 66 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.79	0.57	39.99	1	1.28
Máximo	1.05	0.80	99.25	1	1.53
Promedio	0.94	0.67	66.77	1	1.42
D. estándar	0.06	0.04	12.42	0.00	0.06

**Tabla 44.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de *Lymnaea radix* P6.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 25 ejemplares en el primer día de puesta (únicos que se autofecundaron de un total de 66) proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	12.69	8.11	69.91	3	1.38
Máximo	19.59	12.27	97.07	3	1.73
Promedio	15.53	9.64	80.22	3	1.61
D. estándar	1.55	1.00	8.07	0.00	0.08

**Tabla 45.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea radix* P6.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 65 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	10.82	7.70	8.32	4.99	9.90	69.38
Máximo	19.90	13.69	14.83	9.41	17.84	130.86
Promedio	16.47	10.68	11.94	7.26	15.04	83.56
D. estándar	2.06	1.15	1.47	0.83	1.80	11.26

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	56.39	1.21	3	1.20	1.25	1.06
Máximo	108.26	4.76	4	1.73	1.50	1.14
Promedio	75.98	3.34	3.02	1.54	1.38	1.09
D. estándar	9.85	0.92	0.12	0.10	0.06	0.02

**Tabla 46.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6 al final de su vida.

#### 4.6.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 66 ejemplares, de los que un ejemplar murió muy tempranamente, por lo que no cabe contar con éste para los análisis.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	12	136	1	1
Máximo	369	276	113	45
Promedio	269.95	195.08	47.40	13.80
D. estándar	64.14	38.03	35.08	11.02

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.003	0.18	1	0
Máximo	0.133	1.00	43	1
Promedio	0.05	0.41	13.54	0.08
D. estándar	0.04	0.27	10.83	0.28

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	0	0	2
Máximo	0	85	22	134
Promedio	0	33.68	8.28	51.84
D. estándar	0	25.54	6.44	40.17

**Tabla 47.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6.



#### 4.6.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 25 ejemplares que se autofecundaron permitió detectar la puesta de clusters con huevos a lo largo de 125 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue siempre menor de 10 clusters/día a lo largo de todo el periodo de puesta. Subsiguientemente, el número de clusters/día pasa a decrecer a 3 o por debajo de 3 a partir del día 86 y apareciendo los primeros días sin emisión alguna a partir del día 84. En los últimos días las emisiones de clusters son nulas con irrupción de algún día entremedio con emisión de 1-2 clusters.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	9	2	1	1.33
Promedio	2.76	0.86	0.85	0.85
D. estándar	2.20	0.39	0.36	0.36

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	185	78	39	39
Promedio	48.50	24.92	7.24	14.66
D. estándar	44.74	18.74	9.30	10.58

**Tabla 48.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 25 ejemplares autofecundados a lo largo de 125 días en la población de *Lymnaea radix* P6.

#### 4.6.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 25 ejemplares que se autofecundaron de un total de 66 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	1	1	1	1
Máximo	45	2	1	1.13
Promedio	13.80	1.08	1.00	1.01
D. estándar	11.02	0.28	0.00	0.03

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	1	1	1	1
Máximo	893	78	14	31.89
Promedio	242.48	31.32	2.36	13.18
D. estándar	271.12	22.39	2.78	8.85

**Tabla 49.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 25 estudiados de la población de *Lymnaea radix* P6.

#### 4.6.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados y sin tendencia a incurvarse cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma alargada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, de anchura más o menos uniforme a todo lo largo y extremos redondeados. La tendencia de los huevos a distribuirse en 3 hileras es de destacar.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	6.74	1.08	4.01	2.31	1.26	1	0.02
Máximo (i)	69.88	7.83	24.89	10.43	6.03	41	0.85
Promedio (i)	27.62	2.32	10.40	4.05	2.57	11.15	0.36
D. estándar (i)	19.39	1.54	6.35	1.69	1.37	12.21	0.21
Mínimo (ii)	31.81	1.93	10.61	3.38	1.93	28	0.47
Máximo (ii)	101.16	8.58	30.80	11.88	3.87	78	1.17
Promedio (ii)	57.60	3.22	17.59	5.85	3.15	45.50	0.81
D. estándar (ii)	21.24	2.19	5.83	2.65	0.57	17.93	0.21
Mínimo (m)	14.35	1.27	5.96	2.98	1.32	2	0.08
Máximo (m)	87.15	2.71	21.67	6.20	4.00	55	0.93
Promedio (m)	41.97	1.97	12.88	4.38	2.94	24.70	0.57
D. estándar (m)	16.18	0.39	3.84	0.84	0.74	13.77	0.22
Mínimo (if)	14.81	1.21	5.19	3.56	1.32	2	0.14
Máximo (if)	78.93	2.57	21.80	6.90	4.08	70	0.89
Promedio (if)	42.38	1.94	12.77	4.55	2.82	20.70	0.43
D. estándar (if)	19.32	0.40	4.83	1.01	0.95	20.11	0.28
Mínimo (f)	10.16	1.29	4.61	2.86	1.23	1	0.05
Máximo (f)	43.97	2.21	13.85	4.82	3.64	17	0.62
Promedio (f)	22.56	1.59	7.76	3.92	2.00	8.15	0.36
D. estándar (f)	8.06	0.29	2.26	0.51	0.59	5.26	0.21

**Tabla 50.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.88	0.63	1.18
Máximo (i)	1.17	0.88	1.59
Promedio (i)	1.01	0.74	1.36
D. estándar (i)	0.08	0.06	0.10
Mínimo (ii)	0.88	0.64	1.33
Máximo (ii)	1.13	0.83	1.59
Promedio (ii)	0.99	0.70	1.41
D. estándar (ii)	0.06	0.05	0.07
Mínimo (m)	0.86	0.61	1.27
Máximo (m)	1.14	0.84	1.55
Promedio (m)	0.97	0.71	1.37
D. estándar (m)	0.06	0.05	0.07
Mínimo (if)	0.83	0.62	1.25
Máximo (if)	1.09	0.81	1.46
Promedio (if)	0.98	0.72	1.37
D. estándar (if)	0.08	0.06	0.09
Mínimo (f)	0.85	0.61	1.20
Máximo (f)	1.06	0.80	1.58
Promedio (f)	0.96	0.72	1.34
D. estándar (f)	0.06	0.05	0.09

**Tabla 51.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6 sometidos a autofecundación.

#### 4.6.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	No clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	1	1	12	11	7	0
Máximo	6	6	184	16	144	49
Promedio	2.62	2.60	56.71	13.62	41.02	15.69
D. estándar	1.39	1.37	40.57	1.33	30.74	11.67

**Tabla 52.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6 sometidos a autofecundación.



**Figura 7.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea radix* P6 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

#### 4.7.- LYMNAEA SP. NAULA P7

##### 4.7.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	1.89	1.12	1.25	0.77	1.75	45.44
Máximo	25.18	14.36	17.83	9.00	22.32	69.16
Promedio	12.50	6.60	8.43	4.37	10.91	57.78
D. estándar	7.47	4.00	5.17	2.70	6.48	6.25

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	44.38	0.50	2	1.69	1.40	1.08
Máximo	102.12	6.99	4	2.09	1.78	1.22
Promedio	64.74	3.42	3.23	1.89	1.50	1.14
D. estándar	16.85	1.95	0.77	0.10	0.06	0.03

**Tabla 53.-** Características de la concha de la población de Lymnaea sp. naula P7.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 31 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.84	0.62	36.51	1	1.24
Máximo	1.23	0.85	86.23	1	1.58
Promedio	1.11	0.76	57.66	1	1.45
D. estándar	0.09	0.05	14.24	0	0.08

**Tabla 54.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de Lymnaea sp. naula P7.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 26 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Ancho máximo de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	10.61	5.26	48.99	3	1.76
Máximo	12.71	6.55	60.17	3	2.16
Promedio	11.60	5.94	55.40	3	1.95
D. estándar	0.47	0.32	2.69	0	0.09

**Tabla 55.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea sp. naula* P7.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 31 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	9.53	5.19	6.81	3.27	8.35	52.68
Máximo	18.68	10.85	12.98	7.88	16.55	65.80
Promedio	16.71	8.94	11.55	6.28	14.62	61.49
D. estándar	2.08	1.19	1.39	0.96	1.82	2.72

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	46.07	2.47	3	1.72	1.40	1.12
Máximo	74.42	5.16	4	2.01	1.50	1.17
Promedio	51.75	4.53	3.74	1.87	1.45	1.14
D. estándar	5.46	0.60	0.44	0.06	0.02	0.01

**Tabla 56.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea sp. naula* P7 al final de su vida.

#### 4.7.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 31 ejemplares, de los que dos especímenes vivieron poco menos de 50 días y murieron.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	51	47	5	2
Máximo	272	65	204	74
Promedio	159.94	53.77	104.90	37.47
D. estándar	46.99	4.12	41.28	15.54

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.04	0.28	2	0
Máximo	0.28	0.43	74	1
Promedio	0.22	0.36	37.50	0.03
D. estándar	0.06	0.03	15.42	0.18

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	3	3	1
Máximo	0	130	8	14
Promedio	0	67.47	5.40	4.90
D. estándar	0	26.24	1.07	3.49

**Tabla 57.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. naula P7.

#### 4.7.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 26 ejemplares que se autofecundaron, de un total de 31 ensayados, permitió hacer el seguimiento de la puesta de clusters con huevos a lo largo de 211 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue siempre bajo, de como máximo, y muy raramente, 20 clusters/día a lo largo de todo el periodo de puesta. Subsiguientemente, el número de clusters/día pasa a decrecer por debajo de 10 a partir del día 110 y apareciendo los primeros días sin emisión alguna a partir del día 133. Hubo puestas hasta el mismísimo último día 211.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	20	2	1	1.14
Promedio	5.33	0.81	0.80	0.80
D. estándar	4.81	0.41	0.40	0.40

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	351	41	23	26.29
Promedio	80.46	15.46	6.32	10.58
D. estándar	82.86	11.22	4.62	7.11

**Tabla 58.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 26 ejemplares autofecundados a lo largo de 211 días en la población de *Lymnaea sp. naula* P7.

#### 4.7.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 26 ejemplares que se autofecundaron de un total de 31 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.



Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	2	1	1	1
Máximo	74	2	1	1.02
Promedio	37.47	1.03	1.00	1.00
D. estándar	15.54	0.18	0.00	0.00

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	18	9	1	9
Máximo	1027	41	11	18.87
Promedio	565.93	30.50	4.80	15.23
D. estándar	222.25	6.44	2.31	2.18

**Tabla 59.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 26 estudiados de la población de *Lymnaea sp. naula* P7.

#### 4.7.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para pasar a ser alargados y con ligera tendencia a incurvarse cuando mayores y conteniendo un número elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma alargada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, de anchura más o menos uniforme a todo lo largo y extremos redondeados. La tendencia de los huevos a distribuirse en 3 hileras, aunque a veces de manera algo desordenada, es de destacar.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo.....(i)	12.96	1.50	6.71	2.65	2.17	8	0.45
Máximo.....(i)	37.21	2.20	13.76	3.66	4.04	36	0.97
Promedio...(i)	22.12	1.87	9.31	3.13	2.98	17.90	0.79
D. estándar (i)	5.43	0.22	1.81	0.29	0.54	6.44	0.11
Mínimo (ii)	26.36	1.56	9.71	3.17	2.34	19	0.71
Máximo (ii)	34.92	2.07	11.97	4.52	3.60	32	0.97
Promedio (ii)	30.12	1.77	10.57	3.58	2.99	25	0.83
D. estándar (ii)	3.32	0.15	0.74	0.43	0.36	3.83	0.09
Mínimo (m)	10.11	1.32	4.76	2.81	1.70	6	0.44
Máximo (m)	40.32	2.27	14.52	4.63	4.24	36	0.96
Promedio (m)	29.88	1.72	10.31	3.71	2.79	22.33	0.73
D. estándar (m)	6.54	0.18	1.91	0.36	0.53	7.37	0.13
Mínimo (if)	17.95	1.36	6.17	3.23	1.73	9	0.50
Máximo (if)	40.16	1.97	11.96	4.66	3.70	31	0.78
Promedio (if)	27.07	1.64	9.32	3.80	2.49	17.30	0.63
D. estándar (if)	7.13	0.19	1.91	0.56	0.57	6.53	0.11
Mínimo (f)	11.31	1.31	5.10	2.65	1.60	1	0.07
Máximo (f)	22.61	2.03	8.42	4.09	2.85	11	0.67
Promedio (f)	15.86	1.56	6.56	3.30	2.01	6.05	0.38
D. estándar (f)	3.12	0.19	0.85	0.37	0.30	2.93	0.17

**Tabla 60.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. naula P7 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.91	0.62	1.31
Máximo (i)	1.08	0.73	1.65
Promedio (i)	1.00	0.67	1.50
D. estándar (i)	0.04	0.03	0.09
Mínimo (ii)	0.95	0.65	1.37
Máximo (ii)	1.13	0.72	1.69
Promedio (ii)	1.03	0.69	1.50
D. estándar (ii)	0.06	0.02	0.09
Mínimo (m)	0.92	0.63	1.41
Máximo (m)	1.17	0.75	1.67
Promedio (m)	1.07	0.70	1.53
D. estándar (m)	0.06	0.03	0.07
Mínimo (if)	1.02	0.70	1.42
Máximo (if)	1.19	0.74	1.64
Promedio (if)	1.11	0.72	1.55
D. estándar (if)	0.06	0.01	0.08
Mínimo (f)	0.83	0.58	1.37
Máximo (f)	1.22	0.76	1.68
Promedio (f)	1.04	0.68	1.52
D. estándar (f)	0.10	0.04	0.09

**Tabla 61.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. naula P7 sometidos a autofecundación.

#### 4.7.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	Nº clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	1	1	5	14	1	0
Máximo	14	14	351	15	312	39
Promedio	6.67	6.67	111.04	14.74	100.78	10.26
D. estándar	3.54	3.54	77.03	0.45	70.60	11.83

**Tabla 62.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea sp. naula* P7 sometidos a autofecundación.



**Figura 8.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea sp. naula* P7 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).

#### 4.8.- LYMNAEA SP. MINERIA P8

##### 4.8.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	1.99	1.36	1.30	0.79	1.82	48.56
Máximo	26.03	13.55	15.40	7.07	21.84	64.47
Promedio	12.25	6.84	7.51	3.81	10.20	57.11
D. estándar	5.95	3.08	3.56	1.69	4.85	3.97

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	42.55	0.57	2	1.45	1.50	1.10
Máximo	119.82	9.36	5	2.04	1.76	1.32
Promedio	67.85	4.10	3.74	1.75	1.62	1.19
D. estándar	20.78	2.15	0.78	0.13	0.06	0.04

**Tabla 63.-** Características de la concha de la población de Lymnaea sp. mineria P8.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 28 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Ancho máximo de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.85	0.63	46.97	1	1.22
Máximo	0.99	0.78	102.08	1	1.49
Promedio	0.94	0.71	73.80	1	1.32
D. estándar	0.04	0.04	13.22	0	0.07

**Tabla 64.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de Lymnaea sp. mineria P8.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 24 ejemplares en el primer día de puesta proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	11.87	6.19	50.87	4	1.54
Máximo	18.39	10.71	73.32	4	1.99
Promedio	14.08	8.18	61.10	4	1.73
D. estándar	1.74	1.23	5.94	0	0.10

**Tabla 65.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea* sp. minería P8.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 28 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	13.25	7.35	7.98	4.49	11.18	51.88
Máximo	21.35	12.54	13.24	7.71	17.68	71.10
Promedio	18.02	10.52	11.25	6.48	15.38	61.18
D. estándar	2.00	1.25	1.30	0.85	1.74	5.05

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	53.13	4.26	4	1.58	1.50	1.12
Máximo	63.57	7.35	4	1.90	1.73	1.23
Promedio	59.01	5.79	4	1.72	1.60	1.17
D. estándar	2.79	0.82	0	0.09	0.06	0.02

**Tabla 66.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. minería P8 al final de su vida.

#### 4.8.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 28 ejemplares, de los que 4 especímenes nunca se autofecundaron.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	87	49	1	1
Máximo	181	158	116	78
Promedio	144.82	65.67	71.38	37.25
D. estándar	31.44	23.06	41.16	26.13

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.01	0.04	1	0
Máximo	0.44	1.00	76	3
Promedio	0.24	0.56	35.54	0.79
D. estándar	0.15	0.21	24.99	0.98

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	2	2	1
Máximo	1	73	67	57
Promedio	0.04	35.00	9.04	9.54
D. estándar	0.20	21.78	13.67	12.25

**Tabla 67.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. mineria P8.

#### 4.8.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico de un total de 24 ejemplares que se autofecundaron permitió hacer el seguimiento de la puesta de clusters con huevos a lo largo de 127 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue siempre bajo, como máximo, y muy raramente, 16 clusters/día a lo largo de todo el periodo de puesta. Es a partir del día 10 que se alcanzan cifras de clusters al día superiores a 10, siendo de destacar que fuese con puestas hasta el mismísimo último día 127 y con únicamente el penúltimo día sin puestas.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	16	3	1	1.33
Promedio	7.04	1.13	0.98	1.00
D. estándar	3.68	0.42	0.15	0.17

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	459	83	39	39.00
Promedio	142.65	36.80	6.14	19.04
D. estándar	0	0	0	0

**Tabla 68.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 24 ejemplares autofecundados a lo largo de 127 días en la población de *Lymnaea* sp. minería P8.

#### 4.8.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 24 ejemplares que se autofecundaron de un total de 28 que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	1	1	1	1
Máximo	78	3	1	1.08
Promedio	37.25	1.54	1.00	1.02
D. estándar	26.13	0.59	0.00	0.02

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	1	1	1	1
Máximo	1669	83	7	32.90
Promedio	754.88	45.46	1.67	15.84
D. estándar	590.39	28.24	1.34	9.48

**Tabla 69.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 24 estudiados de la población de *Lymnaea* sp. minería P8.

#### 4.8.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados y sin tendencia a incurvarse cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma alargada, sin capa interna de estuche envolvente de los huevos visible ni en clusters pequeños ni en clusters grandes, de anchura más o menos uniforme a todo lo largo y extremos redondeados. La tendencia de los huevos a distribuirse en 3 hileras es de destacar.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.



Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	6.51	1.17	3.66	2.21	1.07	1	0.01
Máximo (i)	98.04	3.86	18.62	10.98	4.33	49	0.84
Promedio (i)	36.70	1.99	10.61	4.65	2.31	13.90	0.32
D. estándar (i)	25.69	0.59	4.88	1.86	0.83	16.30	0.25
Mínimo (ii)	28.36	1.25	8.52	3.65	1.76	14	0.42
Máximo (ii)	88.53	1.94	19.36	6.23	3.48	69	0.79
Promedio (ii)	52.72	1.66	13.23	4.96	2.66	35	0.66
D. estándar (ii)	18.63	0.23	3.42	0.81	0.46	15.18	0.12
Mínimo (m)	18.63	1.23	6.59	3.89	1.49	1	0.05
Máximo (m)	100.69	2.55	19.94	8.34	3.74	64	1.05
Promedio (m)	50.68	1.60	12.29	5.17	2.39	26.40	0.50
D. estándar (m)	18.15	0.25	3.23	0.93	0.50	13.93	0.21
Mínimo (if)	31.33	1.36	8.96	4.39	1.91	11	0.25
Máximo (if)	81.97	2.06	20.08	5.44	4.23	41	0.52
Promedio (if)	50.00	1.59	12.56	4.84	2.60	21.80	0.43
D. estándar (if)	14.40	0.25	3.43	0.33	0.72	9.57	0.10
Mínimo (f)	10.54	1.14	4.29	3.05	1.12	2	0.11
Máximo (f)	56.84	2.07	13.12	5.72	2.62	30	0.60
Promedio (f)	30.18	1.45	8.67	4.56	1.91	11.25	0.34
D. estándar (f)	12.04	0.23	2.53	0.75	0.52	7.84	0.14

**Tabla 70.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. minería P8 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.92	0.68	1.21
Máximo (i)	1.22	0.83	1.61
Promedio (i)	1.01	0.76	1.33
D. estándar (i)	0.07	0.04	0.10
Mínimo (ii)	0.95	0.67	1.27
Máximo (ii)	1.13	0.83	1.43
Promedio (ii)	1.01	0.74	1.36
D. estándar (ii)	0.06	0.04	0.04
Mínimo (m)	0.89	0.66	1.22
Máximo (m)	1.19	0.85	1.53
Promedio (m)	1.02	0.75	1.36
D. estándar (m)	0.07	0.05	0.07
Mínimo (if)	0.99	0.73	1.22
Máximo (if)	1.14	0.87	1.50
Promedio (if)	1.05	0.79	1.34
D. estándar (if)	0.05	0.05	0.09
Mínimo (f)	0.91	0.69	1.19
Máximo (f)	1.15	0.91	1.46
Promedio (f)	1.03	0.77	1.34
D. estándar (f)	0.07	0.06	0.07

**Tabla 71.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. minería P8 sometidos a autofecundación.

#### 4.8.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	No clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	2	1	11	13	10	0
Máximo	14	12	319	14	250	96
Promedio	7.96	5.44	115.22	13.52	91.81	23.41
D. estándar	3.50	2.71	73.22	0.51	62.44	25.01

**Tabla 72.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. minería P8 sometidos a autofecundación.



**Figura 9.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea* sp. minería P8 en visiones ventral (izq.) y dorsal (der.).

#### 4.9.- LYMNAEA UB. P9

##### 4.9.1.- ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA

Hemos estudiado un total de 35 ejemplares escogidos desde el más pequeño hasta el más grande y de manera gradual para cubrir todo el crecimiento de los especímenes de esta población mantenida experimentalmente en el laboratorio. Los resultados sobre este estudio de la variabilidad morfométrico total de las diferentes características de la concha se detallan en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	2.26	1.47	1.47	0.98	2.06	45.85
Máximo	17.87	8.84	11.45	5.34	15.62	84.95
Promedio	9.19	5.11	6.21	3.33	8.23	63.55
D. estándar	4.38	2.08	2.79	1.28	3.85	9.00

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	54.29	0.67	2	1.43	1.29	1.07
Máximo	119.36	5.74	4	2.02	1.56	1.16
Promedio	71.33	2.61	3.11	1.74	1.46	1.11
D. estándar	14.96	1.43	0.68	0.18	0.07	0.02

**Tabla 73.-** Características de la concha de la población de Lymnaea ub. P9.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 44 ejemplares de recién nacidos proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	0.75	0.55	31.15	1	1.27
Máximo	1.11	0.75	87.66	1	1.57
Promedio	0.97	0.68	49.21	1	1.43
D. estándar	0.09	0.05	12.29	0	0.06

**Tabla 74.-** Características de la concha en recién nacidos de la población de Lymnaea ub. P9.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 44 ejemplares en el primer día de puesta (se autofecundaron de un total de 44) proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Ángulo de la espira (AEC)	No de espiras	Ratio (LC/AC)
Mínimo	6.36	3.36	42.88	3	1.62
Máximo	10.62	5.89	67.89	3	2.04
Promedio	8.47	4.70	58.03	3	1.81
D. estándar	1.14	0.75	5.38	0	0.09

**Tabla 75.-** Características de la concha en ejemplares en su primer día de puesta de la población de *Lymnaea* ub. P9.

El estudio de la variabilidad morfométrica de la concha en 44 ejemplares en el final de su vida proporcionó los resultados anotados en la siguiente Tabla.

Características	Longitud de la concha (LC)	Anchura máxima de la concha (AC)	Longitud de la abertura (LA)	Anchura de la abertura (AA)	Longitud de la última espira (LUE)	Ángulo de la espira (AEC)
Mínimo	10.10	6.10	6.34	4.00	8.99	49.57
Máximo	17.01	9.49	11.79	7.09	15.13	79.25
Promedio	12.66	7.33	8.45	4.95	11.26	63.21
D. estándar	1.76	0.88	1.18	0.75	1.52	6.22

Características	Ángulo corto de la espira (ACE)	Longitud de la espira (SpL)	No de espiras	Ratio LC/AC	Ratio LC/LA	Ratio LC/LUE
Mínimo	52.23	2.69	3	1.38	1.42	1.08
Máximo	75.87	4.66	4	1.92	1.59	1.17
Promedio	61.84	3.61	3.23	1.73	1.50	1.12
D. estándar	5.27	0.56	0.42	0.12	0.04	0.02

**Tabla 76.-** Características de la concha en ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9 al final de su vida.

#### 4.9.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN

El experimento de autofecundación se lanzó con un total de 44 ejemplares, de los que todos se autofecundaron.

Los resultados obtenidos quedan plasmados en la siguiente Tabla.

Características	Periodo o tiempo de vida (total en días)	Periodo de vida antes de la puesta (días)	Periodo de puesta (días)	Número de clusters puestos por ejemplar
Mínimo	50	25	12	4
Máximo	246	85	193	63
Promedio	139.70	50.02	82.61	25.75
D. estándar	59.46	22.35	53.39	16.19

Características	Capacidad total de puesta (No. clusters / periodo de vida total)	Tasa de puesta en el periodo sexual (No. clusters / periodo de puesta en días)	Número de días en que sólo puso 1 cluster	Número de días en que puso 2 clusters
Mínimo	0.08	0.19	4	0
Máximo	0.29	0.50	59	2
Promedio	0.17	0.31	25.39	0.18
D. estándar	0.05	0.10	15.75	0.54

Características	Número de días en que puso 3 clusters	Total de días sin puesta dentro del periodo de puesta	Máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta	Periodo de post-puesta (días)
Mínimo	0	8	3	0
Máximo	0	149	14	27
Promedio	0	57.05	7.95	7.05
D. estándar	0	40.31	2.83	5.40

**Tabla 77.-** Características de la autofecundación en ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9.

#### 4.9.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS

El seguimiento cronológico del total de 44 ejemplares que se autofecundaron (ninguno dejó de autofecundarse), permitió hacer el seguimiento de la puesta de clusters con huevos a lo largo de 200 días. Durante este periodo se observó como el número de clusters fue siempre bajo, de como máximo, y muy raramente, 16 clusters/día a lo largo de todo el periodo de puesta. Es a partir del día 10 que se alcanzan cifras de clusters al día superiores a 10, siendo de destacar con puestas hasta el mismísimo último día 211 y con únicamente un día sin puestas.

Las características de los resultados de emisión en este seguimiento cronológico se anotan en la siguiente Tabla.

Características	Emisión de clusters			
	Total de cluster/día	Máximo de clusters/día	Mínimo de clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	19	2	1	1.30
Promedio	5.67	0.94	0.91	0.91
D. estándar	4.63	0.34	0.29	0.29

Características	Emisión de huevos			
	No de huevos por día	Máximo de huevos por cluster	Mínimo de huevos por cluster	Promedio de huevos por cluster
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	597	75	45	48.00
Promedio	156.23	33.84	14.43	23.94
D. estándar	139.63	16.09	9.49	10.83

**Tabla 78.-** Características del seguimiento cronológico de las puestas de clusters y huevos puestos por 44 ejemplares autofecundados a lo largo de 200 días en la población de *Lymnaea* ub. P9.

#### 4.9.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS

El estudio se efectuó sobre un total de 44 ejemplares, habiéndose autofecundado todos los que se sometieron al experimento. Los resultados obtenidos sobre clusters y huevos se expresan en la siguiente Tabla.

Características	Total de cluster en toda su vida	Máximo clusters puestos/día	Mínimo clusters/día	Promedio de clusters/día
Mínimo	4	1	1	1.00
Máximo	63	2	1	1.06
Promedio	25.75	1.11	1	1
D. estándar	16.19	0.32	0	0.01

Características	Total de huevos en toda su vida	Máximo de huevos/cluster	Mínimo de huevos/cluster	Promedio de huevos/cluster
Mínimo	107	28	2	16.63
Máximo	2143	75	25	41.53
Promedio	710.11	42.02	9.86	26.35
D. estándar	503.08	11.29	5.49	6.31

**Tabla 79.-** Recuentos de clusters y huevos puestos por cada ejemplar autofecundado de un total de 44 estudiados de la población de *Lymnaea* ub. P9.

#### 4.9.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS

Los clusters de este *Lymnaeido* demostraron ser ovalados cuando pequeños al principio conteniendo un número muy escaso de huevos, para ser muy alargados y sin tendencia a incurvarse cuando mayores y conteniendo un número muy elevado de huevos. El cluster típico muestra una forma alargada, siendo de destacar la capa interna de estuche envolvente de los huevos, bien visible tanto en clusters pequeños como en clusters grandes, de anchura más o menos uniforme a todo lo largo y extremos redondeados. La tendencia de los huevos a distribuirse en 3 hileras en los clusters intermedios es de destacar.

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos en ellos contenidos fue estudiada distinguiendo 5 grupos: Grupo i = primeros clusters puestos; Grupo ii = clusters intermedios puestos entre los iniciales y los de en medio; Grupo m = clusters puestos en su tiempo de puesta media; Grupo if = clusters puestos entre la etapa media y final; Grupo f = clusters puestos en la etapa final del periodo de puesta.

Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes Tablas.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Área de cluster (CA)	Redondez del cluster (CR)	Longitud de cluster (CL)	Ancho máximo del cluster (CW)	Ratio del cluster (CL/CW)	No. de huevos/ cluster (CEN)	Ratio CEN/CA
Mínimo (i)	7.41	1.53	4.66	2.21	1.85	6	0.74
Máximo (i)	33.66	2.34	12.55	4.75	3.82	28	1.77
Promedio (i)	19.48	1.93	8.62	3.20	2.72	20.50	1.08
D. estándar (i)	6.95	0.20	2.14	0.68	0.58	6.03	0.22
Mínimo (ii)	11.73	1.38	5.45	2.81	1.94	8	0.67
Máximo (ii)	34.12	2.02	11.87	4.66	3.45	43	1.27
Promedio (ii)	26.30	1.82	9.87	3.65	2.71	26.40	0.99
D. estándar (ii)	6.22	0.20	1.80	0.51	0.47	9.69	0.25
Mínimo (m)	18.25	1.58	7.80	2.77	1.96	16	0.53
Máximo (m)	42.58	3.04	14.70	5.26	4.58	50	1.50
Promedio (m)	30.13	2.07	11.38	3.59	3.25	35.13	1.15
D. estándar (m)	5.40	0.29	1.70	0.68	0.64	9.97	0.21
Mínimo (if)	23.95	1.75	10.09	3.21	1.93	26	0.83
Máximo (if)	43.63	2.95	14.01	6.41	3.64	60	1.59
Promedio (if)	34.39	2.23	11.82	4.39	2.80	39.60	1.16
D. estándar (if)	6.76	0.35	1.50	1.10	0.57	10.05	0.23
Mínimo (f)	10.31	1.23	4.34	2.87	1.40	7	0.35
Máximo (f)	35.75	2.47	11.93	4.82	3.67	47	1.37
Promedio (f)	22.91	1.79	8.61	3.70	2.33	18.50	0.77
D. estándar (f)	7.46	0.38	2.18	0.59	0.51	10.60	0.22

**Tabla 80.-** Características de los clusters (n = 100) puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9 sometidos a autofecundación.

Código /cluster/ i, ii, m, if, f	Longitud del huevo (EL)	Ancho del huevo (EW)	Ratio del huevo (EL/EW)
Mínimo (i)	0.76	0.55	1.37
Máximo (i)	0.99	0.64	1.61
Promedio (i)	0.87	0.59	1.48
D. estándar (i)	0.07	0.03	0.06
Mínimo (ii)	0.82	0.59	1.26
Máximo (ii)	0.97	0.68	1.53
Promedio (ii)	0.89	0.62	1.43
D. estándar (ii)	0.05	0.03	0.08
Mínimo (m)	0.76	0.55	1.32
Máximo (m)	1.00	0.69	1.68
Promedio (m)	0.89	0.61	1.45
D. estándar (m)	0.05	0.03	0.08
Mínimo (if)	0.87	0.60	1.34
Máximo (if)	0.99	0.69	1.54
Promedio (if)	0.92	0.64	1.44
D. estándar (if)	0.04	0.03	0.07
Mínimo (f)	0.75	0.54	1.33
Máximo (f)	0.99	0.69	1.55
Promedio (f)	0.90	0.62	1.44
D. estándar (f)	0.06	0.03	0.07

**Tabla 81.-** Características de los huevos puestos (n = 100) por ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9 sometidos a autofecundación.



#### 4.9.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS

A partir de los clusters obtenidos de los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió al estudio del tiempo de eclosión de los huevos y del porcentaje de nacimientos a que dieron lugar, obteniéndose los resultados que se anotan en la siguiente Tabla.

Características	No de cluster puesto en ese día	No clusters seleccionados al azar	Total de huevos	Tiempo de eclosión de los huevos (días)	Total de recién nacidos	Total de huevos que no eclosionaron
Mínimo	1	1	3	13	1	0
Máximo	9	9	193	15	160	108
Promedio	3.39	3.32	62.79	13.82	51.37	11.42
D. estándar	2.16	2.05	46.94	0.71	37.33	20.53

**Tabla 82.-** Características de la viabilidad de los huevos puestos por ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9 sometidos a autofecundación.



**Figura 10.-** Ejemplares de la población de *Lymnaea* ub. P9 en visiones, ventral (izq.) y dorsal (der.).



# **CAPÍTULO V**

## **DISCUSIÓN**



## **5.- DISCUSIÓN**

Los estudios sobre *Lymnaeidos* efectuados resultan ser totalmente originales, excepto por la morfología y morfometría de las conchas. Para todas las demás características estudiadas resulta preciso llevar a cabo largos y laboriosos trabajos experimentales que, para poder ser significativos, deben ineludiblemente realizarse en cámaras climáticas de alta sensibilidad que permitan estandarizar las características abióticas concretas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo. Adicionalmente, es necesario estandarizar también la fuente nutritiva para alimentar a los especímenes vivos en cultivo, teniéndose que contar con algas para los recién nacidos y después de suficiente alimento vegetal para los adultos. Por último, es imprescindible llevar a cabo todos estos cultivos con agua estandarizada que mantenga siempre las mismas propiedades y características químicas. Sólo así resulta posible al final poder efectuar análisis comparados que ofrezcan resultados significativos.

Todo ello confecciona un conjunto de trabajo único que nunca había sido realizado con *Lymnaeidos* por otros autores con la duración aquí analizada con antelación y consecuentemente la ausencia de literatura al respecto con la que comparar.

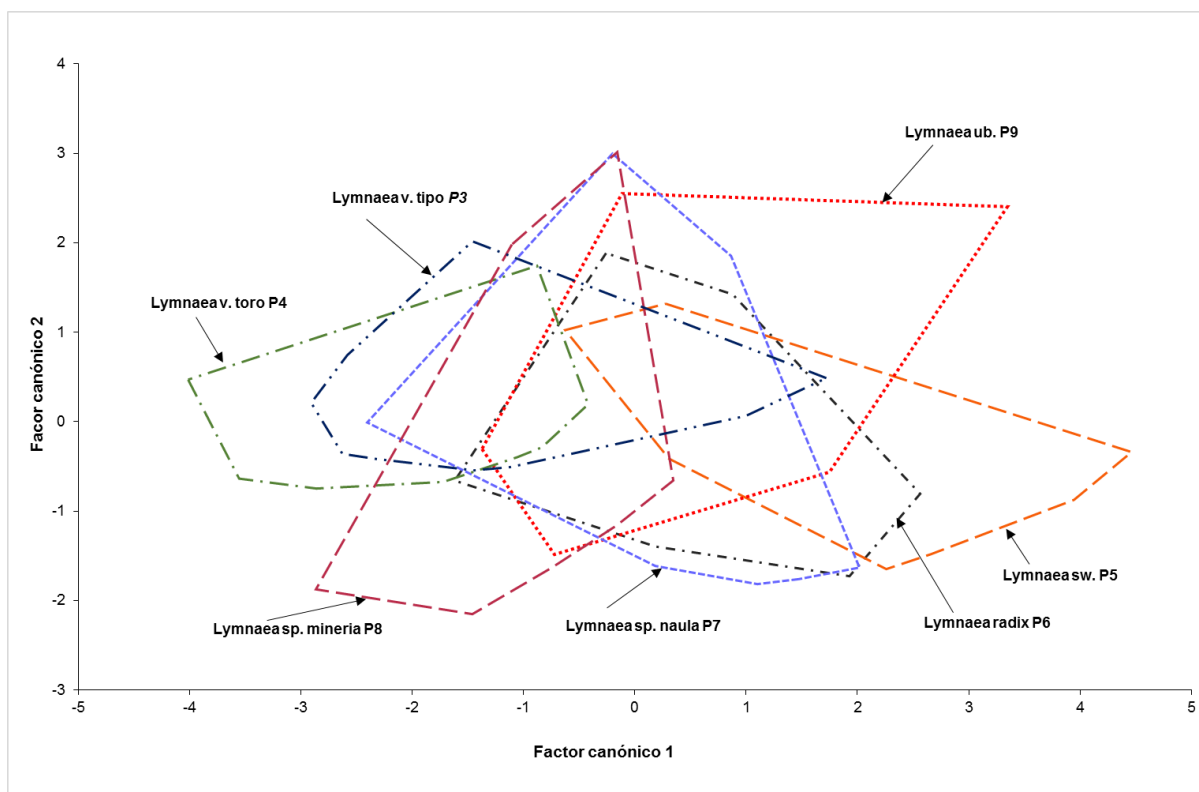
### **5.1.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO COMPARADO DE LAS POBLACIONES**

#### **5.1.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CONCHAS**

Las poblaciones estudiadas cabe agruparlas en tres grupos según su tamaño. Así *Lymnaea sch.* P1 y *Lymnaea sch.* P2 son *Lymnaeas* de pequeño tamaño cuya longitud no supera los 8 mm. *Lymnaea v. tipo* P3 y *Lymnaea v. toro* P4 pertenecen a otro grupo cuya longitud supera ya los 10 mm, aunque sin superar los 13 mm. Y por último, las restantes poblaciones de *Lymnaea sw.* P5, *Lymnaea radix* P6, *Lymnaea sp. naula* P7, *Lymnaea sp. mineria* P8 y *Lymnaea ub.* P9 son todas ellas *Lymnaeas* que alcanzan un tamaño grande, con una longitud incluso superando los 26 mm.

Los resultados antedichos de este estudio comparado apropiado en cuestión se reflejan muy bien en un gráfico comparativo de las morfometrías de 35 ejemplares utilizados para la caracterización de cada una de las poblaciones, sin incluir las dos primeras por tratarse de poblaciones de muy pequeño tamaño y por ello fácilmente distinguibles.

El aspecto puntiagudo de la concha en *Lymnaea* sw. P5, *Lymnaea* radix P6, *Lymnaea* sp. naula P7, *Lymnaea* sp. mineria P8 y *Lymnaea* ub. P9 permite también distinguir a estas poblaciones respecto tanto de las pequeñas *Lymnaea* sch. P1 y *Lymnaea* sch. P2, como de las medianas *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4.



Por lo demás, el resto de características morfométricas no permite una buena diferenciación de las poblaciones, lo que no hace sino volver a destacar las dificultades que ofrecen los *Lymnaeidos* en general para su clasificación y diferenciación cuando únicamente se cuenta con las conchas.

### 5.1.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CLUSTERS

Los estudios realizados demuestran la importancia de los clusters para la diferenciación de especies. Si bien los clusters pequeños no son suficientes, cuando los clusters comienzan a ser mayores proceden ya a mostrar una forma y una tendencia que suele diferir entre las diferentes especies.

Así, los clusters de *Lymnaea* ub. P9 se diferencian perfectamente y fácilmente de todos los demás por la presencia de una segunda capa interna a modo de estuche interno que envuelve a los huevos. Esta característica de dicho estuche es única y no aparece en ninguna otra población.

Los clusters de *Lymnaea* sch. P1 y *Lymnaea* sch. P2 resultan idénticos, y los de *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4 se parecen igualmente entre sí, lo mismo que los de *Lymnaea* sw. P5 y *Lymnaea* radix P6 entre sí, y también los de *Lymnaea* sp. naula P7 y *Lymnaea* sp. mineria P8 entre ellos mismos. Pero las diferencias entre estos grupos unos con otros son bien evidentes, tanto en forma y tendencia, como en número de huevos que contienen y tamaños.

### **5.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HUEVOS**

Los huevos, a diferencia de los clusters, demuestran no modificar su tamaño a lo largo de la vida del espécimen que los pone, dentro de una misma población. Sin embargo, y de manera inesperada por cuanto nunca antes se había notificado según nuestros conocimientos, el tamaño de los huevos muestra diferencias entre unas poblaciones y otras de las estudiadas.

Así, los huevos de *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4 se parecen entre sí, mostrando diferencias claras, con un tamaño evidentemente menor (inferior a 1.00 mm) que en los huevos de *Lymnaea* sw. P5, *Lymnaea* radix P6, *Lymnaea* sp. naula P7 y *Lymnaea* sp. mineria P8 que superan con creces dicho límite y no muestran ordenamiento alguno.

También resulta de interés la ubicación que muestran los huevos dentro de los clusters. En *Lymnaea* ub. P9, todos los huevos se localizan dentro de la capa del estuche interno, inexistente en todas las demás. En algunas poblaciones, además, los huevos muestran tendencia a organizarse en filas longitudinales, como de a 3 en *Lymnaea* sw. P5 y *Lymnaea* radix P6, mientras que en otras poblaciones no parece haber una distribución tan marcada, como en *Lymnaea* sp. naula P7 y *Lymnaea* sp. mineria P8.

El número de huevos dentro de un cluster de mediano y de gran tamaño dentro de una población dada muestra diferencias claras entre las distintas poblaciones estudiadas, si bien no se detectan cuando pequeños y en el comienzo del periodo de puesta.

De esta manera, las poblaciones *Lymnaea* sch. P1 y *Lymnaea* sch. P2 muestran un número comparativamente reducido de huevos dentro de un cluster, las poblaciones *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4 muestran un número de huevos por cluster algo mayor, y finalmente las poblaciones *Lymnaea* sw. P5, *Lymnaea* radix P6, *Lymnaea* sp. naula P7 y *Lymnaea* sp. mineria P8 lo presentan mayor aún, si bien ello

no parece muy claro en el caso de *Lymnaea* sp. *naula* P7. La correlación evidente entre el tamaño de los caracoles y el número de huevos dentro de un cluster sugiere una mayor capacidad de producción por parte de los *Lymnaeidos* de mayor tamaño.

## **5.2.- ANÁLISIS BIOLÓGICO COMPARADO DE LAS POBLACIONES**

### **5.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA AUTOFECUNDACIÓN**

No todas las poblaciones mostraron una tendencia a la autofecundación a un nivel similar. La población *Lymnaea* ub. P9 destaca en sobremanera al compararse con las demás por ser la única en la que todos los individuos ensayados recurrieron a la autofecundación (100%).

En el otro extremo se sitúan dos poblaciones que son las que mostraron una menor tendencia a la autofecundación, concretamente la población de *Lymnaea* sw. P5 (47,8%) y la de *Lymnaea* radix P6 (37,8%).

Las restantes poblaciones se muestran intermedias, si bien con una tendencia clara a recurrir a este tipo de fecundación al encontrarse en situación de aislamiento, incluyendo *Lymnaea* v. tipo P3 (84,7%), *Lymnaea* v toro P4 (90.4%), *Lymnaea* sp. *naula* P7 (83,8%) y *Lymnaea* sp. *mineria* P8 (85,7%), todas ellas caracterizadas por ser *Lymnaeidos* de gran tamaño.

### **5.2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA CRONOLOGÍA DE LAS PUESTAS**

Un análisis pormenorizado demuestra que existen diferencias a nivel del periodo de vida antes de la primera puesta. Este periodo es corto en *Lymnaea* sch. P1 y *Lymnaea* sch. P2 (de sólo hasta 50 días), algo más largo en *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v toro P4 (de hasta 113 días), muy largo en *Lymnaea* sw. P5 y *Lymnaea* radix P6 (de hasta 276 días), intermedio en *Lymnaea* sp. *naula* P7 (de hasta 65 días) y en *Lymnaea* ub. P9 (de hasta 85 días), y largo en *Lymnaea* sp. *mineria* P8 (de hasta 158 días).

En lo que se refiere a la duración del periodo de puesta, cuatro poblaciones destacan claramente con máximos por encima de las restantes: *Lymnaea* ub. P9 (193 días), *Lymnaea* v. tipo P3 (197 días), *Lymnaea* sp. *naula* P7 (204 días) y sobre todos *Lymnaea* v toro P4 (321 días). Las demás poblaciones muestran una duración de puesta con máximos inferiores, tales como *Lymnaea* sch. P1 (161 días), *Lymnaea* sch.



P2 (136 días), *Lymnaea sw.* P5 (157 días), y las más bajas *Lymnaea radix* P6 (113 días) y *Lymnaea sp. mineria* P8 (116 días).

Una característica de singular interés la constituye el denominado periodo post-puesta, esto es, la supervivencia de un individuo una vez terminado su periodo de puesta o vida sexual activa. En este sentido, hay poblaciones que demostraron ser capaces de estar poniendo clusters hasta casi el final de su vida, incluso ciertos individuos hicieron puestas hasta el día antes de su muerte, como sucedió en *Lymnaea sch.* P1 (hasta 33 días), *Lymnaea sch.* P2 (37 días), *Lymnaea sp. naula* P7 (14 días), *Lymnaea ub.* P9 (27 días) e incluso también *Lymnaea sp. mineria* P8 (57 días). Las demás poblaciones demostraron ser capaces de sobrevivir bastante después de finalizada su vida sexual, tal como se vio en *Lymnaea v. tipo* P3 (hasta 109 días), *Lymnaea v. toro* P4 (90 días), *Lymnaea sw.* P5 (162 días) y *Lymnaea radix* P6 (134 días).

### **5.2.3.- CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DE LAS PUESTAS**

El número de clusters puestos a lo largo de la vida demuestra tener únicamente un valor secundario, ya que lo realmente importante es el número de huevos por ser el que marca la descendencia potencial y este número de huevos difiere mucho entre los clusters de una u otra especie. En este aspecto, de todos modos, destacan *Lymnaea v. tipo* P3 con un máximo de 94 clusters y *Lymnaea v. toro* P4 con 114. Las demás poblaciones se mueven en cifras que oscilan entre un máximo total de 45 clusters para *Lymnaea radix* P6 y de 74 clusters para *Lymnaea sp. naula* P7.

Más interesantes resultan los índices de número de clusters/vida total en días y de número de clusters/periodo de puesta en días y que no guardan relación directa con el número absoluto de clusters depositados por un espécimen. El máximo del primer índice oscila entre 0.13 para *Lymnaea radix* P6 y 0.45 para *Lymnaea sch.* P2. El máximo del segundo índice oscila entre 0.4288 para *Lymnaea sp. naula* P7 y 1.00 (o sea a una tasa de producción de un cluster por día) para *Lymnaea v. tipo* P3, *Lymnaea v. toro* P4 y *Lymnaea radix* P6.

Pero sin duda el dato definitivo en este apartado es el que se refiere al número de huevos puestos a lo largo de toda la vida del molusco. Es aquí donde *Lymnaea v. toro* P4, con un máximo de hasta 3101 huevos por ejemplar, y *Lymnaea ub.* P9, con un máximo de hasta 2143 huevos por espécimen, batieron ampliamente a todas las demás poblaciones. Aunque a cierta distancia, cabe resaltar también a *Lymnaea sp. mineria*

P8, con un máximo de hasta 1669 huevos por espécimen. Las restantes poblaciones muestran ya cifras más bajas, de entre 893 huevos en *Lymnaea radix* P6 y 1299 huevos en *Lymnaea* v. tipo P3.

#### **5.2.4.- CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA PROGENIE**

Los promedios de huevos eclosionados dando recién nacidos por día oscilan muy ampliamente entre las diferentes poblaciones. Aquella que mostró un menor promedio diario en este sentido fue *Lymnaea* v. toro P4 con únicamente 10.43, seguida por *Lymnaea* v. tipo P3 con 17.23. En el extremo opuesto se encuentran *Lymnaea* sp. mineria P8 con un promedio de 91.81 huevos eclosionados/día y sobre todo *Lymnaea* sp. naula P7 con un promedio altísimo de 100.78. Las demás poblaciones se mueven entre un 41.02 para *Lymnaea radix* P6 y un 51.37 para *Lymnaea* ub. P9, y consecuentemente en términos que podríamos clasificar como intermedios.

#### **5.3.- APLICABILIDAD DE LOS ESTUDIOS EFECTUADOS**

##### **5.3.1.- INTERÉS EN SISTEMÁTICA**

Desde antiguo se conocía ya el hecho de que la morfología y morfometría de los clusters en los Lymnaeidae difería entre unas especies y otras. Sin embargo, las enormes dificultades de recolección de las puestas en la naturaleza, así como la gran complejidad y coste que representa la realización de cultivos experimentales de las especies y su seguimiento cronológico hasta la consecución de que los ejemplares empiecen a poner clusters, ha conllevado que este aspecto de evidente potencial importancia en la distinción de especies y, por lo tanto, también en sistemática y quizás taxonomía supraespecífica de los Lymnaeidae sea ignorado en general. Ello lo demuestra de manera fehaciente la ausencia de estudios de este tipo en la mayor y más completa obra sobre esta familia de moluscos (HUBENDICK, 1951), incluso a pesar de su gran interés en Parasitología y en la transmisión de importantes enfermedades humanas y de animales domésticos (BARGUES et al., 2001).

Únicamente KRUGLOV (2005) procede a incluir esquemas y dibujos de clusters para varias especies en la más reciente revisión de esta familia de Gasterópodos, si bien de manera escasa y con insuficiencia de información, a no especificar, por

desconocimiento, si los clusters ilustrados conciernen a puestas jóvenes, intermedias o maduras.

Los resultados de nuestros estudios demuestran la gran utilidad en la diferenciación de poblaciones y de especies que llegan a tener la morfología y morfometría de los clusters y, consiguientemente pues también, en sistemática y taxonomía de los Lymnaeidae. En nuestra publicación sobre *Lymnaea schirazensis* ya demostramos como estos aspectos de las puestas permiten incluso diferenciar entre dos especies morfológicamente, anatómicamente, ecológicamente y etológicamente indiferenciables como *L. schirazensis* y *G. truncatula* a nivel mundial, incluyendo los cinco continentes de Asia, África, Europa, América del Norte y Caribe y América del Sur (BARGUES et al., 2001).

Bien es cierto que para la utilización aplicada de estas características de las puestas hay que partir de los conocimientos básicos que aquí aportamos, tales como la demostración de que los clusters resultan de utilidad sobre todo cuando son muy maduros, de gran tamaño e incluyen un gran número de huevos, pues es entonces cuando los clusters muestran su tendencia morfológica en toda su extensión.

La utilidad práctica de los clusters en sistemática y taxonomía puede extenderse a los clusters intermedios, pero de ninguna manera a los clusters jóvenes conteniendo un número escaso o reducido de huevos, ya que a este nivel las características morfológicas y morfométricas de los clusters de diferentes especies se solapan y no permite una diferenciación clara y sin ambigüedades.

Más sorprendente ha sido incluso la detección de que también los huevos, y más concretamente su tamaño, expresado en longitud, anchura y el ratio entre longitud y anchura así como su distribución interna dentro de los clusters, vinieran también a demostrar que en ciertos casos que ostentan características bien diferentes entre especies y, consecuentemente, también la posibilidad de que el tamaño y la distribución intracluster de los huevos puedan ser utilizadas para la diferenciación de especies en ciertos casos. Más adelante cabrá incluso verificar si estas dos características de los huevos pudiesen tener también una utilidad práctica en sistemática y taxonomía supraespecífica en esta familia de Gasterópodos.

Cabe resaltar, pues, que nuestro estudio abre un nuevo campo aplicado en sistemática y taxonomía de los Lymnaeidos, de gran interés sobre todo en los grupos de Lymnaeidae en los cuales la confusión sistemática y taxonómica es indudable, como sucede dentro de *Galba/Fossaria*, el grupo *Radix* y el grupo de los Stagnicolinos. Dentro del grupo *Galba/Fossaria*, nuestra diferenciación de *L. schirazensis* respecto de *G. truncatula* se convierte en el ejemplo a seguir.

### 5.3.1.1.- DIFERENCIACIÓN DE POBLACIONES Y ESPECIES

Dentro de los materiales que hemos tenido la oportunidad de estudiar con profundidad en esta Memoria, nuestros resultados demuestran que se pueden distinguir grupos de poblaciones/especies claros.

En primer lugar, la existencia de una capa interna dentro del cluster, a modo de estuche englobante de los huevos muy bien patente, detectado en *Lymnaea* ub. P9 e inexistente en todas las demás poblaciones, se nos antoja de suficiente peso como para la distinción de unidades supraespecíficas como las de a nivel de género.

En segundo lugar, la tendencia a dar lugar a clusters muy largos, conteniendo un número muy elevado de huevos, siendo estos clusters bien rectilíneos bien sólo un poco incurvados y manteniendo una anchura más o menos uniforme a todo lo largo, también distingue a las especies de gran tamaño como *Lymnaea* sw. P5, *Lymnaea radix* P6, *Lymnaea* sp. *naula* P7 y *Lymnaea* sp. *mineria* P8.

Y finalmente, la tendencia a hacerse incurvados desde ya los clusters intermedios, con extremos adelgazándose progresivamente, y conteniendo un número de huevos claramente inferior a los contenidos en los clusters de los *Lymnaeidos* grandes, peculiarizan a *Lymnaea* sch. P1, *Lymnaea* sch. P2, *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4. A su vez, el número muy inferior de huevos en las dos primeras respecto de las dos segundas ofrece un elemento discriminatorio adicional.

Y no se puede terminar sin destacar el hallazgo de que el tamaño y ordenamiento de los huevos también resulta discriminatorio a veces. De esta manera, los huevos de *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4 se parecen entre sí, mostrando diferencias claras, con un tamaño evidentemente menor (inferior a 1.00 mm) que en los huevos de *Lymnaea* sw. P5, *Lymnaea radix* P6, *Lymnaea* sp. *naula* P7 y *Lymnaea* sp. *mineria* P8 que superan con creces dicho límite. Además, en algunas poblaciones, los huevos muestran tendencia a organizarse en filas longitudinales, como de a 3 en *Lymnaea* sw. P5 y *Lymnaea radix* P6, mientras que en otras poblaciones no parece haber una distribución tan marcada, como en *Lymnaea* sp. *naula* P7 y *Lymnaea* sp. *mineria* P8, y en otras no parece haber ordenamiento alguno como en a *Lymnaea* sch. P1, *Lymnaea* sch. P2, *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4.

Es evidente que en lo referente a estos últimos caracteres son precisos estudios sobre otras muchas especies, de manera a poder visualizar las posibles relaciones de estos elementos de los clusters y de los huevos con la filogenia y

sistemática/taxonomía actuales para poder vislumbrar que aspectos son de mayor o menor interés aplicado y a qué nivel.

### 5.3.2.- INTERÉS EN EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

El fenómeno de autofecundación en animales hermafroditas ha atraído la atención de los especialistas en Genética desde hace muchos años (LI & HORVITZ, 1953; HUTCHINSON & TEMPLETON, 1999). Más recientemente, el foco de estos estudios se ha efectuado sobre moluscos Pulmonados Gasterópodos dulceacuícolas (JARNE et al., 1993; JARNE, 1995; JARNE & STÄDLER, 1995; JARNE & AULD, 2006; PUURTINEN et al., 2007).

Es de destacar el hecho de que los moluscos en cuestión recurran a la autofecundación o a la fecundación cruzada no implica aparentemente el origen de capacidades diferentes de albergar y transmitir especies parásitas ni siquiera de perder esta capacidad de transmisión (PUURTINEN et al., 2004). Ello quiere decir, consecuentemente, que la autofecundación de los moluscos afectará a la transmisión de parásitos y de las enfermedades parasitarias que éstos vectorizan únicamente en lo que se refiere a la dinámica de transmisión, al tener efectos sobre la capacidad de multiplicación y de origen de nuevas poblaciones en diferentes situaciones.

La mayor parte de estudios sobre autofecundación y sus consecuencias genéticas y poblacionales se han desarrollado en moluscos de la familia Planorbidae y más concretamente sobre especies del género *Bulinus* (RUDOLPH & BAILEY, 1985). En un principio se creyó que la autofecundación era la estrategia de reproducción a la que recurrían los especímenes denominados afálicos (carentes de pene), aunque posteriormente se vio que también los especímenes eufálicos (con pene) recurrían a la autofecundación.

Así, son muy numerosas las publicaciones al respecto sobre todo en la especie *Bulinus truncatus* o *B. globosus* (su sinonimia sigue en entredicho aún hoy en día) (NJIOKOU et al., 1993a, b, 1994; DOUMS & JARNE, 1996; VIARD et al., 1996, 1997a, b). Otras especies sometidas a estudios parecidos han sido las especies *Bulinus forskalii* y *Bulinus cernicus* (ROLLINSON et al., 1989; NJIOKOU et al., 2000; GOW et al., 2005).

En el caso de la familia Lymnaeidae, que es el que a nosotros nos interesa por el presente trabajo, los estudios de autofecundación se han centrado en cuatro especies

pertenecientes a también cuatro géneros diferentes: *Lymnaea stagnalis*, especie tipo del género tipo y representante del grupo de los Stagnicolinos, *Lymnaea peregra* como representante del grupo *Radix*, *Lymnaea columella* como representante del género *Pseudosuccinea*, y finalmente *Lymnaea truncatula* como representante del género *Galba* dentro del grupo *Galba/Fossaria*.

La existencia de autofecundación en Lymnaeidos fue detectada ya desde antiguo en la especie *Lymnaea columella* por SELLERS COLTON a principios del siglo pasado (SELLERS COLTON, 1912), aunque con posterioridad únicamente volvió a ser objeto de estudio con relación a este fundamental aspecto biológico en el presente siglo en Cuba (/GUTIERREZ et al., 2001).

Más estudios fueron dedicados a *Lymnaea stagnalis*, evidentemente debido a su asequibilidad como una especie propia de jardines y parques y consiguiente facilidad de su mantenimiento en cultivos experimentales en el laboratorio (CAIN, 1956; COUTELLEC & LAGADIC, 2006; SUONPAA, 2008; CAQUET & COUTELLEC, 2011; BOUETARD et al., 2014).

*Lymnaea peregra* fue un importante objeto de estudio en trabajos sobre autofecundación a finales del siglo pasado (JARNE & DELAY, 1990; COUTELLEC-VRETO et al., 1997, 1998).

Y finalmente más interesantes resultan los trabajos llevados a cabo sobre la especie *Galba truncatula*, por el motivo de ser una especie vectora por excelencia (SMITH, 1981; VAREILLE-MOREL et al., 2002; TROUVE et al., 2003, 2005; MEUNIER et al., 2003, 2004).

### **5.3.2.1.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EXPANSIÓN GEOGRÁFICA**

Nuestros estudios sugieren que todos los Lymnaeidos recurren a la autofecundación, esto sí, con mayor o menor frecuencia según unas u otras especies y, evidentemente, dependiendo de las diferentes situaciones en la naturaleza relacionado con las posibilidades de encuentro existentes entre diferentes individuos habitantes de un mismo hábitat, biótomo o medio.

Desde el punto de vista de la transmisión, epidemiología y control de la enfermedad de la Fascioliasis que transmiten los Lymnaeidos, la capacidad de autofecundación se muestra trascendental, al implicar la posibilidad de que el transporte pasivo de un único espécimen sea suficiente para poder disparar una nueva población y con ello la colonización de un nuevo medio y lugar ya próximo, ya lejano o muy lejano. Todo esto

puede suceder ya por fuerzas de la naturaleza como puede ser por ejemplo el arrastre por corrientes de agua en subidas de nivel de ríos consecuencia de una pluviometría intensa o mediante transporte pasivo en barro adherido a las patas de animales que frecuentan los hábitats de los Lymnaeidos para por ejemplo beber agua, tales como el ganado o determinados mamíferos y aves silvestres, ya por actividades llevadas a cabo por el hombre como sucede en la construcción de almacenajes de agua, presas y demás y las construcciones de irrigación relacionadas con las mismas.

En este sentido, pues, cabe destacar la tendencia a la autofecundación que muestra cada población. Y en este aspecto resalta inmediatamente población *Lymnaea* ub. P9 que mostró un 100% de tendencia individual a autofecundación. Ello coincide totalmente con la enorme capacidad de expansión geográfica y colonización de diferentes países en todos los continentes, en un fenómeno en el que la ausencia total de mutaciones en todos los marcadores tanto de ADN nuclear ribosomal como de ADN mitocondrial demuestra el carácter reciente de esta expansión tenida lugar sin duda gracias a las actividades humanas, muy probablemente relacionadas con el comercio de peceras y peces ornamentales como también con también en el intercambio de especies vegetales por parte de parques botánicos (BARGUES et al., 2011).

Las poblaciones restantes de Lymnaeidos con altísima tendencia a la autofecundación son *Lymnaea* v. tipo P3 (tendencia de autofecundación de 84,7%), *Lymnaea* v toro P4 (90.4%), *Lymnaea* sp. naula P7 (83,8%) y *Lymnaea* sp. minería P8 (85,7%), y se muestran también pues con gran capacidad colonizadora, mientras que las poblaciones de *Lymnaea* sw. P5 (47,8%) y la de *Lymnaea* radix P6 (37,8%) no parecen ser muy capaces de tener esta singularidad de expansión.

Cabe recordar aquí como ya se ha destacado el papel de los Lymnaeidos colonizadores en la expansión de la enfermedad de la Fascioliasis en diferentes países y continentes (MAS-COMA et al., 2003; MAS-COMA, 2004).

### **5.3.2.2.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EPIDEMIAS**

Uno de los aspectos más destacados de la epidemiología de la Fascioliasis es, por un lado, la estacionalidad intra-anual que suele mostrar la transmisión y en consecuencia la detección de pacientes infectados e unas u otras épocas del año (MAS-COMA, 2004). Esta estacionalidad puede ser mono- o biestacional y estar relacionada tanto con la monoestacionalidad o biestacionalidad de la pluviometría

(AFSHAN et al., 2014) como con fenómenos climáticos extraordinarios como la intensidad muy marcada de lluvias durante un año concreto (MAS-COMA, 2004).

En estos casos, los incrementos de la Fascioliasis no hacen sino transmitir la consecuencia de incrementos poblacionales de los Lymnaeidos vectores, que al aumentar desmesuradamente en número al aprovechar las nuevas condiciones de disponibilidad de agua así aumentan la capacidad de transmisión de la enfermedad. *Galba truncatula* es bien conocida por estar asociada a estos fenómenos de epidemias humanas en Europa (MAS-COMA, 2004).

En este sentido, pues, todas las características de la autofecundación como la capacidad de puesta de clusters y huevos y la duración del periodo de puesta pasan a ser decisivas. Pero el aspecto que hay que destacar sobre todo es el periodo de vida antes de la primera puesta y que determinará el tiempo a transcurrir entre las lluvias y la producción de población suficiente para un aumento de la transmisión de la enfermedad. Este factor es pues crucial tanto en epidemiología como en control, al permitir predecir el tiempo de aparición de epidemias y la posibilidad y conveniencia de poner en marcha medidas apropiadas de control.

En este aspecto del periodo de tiempo necesario para el comienzo de la puesta de clusters y huevos en los Lymnaeidos autofecundados destacan muy especialmente las poblaciones de Lymnaeidos de pequeño tamaño, de *Lymnaea* sch. P1 y *Lymnaea* sch. P2 (de sólo hasta 50 días) y un poco más largo periodo en las poblaciones de *Lymnaea* v. tipo P3 y *Lymnaea* v. toro P4 (de hasta 113 días), muy al contrario del muy largo periodo en las poblaciones de especies de gran tamaño como *Lymnaea* sw. P5 y *Lymnaea radix* P6 (de hasta 276 días) y *Lymnaea* sp. mineria P8 (de hasta 158 días).

También aquí hay que hacer un punto y aparte para el periodo en cuestión en la población de *Lymnaea* ub. P9 (de hasta 85 días), que viene a sumarse a lo antes descrito sobre su total tendencia a la autofecundación.

De un modo resumido, pues, cabe concluir que las especies de Lymnaeidos pequeños son los que tiene una capacidad más rápida de responder a cambios del medio que conlleven un favorecimiento de las condiciones externas para su desarrollo. Esto a su vez vendría a indicar que es *F. hepatica* y no *F. gigantica* la especie causal con mayor capacidad de originar epidemias, lo que se explicaría porque las especies del grupo *Galba/Fossaria* vectores de *F. hepatica* son siempre Lymnaeidos de pequeño tamaño, al contrario de los Lymnaeidos del grupo *Radix* implicados en la transmisión de *F. gigantica*, que son especies siempre de gran tamaño, como *Radix natalensis* en África o las especies de la superespecie *R. auricularia* a lo largo de todo el Sur de Asia y hasta el mismo Sud-Este de Asia.



Estos resultados conseguidos en nuestros estudios aquí plasmados abren un nuevo y amplio campo de estudio con importantes implicaciones en epidemiología, predicción y control. En el futuro convendrá llevar a cabo estudios similares en poblaciones de más especies vectoras, sobre todo seleccionando los más importantes vectores en los diferentes continentes, para así poder cuantificar todos estos aspectos y poderlos incluir oportunamente en las fórmulas matemáticas para los cálculos de los índices de predicción, tan útiles en la Fascioliasis debido a la marcada dependencia de las fases larvarias de *Fasciola* y de las especies de *Lymnaeidae* vectoras, tal y como ya se ha demostrado recientemente (MAS-COMA et al., 2008, 2009; AFSHAN et al., 2014).



## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES**



## 6.1.- CONCLUSIONES

A partir de los estudios realizados formando parte de la presente Tesis Doctoral, cabe extraer numerosas y variadas conclusiones. Procedemos a enumerarlas a continuación.

- Los Lymnaeidos sometidos a iguales condiciones abióticas presentan conchas cuya morfología no permite una clara distinción entre especies, salvo en características muy concretas que singularizan a una especie o grupo de especies.
- Los Lymnaeidos sometidos a iguales condiciones abióticas presentan conchas cuya morfometría muestra parámetros que se solapan en su mayoría, excepto las características de talla, especialmente tamaño expresado por longitud y anchura máxima de la concha, manifestándose las diferencias cada vez más acusadas a medida que se va alcanzando su mayor crecimiento, si bien en algunos casos los Lymnaeidos muestran características morfométricas ya diferentes en el momento de la primera puesta.
- Los clusters de los Lymnaeidos muestran características diferentes según las especies.
- Las características morfológicas de los clusters muestran diferencias de mayor o menor importancia, algunas a nivel de especie y otras incluso a nivel de género.
- Los huevos de los Lymnaeidae presentan tamaños diferentes en algunas especies y su distribución interna dentro de los clusters parece mostrar diferentes patrones.
- La morfología y morfometría de los clusters y de los huevos son elementos de interés aplicado a considerar a partir de ahora en sistemática y taxonomía de los Lymnaeidae.
- Todos los Lymnaeidos parecen tener la capacidad de recurrir a la autofecundación, a pesar de ser todos eufálicos y no darse casos de afalia.
- Sin embargo, las especies de Lymnaeidae muestran diferencias evidentes en su tendencia mayor o menor a la autofecundación cuando se aísla a los individuos,

incluyendo tendencias que van desde el 100% hasta otras menores que ni siquiera alcanzan el 40%.

- En la cronobiología de la emisión de puestas de Lymnaeidos autofecundados se dan diferencias a nivel del periodo de pre-puesta (días de vida hasta la primera puesta), periodo de puesta, número de días en que se puso sólo 1, 2 o 3 clusters, el total de días sin puesta dentro del periodo de puesta, el máximo número de días sin puesta entre 2 días de puesta y el periodo de post-puesta.

- Las poblaciones de Lymnaeidae muestran diferencias en el número de puestas por espécimen, la capacidad total de puesta (número de clusters / periodo de vida total) y tasa de puesta en el periodo sexual (número de clusters / periodo de puesta en días).

- Las poblaciones de Lymnaeidae muestran diferencias en el número de huevos por espécimen a lo largo de toda su vida, así como también en el número de huevos incluidos por cluster.

- El número de huevos por cluster va creciendo a lo largo de la vida del Lymnaeido hasta llegar a un máximo que se alcanza en la mayoría de poblaciones en la tercera o cuarta parte de un total de cinco partes de duración del periodo de puesta, si bien algunas poblaciones lo alcanzan más precozmente en la segunda parte de dicho periodo, para decrecer posteriormente de manera gradual hasta perder totalmente la capacidad de puesta.

- El porcentaje de viabilidad de los huevos de clusters puestos por especímenes autofecundados, unido a la capacidad total de puesta, parece ser en todos los casos suficiente para dar lugar a una nueva población.

- Las varias características de la autofecundación muestran interés aplicado al repercutir en la transmisión, epidemiología y control de la Fascioliasis.

- La tendencia a la autofecundación se muestra como un factor de importancia en la capacidad de expansión y colonización de nuevos hábitats y lugares, al observarse una correlación evidente entre los resultados de autofecundación obtenidos y los conocimientos actuales sobre la dispersión de las especies de Lymnaeidos, abriendo así camino a la dispersión geográfica de la Fascioliasis.

- El periodo de vida antes de la primera puesta o precocidad de puesta se muestra como el factor primordial en la capacidad más o menos rápida de respuesta a cambios del medio, esencialmente las lluvias, determinando el tiempo a transcurrir entre las lluvias y la producción de población suficiente para un aumento de la transmisión de la enfermedad.
  
- El periodo de vida antes de la primera puesta o precocidad de puesta se convierte pues en un factor crucial tanto en epidemiología como en control, al permitir predecir el tiempo de aparición de epidemias y la posibilidad y conveniencia de poner en marcha medidas apropiadas de control.
  
- Las especies de Lymnaeidos pequeños son aquellas en las que el periodo de vida antes de la primera puesta es más corto y por tanto las que tiene una capacidad más rápida de responder a cambios del medio que conlleven un favorecimiento de las condiciones externas para su desarrollo.
  
- Las especies pequeñas del grupo *Galba/Fossaria* vectores de *F. hepatica*, por su mayor precocidad de puesta, ostentan pues una mayor capacidad de originar epidemias. mientras que las especies grandes propias del grupo *Radix* vectoras de *F. gigantica* tiene menor precocidad de puesta y son consecuentemente menos capaces de originar epidemias.
  
- Los numerosos resultados obtenidos abren varios campos nuevos de investigación de utilidad en sistemática y taxonomía de los Lymnaeidae vectores, y de la transmisión, epidemiología y control de la Fascioliasis en los diferentes países y continentes.





## **CAPÍTULO VII**

### **BIBLIOGRAFÍA**



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- ACHA (P.N.) & SZYFRES (B.), 1986.- Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud OPS/OMS. Segunda edición Washington. Publicación científica 503: 689-696.
- ADACHI (S.), KOTANI (K.), SHIMIZU (T.), TANAKA (K.), SHIMIZU (T.) & OKADA (K.), 2005.- Asymptomatic fascioliasis. *Internal Medicine*, 44 (9): 1013-1015.
- AFSHAN (K.), FORTES-LIMA (C.A.), ARTIGAS (P.), VALERO (M.A.), QAYYUM (M.) & MAS-COMA (S.), 2014.- Impact of climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and seasonality of human and animal fascioliasis in Pakistan. *Geospatial Health*, 8 (2): 317-334.
- AFSHAN (K.), VALERO (M.A.), QAYYUM (M.), PEIXOTO (R.V.), MAGRANER (A.) & MAS-COMA (S.), 2014.- Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *Journal of Helminthology*, 88: 417-426.
- AGNAMEY (P.), FORTES-LOPES (E.), RACCURT (C.P.), BONCY (J.) & TOTET (A.), 2012.- Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in Haiti. *Journal of Parasitology Research*, pp. 1-3. (www.hindawi.com/- acceso 10-04-2015).
- AGUIRRE (P.), 1939.- La *Limnaea attenuate* (Say, 1829) Huésped intermediario de la *Fasciola hepatica* en la República Mexicana. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 1: 67-70.
- AHMEDULLAH (F.), AKBOR (M.), HAIDER (M.G.), HOSSAIN (M.M.), KHAN (M.A.), HOSSAIN (M.I.) & SHANTA (I.S.), 2007.- Pathological investigation of liver of the slaughtered buffaloes in Barisal District. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 5 (1-2): 81-85.
- ALACÓN DE NOYA (B.), ROJAS (E.), COLMENARES (C.), MORALES (C.), CONTRERAS (R.), KAY (S.V.), HERNÁNDEZ (D.), BRICEÑO (S.), SCORZA (J.V.) & NOYA (O.), 2007.- Brote familiar de fascioliasis en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, XLVII (1): 47-54.
- ALACÓN DE NOYA (B.), SOSA (V.L.), COLMENARES (C.), BEKER (B.), CONTRERAS (R.) & MEO (P.M.), 2006.- Localización pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. *GEN Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología*, 60: 134-137.
- ALATOOM (A.), SHEFFIELD (J.), GANDER (R.), SHAW (J.) & CAVUOTI (D.), 2008. - Fascioliasis in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 11 (2-2). 483-485.
- ALICATA (E.J.), 1938.- Observations on the life history of *Fasciola gigantica*, the common liver fluke of cattle in Hawaii, and the intermediate host, *Fossaria ollula*. University de Hawaii and the United States Department of Agriculture. Honolulu T.H., 22 pp.
- ALVARES-CHACON (R.), GARCIA-ROSALES (J.J.), CRUZ-OTERO (M.C.), WONG-CHIO (M.) CABRERA-BRAVO (M.), GOMEZ-GOMEZ (J.V.) & GAMEZ-ARANDA (V.), 1992. - Fasciolosis en los niños. Estudio de 10 casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 49: 365-371.
- ANDERSON (N.), LUONG (T.T.), BUI (K.L.), SMOOKER (P.M.) & SPITHILL (T.W.), 1999. - The sensitivity and specificity of two methods for detection of fasciola infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 83: 15-24.
- ANDERSON (R.M.) & CROMBIE (J.), 1984.- Experimental studies of age-prevalence curves for *Schistosoma mansoni* infections in populations of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology*, 89: 79-104.
- ANDREWS (S.J.), 1999. - The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis (J.P. Dalton edit.), CABI Publishing, New York, USA, 1: 1-20.

- ANGLES (R.), STRAUSS (W.), RAMIREZ (S.), ESTEBAN (J.G.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Human fascioliasis in Bolivia: coprological surveys in different provinces of the Department of La Paz. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (1): 33-37.
- ANONYMOUS, 1988. - Parasitic diseases: hepatic distomiasis caused by *Fasciola hepatica*. *Weekly Epidemiological Record (WHO)*, 63: 109-111.
- ANURACPREEDA (P.), WANICHANON (C.) & SOBHON (P.), 2008. - *Paramphistomum cervi*: Antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera. *Experimental Parasitology*, 118 (2): 203-207.
- APT (W.), AQUILERA (X.), VEGA (F.), ALCAINO (H.), ZULANTAY (I.), APT (P.), GONZÁLEZ (V.), RETAMAL (C.), RODRÍGUEZ (J.) & SANDOVAL (J.), 1993.- Prevalence of fascioliasis in human, horses, pigs, and wild rabbits in 3 Chilean Provinces. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 115 (5): 405-414.
- APT (W.), BOTERO (D.), CAMILLO-COURA (L.), CIMERMAN (B.), CIMERMAN (S.), EHRENBERG (J.), FLISSER (A.), KATZ (N.), LAZO (R.F.), MAS-COMA (S.), MORERA (P.), NAQUIRA (C.) & NOYA (O.), 2000.- Informe técnico de un Comité de Expertos: Normas para evaluar medicamentos en parasitosis del tubo digestivo y anexos del hombre. *Parasitología al Día*, 24: 127-133.
- ARFAA (F.), MOVAFAGH (K.) & MAHDAVI (M.), 1969. - *Lymnaea gedrosiana*, an intermediate host of *Fasciola hepatica* in Iran. *The Journal of Parasitology*, 55 (1): 134-135.
- AROONROCH (R.), WORAWICHAWONG (S.), NITIYANANT (P.), KANCHANAPITAK (A.) & BUNYARATVEJ (S.), 2006. - Hepatic fascioliasis due to *Fasciola hepatica*: A two-case report. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 89 (10): 1770-1774.
- ARROYO (R.), BRENES (R.) & GARCÍA (R.), 1986. - Fascioliasis hepática humana en el período de estado. (Presentación de dos casos). *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 7 (2): 129-132.
- ARROYO (R.), MORA (J.A.), MOLINA (S.), TROPER (L.) & AMADOR (A.), 1979.- Fascioliasis hepática humana en Costa Rica. V Congreso Latinoamericano de Parasitología, Buenos Aires, Argentina, pp. 35-57.
- ARTIGAS (P.), 2012. - Fascioliasis humana y animal en Sudamérica: caracterización molecular de los lymnaeidos vectores y sus implicaciones en transmisión y epidemiología. Tesis doctoral, Departamento de biología celular y parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, España, 312 pp.
- 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 (doi: 10.1016/j.actatrop.2011.09.002).
- ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), FLORES (R.), URREA (F.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2009.- Presence of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in wild populations of *Galba truncatula*, main vector of fascioliasis in Europe. In: *6th International Symposium on Limnology and Aquatic Birds: Monitoring, Modelling and Management* (Huesca, Spain, 27-30 October 2009), International Society of Limnology (SIL), Pyrenean Institute of Ecology (CSIC), Proceedings: 76-78.
- ARTIGAS (P.), MERA Y SIERRA (R.), CUERVO (P.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2009.- Scolopacidae and other aquatic migratory birds as possible dispersal agents of lymnaeid snails, in Mendoza province, Argentina. In: *6th International Symposium on Limnology and Aquatic Birds: Monitoring, Modelling and Management* (Huesca, Spain, 27-30 October 2009), International Society of Limnology (SIL), Pyrenean Institute of Ecology (CSIC), Proceedings: 80-82.
- ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.), AGRAMUNT (V.H.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Characterization 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.) & MAS-COMA (S.), 2014. - *Fasciola gigantica* transmission in the zoonotic fascioliasis endemic lowlands of Guilan, Iran: experimental assessment. *Veterinary Parasitology*, 205: 96-106.
- ASHRAFI (K.), BARGUES (M.D.), O'NEILL (S.) & MAS-COMA (S.), 2014.- Fascioliasis, a worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12: 636-649.
- ASHRAFI (K.), MASSOUD (J.), HOLAKOUEI (K.), MAHMOODI (M.), JOAFSHANI (M.A.), VALERO (M.A.), FUENTES (M.V.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* might be the most prevalent causal agent of fascioliasis in northern Iran. *Iranian Journal of Public Health, Tehran*, 33 (4): 31-37.
- ASHRAFI (K.), MASSOUD (J.), HOLAKOUEI NAIENI (K.), JO-AFISHANI (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.
- ASHRAFI (K.), MESSOUD (J.), HOLAKOUEI (K.), MAHMOODI (M.) JOAFSHANI (M.A.), VALERO (M.A.), FUENTES (M.V.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Evidence suggesting that *Fasciola gigantica* might be the most prevalent causal agent of fascioliasis in Northern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 33 (4): 31-37.
- ASHRAFI (K.), TAHBAZ (A.), SHARIFDINI (M.) & MAS-COMA (S.), 2015.- Familial *Trichostrongylus* infection misdiagnosed as acute fascioliasis. *Emerging Infectious Diseases*, 21 (10): 1869-1870.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), FORGHAN-PARAST (K.), REZAEIAN (M.), SHAHTAHERI (S.J.), HADIANI (M.R.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Potential transmission of human fascioliasis through traditional local foods, in northern Iran. *Iranian Journal of Public Health, Tehran*, 35 (2): 57-63.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), MASSOUD (J.), SOBHANI (A.R.), SOLAYMANI-MOHAMMADI (S.), CONDE (P.), KHOUBBANE (M.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Plant-borne human contamination by fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75 (2): 295-302.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), MASSOUD (J.), SOLAYMANI-MOHAMMADI (S.), CONDE (P.), KHOUBBANE (M.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2006a.- Plant-borne human contamination by fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 395-302.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), PANOVA (M.), PERIAGO (M.V.), MASSOUD (J.), & MAS-COMA (S.), 2006b.- Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitology International*, 55 (4): 249-260.
- ASHRAFI (K.), VALERO (M.A.), PEIXOTO (R.V.), ARTIGAS (P.), PANOVA (M.) & MAS-COMA (S.), 2015.- Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: relationships between zonal overlap and phenotypic traits. *Infection, Genetics and Evolution*, 31: 95-109. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.009>).
- 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.
- AYAZ (S.), KHAN (S.), KHAN (S.N.), BIBI (F.), SHAMAS (S.) & AKHTAR (M.), 2011.- Prevalence of zoonotic parasites in drinking water of three districts of khyber Pakhtunkw Province, Pakistan. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences* 9 (1): 67-69.

- BACIGALUPO (J.), 1930.- La *Limnaea viatrix* d'Orbigny, huésped intermediario de la *Fasciola hepatica* en la República Argentina. *Revista de la Sanidad Militar*, 5: 531-534.
- BALDOCK (F.C.) & ARTHUR (R.I.), 1985.- A survey of fascioliasis in beef cattle killed at abattoirs in Southern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 62: 324-326.
- 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.), 2005a.- Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Helminthology*, 79 (3): 257-267.
- BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2010.- Molecular characterisation of human and animal fascioliasis in the Americas. In: *Sustainable Improvement of Animal Production and Health* (N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen edit.), Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, International Atomic Energy Agency, Vienna, and Food Agriculture Organization of the United Nations, Rome: 353-357.
- BARGUES (M.D.), 2011.- Haplotipificación combinada de limneidos vectores de fascioliasis: evaluación y aplicabilidad de marcadores ribosómicos y mitocondriales. *Biomédica*, 31 (Supl. 3): 157-159.
- BARGUES (M.D.), 2011.- Marcadores moleculares para la distinción de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. *Biomédica*, 31 (Supl. 3): 176-178.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), JACKIEWICZ (M.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2006b. - Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline lymnaeidae (Gastropoda). *Heldia (Münchner Malakologische Mitteilungen)*, München, 6 (1-2): 29-40.
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2011c.- 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 (22 pp.) (<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/132>).
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), FLORES (R.), GLÖER (P.), ROJAS-GARCÍA (R.), ASHRAFI (K.), FALKNER (G.) & MAS-COMA (S.), 2011a.- *Lymnaea shirazensis*, an overlooked snail distorting fascioliasis data: genotype, phenotype, ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLoS ONE*, 6 (9): e24567 (33pp, + 3 Suppl. Tables + 5 Figures).
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), KHOUBBANE (M.), ORTIZ (P.), NAQUIRA (C.) & MAS-COMA (S.), 2012.- Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. shirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*, 5: 174 (16 pp.).
- BARGUES (M.D.), ARTIGAS (P.), MERA Y SIERRA (R.L.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2007a.- Characterization 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.), 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.), GONZALES (C.), ARTIGAS (P.), MAS-COMA (S.), 2011b.- A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationship with human and animal infection. *Parasites & Vectors*, 4: 1-18.
- BARGUES (M.D.), HORÁK (P.), PATZNER (R.A.), POINTIER (J.P.), JACKIEWICZ (M.), MEIER-BROOK (C.) & MAS-COMA (S.), 2003.- Insights into the relationships of Palearctic 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.), MANGOLD (A.J.), MUÑOZ-ANTOLI (C.), POINTIER (J.P.) & MAS-COMA (S.), 1997b.- SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *Journal of Parasitology*, 83 (6): 1086-1092.
- BARGUES (M.D.), MARQUEZ (F.J.) & MAS-COMA (S.), 1995.- Rapid non-radioactive and non-fluorescent rDNA sequencing: application to parasites. *Research and Reviews in Parasitology*, 55 (3): 199-205.
- BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.), GOMEZ (H.G.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2007.- 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.), MERA Y SIERRA (R.), GOMEZ (H.G.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2006.- 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.), MERA Y SIERRA (R.L.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2012.- 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.), MERA Y SIERRA (R.L.), GOMEZ (H.G.), ARTIGAS (P.) & MAS-COMA (S.), 2006a.- Ribosomal DNA ITS-1 sequencing of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) and its potencial impact on fascioliasis transmission in Mendoza, Argentina. *Animal Biodiversity and Conservation*, 29 (2): 191-194.
- BARGUES (M.D.), MERA Y SIERRA (R.L.), 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.), 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.), OVIEDO (J.A.), FUNATSU (I.R.), RODRIGUEZ (A.) & MAS-COMA (S.), 1995.- Survival of Lymnaeid snails from the Bolivian Northern Altiplano after the parasitization by different Bolivian isolates of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). In: *Unitas Malacologica* (A. Guerra, E. Rolán & F. Rocha edit.), Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo: 443-445.
- 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.
- BECERRIL (M. A. F.), 2014.- Parasitología Médica. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.DE C.V. México, 24: 209-215.
- BECH (I.), TABERNER (M.) & ALTIMIRAS & ROSET (J.), 2003.- Nuevas aportaciones al conocimiento de los moluscos actuales y del cuaternario en extremadura. *Revista de Estudios Extremeños*, 59 (2): 837-870.
- BENDEZÚ (P.), FRAME (A.) & HILLYER (G.V.), 1982. – Human fascioliasis in Corozal, Puerto Rico. *The Journal of Parasitology*, 68 (2): 297-299.
- BERNAL (D.), DE LA RUBIA (J.E.), CARRASCO-ABAD (A.M.), TOLEDO (R.), MAS-COMA (S.) & MARCILLA (A.), 2004.- Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 563: 203-206.

- BHUTTO (B.), ARIJO (A.), PHULLAN (M.S.), & RIND (R.), 2012.- Prevalence de fascioliasis in buffaloes under different agroclimatic areas of sindh Province of Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(2):241-245.
- BIAGI (F.), PORTILLA (J.), & TAY (J.), 1958.- Observaciones sobre fascioliasis y otra helmintiasis humanas en Atlixco, Puebla. *Prensa Médica Mexicana*, 23 (8): 317-320.
- BIELER (R.), 1992. - Gastropod phylogeny and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23: 311-338.
- 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 Hemsferio Sur S.A., Buenos Aires. 627 pp.
- BOISSIER (J.), MONE (H.), MITTA (G.), BARGUES (M.D.), MOLYNEUX (D.) & MASCOMA (S.), 2015.- Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 15 (7): 757-758.
- 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 infléçand la durée de période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Compareé*, 60: 5-10.
- BOIX-BUSSON (D.), RONDELAUD (D.) & COMBES (C.), 1985b.- L'infestacion de *Lymnaea glabra* Müller por *Fasciola hepatica* L. Les caractéristiques des émissions cercariennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Compareé*, 60: 11-21.
- BORAY (J.C.), 1969a. - Experimental Fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-210.
- BORAY (J.C.), 1978. – The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. *Veterinary Parasitology*, 4: 127-141.
- BORAY (J.C.), 1982. – Fascioliasis. In: Handbook series in Zoonoses, section C, Parasitic Zoonoses (G.V. Hillyer & C.E. Hopla edit.), Volume III, CRC Press, Boca Raton, pp. 71-88.
- BORAY (J.C.), 2007. – Liver fluke disease in sheep and cattle. PRIMEFACTS, 446: 1-10. ([www.dpi.nsw.gov.au/](http://www.dpi.nsw.gov.au/) acceso 03-4-2015).
- BORAY (J.C.), HAPPICH (F.A.) & ANDREWS (J.C.), 1969b. – The epidemiology of fasciolosis in two representative endemic regions of Australia. *Australian Veterinary Journal*, 45: 549-553.
- BOSS (K.J.), 1971. - Critical estimate of the number of recent mollusca. *Occasional Papers on Mollusks* 40 (3): 81-135.
- BOUETARD (A.), CÔTE (J.), BESNARD (A.L.), COLLINET (M.) & COUTELLEC (M.A.), 2014.- Environmental versus anthropogenic effects on population adaptive divergence in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *PLoS ONE*, 9 (9): e106670 (doi:10.1371/journal.pone.0106670).
- BRICEÑO (R.A.L.), 1950.- Trabajo experimental sobre *Fasciola hepatica*. *Revista de Sanidad y Asistencia Social*, 14: 380-388.
- BRITO (A.E.), HERNÁNDEZ (M.B.), DE LA FÉ (P.R.) & SILVEIRA PRADO (A.E.), 2010.- Prevalencia, decomisos de hígado y pérdidas económicas por *Fasciola hepatica* en mataderos bovinos de tres Provincias de la Región Central de Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(4): 1-7. ([www.redalv.org/](http://www.redalv.org/) - acceso 10-04-2015).
- BROWN (D.S.), 1994. – Freshwater snails of Africa and their medical importance. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2nd edition, London, 673 pp.
- BROWN (K.M.) & LYDEARD (C.), 2010. - Mollusca: Gastropoda. In: Ecology and classification of North American freshwater invertebrates (J.H. Thorp & A.P. Covich edit.), Third Edition, Elsevier, California, USA, Chapter 10: 277-307.



- BROWN (K.M.). 2001. - Mollusca: Gastropoda. In: Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (J.H. Thorp & A.P. Covich edit.), Second Edition, Academic Press, California, USA, Chapter 10: 297-329.
- BRUMPT (E.), VELASQUEZ (J.), UCROZ (H.) & BRUMPT (L.CH.), 1939-1940. - Découverte de l'hôte intermédiaire, *Limnaea bogotensis* Pilsbry, de la grande douve, *Fasciola hepatica*, en Colombie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, Tomo 17: 563-579.
- BRUSCA (R.C) & BRUSCA (G.J.), 2003.- Phylum Mollusca. In: Invertebrates, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 20: 703-770.
- BRUSCA (R.C), BRUSCA (G.J.) & HARVER (N.), 2005. - Phylum Mollusca. In: Invertebrados (F. M. Pardos edit.), McGRAW-HILL Interamericana de España, 2nd Edición, 20: 757-832
- BUCHON (P.), CUENCA (H.), QUITON (A.), CAMACHO (A.M.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Fascioliasis in cattle in the human high endemic region of the Bolivian Northern Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (2): 71-83.
- BUI (K.L.), DO (T.T.), LE (N.M.), OSAMU (S.) & SHINOBU (Y.), 2003.- Application of agar gel diffusion test to the diagnosis of fasciolosis in cattle and buffaloes in the red river delta in Vietnam. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37: 201-205.
- CABALLERO Y CABALLERO (E.) & LARIOS (I.), 1940.- Las formas evolutivas de *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) en dos moluscos pulmonados de la Laguna de Lerma. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 11: 231-238.
- CAIN (G.L.), 1956.- Studies on cross-fertilization and self-fertilization in *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biology Bulletin*, 111: 45-52.
- CANO (G.) & VELÁSQUEZ (L.), 2004.- Determinación de la fasciolosis bovina: coprología e identificación de focos de *Fasciola hepatica* en las haciendas ganaderas de la Universidad de Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17: 2.
- CAQUET (T.) & COUTELLE (M.A.), 2011.- Heterosis and inbreeding depression in bottlenecked populations: a test in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 24 (10): 2248-2257.
- CARON (Y.), RONDELAUD (D.) & LOSSON (B.), 2008.- The Detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitology Research*, 103: 735-744.
- CARRADA-BRAVO (T.) & ESCAMILLA (J.R.M.), 2005.- Fasciolosis: revisión clínico-epidemiológica actualizada. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 52 (2): 83-96.
- CASTILLO-RODRÍGUEZ (Z.G.), 2014.- Biodiversity of marine mollusks in México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 85(1): 419-430.
- CHAI, (J.Y.), 2007. - Intestinal flukes. In: Foodborne Parasitic: Fish and Plant-Borne Parasites (K.D. Murrell & B. Fried edit.), Springer, New York, USA, 2: 53-115.
- 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 comparee*, 65: 177-182.
- CHEN (J.X.), CHEN (M.X.), AI (L.), XU (X.N.), JIAO (J.M.), ZHU (T.J.), SU (H.Y.), ZANG (W.), LUO (J.J.), GUO (Y.H.), LV (S.) & ZHOU (X.N.), 2013.- An outbreak of human *Fascioliasis gigantica* in Southwest China. *PLoS ONE*, 8 (8): e71520, 10 pp.
- CHEN (M.G.) & MOTT (K.E.), 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: *Tropical Diseases Bulletin*, 87: R1-R38.
- CHEN (M.G.), 1991. - *Fasciola hepatica* infection in China. *The Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health*, 22: 356-360.
- CHEUNG (J.), ENNS (R.), ROMNEY (M.), REYNOLDS (S.) & AMAR JACK, 2005. - Biliary fascioliasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 61 (4): 596-597.
- CHI (J.G.), SUNG (R.H.) & CHO (S.Y.), 1988.- Tissue parasitic diseases in Korea. *Journal of Korea Medical Science*, 3 (2): 51-62.

- CHO (S.Y.), SEO (B.S.), KIM (Y.I.), WON (C.K.) & CHO (S.K.), 1976.- A case of human fascioliasis in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 14: 147-152.
- CHO (S.Y.), YANG (H.M.), KONG (Y.), KIM (J.C.), SHIN (K.W.) & KOO (B.S.), 1994.- Intraocular fascioliasis: A case report. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50 (3): 349-353.
- COLTON (H.S.) & PENNYPARKER (M.), 1934.- The result of twenty years of self-fertilisation in the pond snail *Lymnaea columella* Say. *The American Naturalist*, 68: 129-36.
- CORDERO DEL CAMPILLO (M.), ROJO (V.), MARTINEZ (F.), SANCHEZ (A.), HERNANDEZ (R.) NAVARRETE (LC.), DIEZ (B.), QUIROZ (R.) & CARVALHO (V.). 1999.- Parasitología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill/Interamericana, España, 935 pp.
- COUDERT (J.) & TRIOZON (F.), 1958. – Recherche sur L'épidémiologie de la distomatose humaine á *Fasciola hepatica* a propos d'une épidémie récente de 500 cas. *Revue D'Hygiène et de Médecine Sociale*, 6: 840-864.
- COUTELLEC (M.A.) & LAGADIC (L.), 2006.- Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, 15 (2): 199-213.
- COUTELLEC-VRETO (M.A.), JARNE (P.), GUILLER (A.), MADEC (L.) & DAGUZAN (J.), 1998.- Inbreeding and fitness in the freshwater snail *Lymnaea peregra*: an evaluation over two generations of self-fertilization. *Evolution*, 52 (6): 1635-1647.
- COUTELLEC-VRETO (M.A.), MADEC (L.) & GUILLER (A.), 1997.- Selfing and biparental inbreeding: a mating system analysis in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Heredity*, 79: 277-285.
- CROSS (J.H.), 1970. – Fasciolopsis in Southeast Asia and the Far East. The Four Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and Other Snail-Transmitted Helminthiasis, pp. 177-199.
- CRUZ (M.I.), IBARRA (V.F.), NARANJO (G.E.), QUINTERO (M.M.T.) & LECUMBERRI (L.J.), 2002.- Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el Rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México. *Veterinaria México*, 33 (2): 189-200.
- CRUZ (R.A.), 1982. – Differential suitability of six lymnaeid snails, exposed to *Fasciola hepatica* Linnaeus 1785. PhD Thesis. Tulane University of Louisiana. United States, 179 pp.
- CRUZ REYES (A.), CHAVARIN (C.), CAMPOS ARIAS (M.P.), TABOADA (J.) & JIMENEZ (E.M.), 1989. - Actividad molusquicida de Piquerol A. aislado *Piqueria minervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles Pulmonados. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (1): 34-40.
- CRUZ-LÓPEZ (M.O.), ADÁN-PIMENTEL (A.), TAMARIZ-CRUZ (O.J.), MUNOZ-LÓPEZ (A.), CRUZ-LÓPEZ (M.C.), CRUZ-LÓPEZ (M.E.) & MUÑOZ-LÓPEZ (S.), 2006.- Fasciolosis hepática diagnosticada en fase de estado. *Revista Gastroenterológica de México*, 71 (1): 59-62.
- CUCHER (M.A.), CARNEVALE (S.), PREPELITCHI (L.), LABBE (J.H.) & WISNIVESKY-COLLI (C.), 2006.- PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology*, 137 (1-2): 74-82.
- CUERVO (P.), DI CATALDO (S.), FANTOZZI (M.C.), DEIS (E.), DIAZ (G.), VIBERTI (G.), ARTIGAS (P.), PEIXOTO (R.), VALERO (M.A.), MERA Y SIERRA (R.) & MAS-COMA (S.), 2015.- Liver fluke (*Fasciola hepatica*) naturally infecting introduced European Brown hare (*Lepus europaeus*) in northern Patagonia: phenotype, prevalence and potential risk. *Acta Parasitologica*, 60 (3): 536-543.

- 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.), BARDUAGNI (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.E.), EL WAKEEL (A.), MAS-COMA (S.) & MONTRESOR (A.), 2003.- 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.W.), BARDUAGNI (P.), YOUSEF (M.M.), EL WAKEEL (A.), HALLAJ (Z.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Human fascioliasis infection: gender difference within school-age children from endemic areas of the Nile Delta, Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101 (2): 155-160.
- CURTALE (F.), MAS-COMA (S.), HASSANEIN (Y.A.E.W.), BARDUAGNI (P.), PEZZOTTI (P.) & SAVIOLI (L.), 2003.- Clinical signs and household characteristics associated with human fascioliasis among rural population in Egypt: a case-control study. *Parassitologia*, 45: 5-11.
- DANIS (M.), NOZAIS (J.P.), CHANDENIER (J.), 1985.- La Distomatose à *Fasciola hepatica*. II: La fasciolose humaine en France. *Action Vétérinaire*, 907: VII-VIII.
- DAWES (B.) & HUGHES (D.L.), 1964.- Fascioliasis: the invasive stage of *Fasciola hepatica* in mammalian host. *Advances in Parasitology*, 2: 97-168.
- DAWES (B.), 1968. - The trematoda with special reference to British and other European forms. Cambridge University Press, New York, 646 pp.
- 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. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 34 (1): 12-34.
- DEVENDRA (V.), SHALINI (K.), VIMALA (V.), PRITI (V.) & NUZHAT (H.), 2006.- Ectopic fascioliasis in the dorsal spine: case report. *Neurosurgery*, 59 (3): E706-E707.
- DIÉGUEZ (L.F.), ABREU (O.G.), VÁSQUEZ (R.C.) & RODRÍGUEZ DE LA VEGA (R.), 2012.- Actividad molusquicida in vitro de *Momordica charantia* L. ("Cundeamor") contra *Fossaria cubensis* (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae). *Revista Electrónica de Veterinaria- ISSN 1695-75D4*, vol. 13, 1-9. (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>).
- DILLON (R.T.), 2000. - The ecology of freshwater molluscs. Cambridge University Press, New York, 509 pp.
- DOMINGO (C.Y.), 2013.- Epidemiology of fasciolosis in Nueva Ecija Province, northern Philippines, including an assessment of ecological factors and recommended control measures. In: Use of environmental animal health management strategies for decision-making (C. Benigno, I. Santos & R. Umbrero edit.), Food and Agriculture of the United Nations Regional Office for Asia and Pacific Bangkok (FAO) 2014, pp 138-145.
- DOUMS (C.) & JARNE (P.), 1996.- The evolution of phally polymorphism in *Bulinus truncatus* (Gastropoda, Planorbidae): the cost of male function analysed through life-history traits and sex allocation. *Oecologia*, 106: 464-469.
- DREYFUSS (G.), ABROUS (M.), RONDELAUD (D.), 2000. – The Susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 86: 158-160.
- DUJARDIN (J.-P.), 2002.- BAC software. Institut de Recherches pour le Développement (IRD, France) (<http://www.fsf.org/copyleft/gpl.html>).

- DURAND (P.), POINTIER (J.P.), ESCOUBEYROU (K.), ARENAS (J.A.), YONG (M.), AMARISTA (M.), BARGUES (M.D.), MAS-COMA (S.) & RENAUD (F.), 2002.- Occurrence of a sibling species complex within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Tropica*, 83 (3): 233-240.
- DURAND (P.), POINTIER (J.P.), ESCOUBEYROU (K.), ARENAS (J.A.), YONG (M.), AMARISTA (M.), BARGUES (M.D.), MAS-COMA (S.) & RENAUD (F.), 2002. - Occurrence of sibling species complex within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. *Acta Tropica*, 83: 233-240.
- EAHMI, 2008.- Policy brief on animal disease distribution modelling and risk mapping in the Philippines: liver fluke and surra. Philippine environmental animal health management initiative, Environmental Animal Health Management Initiative, 4 pp. ([www.eahmi.org/](http://www.eahmi.org/)- acceso 23-3-2015).
- ERENSOY (A.), KUK (S.) & OZDEN (M.), 2009.- Genetic identification of *Fasciola hepatica* by ITS-2 sequence of nuclear ribosomal DNA in Turkey. *Parasitology Research*, 105: 407-412.
- ESPINO (A.M.), DIAZ (A.), PÉRES (A.) & FINLAY (C.M.), 1998.- Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2723-2727.
- ESPINOZA (J.R.), MACO (V.), MARCOS (L.), SAEZ (S.), NEYRA (V.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), GOTUZZO (E.), CHAVARRY (E.), HUAMAN (C.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 2007.- Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76 (5): 977-982.
- ESTEBAN (J.G.), AGUIRRE (C.), ANGLÉS (R.), ASH (L.R.) & MAS-COMA (S.), 1998.- Balantidiasis in Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 922-927.
- ESTEBAN (J.G.), AGUIRRE (C.), FLORES (A.), STRAUSS (W.), ANGLÉS (R.) & MAS-COMA (S.), 1998.- High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (1): 50-55.
- 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.), AGUIRRE (C.), STRAUSS (W.), ANGLÉS (R.) & MAS-COMA (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.), ANGLÉS (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.), FLORES (A.), ANGLÉS (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.), GONZALES (C.), BARGUES (M.D.), ANGLÉS (R.), SANCHEZ (C.) & NÁQUIRA (C.), 2002.- High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation Zone in Peru. *Tropical Medicine & International Health*, 7: 339-348.
- ESTEBAN (J.G.), GONZALES (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.
- ESTEBAN (J.G.), GONZALEZ (C.), BARGUES (M.D.), ANGLÉS (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.
- ESTRADA (V.E.O.), GÓMEZ (M.G.) & VELÁSQUEZ (L.E.T.), 2006.- La higiene del ganado y la fasciolosis bovina, Medellín y Rionegro, 1914-1970. *IATREIA Revista Médica Universidad de Antioquia*, 19 (4): 393-407.
- EUZÉBY (J.), 2001.- Los parásitos de las carnes: epidemiología, fisiopatología, incidencias zoonóticas. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza-España, 430 pp.
- FERNANDEZ CALIENES (A.), FRAGA (J.), POINTIER (J.P.), YONG (M.), SANCHEZ (J.), COUSTAU (C), GUTIÉRREZ (A.) & THÉRON (A.). 2004. - Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, 92 (1): 83-87.
- FLORES (A.), ESTEBAN (J.G.), ANGLES (R.) & MAS-COMA (S.), 2000.- Soil-transmitted helminth infections at very high altitude in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95 (3): 272-277.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2011.- Challenges of animal health information systems and surveillance for animal diseases and zoonoses. FAO Animal Production and Health Proceedings, No. 14, Roma, Italy, 122 pp. (copyright@fao.org).
- FORONDA (P.), BARGUES (M.D.), ABREU-ACOSTA (N.), PERIAGO (M.V.), VALERO (M.A.), VALLADARES (B.) & MAS-COMA (S.), 2008.- Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitology Research*, 103 (5): 1177-1181.
- 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. *Research and Reviews in Parasitology*, 59 (3-4): 129-134.
- FUENTES (M.V.), 2004.- Proposal of a Geographical Information System for modelling zoonotic fascioliasis transmission in the Andes. *Parasitología Latinoamericana*, 59: 51-55.
- FUENTES (M.V.), COELLO (J.R.), BARGUES (M.D.), VALERO (M.A.), ESTEBAN (J.G.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Small mammals (Lagomorpha and Rodentia) and fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano endemic zone. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (2): 115-121.
- FUENTES (M.V.), MALONE (J.B.) & MAS-COMA (S.), 2001.- Validation of a mapping and predicting model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica*, 79 (1): 87-95.
- FUENTES (M.V.), SAINZ-ELIPE (S.), NIETO (P.), MALONE (J.B.) & MAS-COMA (S.), 2005.- A GIS forecast model for human and animal fascioliasis transmission in the central Andes. In: Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases, Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology. Volume 1. Articles of Keynote Speakers (S. Mas-Coma edit.), Medimond S.R.L., International Proceedings Division, Monduzi Editore, Bologna, Italy (ISBN: 88-7587-115-9): 267-278.
- FUENTES (M.V.), SAINZ-ELIPE (S.), NIETO (P.), MALONE (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2005.- Geographical Information Systems risk assessment models for zoonotic fasciolosis in the South American Andes region. In: Geographic Information Systems and Remote Sensing in Parasitology (J.B. Malone edit.), *Parassitologia* (Special Issue), 47: 151-156.
- FUENTES (M.V.), SAINZ-ELIPE (S.), NIETO (P.), MALONE (J.P.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Aplicación de SIG y teledetección satelital en los modelos de transmisión de la fascioliasis humana y animal en los Andes. In: Medio Ambiente, Recursos y Riesgos Naturales: Análisis Mediante Tecnología SIG y Teledetección (C. Conesa García, Y. Alvarez Rogel & J.B. Martínez Guevara edit.), Grupo de Métodos

- Cuantitativos, SIG y Teledetección (Asociación de Geógrafos Españoles) y Departamento de Geografía, Universidad de Murcia, Murcia: 373-386.
- 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. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93 (8): 835-850.
- FUENTES (M.V.), VALERO (M.A.), BARGUES (M.D.), ESTEBAN (J.G.), ANGLES (R.) & MAS-COMA (S.), 1999a.- Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93 (8): 835-850.
- FURST (T.), KEISER (J.) & ULTZINGER (J.), 2012.- Global burden of human Food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12 (3): 210-221.
- 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 Societe France de Parasitologie*, 1: 79-82.
- GANDHI (V.), JAIN (P.), RATHOD (V.) & NAGRAL (S.), 2010.- Endoscopic ultrasound in biliary fasciolosis. *Indian Journal of Gastroenterology*, 29: 128.
- GARCIA (E.N.), 2003.- Moluscos continentales de México: dulceacuícolas. *Revista Biología Tropical*, 51 (3): 495-505.
- GARG (R.), YADAV (C.L.), KUMAR (R.R.), BANERJEE (P.S.), VATSYA (S.) & GODARA (R.), 2009.- The epidemiology of fasciolosis in ruminants in different geoclimatic region of North India. *Tropical Animal Health and Production*, 41: 1695-1700.
- GEIGER (D.L.), DESOWITZ (R.S.), ALLEN (L.E.H.), SUKHAVAT (K.) & VIYANANT (V.), 2006. - Marine Gastropoda. In: The Mollusks. A guide to their study, collection, and preservation (C.F. Sturm, T.A. Pearce & A. Valdés edit.). American Malacological Society. Pittsburgh, USA, Chapter 24: 295-312.
- GEURDEN (T.), SOMERS (R.), THANH (N.T.G.), VIEN (L.V.), HGA (V.T.), GIANG (H.H.), DORNY (P.), GIAO (H.K.) & VERCRUYSSSE (J.), 2008.- Parasitic infections in dairy cattle around Hanoi, Northern Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 153: 384-388.
- GHILDIYAL (J.P.), SINGH (D.P.) & GOYAL (R.), 2014.- Cutaneous images of interest of fascioliasis from India. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 57 (3): 499-500.
- GIAP (LH), 1987. – Distomatose hépatique à *Fasciola hepatica*. Laboratoire de Parasitologie. Université de Bordeaux II, Bordeaux, France, pp 1-74.
- 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.
- GIROD (A.), BIANCHI (I.) & MARIANI (M.), 1980.- Gasteropodi, 1. (Gastropoda: Pulmonata Prosobranchia: Neritidae, Viviparidae, Bithyniidae, Valvatidae). Consiglio Nazionale Delle Ricerche AQ/1/44, Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, Verona, Stamperia, Italy 86 pp.
- 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.
- GLÖER (P.) & MEIER-BROOK, 1998.- Süßwassermollusken. Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. 12<sup>th</sup> Auflage, überarbeitet und erweitert. Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung, Hamburg, 136 pp.
- GLÖER (P.) & PESIC (V.), 2012.- The freshwater snails (Gastropoda) of Iran, with descriptions of two new genera and eight new species. *ZooKeys*, 219: 11-61.

- GLÖER (P.), 2002.- Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas: Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands. Hackenheim: Conchbook Publishing, 73: 1-327.
- GLÖER (P.), BOETERS (H.D.) & PEŠIĆ (V.), 2014.- Freshwater molluscs of Kyrgyzstan with description of one new genus and species (Mollusca: Gastropoda). *Folia Malacologica*, 22: 1-9.
- GOLD (D.), 1972.- *Fasciola* in Israel: ecological, epizootiological and immunological aspects. Ph.D. thesis, Tel Aviv University, (in Hebrew with English summary), 153 pp.
- GÓMEZ (T.A.), PEREZ (R.R.) & ZERON (F.B.), 1978. – Fasciolosis en México. Estado actual y huéspedes intermediario. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 20: 121-127.
- GONZALBO (M.), TRUEBA (G.), FORNASINI (M.), FUENTES (M.V.), BARGUES (M.D.), ÉSTEBAN (J.G.) & MAS-COMA (S.), 2004.- Coproparasitological survey in schoolchildren from the community of Planchaloma (Province of Cotopaxi, Ecuador). In: Multidisciplinarity for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases, IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP 9) (S. Mas-Coma, J.G. Esteban & M.A. Valero edit.), Programme and Abstracts, J. Aguilar S.L., Valencia, Spain, Abstract No. 874: 447 (Spanish version in *Enfermedades Emergentes*, 6, 3, No 84:170).
- GONZÁLES (M.), ELVÍREZ (A.G.), LAZO (S.V.), PUPO (D.O.), HAEDO (W.Q.) & CONCEPCIÓN (L.I.), 2001.- Imagenología y fasciolosis de vías biliares: reporte de cuatro casos. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 21 (3): 1-3.
- 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.
- GOW (J.L.), NOBLE (L.R.), ROLLINSON (D.), TCHUEM TCHUENTE (L.A.) & JONES (C.S.), 2005.- High levels of selfing are revealed by a parent-offspring analysis of the medically important freshwater snail, *Bulinus forskalii* (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*, 71: 175–180.
- GRACZYK (T.) & FRIED (B.), 1998. – Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58: 501-504.
- GRAY (G.D.) & COPLAND (R.S.), 2008. – Overview. In: Overcoming liver fluke as a constraint to ruminant production in South-East Asia (G.D. Gray, R.S. Copland & D.B. Copeman edit.), Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Australia, pp. 12-20. ([www.aciar.gov.au/](http://www.aciar.gov.au/)).
- GROCK (R.), MORALES (G.), VACA (J.L.) & MAS-COMA (S.), 1998.- Fascioliasis in sheep in the human high endemic region of the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, 58 (2): 95-101.
- GUTIERREZ (A.), PERERA (G.), YONG (M.) & WONG (L.), 2001.- The effect of isolation on the life-history traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (4): 577-581.
- GUTIÉRREZ (A.), PERERA (G.), YONG (M.), SÁNCHEZ (J.) & WONG (L.), 2000. – Life-history traits of *Fossaria cubensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) under experimental exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda. Digenea). *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (5): 747-752.
- GUTIÉRREZ (A.), POINTIER (J.P.), FRAGA (J.), JOBET (E.), MODAT (S.), PÉREZ (R.T.), YONG (M.), SÁNCHEZ (J.), LOKER (E.S.) & THÉRON (A.), 2003. – *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology*, 105 (3-4): 211-218.
- 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.

- HENEBERG (P.), 2013.- Phylogenetic data suggest the reclassification of *Fasciola jacksoni* (Digenea: Fasciolidae) as *Fascioloides jacksoni* comb. *Parasitology Research*, 112: 1679-1689.
- HILLYER (G.V.), SOLER DE GALANES (M.), RODRIGUEZ-PEREZ (J.), BJORLAND (J.), SILVA DE LAGRAVA (M.), RAMIREZ GUZMAN (S.) & BRYAN (R.T.), 1992.- 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46 (5): 603-609.
- HOLLAND (W.G.), LUONG (T.T.), NGUYEN (L.A.), DO (T.T.) & VERCRUYSSSE (J.), 2000.- The epidemiology of nematode and fluke infections in cattle in the red River Delta in Vietnam. *Veterinary Parasitology*, 93: 141-147.
- HORÁK (J.G.) & KOLÁROVÁ (L.), 2001.- Bird: schistosomes: Do they die in mammalian skin? *Trends in Parasitology*, 17: 66-69.
- HUBENDICK (B.), 1951.- *Recent Lymnaeidae. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution.* Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, Fjärde Serien, 3 (1): 1-223 + 5 pl.
- HUFFMAN (J.E.), 2014.- Selected wildlife trematodiasis. In: Digenetic Trematodes (R. Toledo & B. Fried edit.), Springer Science+Business Media, Nueva York, Chapter 13: 429-456.
- HUNTER (J.M.), REY (L.), CHU (K.Y.), ADEKOLU-JOHN (E.O.) & MOTT (K.E.), 1994.- Enfermedades parasitarias y desarrollo hidráulico. Necesidad de una negociación intersectorial. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Suiza, 156 pp.
- HURTREZ-BOUSSES (S.), DURAND (P.), JABBOUR-ZAHAB (R.), GUEGAN (J.F.), MEUNIER (C.), BARGUES (M.D.), MAS-COMA (S.) & RENAUD (F.), 2004.- Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology Notes*, 4: 689-690.
- 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.
- HUTCHINSON (D.W.) & TEMPLETON (A.R.), 1999.- Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 53: 1898-1914.
- INCANI (R.N.), VIEIRA (J.M.), PACHECO (M.), PLANCHART (S.), AMARISTA (M.) & LAZDINS (J.), 2003.- Human infection by *Fasciola hepatica* in Venezuela: report of geriatric case. *Investigación Clínica*, 44: 255-260.
- IRFAN (M.), 1984. - Pathology of the liver in fascioliasis in sheep. *Pakistan Veterinary Journal*, 4: 53-55.
- ISHII (Y.), NAKAMURA-UCHIYAMA (F.) & NAWA (Y.), 2002.- A praziquantel-ineffective fascioliasis case successfully treated with triclabendazole. *Parasitology International*, 51: 205-209.
- JABBOUR-ZAHAB (R.), POINTIER (J.P.), JOURDANE (J.), JARNE (P.), OVIEDO (J.A.), BARGUES (M.D.), MAS-COMA (S.), ANGLES (R.), PERERA (G.), BALZAN (C.), KHALLAAYOUNE (K.) & RENAUD (F.), 1997.- Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis, with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, 64: 191-203.
- JACKIEWICZ (M.), 1986b.- Pakiet plemnikow *Lymnaea corvus* (GMELIN) (Gastropoda, Basommatophora), *Protozoologia i Zoologia*, Warszawa- Wrocław, Poland, 30 (1): 121-122.
- JACKIEWICZ (M.), 1998.- European Species of the Family *Lymnaeidae* (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora), Genus, Head Editor, Wrocław, Poland, vol. 9 (1): 1-93.



- JARNE (P.) & AULD (J.R.), 2006.- Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution* 60: 1816–1824.
- JARNE (P.) & DELAY (B.), 1990.- Inbreeding depression and self-fertilization in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). *Heredity*, 64: 169–175.
- JARNE (P.) & STÄDLER (T.), 1995.- Population genetic structure and mating system evolution in freshwater pulmonates. *Experientia*, 51: 482–497.
- JARNE (P.), 1995.- Mating system, bottlenecks and genetic polymorphism in hermaphrodite animals. *Genetic Research*, 65: 193–207.
- JARNE (P.), POINTIER (J.P.), DAVID (P.) & KOENE (J.M.), 2010.- Basommatophoran Gastropods. In the evolution of “primary” sexual character in animal, (J.L. Leonard & A. Córdova-Aguilar edit.), Oxford University Press, New York, USA, 9: 173- 196.
- JARNE (P.), VIANEY-LIAUD (M.) & DELAY (B.), 1993.- Selfing and outcrossing in hermaphrodite freshwater gastropods (Basommatophora): where, when and why? *Biological Journal of the Linnean Society*, 49: 99–125.
- JONG-BRINK (M.), 1990.- How trematode parasites interfere with reproduction of their intermediate hosts, freshwater snails. *Journal Medical and Applied Malacology*, 2: 101-133.
- KAGEI (N.), 1993.- Current status of fascioliasis in Japan. *Infectious Agents Surveillance Report*, pp. 101-102.
- KANG (M.L), TEO (C.H.Y.), WANSAICHEONG (G.K.L.), GIRON (D.M.) & WILDER-SMITH (A.), 2008.- *Fasciola hepatica* in a New Zealander traveler. *Journal of Travel Medicine* 15: 196-199.
- KANOKSIL (W.), WATTANATRANON (D.), WILASRUSMEE (C.), MINGPRUEDH (S.) & BUNYARATVEJ (S.), 2006.- Endoscopic removal of one live biliary *Fasciola gigantica*. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 89 (12): 2150-2154.
- KASSAI (T.), 1998.- Phylum: Platyhelminthes vermes planos. In: *Helminología Veterinaria* (C.A. Acedo, E.M. Cacho, J.C. Quílez & F.B. López trad.), Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza, España, 1: 1-49.
- KENDALL (S.B.), 1953.- The life-history of *Lymnaea truncatula* under laboratory conditions. *Journal of Helminthology*, 27: 17-28.
- KHAN (M.N.), SAJID (M.S.), KHAN (M.K.), IQBAL (Z.) & HUSSAIN (A.), 2010.- Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Parasitology Research*, 107: 787-794.
- KHAN (W.), NOOR-UN-NISA & KHAN (A.), 2014.- A case of *Fasciola hepatica* infection in Swat, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 46 (6): 1789-1790.
- KHOUBBANE (M.), 2002.- *Fasciola humana* y animal en Egipto e Irán caracterización biológica y molecular de las especies parásitas implicadas y de sus moluscos hospedadores intermediarios. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, 332 pp.
- KHUONG (L.H.) KHANH (N.V.) & LOI (H.H.), 2001. – Liver fluke infection in cattle according to different ecological regions of Vietnam. *Science and Veterinary Techniques*, 1: 36-40.
- KHURANA (S.) & MALLA (N.), 2014. - Water and food-borne trematodiasis in humans. *Water and Health*, pp. 219-227.
- KIM (J.), CHUNG (W.S.) & CHO (K.H.), 1994.- Status of parasitic infection diagnosed by surgical biopsy in Kwangju and Chollanam-do. *The Korean Journal of Parasitology*, 32 (2): 93-100.
- KIM (S.H.), JUNG (C.K.), HER (J.), HUR (K.H.), CHOI (J.H.), KANG (K.H.) & HWANG (C.H.), 2014.- A case of fascioliasis in the intrahepatic duct with concurrent clonorchiasis. *The Korea Society of Gastroenterology*, 64 (5): 298-301.
- KIM (Y.H.), KANG (K.J.) & KWON (J.H.), 2005.- Four cases of hepatic fascioliasis mimicking cholangiocarcinoma. *The Korean Journal of Hepatology*, 11: 169-175.

- KLEIMAN (F.), PIETROKOVSKY (S.), PREPELITCHI (L.), CARBAJO (A.E.) & WISNIVESKY-COLLI (C.), 2007.- Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian Valleys, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 145 (3-4): 274-286.
- KODAMA (K.), 1997. – Human fascioliasis: comparason of a fasciolicidal effect of bithionol and praziquantel. *Kansenshogaku Zasshi*, 71 (11): 1162-1167.
- KRUGLOV (N.D.), 2005. Lymnaeid snails of Europe and northern Asia. Smolensk: Smolensk State Pedagogical University Press, Smolensk, 508 pp.
- KRUGLOV (N.D.), 2005.- *Molluscs of the Family Lymnaeidae (Gastropoda, Pulmonata) in Europe and Northern Asia*. SGPU Publishing, Smolensk, 507 pp.
- KUMAR (A.), GAUTAM (A.) & CHATURVEDI (S.), 1995.- Obstructive jaundice due to *Fasciola hepatica*. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 14(2): 79-80.
- LANDEROS (M.A.V.), IBARRA (F.V.), ESCUDERO (J.L.C.) & MILIÁN (F.S.), 1980.- Determinación de algunos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, en la Cuenca Lechera de Tulancingo, HGO. *Técnica Pecuaria*, 47-51.
- LE (T.H.), DE (N.V.), AGATSUMA (T.), BLAIR (D.), VERCRUYSS (J.), DORNY (P.), THI (T.G.) & McMANUS (D.P.), 2007.- Molecular confirmation that *Fasciola gigantica* can undertake aberrant migrations in human hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 648-650.
- LE (T.H.), DE (N.V.), AGATSUMA (T.), NGUYEN (T.G.T.), NGUYEN (Q.D.), McMANUS & BLAIR (D.), 2008.- Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in Vietnam. *International Journal for Parasitology*, 38: 725-730.
- LEE (O.J.) & KIM (T.H.), 2006.- Indirect evidence of ectopic pancreatic fascioliasis in a human. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21: 1631-1633.
- LEE (S.H.), CHO (S.Y.) & SEO (B.S.), 1982.- A human case of ectopic fascioliasis in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 20 (2): 191-200.
- LEVINE (N.D.), 1970. – Integrated control of snail. *American Zoologist*, 10 (4): 579-582.
- LEVINE (N.D.), 1978.- Textbook of veterinary parasitology. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. USA, pp. 49- 53.
- LI (C.C.) & HORVITZ (D.G.), 1953.- Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5: 107–117.
- LIU (Y.), LI (F.), LIU (W.), DAI (R.S.), TAN (Y.M.), HE (D.S.), LIN (R.Q.) & ZHU (X.Q.), 2009.- Prevalence of helminths in water buffaloes in Hunan Province, China. *Tropical Animal Health and Production*, 41: 543-546.
- LÓPEZ (A.), SILVA (C.) & BUSEK (D.M.), 2004. – Fascioliasis hepatica: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Radiología*, 10 (3): 118-123.
- LORENZO-MORALES (J.), ORTEGA-RIVAS (A.), MARTINEZ (E.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), PERIAGO (M.V.), FORONDA (P.), ABREU-ACOSTA (N.), VALLADARES (B.) & MAS-COMA (S.), 2006.- *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Tropica*, 100: 63-69.
- 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.
- MALEK (E.A), 1962.- *Laboratory guide and notes for medical malacology.*, Burgess Publishing company. Minneapolis, Minn, USA, 154 pp.
- MALONE (J.B.), GOMMES (R.), HANSEN (J.), YILMA (J.M.), SLINGENBERG (J.), SNIJDERS (F.), NACHTERGAELE (F.) & ATAMAN (E.), 1998.- A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on food and agriculture organization databases. *Veterinary Parasitology*, 78: 87-101.

- 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.
- MANNING (S.G.), DESOWITZ (R.S.), ALLEN (L.E.), SUKHAVAT (K.) & VIYANANT (V.), 1968. - Studies on the epidemiology of *Fasciolopsis busky* in Thailand. No. Reference 3769: 245-248.
- MANSOORIAN (A.), 2001. – Freshwater gastropods of Khuzestan Province south-west Iran. *Iranian International Journal of Science*, 2 (2): 1-9.
- MAQBOOL (A.), HAYAT (C.S.), AKHTAR (T.) & HASHMI (H.A.), 2002.- Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. *Veterinarski Arhiv*, 72: 221-228.
- 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.
- MARCOS (L.A.), MACO (V.), TERASHIMA (A.), SAMALVIDES (F.), ESPINOSA (J.R.) & GOTUZZO (E.), 2004.- Hiperendemicidad de fasciolosis humana en el Valle de Mantaro: factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. *Gastroenterología del Perú*, 24: 158-164.
- MARCOS (L.A.), TERASHIMA (A.), LEGUIA (G.), ESPINOSA (J.R.) & GOTUZZO (E.), 2007.- La Infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 17 (4): 389-396.
- MARQUEZ (F.J.), OVIEDO (J.A.) & MAS-COMA (S.), 1995.- Molecular characterization of the Lymnaeid snails inhabiting the human Fascioliasis high endemic zone of the Bolivian Northern Altiplano. In: *Unitas Malacologica* (A. Guerra, E. Rolán & F. Rocha edit.), Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo: 459-461.
- MARTINDAH (E.), KUSUMANINGSIH (A.), WIDJAJANTI (S.), FRANK (B.) & SUHARDONO, 1998. - Extension program on the control of bovine fasciolosis in west Java, Indonesia. *Jurnal LLmu Ternak dan Veteriner*, 3: 206-213.
- MARTÍNES (R.S.), DOMENECH (I.C.), MILLÁN (J.C.M.) & PINO (A.S.), 2012.- Fascioliasis, clinical-epidemiological review and diagnosis. *Revista Cubana de Higiene Epidemiología*, 50: 1.
- MARTÍNEZ-BEBERT (K.), RODRÍGUEZ-BÁEZ (R.), PILAR-PÉREZ (R.), PILA-PELÁEZ (R.) & TAMAKLOE (K.), 2002.- Hematoma hepático por fascioliasis. *Gaceta Médica de México*, 138 (3): 271-274.
- MARTINEZ-ORTI (A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2015.- Dos nuevas localizaciones para España de *Bulinus truncatus* (Audouin, 1827) (Gastropoda: Planorbidae), hospedador intermediario de Schistosomiasis urinaria. *Arxius de Miscel.lània Zoològica*, 13: 25-31.
- MARTY (A.M.), MAS-COMA (S.) & BARGUES (M.D.), 2000.- Miscellaneous Trematodiasis. In: *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (W.M. Meyers, R.C. Neafie, A.M. Marty & D.J. Wear edit.), Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington D.C.: 107-115.
- MARUYAMA (H.), NODA (S.), MIMORI (T.) & NAWA (Y.), 1996.- Fascioliasis cases recently found in the southern part of Kyushu District, Japan. *Japanese Journal of Parasitology* 45: 247-254.
- 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.), 1996.- Fascioliasis humana en Iberoamérica. In: *Parasitismo y Desarrollo* (A.R. Martínez Fernández coord.), Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, Real Academia de Farmacia, Madrid, pp. 31-86.
- MAS-COMA (S.), 1998.- Human fascioliasis in Europe and Latin America. In: *Infectious Diseases and Public Health. A Research and Clinical Update* (M. Angelico & G. Rocchi edit.), Balaban Publishers, Philadelphia, L'Aquila: 297-313.

- MAS-COMA (S.), 2003.- Human Fascioliasis. In: Proceedings of the SHSR Seminar on Mid-Term Achievements and Lessons Learned (26 March 2003) (P. Barduagni edit.), Support to the Health Sector Reform in Behera and Qena Governorates, Egypt (SHSR), General Directorate of Primary Health Care, Ministry of Health and population, Egypt and Cooperazione Italiana, Royal Nile Tower, Cairo: 30-39.
- MAS-COMA (S.), 2003.- The 9th Chamlong-Tranakchit Harinasuta Lecture - Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. In: *4th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, 2nd International Meeting on Gnathostomiasis, and Joint International Tropical Medicine Meeting 2003* (4th FBPZ & JITMM 2003, 2-4 Dec. 2003, Siam City Hotel), Bangkok, Thailand: 44-60.
- MAS-COMA (S.), 2004.- Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35 (Suppl. 1): 1-11.
- MAS-COMA (S.), 2004a.- Human fascioliasis. In: *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.), World Health Organization (WHO), IWA Publishing, London, UK, Chapter 19: 305-322.
- MAS-COMA (S.), 2005. – Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*, 79 (3): 207-216.
- MAS-COMA (S.), 2007.- *Lymnaea cousini* (Gastropoda: Lymnaeidae) as transmitter of fascioliasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (2): 241-242.
- MAS-COMA (S.), 2007.- Parasitic diseases, global change and the developing world: the example of emerging fascioliasis. Doctor Honoris Causa Lectio on the occasion of conferring the “Doctor Honoris Causa” title to Prof. Dr. Santiago MAS-COMA by the “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy (UMF) of Cluj-Napoca. *Scientia Parasitologica, Cluj-Napoca*, 8 (1): 10-20.
- MAS-COMA (S.), 2010.- The importance of emerging and re-emerging zoonotic diseases: recognition, monitoring and control. In: *Sustainable Improvement of Animal Production and Health* (N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen edit.), Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, International Atomic Energy Agency, Vienna, and Food Agriculture Organization of the United Nations, Rome: 277-284.
- MAS-COMA (S.), 2011.- Circulación de *Fasciola hepatica* en áreas de endemia humana: hacia un enfoque zoonótico-ambiental integrado. *Biomédica*, 31 (Supl. 3): 199-201.
- MAS-COMA (S.), 2011.- El cambio climático y su impacto sobre las enfermedades causadas por helmintos. In: *Temas de Zoonosis V* (J. Basualdo, R. Cacchione, R. Durlach, P. Martino & A. Seijo edit.), Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires, Capítulo 22: 195-203.
- MAS-COMA (S.), 2011.- Heterogeneidad epidemiológica de la Fascioliasis humana: diferentes patrones de transmisión, con énfasis en América Latina. *Biomédica*, 31 (Supl. 3): 173-176.
- MAS-COMA (S.), 2013.- Capítulo 25 Fasciolopsiasis, Capítulo 50 Fascioliasis, Capítulo 51 Clonorquiasis, Capítulo 52 Opistorquiasis. In: *Parasitología Humana* (W.L. Apt Baruch), McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., México D.F., 25: 179-183; 50: 379-389; 51: 390-394; 52: 395-401.
- MAS-COMA (S.), 2014.- Helminth-Trematode: *Fasciolopsis buski*. In: *Encyclopedia of Food Safety* (Y. Motarjemi, G.G. Moy & E.C.D. Todd edit.), Elsevier Major Reference Works, ScienceDirect Online Platform, Elsevier, Academic Press, Waltham, MA, Vol. 2. Hazards and Diseases: 146-157.
- 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*, 3rd Series (M.J. Aminoff, F. Boller & D.E. Swaab edit.), Volume 114

- Neuroparasitology and Tropical Neurology* (H.H. García, H.B. Tanowitz & O.H. Del Brutto edit.), Elsevier, Amsterdam, Chapter 24: 297-310.
- MAS-COMA (S.), AGRAMUNT (V.H.) & VALERO (M.A.), 2014.- Neurological and ocular fascioliasis in humans. *Advances in Parasitology*, 84: 27-149.
- 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: 454-467.
- 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.), ARTIGAS (P.) & BARGUES (M.D.), 2009a.- Filogenia de los Lymnaeidae vectores de *Fasciola hepatica*. In: Tendencias y Futuro de la Investigación en Parasitología y en Productos Naturales (C. Corredor Pereira, F. Guhl Nannetti & C. Duque Beltrán edit.), Memorias del Seminario Internacional ACOFACIEN-ACCEFYN (Asociación Colombiana de Facultades de Ciencias y Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogotá, 4-7 Agosto 2008), Editora Guadalupe S.A., Bogotá D.C., Colombia, 141-157.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & ESTEBAN (J.G.), 1999b.- Human Fasciolosis. In: *Fasciolosis* (J.P. Dalton edit.), CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK: 411-434.
- 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.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2006.- Gastrodiscoidiasis, a plant-borne zoonotic disease caused by the intestinal amphistome fluke *Gastrodiscoides hominis* (Trematoda: Gastrodiscidae). *Research and Reviews in Parasitology*, 66 (1-4): 75-81.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2007.- Plant-borne trematode zoonoses: fascioliasis and fasciolopsiasis. In: World Class Parasites: food-borne parasitic zoonoses. Fish and plant-borne parasites (K.D. Murrell & B. Fried edit.), Springer Verlag, New York, vol. 11: 293-334.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2014.- Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: Update for the present global scenario. *Parasitology*, 141 (Special Issue): 1918-1946.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.) & VALERO (M.A.), 2014.- Fascioliasis. In: *Helminth Infections and Their Impact on Global Public Health* (F. Bruschi edit.), Springer-Verlag Wien, Chapter 4: 93-122.
- MAS-COMA (S.), BARGUES (M.D.), MARTY (A.M.) & NEAFIE (R.C.), 2000.- Hepatic Trematodiasis. In: *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (W.M. Meyers, R.C. Neafie, A.M. Marty & D.J. Wear edit.), Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington D.C.: 69-92.
- 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. In: *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites* (C. Combes & J. Jourdane edit.), Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan, Vol. 2: 81-123.
- MAS-COMA (S.), CORACHAN (M.) & BARGUES (M.D.), 2005.- Infecciones causadas por trematodos. Esquistosomosis. Otras trematodosis. In: *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (V. Ausina Ruiz & S. Moreno Guillén dir.), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana, Madrid, Capítulo 116: 1115-1122.

- 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.), 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.), 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.), 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 (2): 736.
- 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.), 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.), 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.), 2009.- Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163 (4): 264-280.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2009b.- *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.), 2010.- Climate change effects on trematode and nematode diseases affecting children in rural areas of developing countries. *International Public Health Journal*, 2 (4): 405-430; & in: *Climate Change and Rural Child Health* (E. Bell, B.M. Seidel & J. Merrick edit.), Nova Science Publishers Inc., New York, Chapter 10: 109-140.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2014.- Fascioliasis. In: *Digenetic Trematodes* (R. Toledo and B. Fried, edit.), *Advances in Experimental Medicine and Biology Series*, Springer Science + Business Media, New York, Vol. 766, Chapter 4: 77-114.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2015.- *Fasciola* and *Fasciolopsis*. In: *Biology of Foodborne Parasites* (L. Xiao, U. Ryan & Y. Feng edit.), Food Microbiology Series (D. Liu edit.), CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, Chapter 20: 371-404.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.A.) & BARGUES (M.D.), 2015.- Fascioliasis. In: *Series of Neglected Tropical Diseases* (P. Hotez, edit.), Vol. 7. *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean* (C. Franco-Paredes & J.I. Santos-Preciado, edit.),

- Springer-Verlag Wien: 129-154.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.D.) & BARGUES (M.D.), 2014a.- Fascioliasis. In: Digenetic Trematodes (R. Toledo & B. Fried edit.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* 766, Springer, Nueva York, USA, Chapter 4: 77-114.
- MAS-COMA (S.), VALERO (M.D.) & BARGUES (M.D.), 2014b.- Fascioliasis. In: Helminth Infections and their Impact on Global Public Health (F. Bruschi edit.), Springer, Wien, Chapter 4: 93-122.
- MAS-COMA (S.), 2004b. - Human fascioliasis: epidemiological patterns in human endemic areas de south America, Africa y Asia. *The Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health*, 35 (1): 1-11
- MATÍNEZ (R.) & MIRANDA (R.), 1968.- Aspectos de la reproducción en moluscos pulmonados del Área Metropolitana de Caracas. En: Estudio de Caracas. Ecología vegetal-fauna Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela, vol. II: 123-165.
- MAZZOTTI (L.), 1955. - *Lymnaea humilis* (Say), huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y enfermedades Tropicales*, 16 (4): 21-23.
- MAZZOTTI (L.), 1955.- *Lymnaea obrussa* Say, huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Revista del Instituto de Salubridad y enfermedades Tropicales*, 15 (3): 163-165.
- MEIER-BROOK (C.) & BARGUES (M.D.), 2002.- *Catascopea*, a new genus for three Nearctic and one Palaearctic stagnicoline species (Gastropoda: Lymnaeidae). *Folia Malacologica*, 10 (2): 83-84.
- MELLENDEZ (R.), CORONADO (A.), DIAZ (J.) & CRESPO (G.), 1983.- Aspectos epidemiológicos de la fascioliasis bovina en el Centro-Occidente Venezolano; con énfasis en la prevalencia del trematode y su hospedador intermediario. *Acta Científica Venezolana*, 34: 65-71.
- MENARD (A.), AGOULON (A.), L'HOSTIS (M.), RONDELAUD (D.), COLLARD (S.) & CHAUVIN (A.), 2001.- *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Veterinary Research*, 32: 499-508.
- MENDONÇA (M.M.), 1987.- *A fasciolose por Fasciola hepatica L. 1758 em s. Miguel Açores. Contribuição para o estudo das condições ecológicas da sua transmissibilidade*. 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.), 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>).
- 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.
- MEUNIER (C.), HURTREZ-BOUSSES (S.), DURAND (P.), RONDELAUD (D.) & RENAUD (F.), 2004.- Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Ecology*, 13: 2535-2543.
- MEUNIER (C.), HURTREZ-BOUSSES (S.), JABBOUR-ZAHAB (R.), DURAND (P.), RONDELAUD (D.) & RENAUD (F.), 2003.- Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Heredity*, 92: 316-322.
- MEUNIER (C.), TIRARD (C.), HURTREZ-BOUSSES (S.), DURAND (P.), BARGUES (M.D.), MAS-COMA (S.), POINTIER (J.P.), JOURDANE (J.) & RENAUD (F.), 2001.-

- Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. *Molecular Ecology*, 10: 1333-1340.
- MEZO (M.), GONZALEZ-WARLETA (M.), CASTRO-HERMIDA (J.A.), MANGA-GONZALEZ (M.Y.), PEIXOTO (R.), MAS-COMA (S.) & VALERO (M.A.), 2013.- The wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) as secondary reservoir of *Fasciola hepatica* in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 198: 274-283.
- MIENIS (H.K.) & RITTNER (O.), 2012.- On the presence of the invasive mimic lymnaea *Pseudosuccinea columella* in Israel (Gasteropoda, Lymnaeidae). *Ellisaria, Newsletter of the Freshwater Mollusk Conservation Society*, 14 (2): 17-20.
- MILIAN (F.S.), HERNANDEZ (E.F.) & FRAGOSO (G.S.), 1989.- Estudio epizootológico de la fasciolosis en la Zona Centro del Estado de Guerrero. *Técnica Pecuaria de México*, 27 (1): 41-47.
- MILLÁN (J.C.), MULL (R.), FREISE (S.) & RICHTER (J.), 2000.- The efficacy and tolerability of triclabendazole in cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63 (5-6): 264-269.
- MILLES (A.), CAPEK (I.), AJANA (F.) SCHEPENS (C.) LLEF (D.) & VAILLANT (V.), 2006. - Commercial watercress as an emerging source of fascioliasis in northern France in 2002: results from an outbreak investigation. *Epidemiology & Infection*. 134: 942-945.
- MINCHELLA (D.J.), 1985.- Hosts life-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, 90: 205-216.
- MOGHADDAM (A.S.) , MASSOUD (J.) , MAHMOODI (M.), MAHVI (A.H.), PERIAGO (M.V.), ARTIGAS (P.), FUENTES (M.V.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2004.- 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.), 2004.- Distributional outline of lymnaeid snails (Gastropoda) in the fascioliasis endemic area of Mazandaran, Iran. *Acta Parasitologica*, 49 (2): 145-152.
- MOLINA (E.C.), GONZAGA (E.A.) & LUMBAO (L.A.), 2005. – Prevalence of infection with *Fasciola gigantica* and its relationship to carcass and liver weights, and fluke and egg counts in slaughter cattle and buffaloes in southern Mindanao, Philippines. *Tropical Animal Health and Production*, 37 (3): 215-221.
- MORALES (G.), PINO (L.A.) & MORALES (J.), 1986.- Distribución de la redias y cercarias de *Fasciola hepatica* en una población silvestre de *Lymnaea cubensis* del occidente de Venezuela. *Acta Científica Venezolana*, 37: 535-541.
- MORALES (J.L.), ARRIAGADA (R.), SALAS (L.), MORALES (C.), FUENTES (F.) & SANTANA (R.), 2009. – Hematoma subcapsular por fasciolosis. *Revista Chile Cirugía*, 61: 73-77.
- MORÁN (A.R.), QUIROZ (H.R.), GUERRERO (C.M.) & HUERTA (M.M.), 1993.- Frecuencias de fasciolosis a través de cuatro técnicas de diagnóstico en toros sacrificados en la Plaza México. *Veterinaria México*, 23 (3):1993.
- MORIENA (R.A.), ALVAREZ (J.D.), PIETROKOVSKY (S.), RUBEL (D.), PREPELITCHI (L.), RACIOPPI (O.) & WISNIVESKY (C.), 2009.- Presencia de *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae) naturalmente infestada con *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) en el Departamento de Santo Tomé, Provincia de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria Argentina*, No. 251, 26: 1-8.
- MOSSOUD (J.) & SADJADI (S.), 1980.- Susceptibility of different species of lymnaea snails to miracidia of *Fasciola gigantica* and *F. hepatica* in Iran. *Journal of Helminthology*, 54 (3): 201-202.
- MOSSOUD (J.), 1990.- Fascioliasis outbreak of man and drug test (Triclabendazol) in Caspian Littoral, northern part of Iran, 1989. *Bulletin Société Française de Parasitologie*, 8: S438.



- 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*, 676: 174-179.
- MOUKRIM (A.), OVIEDO (J.A.), VAREILLE-MOREL (Ch.), RONDELAUD (D.) & MAS-COMA (S.), 1993.- *Haplometra cylindracea* (Trematoda: Plagiorchiidae) in *Lymnaea truncatula*: cercarial shedding during single or dual infections with other digenean species. *Research and Reviews in Parasitology*, 53 (1-2): 57-61.
- MOWLAVI (G.), MAMISHI (S.), ROKNI (M.B.), GHARAGUZLO (M.J.), ASHRAFI (K.) & MAS-COMA (S.), 2010.- Neglected human fascioliasis case in a visceral leishmaniasis endemic area, northwestern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 39 (3): 129-131.
- MOWLAVI (G.), MOKHTARIAN (K.), MAKKI (M.S.), MOBEDI (I.), MASOUMIAN (M.), NASERI (R.), HOSEINI (G.), NEKOU EI (P.) & MAS-COMA (S.), 2015.- *Dicrocoelium dendriticum* found in a Bronze Age cemetery in western Iran in the pre-Persepolis period: the oldest Asian palaeofinding in the present human infection hottest spot region. *Parasitology International*, 64: 251-255 (doi: 10.1016/j.parint.2015.02.007).
- MUÑOZ-RIVAS (G.), 1953. – Fasciolosis experimental. *Revista de la Academia Colombiana Ciencias, Físicas y Naturales*, 9: 156-158.
- NARAIN (K.), BISWAS (D.), RAJQURU (S.K.) & MAHANTA (J.), 1997.- Human distomatosis due to *Fasciola hepatica* infection in Assam, India. *Journal of Communicable Diseases*, 29 (2): 161-165.
- NATIONAL VECTOR BORNE DISEASE CONTROL ROGRAMME, 2013.- Lymphatic filariasis. [www.nvbd.gov.in/](http://www.nvbd.gov.in/)- acceso 10-3-2015.
- NATIONAL VECTOR BORNE DISEASE CONTROL ROGRAMME, 2014.- Malaria situation in India. [www.nvbd.gov.in/](http://www.nvbd.gov.in/)- acceso 10-3-2015.
- NGOEN-KLAN (R.), PIANGJAI (S.), SOMWANG (P.), MOOPHAYAK (K.), SUKONTASON (K.), SUKONTASON (K.L.), SAMPSON (M.) & IRVINE (K.), 2010.- Emerging helminths infection in snail and cyprinoid fish in sewage treatment Wetlands Water in Cambodia. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 7 (3): 13-21.
- NGUYEN (T.G.), DE (N.V.), VERCRUYSSSE (J.), DORNY (P.) & LE (T.H.), 2009.- Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam. *Experimental Parasitology*, 123 (4): 354-361.
- NGUYEN (T.G.), LE (T.H.), DAO (T.H.), TRAN (T.L.), PRAET (N.), SPEYBROECK (N.), VERCRUYSSSE (J.) & DORNY (P.), 2011.- Bovine fasciolosis in the human fasciolosis hyperendemic Binh Province in Central Vietnam. *Acta Tropica*, 117: 19-22.
- NGUYEN (T.G.), NGUYEN (D.T.), VAN NGUYEN (T.), HUYNH (V.V.), LE (D.Q.), FUKUDA (Y.) & NAKAI (Y.), 2012.- Prevalence of *Fasciola* in cattle and of its intermediate host lymnaea snails in Central Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 1847-1853.
- NITHIUTHAI (S.), ANANTAPHRYTI (M.T.), WAIKAGUL (J.) & GAJADHAR (A.), 2004.- Waterborne zoonotic helminthiases. *Veterinary Parasitology*, 126: 167-193.
- NJIOKOU (F.), BELLEC (C.), BERREBI (P.), DELAY (B.) & JARNE (P.), 1993.- Do self-fertilization and genetic drift promote a very low genetic variability in the allotetraploid *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae) populations? *Genetical Research*, 62 (2): 89-100.
- NJIOKOU (F.), BELLEC (C.), JARNE (P.), FINOT (L.) & DELAY (B.), 1993.- Mating system analysis using protein electrophoresis in the self-fertile hermaphrodite species *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 59: 125-133.
- NJIOKOU (F.), DELAY (B.), BELLEC (C.), N'GORAN (E.K.), YAPI YAPI (G.) & JARNE

- (P.), 1994.- Population genetic structure of the schistosome-vector snail *Bulinus globosus*: examining the role of genetic drift, migration and human activities. *Heredity*, 72: 488-497.
- NJIOKOU (F.), MOUAFO (J.B.), TEUKENG (F.), NJINE (T.), EKOBO (A.S.) & JARNE (P.), 2000.- The influence of self-fertilization and pairing on life-history traits in the freshwater snail *Bulinus forskalii* (Gastropoda, planorbidae). *Acta Tropica*, 76 (2): 159-167.
- NOVOBILSKÝ (A.), KAŠNY (M.), BERAN (L.), RONDELAUD (D.) & HÖGLUND (J.), 2013.- *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasites & Vectors*, 6: 651- 660.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD & ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OMS & OPS), 2003. – Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. In: *Parasitosis*, Tercera edición, Washington, EUA, No 580, vol. 3: 1-423.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD & ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OMS & OPS), 2007.- Acción contra las lombrices. Publicado gracias a la Fundación Bill & Melinda Gates, Impreso 2008, No. 10: 1-8.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2014.- Trematodiasis de transmisión alimentaria. Centro de prensa. Nota descriptiva N° 368. ([www.who.int/](http://www.who.int/) acceso 18-10-2014).
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2011.- Informe: Taller regional para la formulación de planes integrados para la prevención, control y eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas. San Salvador, Salvador 16-18 mayo, 131 pp. ([www.paho.org/](http://www.paho.org/) acceso 10-04-2015).
- OVIEDO (J.A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1995.- Ecological characteristics of Lymnaeid snails in the human Fascioliasis high endemic zone of the Bolivian Northern Altiplano. In: *Unitas Malacologica* (A. Guerra, E. Rolán & F. Rocha edit.), Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo: 463-465.
- OVIEDO (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 (1): 35-43.
- OVIEDO (J.A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 1996.- The intermediate snail host of *Fasciola hepatica* on the Mediterranean island of Corsica. *Research and Reviews in Parasitology*, 56 (4): 217-220.
- PALMER (D.G.), LYON (J.), PALMER (M.A.) & FORSHAW (D.), 2014.- Evaluation of a copro-antigen ELISA to detect *Fasciola hepatica* infection in sheep, cattle and horses. *Australian Veterinary Journal*, 92 (9): 357-361.
- 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.
- PERIAGO (M.V.R.), 2008.- Caracterización fenética y genética de individuos del género *Fasciola* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) en bovidos y humanos de la zona endémica del Delta del Nilo (Egipto). Tesis Doctoral, Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, España, 285 pp.
- PHAM (S.L.) & PHAN (D.L.), 2000.- Parasitic diseases in livestock and preventive measures (in Vietnamese). Hanoi, *Agriculture Press*, pp. 68-79.

- PLEASANCE (J.), RAADSMA (H.W.), ESTUNINGSIH (S.E.), WIDJAJANTI (S.), MEEUSEN (E.) & PIEDRAFITA (D.), 2011.- Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*, 178: 264-272.
- POINTIER (J.P.), CAZZANIGA (N.J.), GONZALEZ-SALAS (C.), GUTIERREZ (A.), ARENAS (J.A.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2006.- Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids snail intermediate hosts of fascioliasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (4): 431-435.
- POINTIER (J.P.), COUSTEAU (C.), RONDELAUD (D.) & THERON (A.), 2007.- *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (Gastropoda: Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitology Research*, 101: 1389-1392.
- POINTIER (J.P.), ESCOUBEYROU (K.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2001.- *Drepanotrema nordestense* (Lucena, 1953) (Pulmonata: Planorbidae): a new record for the Bolivian Altiplano and its differentiation by morphology and enzymes. *Journal of Molluscan Studies*, 67: 7-16.
- POINTIER (J.P.), PARAENSE (W.L.), DEJONG (R.J.), LOKER (E.S.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA (S.), 2002.- A potential snail host of schistosomiasis in Bolivia: *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 793-796.
- PONDER (W.F.) & LINDBERG (D.R.), 1997.- Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of Linnaean Society*, 119: 83-265
- POULIN (R.), 2006.- Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132: 143-151.
- 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
- PREPELITCHI (L.), KLEIMAN (F.), PIETROKOVSKY (S.M.), MORIENA (R.A.), RACIOPPI (O.), ALVAREZ (J.) & WISNIVESKY (C.), 2003.- First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 889-891.
- PROCIV (P.), WALKER (J.C.) & WHITBY (M.), 1992.- Human ectopic fascioliasis in Australia: first case reports. *Medical Journal of Australia*, 156 (5): 349-351.
- PULS-VAN KAMP (G.M.) & JANSEN (H.B.), 1974.- Observations on fascioliasis and its intermediate host, *Lymnaea cousin*, in the Andes mountains of Ecuador. *Tijdschr Diergeneeskde (Journal)*, 99(8): 410-420.
- PUURTINEN (M.), HYTÖNEN (M.), KNOTT (K.E.), TASKINEN (J.), NISSINEN (K.) & KAITALA (V.), 2004.- The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematode parasites in a freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Evolution*, 58: 2747-2753.
- PUURTINEN (M.), KNOTT (K.E.), SUONPAA (S.), NISSINEN (K.) & KAITALA (V.), 2007.- Predominance of outcrossing in *Lymnaea stagnalis* despite low apparent fitness costs of self-fertilization. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: 901-912.
- QURESHI (A.W.), TANVEER (A.), QURESHI (S.W.), MAQBOOL (A.), GILL (T.J.) & ALI (S.A.), 2005.- Epidemiology of human fasciolosis in rural areas of Lahore, Pakistan. *Punjab University Journal of Zoology*, 20: 159-168.
- RAMACHANDRAN (J.), AJJAMPUR (S.S.R.), CHANDRAMOHAM (A.) & VARGHESE (G.M.), 2012. - Cases of human fascioliasis in India: tip of the iceberg. *Journal of Postgraduate Medicine*, 58 (2): 150-152.
- RAMIREZ-VILLAMEDIANA (J.J.) & VERGANI (F.), 1949.- Contribución al estudio del ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica* en Venezuela. *Revista Ganadera de Colombia*, 3: 817-826.

- RECALDE-REYES (D.P.), PADILLA (L.S.), GIRALDO (M.I.G.), TORO (L.J.S.), GONZALES (M.M.) & CASTAÑO (J.C.O.), 2014.- Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el Departamento de Quindío-Colombia. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 18 (4): 153-157.
- RIM (H.), FARAG (H.), SORNMANI (S.) & CROSS (J.), 1994.- Food-borne trematodes: ignored or emerging?. *Parasitology Today*, 10 (6): 207-209.
- 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 (5): 355-358.
- RISQUEZ (J.R.), 1929.- Estado actual de la parasitología en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas* (1904-1911), 25: 38-41.
- ROBERTS (E.W.), 1950.- Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snai host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 44: 187-206
- RODRÍGUEZ (A.) & GONZÁLES (H.), 1975.- Sobre un nuevo caso humano de fascioliasis hepática en Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 8: 111-114.
- ROJO (F.A.V.) & FERRE (I.P.), 1999.- Parasitosis hepática: Fasciolosis. En: Parasitología Veterinaria (M. Cordero Del Campillo, F.A. Rojo Vázquez, A.R. Martínez Fernández, M. C. Sánchez Acedo, S. Hernandez Rodriguez, I.N. Lopez-Cozar, P. Diez Baños, H. Quiroz Romero & M. Carvalho Varela edit.), McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., Madrid, Capítulo 20: 260-282.
- ROLLINSON (D.), KANE (R.A.) & LINES (J.R.L.), 1989.- An analysis of fertilization in *Bulinus cernicus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Zoology*, 217: 295-310.
- ROMBERT (P.C.) & GRÁCIO (M.A.) & TRINCA (A.T.), 1991.- Importância crescente da *Fasciolíase hepática* humana em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 4: 243-250.
- ROMBERT (P.C.) & GRÁCIO (M.A.), 1990. – Surto epidémico de *Fasciolíase hepática* humana. *O Médico*, 122: 706.
- ROMERO (R.C.), 1999.- Microbiología y Parasitología Humana (Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas). Editorial Médica Panamericana. Segunda edición, México, pp. 704-717.
- RONDELAUD (D.) & BARTHE (D.), 1978.- Arguments et propositions pour une nouvelle interpretation 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.), 1983.- Les modifications structurales du rein chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. *Annales de Parasitologie Humaine et comparée*, 582: 109-116.
- ROSANIGO (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. Buenos Aires, *Gaceta Veterinaria*, 45 (382): 739-749.
- ROSAS (H.L.), FIESTAS (C.F.), TORRES (R.M.), AITA (G.C.) & LOZADA (D.M.), 2008.- Hematoma subcapsular hepatico por fasciolosis. *Revista Chilena de Radiología*, 14 (1): 20-24.
- ROSS (J.G.) & O'HAGAN (J.), 1968.- *Lymnaea truncatula* populations studies: sampling techniques. *Journal of Medical Laboratory Technology*, 25: 112-116
- ROWCLIFE (S.A.) & OLLERENSHAW, 1960.- Observations on the bionomics of the egg *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 54 (2): 172-181.
- RUDOLPH (P.H.) & BAILEY (J.B.), 1985.- Copulation as females and use of allosperm in the freshwater snail genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 51: 267-275.

- SALAZAR (L.), ESTRADA (V.E.) & VELASQUEZ (L.), 2006.- Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology*, 114: 77-83.
- 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. *Journal of Molluscan Studies*, 66: 31-44.
- SAMPAIO-SILVA (M.L.), DA COSTA (J.M.), DA COSTA (A.M.), PIRES (M.A.), LOPES (S.A.), CASTRO (A.M.) & MONJOUR (L.), 1996.- Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54 (2): 146-148.
- SÁNCHEZ (C.), APARICIO (W.) & HURTADO (C.), 1993. – Distomiasis hepática en la población humana del sistema fluvial Asilo-Azángaro-Puno. *Libro de Resúmenes del XI Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso Peruano de Parasitología*, Lima, Perú, pp. 50.
- SANCHEZ (R.), PEREIRA (G.) & SANCHEZ (J.), 1995.- Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedero intermedio de *Fasciola hepatica* (Linneus) en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. ([www.sld.cu/](http://www.sld.cu/)- acceso 16-04-2015).
- SÁNCHEZ-SOSA (S.), ROJAS-ORTEGA (S.), REED-SAN (G.R.) & TORREZ-SANTANA (M.A.), 2000.- Fasciolosis hepatobiliar masiva. *Revista Gastroenterológica de México*, 65 (4): 179-183.
- SCORZA (J.V.), VILLEGAS (E.) & MORALES (C.), 1999.- Fascioliasis hepática en el estado Trujillo, Venezuela: un segundo caso clínico. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical*, 3: 9-13.
- SELLERS COLTON (H.), 1912.- *Lymnaea columella*, and self-fertilization. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 64: 173-183.
- SESA, 2003.- Estadísticas anuales del control epidemiológico. *Servicio Ecuatoriano de Sanidad Animal*, pp. 90.
- SIDDIQI (M.N.) & SHAH (S.A.U.), 1984.- Natural infection of helminths in liver and respiratory tract of cattle of peshawar and histology of *Paramphistomum cervi*. *Pakistan Veterinary Journal*, 4: 100-107.
- 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.
- SLINGENBERGH (J.), GILBERT (M.), DE BALOGH (K.) & WINT (W.), 2004.- Ecological sources of zoonotic diseases. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics*, 23 (2), 467-484.
- SMITH (G.), 1981.- Copulation and oviposition in *Lymnaea truncatula* (Muller). Research note. *Journal of Molluscan Studies*, 47: 108-111.
- SORRIBES (J.), AUBARY (M.J.), BARGUES (M.D.) & MAS-COMA, 1990.- Revisión de los casos humanos de fascioliasis en España entre los años 1970 y 1989. En: Congreso de Zoonosis, 1 Interautonómico, Reunión de la International Zoonoses Association (IZA), Valencia, Spain, vol. 186.
- SOTHOEUN (S.), DAVUN (H.) & COPEMAN (B.), 2006.- Abattoir study on *Fasciola gigantica* in Cambodian cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 38: 113-115.
- SOULSBY (E.J.L.), 1982.- Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, Lea & Febiger, 7<sup>th</sup> edition, Bailliere Tindall, London, 809 pp.
- STORK (M.G.), VEABLES (G.S.), JENNINGS (S.M.F.), BEESLEY (J.R.), BENDESZU (P.) & CAPRON (A.), 1973.- An investigation of endemic fascioliasis in Perú Village children. *Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 231-235.
- STOTHARD (J.R.), BREMOND (P.), ANDRIAMARO (L.), LOXTON (N.J.), SELLIN (B.) & ROLLINSON (D.), 2000.- Molecular characterization of the freshwater snail *Lymnaea natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) on Madagascar with an observation

- of an unusual polymorphism in ribosomal, small subunit genes. *Journal of Zoology*, 252: 303-315.
- STRAUSS (W.), ANGLES (R.), ESTEBAN (J.G.) & MAS-COMA (S.), 1997.- Human fascioliasis in Bolivia: serological surveys in Los Andes province of the Department of La Paz. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (2): 109-113.
- STRONG (E.E.), GARGOMINY (O.) PONDER (W.F.) & BOUCHET (P.), 2008. - Global diversity of gastropods (Gastropoda: Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 149-166.
- SUHARDONO & COPEMAN (D.B.), 2008.- Epidemiology of *Fasciola gigantica* in cattle and buffalo. In: Overcoming liver fluke as a constraint to ruminant production in South-East Asia (G.D. Gray, R.S. Copland & D.B. Copeman edit.), Australian Centre for International Agricultural Research, ACIAR, Australia, Monograph No. 133 (3): 38-54.
- SUHARDONO, ROBERTS (J.A.) & COPEMAN (D.B.), 2006.- Distribution of metacercariae of *Fasciola gigantica* on rice straw. *Tropical Animal Health and Production*, 38: 117-119.
- SUHARDONO, ROBERTS (J.A.), COPLAN (J.W.) & COPEMAN (D.B.), 1997.- Control of bovine fasciolosis in Indonesia. *Épidémiologie et Santé Animale*, pp. 31-32.
- SUKHAPESNA (V.), TANTASUVAN (D.), SARATAPAN (N.) & IMSUP (K.), 1989.- A study on the prevalence of liver fluke infection in cattle and buffaloes in Thailand. *Journal Thai Veterinary and Medicine Association*, 40:13-9.
- SUONPAA (S.), 2008.- Effects of selfand crossfertilization on parental fecundity and offspring survival in eight populations of *Lymnaea stagnalis*. Master of Science Thesis, Faculty of Mathematics Science, University of Jyväskylä, 25 pp.
- TAKEMOTO (Y.), YOKOTA (M.), YOSHIDA (H.), YAMAGAMI (S.), KOTANI (T.) & TOMIMURA (T.), 1977.- Experimental fascioliasis in monkeys: II. Studies on liver function tests and electrophoretic pattern of serum protein in monkeys infected with the "japanese species" of *Fasciola*. Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Ser. B, *Agriculture and biology*, vol. 29: 32-41.
- 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.
- TANTRAWATPAN (C.), MALEEWONG (W.), WONGKHAM (C.), WONGKHAM (S.), INTAPAN (P.M.) & NAKASHIMA (K.), 2005.- Serodiagnosis of human fascioliasis by a cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (1): 82-86.
- THOMAS (D.L.) & McCLINTOCK (J.B.), 1990.- Embryogenesis and the effects of temperature on embryonic development, juvenile growth rates, and the onset of oviposition in the fresh-water pulmonate gastropod *Physella cubensis*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 17 (1): 65-71.
- TONGSON (M.S.), 1978 National fascioliasis control program for the Philippines (of far animals). Conference: Annual Convention of the Veterinary Practitioners Association of the Philippines. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, pp. 22-23.
- TOURATIER (L.), 1988. – Note sur la place du Nitroxylnil dans la lute intégrée contre la fasciolose bovine à *Fasciola gigantica* à Madagascar. *Revue D'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 41: 181-189.
- TRAN (V.H.), TRAN (T.K.), NQUYE (H.C.), PHAM (H.D.) & PHAM (T.H.), 2001. - Fascioliasis in Vietnam. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2: 48-50.

- TROPMEDTE CHNICAL GROUP, 1986. – Snails of medical importance in Southeast Asia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 17: 282-322.
- TROUVE (S.), DEGEN (L.) & GOUDET (J.), 2005.- Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 358–370.
- TROUVE (S.), DEGEN (L.), RENAU (F.) & GOUDET (J.), 2003.- Evolutionary implications of a high selfing rate in the freshwater snail *Lymnaea truncatula*. *Evolution*, 57: 2303–2314.
- TRUEBA (G.), GUERRERO (T.), FORNASINI (M.), CASARIEGO (I.) ZAPATA (S.), ONTANEDA (S.) & VASCO (L.), 2000.- Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in the ecuadorian Andes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62 (4): 518.
- TURRIENTES (M.C.), SAENZ de SANTA MARIA (A.), CEBALLOS (E.), DIAZ (M.), BARENO (M.), MURO (A.), PARDO (J.) & LOPEZ-VELEZ (R.), 2004.- Fasciolosis importada y autóctona. *Enfermedades Emergentes*, 6 (119): 188.
- UBEIRA (F.M.), MUIÑO (L.), VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ-CRESPO (I.), MEZO (M.), GONZALEZ-WARLETA (M.), ROMARIS (F.), PANIAGUA (E.), CORTIZO (S.), LLOVO (J.) & MAS-COMA (S.), 2009.- MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81 (1): 156-162.
- UENO (H.) & YOSHIHARA (S.), 1974.- Vertical distribution of *Fasciola gigantica* metacercariae in stems of rice plant grown in a water pot. *National Institute of Animal Health Quarterly*, 14: 54-60.
- 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.
- URIBE (N.G.) & GARCÍA (C.H.C.), 2013.- Fasciolosis, zoonosis emergente y reemergente vista desde una dimensión ambiental (Revisión). Academia Biomédica digital ([www.vitae.ucv.ve/](http://www.vitae.ucv.ve/)- acceso 07-4-2015).
- 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 Parasitologica*, 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. *Veterinary Parasitology*, 102 (1-2): 85-100.
- 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.), 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.), 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.), MARCOS (M.D.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 1998a.- *Fasciola hepatica* development experimentally infected black rat, *Rattus rattus*. *Parasitology Research*, 84: 188-194.

- VALERO (M.A.), MARTI (R.), MARCOS (M.D.), ROBLES (F.) & MAS-COMA (S.), 1998.- Le mollusque *Lymnaea truncatula* (Lymnaeidae) dans les rizières de l'Est de l'Espagne. *Vie et Milieu*, 48 (1): 73-78.
- 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). VIth European Multicolloquium of Parasitology, September 7-11, Netherlands Congress Centre, The Hague, the Netherlands: 221 pp.
- 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.), 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.), 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.), PANOVA (M.), COMES (A.M.), FONS (R.) & MAS-COMA (S.), 2002.- Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *Journal of Parasitology*, 88 (2): 308-313.
- VALERO (M.A.), PANOVA (M.), MAS-COMA (S.), CONTRERAS DEL RINCON (M.) & FONS (R.), 2003.- La teoría del caos y la Fascioliasis. *Revista Internacional de Sistemas*, Valencia, 13: 79-88.
- VALERO (M.A.), PANOVA (M.), PEREZ-CRESPO (I.), KHOUBBANE (M.) & MAS-COMA (S.), 2011.- Correlation between egg-shedding and uterus development in *Fasciola hepatica* human and animal isolates: Applied implications. *Veterinary Parasitology*, 183: 79-86.
- VALERO (M.A.), PEREZ-CRESPO (I.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), PANOVA (M.), ORTIZ (P.), MACO (V.), ESPINOZA (J.R.) & MAS-COMA (S.), 2012.- *Fasciola hepatica* phenotypic characterisation in Andean human endemic areas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 403-410.
- 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.
- VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ-CRESPO (I.), ANGLES (R.), VILLEGAS (F.), AGUIRRE (C.), STRAUSS (W.), ESPINOZA (J.R.), HERRERA (P.), TERASHIMA (A.), TAMAYO (H.), ENGELS (D.), GABRIELLI (A.F.) & MAS-COMA (S.), 2012.- Field evaluation of a coproantigen detection test for fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of Andean countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (9): e1812 (11 pp.).
- VALERO (M.A.), PERIAGO (M.V.), PEREZ-CRESPO (I.), RODRIGUEZ (E.), PERTEGUER (M.J.), GARATE (T.), GONZALEZ-BARBERA (E.M.) & MAS-COMA (S.), 2012.- Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of human fascioliasis in different epidemiological situations. *Tropical Medicine and International Health*, 17 (5): 630-636.
- 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.), UBEIRA (F.M.), KHOUBBANE (M.), ARTIGAS (P.), MUIÑO (L.), MEZO (M.), PEREZ-CRESPO (I.), PERIAGO (M.V.) & MAS-COMA (S.), 2009.- MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in



- sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 159 (1): 77-81.
- VALERO (M.A.), VAREA (M.T.) & MARIN (R.), 2000.- *Fasciola hepatica*: lithogenic capacity in experimentally infested rats and chemical determination of the main stone components. *Parasitology Research*, 86: 558-562.
- VAREILLE-MOREL (C.), RONDELAUD (D.) & DREYFUSS (G.), 2002.- Experimental colonization of new habitats by *Galba truncatula* O.F. Muller (Gastropoda: Lymnaeidae) in central France and their susceptibility to experimental infection with the trematode *Fasciola hepatica* L. *International Journal of Limnology*, 38: 35-40.
- VAZQUEZ-ELIOZONDO (G.), ZAVALA-GARCIA (C.), ELIZONDO (J.) & LIZARDI-CERVERA (J.), 2007.- Infestación por *Fasciola hepatica* en la vía biliar, México, *Médica Sur*, 14: 26-30.
- VELASQUEZ (L.E.), 2006.- Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseau, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (7): 795-799.
- VENTURINI (L.M.) & VALENZUELA (M.L.), 1985a.- Infección experimental de ovinos con *Fasciola hepatica*. *Revista Médica Veterinaria*, 66: 196-198.
- VERGANI (F.), 1911.- Datos experimentales sobre el caracol *Lymnaea (Galba) cubensis*. *Revista Veterinaria de Venezuela* 1957, 52: 193-210.
- VERLE (P.), KONGS (A.), DE (N.V.), THIEU (N.Q.), DEPRAETERE (K.), KIM (H.T.) & DORMY (P.), 2003.- Prevalence of intestinal parasitic infections in northern Vietnam. *Tropical Medicine and International Health*, 8 (10): 961-964.
- VIARD (F.), BREMOND (P.), LABBO (R.), JUSTY (F.), DELAY (B.) & JARNE (P.), 1996.- Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics*, 142: 1237-1247.
- VIARD (F.), DOUMS (C.) & JARNE (P.), 1997.- Selfing, sexual polymorphism and microsatellites in the hermaphroditic freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 264: 39-44.
- VIARD (F.), JUSTY (F.) & JARNE (P.), 1997.- Population dynamics inferred from temporal variation at microsatellite loci in the selfing snail *Bulinus truncatus*. *Genetics*, 146: 973-982.
- VIBOOLYAVATANA (J.), SUMETHANURUGKUL (P.) & CHEARANAI (S.), 1981.- Studies in distribution of snail intermediate hosts of parasitic infections in Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 12 (2): 200-203.
- VILLATORO (L.L.G.), 2008.- Diagnóstico de *Fasciola hepatica* y las pérdidas económicas que ocasiona en bovinos que se faenan en el rastro Anisa de Villa Nueva. Tesis de Grado Académico Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 43 pp.
- VILLAVICENCIO (A.) & CARVALHO DE VASCONCELLOS (M.), 2005.- First report of *Lymnaea cousini* Jousseau, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (7): 735-737.
- VILLEGAS (F.), ANGLES (R.), BARRIENTOS (R.), BARRIOS (G.), VALERO (M.A.), HAMED (K.), GRUENINGR (H.), AULT (S.K.), MONTRESOR (A.), ENGELS (D.), MAS-COMA (S.) & GABRIELLI (A.F.), 2012.- Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (8): e1720 (7 pp.).
- WANG (D.Y.), ZHANG (W.Y.) & HUANG (W.Y.), 2006.- Epidemiological investigation of fascioliasis in cattle and buffaloes in Guangxi. *Guangxi Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 22: 200-202.

- WILCHES (C.), JARAMILLO (J.G.), MUÑOZ (D.L.), ROBLEDO (S.M.) & VELEZ (I.D.), 2009.- Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes del Valle de San Nicolás, Oriente Antioqueño. *Asociación Colombiana de Infectología*, 13 (2): 92-99.
- 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
- WOODRUFF (D.) & UPATHAM (E.S.), 1992.- Snail-transmitted diseases of medical and veterinary importance in Thailand and the Mekong Valley. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 4: 1-12.
- WOOLHOUSE (M.E.J.) & CHANDIWANA (S.K.), 1989.- Spatial and temporal heterogeneity in the population dynamics of *Bulinus globosus* and *Biomphalaria pfeifferi* and in the epidemiology of their infection with schistosomes. *Parasitology* 98: 21-34.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995.- Foodborne trematode infections. Bulletin World Health Organization, 73 (3): 397-399, 403-405.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006.- Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. Who headquarters, Geneva, Switzerland 17-18 october 2006, WHO, Printed in 2007, 33 pp.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009.- Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and taeniasis/ cysticercosis. Geneva, Switzerland. Printed in 2011, 3: 59.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. – The control of neglected zoonotic diseases. Community-based interventions for prevention and control. Geneva, Switzerland, 20: 31.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012. - *Fasciola* spp. In: Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites, Annex 7. Specific information for the ranked parasites, Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting, 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy, publication 2014, 7: 104-107.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013.- Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases. France, pp 139.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. - South-east Asia journal of public health. Regional office for south-east Asia (S. Ramsay Chief edit.), New Delhi, India, 3 (1): 1-122 ([www.searo.who.int/publications/journals/sejph](http://www.searo.who.int/publications/journals/sejph))
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015.- Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 211 pp. ([www.who.int/](http://www.who.int/)- acceso 03-4-2015).
- XIANG (C.B.), ZHANG (Q.S.), ZHANG (D.B.) & DU (L.), 2003.- Survey of human infection with *Fasciola* and *Fasciolopsis* in China. *Occupation and Health* 19 (11):90.
- XU (L.Q.), YU (S.M.) & XU (S.M.), 2000.- Distribution and pathogenic impact of human parasites in China, Beijing, People's Medical Publishing House, Beijing, China, 928 pp.
- YANG (G.J.), LUI (L.), ZHU (H.R.), GRIFFITHS (S.M.), TANNER (M.), BERGQUIST (R.), UTZINGER (J.) & ZHOU (X.N.), 2014.- China's sustained drive to eliminate neglected tropical diseases. *The Lancet Infectious Disease* 14: 881-892.
- YILMA (J.M.) & GÖDEKMERDAN, 2004.- Human fasciolosis in Van Province, Turkey. *Acta Tropica*, 92 (2): 161-162.
- YILMA (J.M.) & MALONE (J.B.), 1998.- A geographic information system forecast model for strategic control of fascioliasis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 78: 103-127.
- YOSHIHARA (S.) & UENO (H.), 2004. - Ingestion of *Fasciola gigantica* metacercariae by the intermediate host snail, *Lymnaea ollula*, and infectivity of discharged metacercariae. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35 (3): 535-539.

- ZHI-QIANG (Z.), 2011.- Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. In: Zootaxa (Z-Q. Zhang edit.), Magnolia Press, New Zealand, 3148: 7-12 (<http://www.mapress/zootaxa/>).
- ZOU (J.), GU (W.), JIAO (J.M.), DU (Q.R.), HE (L.F.) & ZHANG (P.), 2012.- First outbreak of *Fasciola gigantica* infection in Yunnan Province: a clinical analysis of 10 cases. *World Chinese Journal of Digestology*, 20 (21): 1978-1981.
- ZUMAQUERO-RIOS (J.L.), SARRACENT-PEREZ (J.), ROJAS-GARCIA (R.), ROJAS-RIVERO (L.), MARTINEZ-TOVILLA (Y.), VALERO (M.A.) & MAS-COMA (S.), 2013.- Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren in Atlixco, Puebla State, Mexico: Epidemiology and treatment with nitazoxanide. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (11): e2553 (16 pp.).



**ANEXOS**  
**PUBLICACIONES**



# *Lymnaea schirazensis*, an Overlooked Snail Distorting Fascioliasis Data: Genotype, Phenotype, Ecology, Worldwide Spread, Susceptibility, Applicability

María Dolores Bargues<sup>1\*</sup>, Patricio Artigas<sup>1</sup>, Messaoud Khoubbane<sup>1</sup>, Rosmary Flores<sup>1</sup>, Peter Glöer<sup>2</sup>, Raúl Rojas-García<sup>3</sup>, Keyhan Ashrafi<sup>4</sup>, Gerhard Falkner<sup>5,6</sup>, Santiago Mas-Coma<sup>1</sup>

**1** Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain, **2** Münchner Malakologische Mitteilungen Helda, Friedrich-Held Gesellschaft, Hetlingen, Germany, **3** Laboratorio de Biología de Parásitos y Vectores, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **4** Department of Medical Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Gilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran, **5** Staatliches Museum für Naturkunde Stuttgart, Stuttgart, Germany, **6** Département Systématique et Evolution, UMS "Taxonomie et Collections", Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

## Abstract

**Background:** Lymnaeid snails transmit medical and veterinary important trematodiasis, mainly fascioliasis. Vector specificity of fasciolid parasites defines disease distribution and characteristics. Different lymnaeid species appear linked to different transmission and epidemiological patterns. Pronounced susceptibility differences to absolute resistance have been described among lymnaeid populations. When assessing disease characteristics in different endemic areas, unexpected results were obtained in studies on lymnaeid susceptibility to *Fasciola*. We undertook studies to understand this disease transmission heterogeneity.

**Methodology/Principal Findings:** A ten-year study in Iran, Egypt, Spain, the Dominican Republic, Mexico, Venezuela, Ecuador and Peru, demonstrated that such heterogeneity is not due to susceptibility differences, but to a hitherto overlooked cryptic species, *Lymnaea schirazensis*, confused with the main vector *Galba truncatula* and/or other *Galba/Fossaria* vectors. Nuclear rDNA and mtDNA sequences and phylogenetic reconstruction highlighted an old evolutionary divergence from other *Galba/Fossaria* species, and a low intraspecific variability suggesting a recent spread from one geographical source. Morphometry, anatomy and egg cluster analyses allowed for phenotypic differentiation. Selfing, egg laying, and habitat characteristics indicated a migration capacity by passive transport. Studies showed that it is not a vector species (n = 8572 field collected, 20 populations): snail finding and penetration by *F. hepatica* miracidium occur but never lead to cercarial production (n = 338 experimentally infected).

**Conclusions/Significance:** This species has been distorting fasciolid specificity/susceptibility and fascioliasis geographical distribution data. Hence, a large body of literature on *G. truncatula* should be revised. Its existence has henceforth to be considered in research. Genetic data on livestock, archeology and history along the 10,000-year post-domestication period explain its wide spread from the Neolithic Fertile Crescent. It is an efficient biomarker for the follow-up of livestock movements, a crucial aspect in fascioliasis emergence. It offers an outstanding laboratory model for genetic studies on susceptibility/resistance in *F. hepatica*/lymnaeid interaction, a field of applied research with disease control perspectives.

**Citation:** Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M, Flores R, Glöer P, et al. (2011) *Lymnaea schirazensis*, an Overlooked Snail Distorting Fascioliasis Data: Genotype, Phenotype, Ecology, Worldwide Spread, Susceptibility, Applicability. PLoS ONE 6(9): e24567. doi:10.1371/journal.pone.0024567

**Editor:** Erika Martins Braga, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

**Received:** February 24, 2011; **Accepted:** August 14, 2011; **Published:** September 29, 2011

**Copyright:** © 2011 Bargues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Studies were funded by Projects No. PM97-0099, No. BOS2000-0570-C02-02, No. BOS2002-01978, No. SAF2006-09278 and No. SAF2010-20805 of the Ministry of Education and Ministry of Science and Innovation, Madrid; Project No. 3006/99 of the Dirección General de Cooperación al Desarrollo, Generalitat Valenciana, Valencia; Project No. PI030545 of the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Ministry of Health, Madrid; and by the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (Projects No. C03/04, No. ISCIII2005-PI050574 and No. ISCIII-RETIC RD06/0021/0017 of the Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa RETICS/FEDER), FIS, Ministry of Health, Madrid, Spain. Joint coordination activities with Mexico, Venezuela and Peru were carried out within the frame of Project No. RLA5049 of the International Atomic Energy Agency (IAEA) (Animal Production and Health Section, Joint Food and Agriculture Organization/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, IAEA Headquarters Vienna, Austria). Part of this work was made possible thanks to a personal fellowship granted to PA by the Agencia Española de Cooperación Internacional, Ministry of Foreign Affairs, Madrid, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the funding and supporting agencies.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: M.D.Bargues@uv.es

## Introduction

Freshwater snails of the family Lymnaeidae (Gastropoda) act as intermediate hosts or vectors of numerous digenetic trematode species. Many lymnaeid species are of applied interest as they transmit several trematode species of large-scale medical and

veterinary impact, among which fasciolids are the most important [1]. *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* are two large-sized fasciolid trematode parasite species that cause fascioliasis, a disease which affects humans and livestock species almost everywhere [2]. This highly pathogenic liver parasitosis has been emerging in many countries of Latin America, Europe, Africa and Asia in the last two

decades [2,3]. This emergence phenomenon has partly been related to climate change [4,5], given the high dependence of both lymnaeid snails and fasciolid larval stages on climatic and environmental characteristics [6–8].

Although livestock species play an important reservoir role, transmission studies have shown that the metacercarial infective stage from different origins, such as sheep, cattle, pig and donkey, represent similar infectivity sources [9,10]. On the contrary, the specificity of fasciolid species regarding concrete lymnaeid species [1] represent a crucial factor in establishing the geographical distribution of the disease in both animals and humans. Moreover, disease prevalences and intensities also depend on the ecological characteristics (population dynamics, anthropophylic characteristics, type of water bodies, etc.) of the different lymnaeid vector species. That is why different lymnaeid species appear linked to the different transmission patterns and epidemiological scenarios of this very heterogeneous disease in humans [11,12]. The continental differences in lymnaeid faunas also explain that in the Americas fascioliasis is only caused by *F. hepatica*, owing to the absence of lymnaeids of the genus *Radix* which act as transmitters of *F. gigantica* [1]. Likewise, as in other vector-borne diseases, this relationship supports the use of lymnaeids as biomarkers of the disease at both local and large scales and can thus be useful for the validation of mathematical modelling and remote sensing–geographical information system (RS-GIS) tools for the control of the disease [8,13].

Despite the applied interest of lymnaeid snails, the present knowledge on the genetics of this gastropod group as well as on their parasite-host interrelationships is far from being sufficient. A good example of this situation is the systematic-taxonomic confusion in which this molluscan family has been immersed [1]. At lymnaeid species level, the problems are found mainly due to the interspecific morphological and anatomic uniformity numerous species present, usually resulting in serious difficulties in specimen classification, sometimes even impeding it [14–16]. Moreover, intraspecific variation of shell shape is particularly well marked within lymnaeids depending on environmental conditions [17,18], although a genetic component in shell shape has been shown at least in some lymnaeid populations [19]. Thus, there are many specimen classification problems, mainly related to: (i) species of the “stagnicoline” group in Europe and North America [14,20]; (ii) the “radix” group in Europe and Asia [20]; (iii) the “fossarine” or “*Galba/Fossaria*” group in the Americas [15] (*Fossaria* is a synonym of *Galba* [21]; terms “fossarine” or “*Galba/Fossaria*” group here used only in the meaning frequently found in American malacological literature of the last century).

At snail host level, trematodes show a marked specificity, from usually oioxenous (one digenean species/one snail species) or stenoxenous (one digenean species/a few, closely related snail species, i.e. those belonging to the same genus) to less frequently oligoxenous (one digenean species/numerous, family-, subfamily- or tribe-related snail species) [22–24]. Variability in the susceptibility of a concrete snail species to infection by a concrete digenean species has shown to be related to differences between snail populations and also between individuals among a concrete snail population [24,25]. Differences in compatibility between a trematode species and different geographical populations of the same snail host species are known, including *Fasciola* [26,27]. Among lymnaeids, pronounced differences in susceptibility have been highlighted among snail populations encountered in close proximity [28,29], and some snail populations have been mentioned to even show a total lack of susceptibility or resistance [29–31].

However, the aforementioned different susceptibility phenomena in lymnaeids have to be considered with great caution. Many

of these lymnaeid species involved in fascioliasis transmission maintain a confusing systematic-taxonomic status. When comparing different lymnaeid DNA sequences, several populations originally classified as belonging to different species showed identical DNA marker sequences, and other populations originally classified as pertaining to the same species presented different DNA marker sequences. Sometimes sequence differences were very few, suggesting intraspecific variability (different haplotypes). However, occasionally differences detected among populations classified as pertaining to the same species were numerous, sufficient as to consider different species involved. Moreover, the number of sequence differences between species sometimes appeared lower than that between populations of the same species [1,14,16]. This clearly underlines both the classification problems and the systematic-taxonomic confusion present in Lymnaeidae. Consequently, several susceptibility differences described could in fact be related to different lymnaeid species instead of different populations of the same lymnaeid species.

The crucial implications of lymnaeid vectors for fascioliasis transmission, epidemiology and control demonstrate the importance of developing new tools to facilitate specimen classification, genetic characterisation of natural populations and laboratory strains, and to elucidate the systematics and taxonomy of Lymnaeidae. The failure of all malacological and non-malacological tools applied to date suggests the analysis of DNA sequences and phylogenetic methods to be worthwhile. The first attempt made by a research collaboration of parasitologists, molecularists and malacologists was successful [1]. This success, together with the rapid realisation that locally restricted studies were insufficient because of the very large geographical distribution and spreading capacities of many lymnaeids belonging to very confusing lymnaeid groups, suggested early on that large, transboundary studies would be needed. In this sense, a worldwide lymnaeid molecular characterisation initiative was instigated [12,16]. The great spreading capacity of lymnaeids means that sometimes not even the continental scale is sufficient, and intercontinental sequence comparisons are needed to classify specimens correctly. As an example: the sympatric *Lymnaea viatrix* and *L. cubensis*, which were noted to be involved in the human fascioliasis high hyperendemic area of the Bolivian Altiplano [32], later proved to only involve morphologically variable *Galba truncatula* of European origin [33–35]. The intercontinental spreading of lymnaeids and its role in fascioliasis dissemination is well known [2,27,36].

Of the different DNA markers used hitherto in lymnaeids, the 18S gene of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) appears to be too conserved and its few variable positions may only be useful at generic and suprageneric taxon levels [15,16,33,37]. Ribosomal DNA ITS-2 and secondarily ITS-1 are the most useful sequences for studies at species level [1,14,15,35,38,39,40]. These two spacers are useful for: (i) classification of lymnaeid specimens, (ii) characterisation of lymnaeid intraspecific genetic interpopulational variability to furnish the genetic base on which to understand fasciolid-lymnaeid specificity, different susceptibilities or compatibilities of geographical strains or even resistances, (iii) establishment of valid species and their geographical distributions, and (iv) assessment of species interrelationships to arrange a natural systematic-taxonomic classification, which will allow for an analysis of coevolution with fasciolids [12,16]. Interestingly, one mutation at the level of the ITS-1 and another at ITS-2 have proved useful to distinguish between resistant and susceptible populations of *P. columella* in Cuba [41], although nothing evidently suggests that these mutations are linked to resistance/susceptibility.



Within mitochondrial DNA (mtDNA), only fragments of 16S and *cox1* have been sequenced in lymnaeids [15,40,42–44]. Recent knowledge indicates that mtDNA markers, including both mitochondrial genes and the ribosomal 12S and 16S genes within the mitochondrial genome, should be used with great caution when dealing with lymnaeid species belonging to different genera and even those well-separated within the same genus [45]. Of particular concern is the saturation of nucleotide positions. Additionally, it has also been documented that incomplete gene sequences do not necessarily contain a sufficiently significant portion of the whole gene, i.e. parts of the gene presenting evolutionary hot spots may be missed [46]. Consequently, the use of mtDNA markers for this initiative is restricted to (i) sequence comparisons and phylogenetic analyses of only closely related species within the same genus, (ii) studies of intraspecific variability of species by sequence comparisons of individuals and populations, (iii) genetic characterisation of laboratory strains, (iv) studies on the spread of populations of a species, and (v) studies on genetic exchange between different neighboring populations [12].

The present paper summarises results obtained in analyses of lymnaeid specimens of given populations originally ascribed to the main fascioliasis vector species *G. truncatula* in Europe, Asia, and Africa, and/or also to similar lymnaeid vector species belonging to the *Galba/Fossaria* group in North America, the Caribbean and South America. Such analyses were performed after obtaining unexpected results in experimental studies about lymnaeid susceptibility to *Fasciola* infection when assessing disease transmission characteristics in human hypo- to hyperendemic fascioliasis areas in the different continents. Multidisciplinary studies carried out to understand experimentally-tested, abnormal fasciolid susceptibility of these widely spread lymnaeid *G. truncatula*-like populations have taken more than 10 years. Characterisation studies have been made by nuclear rDNA and mtDNA sequences, phylogenetic tree reconstruction, phenotypic differentiation by shell morphometry, morphoanatomical characterisation, fecundation studies, ecological observations, and assessment of the geographical spread in correlation with historical events. These results demonstrate that another lymnaeid species, *Lymnaea* (*s. l.*) *schirazensis*, genetically distant but phenotypically very close, has always been confused with *G. truncatula* and/or other similar lymnaeid vector species in all these continents. The implications for fascioliasis are discussed, as this hitherto overlooked species has been distorting results of fasciolid specificity/susceptibility analyses as well as the geographical distribution of the disease. The existence of this *G. truncatula*-like lymnaeid species frequently present in animal fascioliasis endemic areas and usual in human fascioliasis endemic areas ought to be henceforth considered to avoid misunderstandings concerning transmission. Moreover, results indicate that *L. schirazensis* can be used as a useful biomarker of foreign livestock introduction, a crucial aspect in fascioliasis spreading and emergence [12]. Additionally, *L. schirazensis* offers an outstanding new laboratory model for studies on genomics and proteomics about susceptibility/resistance in *F. hepatica*/lymnaeid interaction, an important field of applied research with disease control perspectives.

## Materials and Methods

### Lymnaeid snail material

The snail specimens studied ( $n = 8572$  specimens) were collected in the field along a ten-year period, from 20 lymnaeid populations present in geographical areas with human and/or animal fascioliasis endemicity of eight countries (Figure 1):

- Iran: 1) Taleb Abad river, Bandar Anzali, Gilan province (37°27'46" N; 49°37'07" E; –23 m below sea level-b.s.l.): 243 living specimens collected and analysed to assess potential natural infection by *Fasciola* through cercarial shedding verification; 2) garden of the Medicine Faculty, Rasht, Gilan province (37°11'39" N; 49°38'04" E; 26 m above sea level-a.s.l.): 81.
- Egypt: 3) El Kazza, Hosh Esa district, Behera governorate (30°50'54" N; 30°16'16" E; 1 m a.s.l.): 1956; 4) Tiba, Delengate district, Behera governorate (30°50'34" N; 30°29'11" E; 4 m a.s.l.): 887; 5) Boulin El Aly, Kafr El Dawar district, Behera governorate (31°10'42" N; 30°10'54" E; 0 m a.s.l.): 369.
- Spain: 6) Albufera of Valencia, Valencia province (39°17'42" N; 0°20'41" W; –1 m b.s.l.): 1291; 7) Nules-Moncofar, Castellon province (39°50'01" N; 0°06'28" W; 34 m a.s.l.): 2077.
- the Dominican Republic: 8) Constanza, Departamento de La Vega (18°54'25" N; 70°44'25" W; 1,184 m a.s.l.): 265; 9) Río Grande, Constanza, Departamento de La Vega (18°52'37" N; 70°43'38" W; 1,182 m a.s.l.): 32.
- Mexico: 10) Los Molinos, subcuenca Nexapa, Atlixco, Puebla (18°56'57" N; 98°23'25" W; 1,952 m a.s.l.): 149; 11) Escuela A. Obrego, La Trinidad Tepango, Atlixco, Puebla (18°51'46" N; 98°26'33" W; 1,774 m a.s.l.): 213; 12) Xalpatlaco, Atlixco, Puebla (18°55'58" N; 98°26'22" W; 1,903 m a.s.l.): 56; 13) Jiutepec, Morelos, Huauchinango (18°53'01" N; 99°11'12" W; 1,377 m a.s.l.): 31.
- Venezuela: 14) Laguna de Fe y Alegría, El Valle, Estado de Merida (8°37'29" N; 71°08'30" W; 1,837 m a.s.l.): 38; 15) Hotel Valle Grande, El Valle, Estado de Merida (8°40'28" N; 71°06'03" W; 2,174 m a.s.l.): 114.
- Ecuador: 16) Guarandauc, Chilligallo (0°17'48" S; 78°38'55" W; 3,158 m a.s.l.): 75; 17) La Buena Esperanza, Cayambe (0°03'39" N; 78°08'25" W; 2,821 m a.s.l.): 283; 18) Machachi, Santo Domingo (0°27'23" S; 78°33'43" W; 2,810 m a.s.l.): 317.
- Peru: 19) Baños del Inca, Cajamarca (07°12'54" N; 78°26'08" W; 2,611 m a.s.l.): 72; 20) Rio Lurin, Lima (12°12'28" S; 76°52'00" W; 154 m a.s.l.): 23.

Lymnaeid materials of the species *G. truncatula* from Albufera of Valencia, Spain, and Qued Tiout, Essaouira, Marrakesh, Morocco were used for comparative analyses.

### Snail laboratory cultures

Lymnaeids were transported under isothermal conditions to the laboratory of Valencia. The possible natural infection by fasciolids was always individually verified prior to the launch of laboratory cultures. This was performed by keeping each lymnaeid specimen isolated in a Petri dish containing a small amount of natural water. After 24 h, the presence or absence of motionless metacercarial cysts or moving cercariae was verified in each Petri dish. A few non-infected specimens from each population were used for species classification of each population by means of DNA sequencing processes.

Afterwards, non-infected lymnaeids were arranged in standard breeding boxers containing 2000 ml fresh water according to lymnaeid species classification, to assure pure specific cultures. Finally, snails were adapted to and maintained under experimentally controlled conditions of 20° C, 90% relative humidity and a 12 h/12 h light/darkness photoperiod in precision climatic chambers (Heraeus-Vötsch VB-0714 and HPS-500). The water was changed weekly and lettuce added *ad libitum*.



**Figure 1. Maps of the Old and New Worlds showing localities where *Lymnaea schirazensis* was collected: A) Old World: 1 = Taleb Abad river, Bandar Anzali, Gilan province, Iran; 2 = Medicine Faculty, Rasht, Gilan province, Iran; 3 = El Kazza, Hosh Esa district, Behera governorate, Egypt; 4 = Tiba, Delengate district, Behera governorate, Egypt; 5 = Boulin El Aly, Kafr El Dawar district, Behera governorate, Egypt; 6 = Albufera of Valencia, Valencia province, Spain; 7 = Nules-Moncofar, Castellon province, Spain; B) New World: 8 = Constanza, Departamento de La Vega, the Dominican Republic; 9 = Río Grande, Constanza, Departamento de La Vega, the Dominican Republic; 10 = Los Molinos, subcuenca Nexapa, Atlixco, Puebla, Mexico; 11 = Escuela A. Obrego, La Trinidad Tepango, Atlixco, Puebla, Mexico; 12 = Xalpatlaco, Atlixco, Puebla, Mexico; 13 = Jiutepec, Morelos, Huauchinango, Mexico; 14 = Laguna de Fe y Alegria, El Valle, Estado de Merida, Venezuela; 15 = Hotel Valle Grande, El Valle, Estado de Merida, Venezuela; 16 = Guarandauco, Chilligallo, Ecuador; 17 = La Buena Esperanza, Cayambe, Ecuador; 18 = Machachi, Santo Domingo, Ecuador; 19 = Baños del Inca, Cajamarca, Peru; 20 = Río Lurin, Lima, Peru. For a higher resolution situation of each locality, see respective coordinates in text. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g001**

## Voucher specimens and taxonomic nomenclature aspects

Voucher specimens of *L. schirazensis*, both experimentally raised and molecularly classified as well as from molecularly classified populations collected in the field, have been deposited in the Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Spain, and the Staatliche Naturhistorische Sammlungen Dresden, Museum für Tierkunde, Dresden, Germany. Other field-collected specimens are kept at Laboratorio de Biología de Parásitos y Vectores, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

The list of species (and subspecies) of molluscs and trematode parasites included in this study, according to the zoological nomenclature, is included in Table S1. The generic name *Lymnaea* is used here throughout in the broad taxonomic meaning (*sensu lato* = *s. l.*).

## Molecular techniques

**DNA extraction.** DNA was extracted from more than one specimen of a given population when this was deemed necessary for sequence verification. Only snails that appeared free of helminth infection were used in the molecular analyses. To reduce the risk of contamination of DNA from helminths further (which are more likely to be localized in other tissues), DNA was only isolated from the foot of each snail. Use of just the feet, rather than all the soft tissues, also prevented the development in the DNA pellets of the white flocculate substance (probably of polysaccharides) and melanin pigments that can inhibit Polymerase Chain Reaction (PCR) and cause amplification of non-specific products [15,34].

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 hr at 55° C with alternate shaking each 15 min. Steps of the procedure were performed according to methods outlined previously [1,15,33]. Total DNA was isolated according to the phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation method [47]. Each pellet was dried and resuspended in 30 µl sterile TE buffer (pH 8.0). This suspension was stored at -20° C until use.

**DNA sequence amplification.** DNA sequences were amplified by PCR using 4–6 µl of genomic DNA for each 50 µl PCR reaction, according to methods outlined previously [1,15,33,35]. Each one of the five DNA markers were PCR amplified independently for each lymnaeid specimen and each PCR product was sequenced for a bona-fide haplotype characterization. A set of 8 conserved oligonucleotide primers was used for the amplification of five superimposed fragments of the 18S ribosomal RNA gene using specific primers and a standard protocol [15,34] to amplify specific 18S rDNA regions. Ribosomal DNA spacers ITS-2 and ITS-1 were amplified using primers designed in conserved positions of 5.8S and 28S rRNA genes and 18S and 5.8S rRNA genes of several eukaryote Metazoa species, respectively [1,15,39]. The target 16S gene region was amplified by PCR using a set of universal primers [48]. Amplification procedures and thermal cycler conditions were carried out as previously described for lymnaeids [42]. A *cox1* gene fragment was amplified using universal primers [49]. Amplifications were generated in a Mastercycle epgradient (Eppendorf, Hamburg, Germany), by 30 cycles of 30 sec at 94° C, 30 sec at 50° C and 1 min at 72° C, preceded by 30 sec at 94° C and followed by 7 min at 72° C for ITS-2 and ITS-1, and by 40 cycles of 30 sec at 90° C, 1 min at 48° C and 1 min at 72° C, preceded by 2.5 min at 94° C and followed by 10 min at 72° C for *cox1*. Ten µl

of each PCR product was checked by staining with ethidium bromide on 1% Nusieve® GTG agarose (FMC) gel electrophoresis, using Molecular Weight Marker VI (Boehringer Mannheim) at 0.1 µg DNA/µl as control.

**Purification and quantification of PCR products.** Primers and nucleotides were removed from PCR products by purification with Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol and resuspended in 50 µl of 10 mM TE buffer (pH 7.6). The final DNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 and 280 nm.

**DNA sequencing.** The sequencing of the entire 18S rRNA gene, the complete rDNA ITS-2 and ITS-1, and the fragments of the mtDNA 16S and *cox1* genes was performed on both strands by the dideoxy chain-termination method [50]. It was carried out with the Taq dye-terminator chemistry kit for ABI 373A and ABI 3700 capillary system (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), using PCR primers.

## DNA haplotype nomenclature

The codes for the sequences obtained follow the standard nomenclature previously proposed for lymnaeid snails [12,16,39]. Note that haplotype codes are only definitive in the case of complete sequences. When dealing with fragments or incomplete sequences, haplotype codes are provisional.

## Software programs

**Sequence alignments.** Sequences were aligned using CLUSTAL-W version 1.8 [51] and MEGA 4.0 [52], and assembly was made employing Staden Package [53]. 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 website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Genetic distances were measured using parameters provided by PAUP v.4.0 b10 [54].

**Sequence comparisons.** The following sequences from GenBank-EMBL were used for comparative analyses (in the following, names of taxa according to articles in which sequences were described; see Table S1 for systematic-taxonomic notes):

- 18S rRNA gene: complete sequences of *Lymnaea* (*Lymnaea*) *stagnalis* (GenBank Accession Number Z73984), *Lymnaea* (*Stagnicola*) *palustris* (Z73983), *Omphiscola glabra* (Z73982), and *Galba truncatula* (Z73985) [33]; *L. cubensis* (Z83831) [15,34], *L. viatrix* and *L. neotropica* (both species with the same sequence AM412222) [15], and *L. humilis* (FN182190) [45], all four from respective type localities; *L. cousini* and *L. meridensis* (both species with the same sequence FN598151), and *Pseudosuccinea columella* (FN598152) [55]; *Radix auricularia* (Z73980) and *R. balthica* (Z73981) [33]. Other incomplete sequences available at GenBank were not used to avoid problems in comparative sequence analyses.
- rDNA ITS-2: *L. (S.) palustris palustris* (AJ319620), *L. (S.) palustris turricula* (AJ319618), *L. (S.) fuscus* (AJ319621), and *Catascopia occulta* (AJ319642) [1,14]; *C. catascopium* (AF013143), *C. emarginata* (AF013141, AF013142), *C. elodes* (AF013138), and *Hinkleyia caperata* (AF013139) [38]; *G. truncatula* H1 (AJ296271), H2 (AJ243017), and H3 (= *L. viatrix sensu* Ueno et al., 1975; = *L. cubensis sensu* Ueno et al., 1975) (AJ272051) [1,15,35]; *L. cubensis* (AM412223), *L. viatrix* (AM412224), *L. neotropica* (AM412225) [15], *L. humilis* (FN182191) [45], *L. cousini* (FN598153), and *L. meridensis* (FN598154) [55], all six

- sequences from respective type localities; *P. columella* (FN598156) [55].
- rDNA ITS-1: *L. (S.) palustris palustris* (AJ626849), *L. (S.) palustris turricula* (AJ626853), *L. (S.) fuscus* (AJ626856), and *C. occulta* (AJ626858) [39]; *C. catascopium* (AF013143), *C. emarginata* (AF013142), *C. elodes* (AF013138), and *Hinkleyia caperata* (AF013139) [38]; *G. truncatula* HA (AJ243018), HB (AJ296270), and HC (= *L. viatrix sensu* Ueno *et al.*, 1975; = *L. cubensis sensu* Ueno *et al.*, 1975) (AJ272052) [1,15,35,39]; *L. cubensis* (AM412226), *L. viatrix* (AM412227), *L. neotropica* (AM412228) [15], *L. humilis* (FN182193) [45], *L. cousini* (FN598157), and *L. meridensis* (FN598159) [55], all six sequences from respective type localities; *P. columella* (FN598160) [55].
  - mtDNA 16S rRNA gene: *Fossaria bulimoides* (AF485657), *F. obrussa* (AF485658), *S. elodes* (AF485652), and *Stagnicola bonnevillensis* (AF485655) [43]; *F. bulimoides* (EU038315) and *S. elodes* isolate 44106 (EU038305) [56]; *L. cubensis* (FN182204) and *L. humilis* (FN182195) [45].
  - mtDNA *cox1* gene: *S. elodes* (EU038352) [56]; *S. elodes* (AY227368), *F. bulimoides* (AY227367), and *Austroplelea tomentosa* (AY227365) [44]; *G. truncatula* from Spain (AM494011) [15] and Germany (EU818799) [57]; *L. cubensis* from Cuba (AM494009–type locality) [15] and the USA (FN182205) [45], *L. viatrix* (AM494010–type locality), *L. neotropica* from Peru (AM494008–type locality) [15] and Argentina [58], *L. humilis* (FN182197–9–type locality) [45], *L. cousini* (FN598161–type locality, and FN598162–3) and *L. meridensis* (FN598164–type locality) [55]; *P. columella* from Australia (AY227366) [44] and Puerto Rico (FN598165) [55].

**Representation of the 18S rRNA secondary structure.** The previously published secondary structure prediction for *Limicolaria kameul* 18S rRNA [59], based on the general eukaryote 18S rRNA secondary structure [60], was used and extended to encompass lymnaeid sequences.

### Phylogenetic inference

Phylogenies were inferred from DNA sequences using maximum-likelihood (ML) estimates with PAUP [54]. ML parameters such as model, base frequencies, transition/transversion ratio (ts/tv), the shape parameter for the gamma distribution, and the proportion of invariant sites, were optimized using the hierarchical likelihood ratio test (hLRT) and the Akaike information criterion (AIC) [61,62], implemented in Modeltest 3.7 [63]. 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 bootstrap analysis using 1000 replicates was made with heuristic search in PAUP. Second, a distance-based phylogeny using the neighbour-joining (NJ) algorithm [64] with ML pairwise distances was obtained. Statistical support for the nodes was evaluated with 1,000 bootstrap replicates, with and without removal of gapped positions. 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 [65] with four chains for 1,000,000 generations and trees were sampled every 100 generations. The first 1,000 trees sampled were ruled out (“burn-in”), and clade posterior probabilities (PP) were computed from the remaining trees. Alternative methods of phylogenetic reconstruction allowing for an evaluation of the support for each node were also applied. A distance-based phylogeny using the NJ

algorithm with LogDet distances was obtained. Statistical support for the nodes was evaluated with 1,000 bootstrap replicates.

Due to different limitations recently shown by mtDNA markers for interspecific sequence analyses in invertebrates [46,66,67], phylogenetic reconstruction by combined sequences data sets was made from ribosomal and mitochondrial markers separately. Combined sets analysed were: a) ITS-1 and ITS-2, considered as the markers to fit best for the analysis of relationships between species, as has already been verified in Lymnaeidae [16]; b) 18S, ITS-1 and ITS-2, to increase the support for evolutionarily older divergence nodes; c) 16S and *cox1*, to evaluate mtDNA genome information; and d) *cox1* gene, by using both the three and only the first two codon positions to assess potential saturation.

Phylogenetic analyses were performed using reference sequences of lymnaeid DNA (see species and Acc. Nos. in list noted above in chapter of sequence comparisons), after adding the following sequences stored at databases: ITS-2: *Radix auricularia* H1 (AJ319628) and *R. balthica* H1 (AJ319633); ITS-1: *R. auricularia* HA (JF922878) and *R. balthica* HA (JF922879); 16S: *L. (L.) stagnalis* (AF485659), *L. (S.) palustris* (U82082), *G. truncatula* (HQ283236), *L. viatrix* (HQ283239), *L. humilis* HA and HB (FN182195, FN182196), *L. cousini* (HQ283237), *L. meridensis* HA, *P. columella* (U82073) and *R. auricularia* (AF485659). *cox1*: *L. (L.) stagnalis* (EU818795), *L. (S.) palustris* (EU818801), *R. auricularia* (EU818800). The intergenic region sequence (AY030361) [68] including both ITSs of a planorbid species, *Biomphalaria pfeifferi*, was used as outgroup. For the combined sets using 18S and 16S, *B. alexandrina* 18S (BAU65225), ITSs (AY030371) and 16S (AY030204) [68] were used for outgroups, similarly as *B. alexandrina cox1* (AF199110).

### Phenotypic study

Only specimens from pure laboratory cultures experimentally maintained in climatic chambers and with previous molecularly assessed lymnaeid species classification were used for snail description and intraspecific variability studies.

Shells and egg clusters of lymnaeids were measured, according to traditional malacological methods [19], using a computerised image-analysis system (CIAS) [69]. This system is based on a DXC-930P colour video camera (Sony, Tokyo) fitted to a stereomicroscope, and connected to computer running image analysis software (ImageProH Plus 4.5; Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD).

For anatomical studies, adult lymnaeids were collected in the field and allowed to relax overnight in water containing menthol. They were then immersed in hot water (70° C) for 40 s before transfer to water at room temperature. The soft parts were drawn from the shells with forceps applied to the cephalopodal mass, and fixed in slightly modified Railliet–Henry’s fluid (930 ml distilled water, 6 g NaCl, 50 ml 40% formalin, and 20 ml glacial acetic acid). The fixed snails were then dissected under a stereomicroscope, so that drawings of the reproductive system could be made using a camera lucida.

Egg clusters were obtained from living lymnaeids experimentally maintained in climatic chambers. Living egg clusters were measured with CIAS. For egg clusters, cluster roundness ( $CR = CP^2/4\pi CA$ ) measurements were used to quantify the cluster shape. It is a measure of how circular an object is (the expected perimeter of a circular object divided by the actual perimeter). A circular object will have a roundness of 1.0, while more irregular objects will have larger values [70].

### Experiments for selfing verification and characterisation

To verify the capacity of snails to give rise to offspring by selfing (= autogamete fusion), egg clusters laid inside the breeding containers,

in which pure laboratory cultures were kept within the climatic chambers, were isolated in Petri dishes. Immediately after egg hatching, each newborn snail specimen was isolated in a small Petri dish provided with water and microalgae (*Oscillatoria formosa*) as food. The growth of the snail and its possible egg cluster laying were thereafter followed on a daily basis. Small portions of fresh lettuce were added to complement the food diet when lymnaeid size was sufficient. This follow-up was continued not only until the first egg cluster appeared in the Petri dish, but expanded for up to several weeks until snail death. The purpose was to obtain numerous egg clusters from each isolated snail and to analyse their laying capacity. The following characteristics were assessed: snail life span (= days elapsed from day of hatching to day of death); prelaying period (= days elapsed from day of hatching to day when first cluster was laid); laying period (= days of sexual activity elapsed from first to last day when clusters were laid by a snail specimen, inclusive); postlaying period (= days elapsed between last laying day and death); total laying capacity (= number of clusters/life span in days); laying rate in the sexually active period (= number of clusters/laying period in days). Shape and size of the living clusters were measured with CIAS, and egg numbers per cluster were noted to verify a potential correlation with the size and age of the respective snail individual at the day of laying.

### Liver fluke experimental infection assays

Isolates of *F. hepatica* from Poland and Peru, and *F. gigantica* from Egypt and Vietnam, maintained in the laboratory according to previously described methods [35], were used for experimental infection assays of the laboratory-reared lymnaeids.

Liver fluke eggs in fresh water were maintained in complete darkness at 20°C to start the embryogenic process. Embryogenesis was followed at intervals of four days until fully embryonated containing a developed miracidium. Developed miracidia were forced to hatch by putting fully embryonated eggs under light and used for the experimental infection of snails. Snails of the

geographical strains from El Kazza and Tiba in Egypt and from Albufera of Valencia in Spain were used for experiments. These lymnaeid strains were selected due to their higher adult survival rates under experimental conditions. Only laboratory-borne specimens were used. Snails of different size and age within the length range of 3.5–7.5 mm were used to assess infection susceptibility.

Lymnaeids were mono- or trimiracidially infected by the aforementioned *F. hepatica* and *F. gigantica* isolates, by exposing each snail to one or three miracidia for four hours in a small Petri dish containing 2 ml of fresh water. During this short period, snail specimens were forced to stay inside water and the disappearance of the miracidium was taken as verification of its successful penetration into the snail. Thereafter, snails were returned to the same standard conditions in the climatic chamber (2000 ml containers, 20°C, 90% r.h., 12 h/12 h light/darkness, dry lettuce *ad libitum*) until day 30 post-infection (dpi). In that day, they were once again isolated in Petri dishes to permit daily monitoring of potential cercarial shedding by individual snails. Lettuce was provided *ad libitum* to each snail in a Petri dish during this monitoring period until death of the snail.

## Results

### DNA sequences

Sequence characteristics are noted in Table 1. Data includes length and GC/AT content, obtained for each one of the five DNA markers analysed in the populations of *L. schirazensis* from the twenty localities of eight countries (Figure 1) with their corresponding haplotype codes and GenBank Accession Nos.

### 18S rRNA gene

All of the 20 populations of *L. schirazensis* presented the same 18S sequence (Table 1). When comparing this 18S sequence with that of *G. trusatula*, a total of 19 variable positions appeared. They

**Table 1.** Nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA marker sequences obtained from populations of *Lymnaea schirazensis* and respective GenBank accession numbers.

DNA marker	Populations	Haplotype No.	Sequence length (nucleotide No.)	GC or AT content (%)	Accession No.
rDNA 18S	all populations studied	L.schir-18S-H1	1852 bp	GC 51.4	FR772291
rDNA ITS-2	Iran, Egypt, Spain, the Dominican Republic, Venezuela, and one population from Peru (Baños del Inca)	L.schir-H1	436 bp	GC 53.9	JF272601
	Mexico, Ecuador and one population from Peru (Rio Lurin)	L.schir-H2	444 bp	GC 53.8	JF272602
rDNA ITS-1	Iran, Egypt, Spain, the Dominican Republic and Venezuela	L. schir -HA	531 bp	GC 56.1	JF272603
	Mexico, Ecuador and Peru	L. schir -HB	533 bp	GC 55.9	JF272604
mtDNA 16S rRNA	all populations except one	L.schir-16S-HA	421 bp	AT 69.6	JF272605
	one population from the Dominican Republic (Constanza)	L.schir-16S-HB	421 bp	AT 69.6	JF272606
mtDNA <i>cox1</i>	Iran, Egypt, Spain, the Dominican Republic, Mexico (populations from Los Molinos, Escuela A. Obrego in La Trinidad Tepango, and Jiutepec), Venezuela, Ecuador (population from Machachi) and Peru (population from Rio Lurin)	L.schir-cox1-Ha	672 bp	AT 69.5	JF272607
	one population from Mexico (Xalpatlaco in Atlixco, Puebla)	L.schir-cox1-Hb	672 bp	AT 69.3	JF272608
	one population from Ecuador (La Buena Esperanza)	L.schir-cox1-Hc	672 bp	AT 69.6	JF272609
	one population from Peru (Baños del Inca)	L.schir-cox1-Hd	672 bp	AT 69.1	JF272610

Nuclear rDNA genes and spacers concern complete sequences and definitive haplotype numbers; mtDNA genes only sequence fragments and provisional haplotype numbers. H= haplotype.

doi:10.1371/journal.pone.0024567.t001

included 6 ts, 2 tv and 11 insertions/deletions (indels) in a 1853 bp-long pairwise alignment, most differences being located in the variable Helix E-10 of the V2 region according to the secondary structure (Figure 2).

A multiple 18S sequence alignment was 1867 bp long. It included: several *Galba/Fossaria* vector species such as *L. cubensis*, *L. viatrix* (the sequence being identical to that of *L. neotropica*), *G. truncatula*, *L. humilis*, and *L. cousini* (sequence identical to that of *L. meridensis*); the peculiar species *P. columella*; three representatives of stagnosticolines (*L. (L.) stagnalis*, *L. (S.) palustris* and *O. glabra*); and two of the *Radix* group (*R. auricularia* and *R. balthica*). This alignment showed a total of 64 variable nucleotide positions (3.43% nucleotide divergence). Thirty-two of these 64 polymorphic sites appeared grouped in the short sequence between positions 206 and 266, which corresponds to the helix E10-1 of the variable area V2 of the secondary structure (Figure 2).

### Second internal transcribed spacer rDNA ITS-2

Two different ITS-2 haplotypes were found among the *L. schirazensis* populations analysed (Table 1). Their pairwise comparison showed only 8 polymorphic sites, corresponding to 8 indels caused by the tetranucleotide microsatellite repeat TGCT, present twice in haplotype 1 between positions 128 and 135 of the alignment but absent in haplotype 2.

The very high number of nucleotide differences detected in the pairwise comparisons of these two ITS-2 sequences with the three ITS-2 haplotypes of *G. truncatula* available at GenBank is

noteworthy. In the different alignments performed, with a bp length varying between 469 to 477, a total of 130–139 differences appeared, including 18–19 ts, 11 tv and 101–109 indels (Table 2).

When comparing the *L. schirazensis* ITS-2 sequences with the other species of the *Galba/Fossaria* group, the pairwise ITS-2 distance matrix obtained with PAUP (only parsimony informative sites considered) showed that the numbers of nucleotide differences were unexpectedly high in all cases. The lowest of these numbers appeared when comparing with *G. truncatula*, although rather high (64–66). Regarding *L. humilis*, *L. cousini* and *L. meridensis*, it ranged from 99 to 118. It appeared to be similarly high (121–136) with regard to *L. cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica*. Nucleotide differences were also numerous when *L. schirazensis* was compared with stagnosticolines and *Pseudosuccinea* (Table S2).

### First internal transcribed spacer rDNA ITS-1

Two different ITS-1 haplotypes were also found among the *L. schirazensis* populations analysed (Table 1). The pairwise comparison of these two sequences showed only 3 polymorphic sites, corresponding to two insertions in positions 296 and 297 (AA or --) and to one mutation in position 443 (A or T) in haplotypes A and B, respectively.

A very high number of nucleotide differences also appeared in the pairwise comparisons with the three ITS-1 haplotypes of *G. truncatula*. In the different alignments performed, with a bp length varying from 558 to 560, a total of 134–138 differences appeared, including 31–32 ts, 21–23 tv and 81–83 indels (Table 2).

Variable areas	VVVV V	V	VVVVVVVVVV	VVVVVVVVVV	VVVVVVVVVV	V V	VV	VVV
	1111 2	2	2222222222	2222222222	2222222222	2 2	45	799
Helix	66668E999E	EEEEEEEEEE	EEEEEEEEEE	EEEEEEEEEE	EEEEEEEEEE	E E11111-1	1EEEE2233	3444
	8	1	1111111111	1111111111	1111111111	1 122222 8	8222227825	5147
	0	0	0000000000	0000000000	0000000000	0 1	111111	
	-	-	-----	-----	-----	-	-----	
	1	1	1111111111	1111111111	1111111111	1	125777	
POSITIONS							11111 1111	
			11112	2222222222	2222222222	2222222222	2333333455	7778811233 4777
	6777925550	3333333444	4444444555	5555555666	6199999688	2493535301	3359	
	9234892786	3456789012	3456789012	3456789012	6214578402	5749696437	6323	
<i>L. (L.) stagnalis</i> Z73984	GTG-T---C	CGTG-----C	CGGGGCGACT	CGTGC-----G	C-CGTAC-CC	-AACGCT-GC	TGTA	
<i>L. (S.) palustris</i> Z73983	...-CA--	.....	.....	.....	.....	-T..A... .	....	
<i>O. glabra</i> Z73982	TAAC----	.....	.....	.....	.....	-G-A...-T.	....	
<i>L. cubensis</i> Z83831*	...-AA--	T..CGTCCG	...T..A.GC	...GTCGC.	.....CTT	GCG...-T-	C.CG	
<i>L. viatrix</i> AM412222*	...-AA--	T...CCTCCG	...T..A.GC	...GTCGC.	.....CTT	-CG...-CT-	C.CG	
<i>G. truncatula</i> Z73985	...-AA--	T-----C	TTTC...GG	-----T-	.....TT	-CG.A...-	C..G	
<i>L. schirazensis</i>	...-AA--	G-CCATTCAT	TCACTT.CG.	G.....	.....CTT	-CG...-CT-	C.CG	
<i>L. humilis</i> FN182190*	...-AA--T	T-----CG	...C..AGGC	..A.G-----	.....CTT	-CG...-CT-	CCCG	
<i>L. cousini</i> FN598151*	...-AA--	T-----CG	...C..A.GC	..A.G-----	.....CTT	-CG...-CT-	C.CG	
<i>P. columella</i> FN598152	...-AA--	T-C.GTCCC	..A-G.GGC	..G-----	T.....CTT	-CG...-CT-	C...	
<i>R. auricularia</i> Z73980	...-CAA--	.....CT	.TTC...GGG	T.C-----	TCGTACT-TA	GCG.A-C-T-	C...	
<i>R. balthica</i> Z73981	...-CATT.	.....CT	.TTC...GGG	T.C-----	TCGTACT-TT	-CG.A.C--	C...	
DIFFERENCE NUMBER		1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234	

**Figure 2. Nucleotide differences in a total of 64 variable positions found in the complete 18S rDNA sequence of the lymnaeid species compared and their location in the secondary structure.** Helix, Position and Difference number = numbers to be read in vertical. Position = numbers refer to positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0. Identical = .; Indel = -. Shaded area corresponds to Helix E10-1 of the variable area V2 where differences in the 18S rDNA gene of Lymnaeidae are concentrated [33]. GenBank Accession Nos. = Z73980–Z73985 [33]; Z83831 [34]; AM412222 [15]; FN182190 [45]; FN598151–FN598152 [55]; *L. schirazensis* from present paper. Sequence correspondences: \* *L. cubensis*, *L. viatrix*, *L. humilis* and *L. cousini* without definitive genus ascription; 18S identical in *L. viatrix* and *L. neotropica* [15]; 18S identical in *L. cousini* and *L. meridensis* [55].

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g002

**Table 2.** Sequence differences detected in pairwise comparisons of ITS-2 and ITS-1 between *Lymnaea schirazensis* and the most morphologically similar species *Galba truncatula*.

Compared species	Alignment length No. of bp	Total differences No. %		Substitutions				Insertions+deletions	
				Transitions		Transversions		No.	%
				No.	%	No.	%		
ITS-2:									
<i>L. schirazensis</i> H1 vs. <i>G. truncatula</i> H1	477	139	29.14	19	3.98	11	2.31	109	22.83
<i>L. schirazensis</i> H1 vs. <i>G. truncatula</i> H2	477	138	28.93	18	3.77	11	2.31	109	22.83
<i>L. schirazensis</i> H1 vs. <i>G. truncatula</i> H3	477	139	29.14	19	3.98	11	2.31	109	22.83
<i>L. schirazensis</i> H2 vs. <i>G. truncatula</i> H1	469	131	27.93	19	4.05	11	2.34	101	21.53
<i>L. schirazensis</i> H2 vs. <i>G. truncatula</i> H2	469	130	27.72	18	3.84	11	2.34	101	21.53
<i>L. schirazensis</i> H2 vs. <i>G. truncatula</i> H3	469	131	27.93	19	4.05	11	2.34	101	21.53
ITS-1:									
<i>L. schirazensis</i> HA vs. <i>G. truncatula</i> HA	560	136	24.28	31	5.53	22	3.93	83	14.82
<i>L. schirazensis</i> HA vs. <i>G. truncatula</i> HB	560	137	24.46	32	5.71	22	3.93	83	14.82
<i>L. schirazensis</i> HA vs. <i>G. truncatula</i> HC	560	138	24.64	32	5.71	23	4.11	83	14.82
<i>L. schirazensis</i> HB vs. <i>G. truncatula</i> HA	558	134	24.01	32	5.73	21	3.76	81	14.52
<i>L. schirazensis</i> HB vs. <i>G. truncatula</i> HB	558	135	24.19	33	5.91	21	3.76	81	14.52
<i>L. schirazensis</i> HB vs. <i>G. truncatula</i> HC	558	136	24.37	33	5.91	22	3.94	81	14.52

doi:10.1371/journal.pone.0024567.t002

When comparing *L. schirazensis* ITS-1 sequences with the other species of the *Galba/Fossaria* group, the pairwise ITS-1 distance matrix obtained with PAUP showed that the numbers of nucleotide differences were also very large. The comparison with *G. truncatula* furnished the second lowest number (81–84), after that of the comparison with *L. meridensis* (77–80). Regarding *L. humilis* and *L. cousini*, it ranged from 87 to 92, and it appeared to be similarly high (83–92) with regard to *L. cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica*. The number of nucleotide differences increased considerably when *L. schirazensis* was compared with stagnicolines (132–143) and *Pseudosuccinea* (129–130) (Table S3).

### 16S rRNA gene of the mtDNA

Two different sequences of the 16S fragment were found (Table 1). They differed by only 2 mutations (C/A in position 85 and A/G in position 305 of their pairwise alignment, in HA/HB, respectively).

Nucleotide comparison with other *Galba/Fossaria* species showed a total of 46 variable positions (10.75%), of which 31 were mutations (7.24%) and 15 were indels (3.50%). This alignment demonstrated that *L. schirazensis* was different from any other *Galba/Fossaria* at the level of this mtDNA gene (Figure 3). In pairwise comparisons, minimum differences were 18 mutations

### POSITION

111111111122222222222223333333444444  
114468822245558883333346677788000446802222  
4690913368027312925612458445245342595742835678

```

L. schirazensis 16S-HA      TAAATGTTTCGGTGTATTTATT---AAATCTATTGTAAAAGTAT---
L. schirazensis 16S-HB      .....A.....---.....G.....---
L. cubensis 16S-HB         CGG.CAA..AA.A...A.T.ACAT-.T.A.G.AA..TT....CCT
F. bulimoides              CGG.CAA..A.....A.T.ACTTT.T.AA..AA..TT....CCT
L. humilis 16S-HA          .GGT.A...AA.AATAA..AAG---.AT..A.A.....---
L. humilis 16S-HB          .GGT.A...AA.AATAA..AAG---.AT..A.A.....A....---
F. obrussa                  .GGT.A.-.AA-AATAA-.AAG---.AT..A.A-.....C----
C. elodes*                  .GGT.A...AA.AATAA..AAG---.AT..A.A.....-..CC-

```

**Figure 3.** Variable positions showed by the mtDNA 16S sequence fragment in a 433-bp-long alignment including the two haplotypes of *Lymnaea schirazensis* and other *Galba/Fossaria* species. Numbers (to be read in vertical) refer to positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0. Identical = . ; Indel = - . Haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene. *L. cubensis* 16S-HB (FN182204), *L. humilis* 16S-HA (FN182195) and *L. humilis* 16S-HB (FN182196) [45]; *F. bulimoides* (AF485657) and *F. obrussa* (AF485658) [43]; \* the sequence ascribed to the stagnicoline *C. elodes* (EU038305) [56] concerns in fact a *Galba/Fossaria* species—see analysis in [45]. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g003

(4.2%) when compared with *L. humilis*, and a maximum of 22 mutations (5.14%) appeared in comparison with *L. cubensis*. Nucleotide differences were more numerous when comparing with the stagnicolines *S. elodes* and *S. bonnevillensis*. The four species alignment showed a total of 56 variable positions (12.93%), 47 of which were mutations (10.85%) and 9 indels (2.08%) (alignment not shown).

### mtDNA cytochrome c oxidase subunit I *cox1*

Four different *cox1* sequences were obtained (Table 1). When aligned, a total of 661 positions were conserved and only 11 were variable, comprising 2 parsimony informative and 9 singleton sites (Table 3). When comparing with species of the *Galba/Fossaria* group and other proximal lymnaeid species available at GenBank, whose *cox1* fragment sequences were similar in length to those obtained in the present study, the higher number of nucleotide differences appeared evident in a pairwise *cox1* distance matrix (Table S4). A comparison with more distant species such as stagnicolines (*S. elodes*) and *Radix* group (*Austropeplea tomentosa*) was not necessary.

The amino-acid sequence of that COX1 gene fragment was 224 aa long. A pairwise comparison showed a 100% identity between the three *L. schirazensis* haplotypes *cox1-a*, *cox1-b* and *cox1-c*, and only one amino-acid difference (isoleucine/threonine, respectively) in position 96 with *L. schirazensis* haplotype *cox1-d* from Baños del Inca, Peru. The provisional haplotypes COX1-I and COX1-II were assigned, respectively. The comparison with the amino acid sequence of other species of the *Galba/Fossaria* group and other proximal lymnaeid species showed that COX1-I of *L. schirazensis* was identical to that of other species, such as *L. viatrix*, *L. humilis* and *L. meridensis*. However, *L. schirazensis* COX1-II appeared to be unique (Figure 4).

### Phylogenetic analysis

**Combined ITS-1 and ITS-2 sets.** This single data-set generated a robust tree, indicating phylogenetic accordance between the two spacers. The ML model best fitting this data-set was HKY85+I, using a ts/tv ratio of 2 ( $\kappa = 3.8979086$ ), base frequencies for A, C, G and T of 0.21534, 0.26862, 0.22661 and 0.28943, respectively, and a proportion of invariable sites = 0.087. To assess the reliability of the nodes in the ML tree (Figure 5 A), a bootstrap analysis using 1,000 replicates was made using branch-swapping algorithm (tree-bisection-reconnection TBR) with heuristic search and the neighbour-joining (NJ) algorithm with the ML pairwise distances in PAUP.

**Table 3.** Nucleotide differences found in the sequences of the 672-bp-long mtDNA *cox1* gene fragment of the four *L. schirazensis* haplotypes described.

Positions	2	2	2	3	3	3	4	4	5	6	
	6	7	7	8	3	4	6	1	5	2	5
	3	1	3	7	9	5	0	7	9	2	1
<i>L. schirazensis</i> <i>cox1-a</i>	C	C	G	T	T	T	A	T	G	G	C
<i>L. schirazensis</i> <i>cox1-b</i>	T	.	C	.	C	C	.	.	.	.	.
<i>L. schirazensis</i> <i>cox1-c</i>	.	.	C	.	C	C	.	.	A	A	T
<i>L. schirazensis</i> <i>cox1-d</i>	.	T	.	C	.	C	G	C	.	.	.

Positions = numbers (to be read in vertical) refer to variable positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0; . = identical to nucleotide in first line; haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene.  
doi:10.1371/journal.pone.0024567.t003

Finally, a Bayesian phylogeny reconstruction procedure was applied to obtain posterior probabilities (BPP) for the nodes in the ML tree with MrBayes 3.1.

In the ML tree obtained (Figure 5 A), *P. columella* appeared basal to two large groupings, namely stagnicolines (including both Palaearctic and Nearctic species), and the *Galba/Fossaria* clade which comprised the *F. hepatica* main vector species. *Lymnaea schirazensis* appeared included within the latter. However, contrary to what would be expected, *L. schirazensis* did not cluster together with *G. truncatula*, of Old World origin, or other morphologically similar lymnaeids such as the New World *L. cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica*. Surprisingly, it appeared linked to the Nearctic *L. humilis* and the two Neotropical *L. cousini* and *L. meridensis*, within a relatively well supported branch (82/78/88 in NJ/ML/BPP).

The topology obtained with the NJ algorithm using LogDet distances (figure not shown) was identical to that shown by the ML tree (Figure 5 A).

When adding two *Radix* species (data matrix of 24 taxa with 1,767 characters), the ML model best fitting was HKY85+G+I, using a ts/tv ratio of 1.45 ( $\kappa = 2.872483$ ), base frequencies for A, C, G and T of 0.22764, 0.25354, 0.23176 and 0.28705, respectively, a shape parameter ( $\alpha$ ) = 0.99, and a proportion of invariable sites = 0.13. In the ML tree obtained (Figure 5 B), *Radix* species clustered independently in a branch basal to all the remaining lymnaeids. Unexpectedly, the location of *L. schirazensis* changed, now becoming basal to the other *Galba/Fossaria* members which clustered together although with very low supports. The topology of the NJ LogDet tree was similar (figure not shown), but with *L. schirazensis* in a subclade with *G. truncatula* showing low bootstrap (only 59).

**Combined 18S, ITS-1 and ITS-2 set.** This three ribosomal marker data set (matrix of 17 taxa and 3,540 characters) also generated a robust tree. The ML model best fitting was HKY85+I, using a ts/tv ratio of 1.48 ( $\kappa = 2.9601982$ ), base frequencies for A, C, G and T of 0.22150, 0.25100, 0.25820 and 0.26930, respectively, and a proportion of invariable sites = 0.44. In the ML tree obtained (Figure 6 A), *L. schirazensis* appeared clustering together with *G. truncatula* (79/81/- in NJ/ML/BPP), and the branch including *L. humilis*, *L. cousini* and *L. meridensis* appeared as the sister group inside the *Galba/Fossaria* clade. The topology obtained with the NJ algorithm using LogDet distances (figure not shown) was identical.

**Combined 16S and *cox1* set.** The data matrix analysed contained 19 taxa and 1,118 characters. The ML model best fitting was HKY85+G+I, using a ts/tv ratio of 1.78 ( $\kappa = 5.083228$ ), base frequencies for A, C, G and T of 0.33500, 0.10560, 0.12210 and 0.43730, respectively, a shape parameter ( $\alpha$ ) = 0.39, and a proportion of invariable sites = 0.35. The ML tree (Figure 6 B) showed *L. schirazensis* haplotypes clustering together with the branch of *L. humilis*, *L. cousini* and *L. meridensis*, although with low support values (60/-/60). The topology furnished by the NJ algorithm using LogDet distances (figure not shown) was similar, with that clade supported by a 64% bootstrap.

***cox1* sets.** Two phylogenetic reconstructions were performed, one by using complete sequences of the *cox1* fragment and another after deleting the third codon position. The data matrix contained 28 taxa, with 672 and 448 characters, respectively. In the trees obtained (figures not shown), very low alpha values, paraphyly and low support values in external nodes, as well as inconsistency of relationships between *Radix*, *Pseudosuccinea* and stagnicolines, suggest sequence saturation. Therefore, a saturation effect may also be expected at the level of the relationships of *L. schirazensis* with other *Galba/Fossaria* species, given the very high nucleotide



Nucleotidic haplotype	Country	Variable positions	Amino acid haplotype
		11111122222222222222	
		1112346890224680111111122222	
		12345678901262666665666642345678901234	
<i>L.cubensis</i> cox1a	Cuba	DIGTLYMIFGIWLTANMIGGGGRPSGDPILYQHLFWFF	<i>L.cubensis</i> COX1-I
<i>L.cubensis</i> cox1b	USA	.....	<i>L.cubensis</i> COX1-I
<i>L.viatrix</i> cox1a	Argentina	.....V.....	<i>L.viatrix</i> COX1-I
<i>L.neotropica</i> cox1a	Peru	.....	<i>L.neotropica</i> COX1-I
<i>L.neotropica</i> cox1b	Argentina	.....S.....	<i>L.neotropica</i> COX1-II
<i>F.bulimoides</i> *	USA	-----?..???.?..???.?..-----	<i>F.bulimoides</i> COX1*
<i>G.truncatula</i> cox1a	Spain	.....	<i>G.truncatula</i> COX1-I
<i>G.truncatula</i> *	Germany	-----?.....?-----	<i>G.truncatula</i> COX1-I*
<i>L.schirazensis</i> cox1a	many countries	.....V.....	<i>L.schirazensis</i> COX1-I
<i>L.schirazensis</i> cox1b	Mexico	.....V.....	<i>L.schirazensis</i> COX1-I
<i>L.schirazensis</i> cox1c	Ecuador	.....V.....	<i>L.schirazensis</i> COX1-I
<i>L.schirazensis</i> cox1d	Peru	.....V.....T.....	<i>L.schirazensis</i> COX1-II
<i>L.humilis</i> cox1a	USA	.....V.....	<i>L.humilis</i> COX1-I
<i>L.humilis</i> cox1b	USA	.....V.....	<i>L.humilis</i> COX1-I
<i>L.humilis</i> cox1c	USA	.....V.....	<i>L.humilis</i> COX1-I
<i>L.cousini</i> cox1a	Ecuador	.....V..V.....	<i>L.cousini</i> COX1-I
<i>L.cousini</i> cox1b	Colombia	.....V..V.....N.....	<i>L.cousini</i> COX1-II
<i>L.cousini</i> cox1c	Colombia	.....V..V.....N.....	<i>L.cousini</i> COX1-II
<i>L.meridensis</i> cox1a	Venezuela	.....V.....	<i>L.meridensis</i> COX1-I
<i>P.columella</i> cox1a	Puerto Rico	.....V..V..M.....T.....	<i>P.columella</i> COX1-I
<i>P.columella</i> **	Australia	-----..V..V..M.....T.....---	<i>P.columella</i> COX1-I**

**Figure 4. COX1 amino acid sequence differences detected in the alignment of the haplotypes of the lymnaeid species studied, together with species of the *Galba/Fossaria* group and other proximal lymnaeid species available in GenBank.** Only *cox1* sequence fragments of a length similar to that of sequences obtained in present paper are included. Variable positions = Numbers (to be read in vertical) refer to positions obtained in the alignment made with MEGA 4.0. — = position not sequenced; ? = undetermined amino acid. Haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene. \* Sequences somewhat shorter and including a few undetermined amino acids; \*\* sequences somewhat shorter although presumably identical to haplotype *cox1a* of the same species.

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g004

differences at ITS levels. Consequently, care should also be taken when considering phylogenetic results furnished by the aforementioned 16S and *cox1* single data set.

#### Diagnostic description of *Lymnaea* (*s. l.*) *schirazensis* Küster, 1862

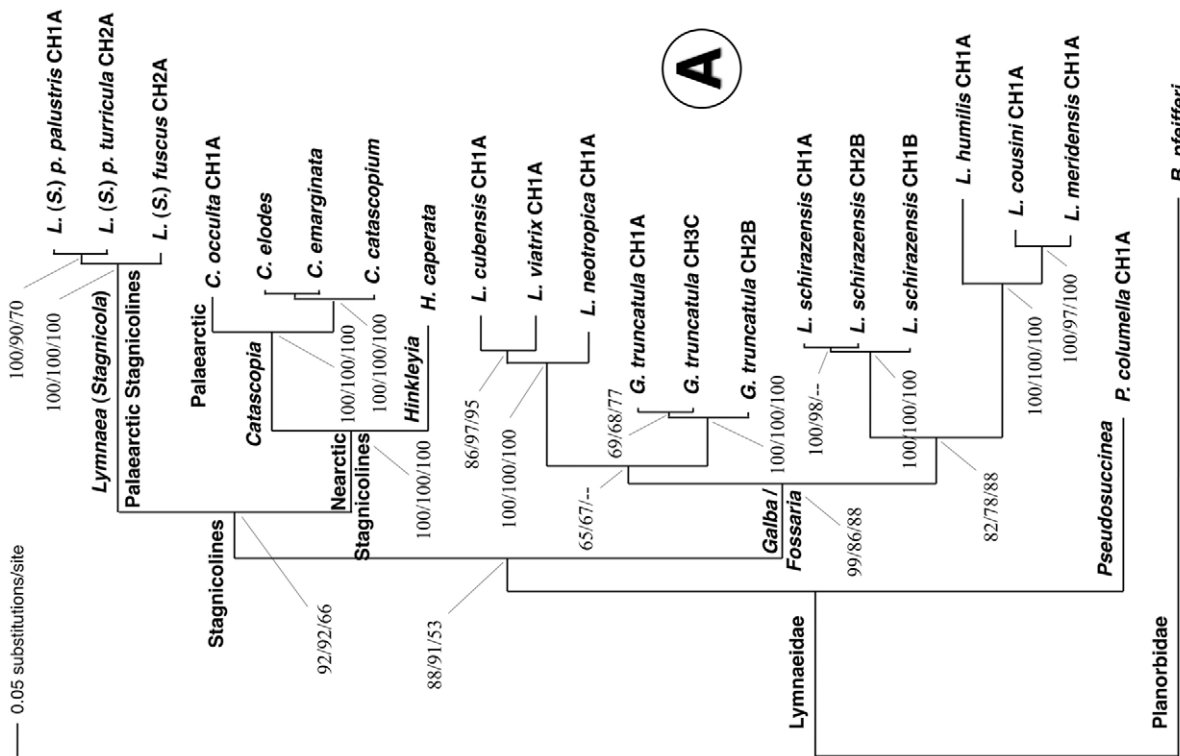
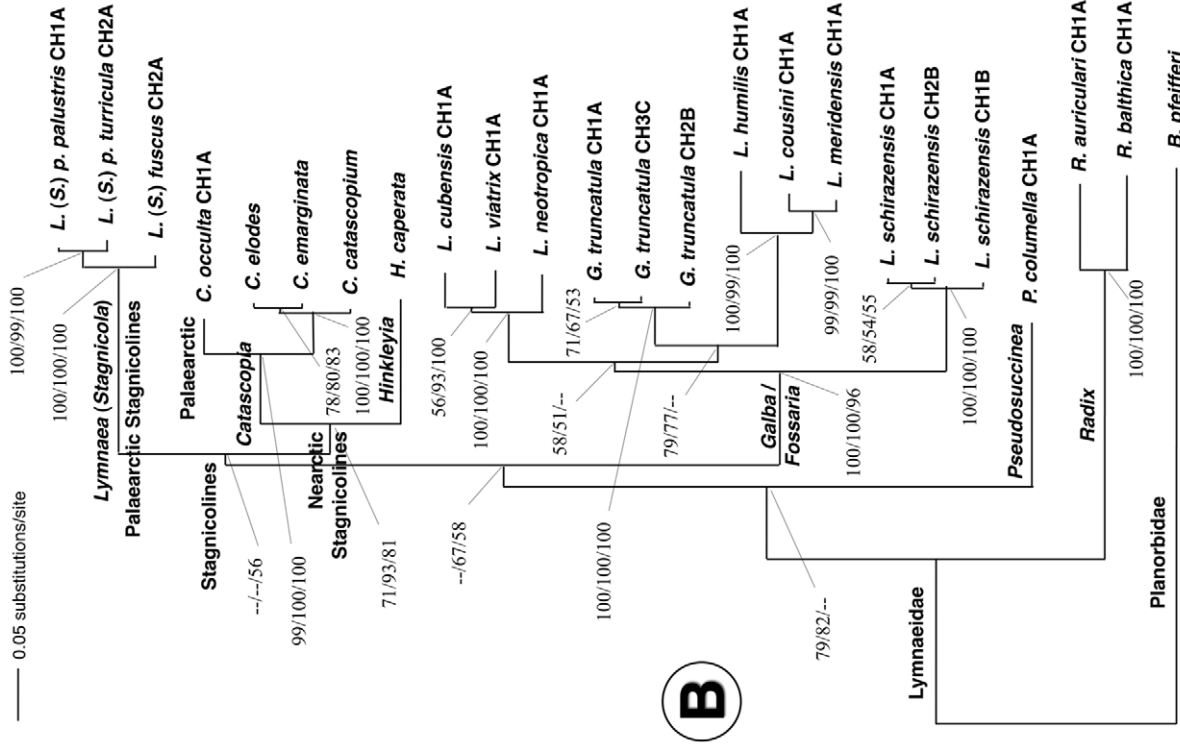
**Type locality.** Shiraz, Iran [71].

**Other localities.** See detailed data on localities of Iran, Egypt, Spain, the Dominican Republic, Mexico, Venezuela, Ecuador and Peru in the “Lymnaeid snail material” section above.

**Shell.** The shell was brownish to reddish light brown, thin-walled, elongated conical, usually with four regular convex whorls and up to 5.5 whorls in the longer specimens (Figure 7). The whorls were somewhat inflated, slightly shouldered, with silky and longitudinally striated surface and separated by a deep, well-marked suture, increasing rather slowly in diameter. The columella was straight, unfolded, and the umbilicus open. The last or body whorl was almost  $\frac{3}{4}$  times as high as the shell height, presenting a slight twisting trend along its basal part visible in the biggest shells when viewed dorsally, and which was due to the enlargement of the basal lip of the peristome (in the way of *Pseudosuccinea columella*). The spire was pointed. The aperture was elongatedly oval, slightly oblique, mid-sized and wider at the base. The thin peristome was patent throughout, the umbilicus partially covered by a widened columellar lip. The shell showed a tendency to be approximately one and a half to two times as long as it is wide, and its aperture tends to be slightly less than half as long as the shell. Measurements and calculated ratios of natural and experimental populations were noted (see Table 4 and Table S5, respectively).

**External morphological characteristics.** The cephalopodal mass was pale greyish. The eyes were black, relatively big in size (Figure 8 A–C). Tentacles were elongate, slender, pyramidal, with narrow base (Figure 8 A–E). The mantle roof was dark, from dark brown to blackish throughout, with small unpigmented white-greyish round spots including several tiny circles at the beginning of the border of the pulmonary region and a few scattered further away in between the initial large round spots (Figure 8 F–I). The border of the mantle was light grey. The black pigmentation of the hypopeplear region of the mantle roof gave a dark appearance to the shell of living specimens by transparency (Figure 8 D,E). This dark appearance did not depend on the characteristics of the natural habitat, as it was maintained across the different laboratory-reared snail generations (quite the opposite of what happens with several darkish populations of other lymnaeid species under experimental conditions).

**Anatomy.** Morphoanatomical features were studied (see Figure 9 and Figure S1). The renal tube extended straight from the pericardial region toward the mantle collar, diagonally across the roof of the palial cavity and parallel to the pulmonary vein and renal vein. It was a straight tube, lined with a folded epithelium, white to white-yellowish, that tapered, smoothed and became transparent distalward until the level of the septum between pulmonary and hypopeplear cavities. In that place, it turned with an almost right-angle to form a short ureter (which lacked the two distinct flexures present in other close species) and finally opened behind the pneumostome. A very slender muscle thread appeared lengthwise on the ventral surface of the renal tube. A layer of very thin transverse parallel muscle fibers gave the inner side of the pulmonary wall a densely striated appearance (Figure 9 A,B).



**Figure 5. Phylogenetic trees of lymnaeid species studied based on maximum-likelihood (ML) estimates: A) data set of ITS-1 and ITS-2, with the planorbid *B. pfeifferi* as outgroup (–Ln = 10016.27013); B) same data set of ITS-1 and ITS-2 with *B. pfeifferi* as outgroup, after adding *Radix* species (–Ln = 10078.46520).** Scale bar indicates the number of substitutions per sequence position. Support for nodes a/b/c: a: bootstrap with NJ reconstruction using PAUP with ML distance and 1000 replicates; b: bootstrap with ML reconstruction using PAUP with 1000 heuristic replicates; c: Bayesian posterior probability with ML model using MrBayes. See Table S1 for systematic-taxonomic notes. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g005

The ovotestis showed a lobulate surface formed by several acini, with a collecting canal which continued into the ovispermiduct. The latter presented a short and very thin proximal segment emptying into the seminal vesicle, an expanded portion of bosselated surface, which narrowed down into a slender distal segment ending in the carrefour surrounded by the albumen gland, oviduct and spermiduct (Figure 9 C–F).

The voluminous albumen gland covered the carrefour and the origin of a bosselated, transverse tubular oviduct which followed a somewhat convolute course, described a nearly complete circle in contact with the albumen gland, and continued into a striated, oblong nidamental gland (Figure 9 C,D and Figure S1 A,B). The initial part of the nidamental gland increased in width to keep the diameter throughout its length or even slightly enlarged in its distal part, to subsequently narrow to give rise to a wrinkled-walled uterus followed by a short vagina. The latter shows a first conical narrowing part and a final short tubular part (without any bulbous swelling or sphincter-like thickening present in other close species) (Figure 9 E–G and Figure S1 A,B), opening into the female genital pore with a slightly thickened lip. All parts of the female reproductive system proximal to the vagina itself showed a pronounced width.

The yellowish spermatheca (Figure S1 A,B) had an oval body and gave rise to a thin, relatively long spermathecal duct which emerged laterally from the spermatheca instead of from its terminal extremity. The almost uniformly thin, smooth-walled spermathecal duct extended diagonally between the nidamental gland and the prostate until joining the final part of the uterus and the beginning of the vagina. The spermathecal duct was not dilated at its distal end (Figure 9 E–G and Figure S1 B).

Emerging from the carrefour, the spermiduct showed an initial slightly dilated part with a granular outer surface slendering into a uniformly thin, straight duct which ran on the ventral surface of the nidamental gland. The distal portion of the spermiduct widened to form a prostate of granular surface, relatively small size, narrower than the nidamental gland. The small, oblong, light grey prostate gland varied in shape from inverted-pear-like to elongated-potato-like, without ventral lengthwise fissure (Figure 9 E,F and Figure S1 C). In cross section, the prostate showed a simple, slit-like lumen (lacking internal folds known in other lymnaeids) (Figure 9 H and Figure S1 D). The prostate gave distally rise to a smooth-walled vas deferens which ran shortly in contact with the vagina and extended until looping caudalward. After this loop, the vas deferens became a uniformly thin, long duct to finally merge into a curved, penial sheath or phallosome (Figure 9 E,F and Figure S1 E,F).

The penis sheath was regularly cylindrical, with a very slightly thicker proximal part (which showed no patent circlet of minute knobs or ring of papillae described in close species). The penis sheath was about a little bit more than half as long than the praeputium. The maximum width of the praeputium was around two or even three times thicker than the penis sheath. The shape of the praeputium was usually elongate-conical, gradually narrowing to terminate in the male genital pore, although it also appeared cylindrical throughout most of its length and only tapering distally (Figure 9 E,F and Figure S1 E,F). This conical shape of the praeputium appeared to be an exception among the typical

conical praeputium shape in Lymnaeidae. The length of the praeputium measured 0.73–1.96 mm (mean 1.13 mm) while that of the penis sheath was 0.36–0.94 mm (mean 0.72 mm), with a praeputium length/penis sheath length ratio of 1.20–2.23 (mean 1.60).

The radula was characterised by a tricuspid central tooth, presenting the large central cusp, a mid-sized right cusp and a small left cusp. The first lateral teeth were usually bicuspid, with two large cusps. In Mexico and also Iran there was a faint tendency to display a small associated denticle appearing at the inner border of the endocone, thus appearing tricuspid. The subsequent four to six lateral teeth were invariably bicuspid, the intermediate teeth were tricuspid, and the marginal ones multi-cuspidate.

**Egg clusters.** Shape variability of egg clusters and eggs was studied (Figure 10), and measurements and calculated ratios were noted (Table 5). Egg clusters were saccular, transparent, with a very thin outer membranous wall. The shape of these egg clusters showed an evident trend from kidney- to banana-like; the more curved and relatively more elongated and narrow the more numerous were the eggs inside. Small clusters containing only few eggs (2–5) appeared rounded to oval, but the elongate-curved shape became soon apparent when the egg number increased. Eggs were from spherical to slightly ovoid, with a uniformly thick outer shell, usually appearing well separated from each other.

## Habitat

The ecological characteristics of *L. schirazensis* appeared to be very peculiar, mainly due to three aspects: (i) its marked amphibious characteristics, (ii) its frequency in antropophilic habitats, and (iii) the wide range of altitudes at which it is present.

Its pronounced terrestrial behaviour was surprising. In the laboratory, snails of this species appeared crawling on or attached to the lateral walls of the containers outside water. When taken with forceps and forced deep into water, they quickly moved out of it again.

In nature, this species was almost never found in water, nor even close to water edges, sometimes up to 1 m or farther from it (Figure 11 I). Outside water, it was usually found on the soil surface under grass besides slow running large rivers (Figure 11 B) or even under relative high bushes completely away from sunshine (Figure 11 H). The smallest amount of water to keep humidity was sufficient for this species to maintain populations, as in ditches of rural paths and dirt tracks (Figure 11 L,N) or even artificial cement canals in gardens (Figure 11 A) and drainage canalizations around buildings and dwellings (Figure 11 K). Man-made small irrigation canals around plant cultures also appeared to offer appropriate conditions for its development (Figure 11 C,D), as well as large drainage cement canals with almost no vegetation (Figure 11 E). Worth mentioning was its presence on mud and livestock footprints in and around animal farms (Figure 11 M).

Besides this link to antropophilic habitats and livestock-inhabited places, it was also found, however, in more silvatic habitats. Examples were specimens under the dense vegetation of the edges of fast running waters in mountain rivers and streams, where populations undoubtedly derived from dragging and floods by the water from upper areas (Figure 11 F,J,G).



**Figure 6. Phylogenetic trees of lymnaeid species studied based on maximum-likelihood (ML) estimates: A) data set of 18S, ITS-1 and ITS-2, with *B. alexandrina* as outgroup ( $-Ln=13171.38533$ ); B) data set of 16S and *cox1*, with *B. alexandrina* as outgroup ( $-Ln=5282.96177$ ).** Scale bar indicates the number of substitutions per sequence position. Support for nodes a/b/c: a: bootstrap with NJ reconstruction using PAUP with ML distance and 1000 replicates; b: bootstrap with ML reconstruction using PAUP with 1000 heuristic replicates; c: Bayesian posterior probability with ML model using MrBayes. See Table S1 for systematic-taxonomic notes. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g006

Its distribution from lowlands to highlands was also worth mentioning. Thus, it was present below sea level, e.g.  $-23$  m at the river edge near the Taleb Abad river mouth at the Caspian Sea, near Bandar Anzali city, in the northern Gilan province of Iran, or the very low altitude of localities such as El Kazza in the Nile Delta region of Egypt, the Mediterranean coast between the villages of Nules and Moncofar in Castellon province of Spain, and Rio Lurin, near Lima, Peru. On the other extreme, this lymnaeid also inhabited high altitude areas such as the 2,821 m of La Buena Esperanza, Cayambe, the 3,158 m of Guarandaucó, Chillogallo, both in Ecuador, or the 2,611 m of Baños del Inca, Cajamarca, Peru. Intermediate altitudes were those of the 1,184 m altitudes around Constanza city in the central mountains of the Dominican Republic, those around 1,770–1,950 m of the localities close to Puebla in Mexico, and the 1,800–2,170 m range along the El Valle valley in Merida, Venezuela.

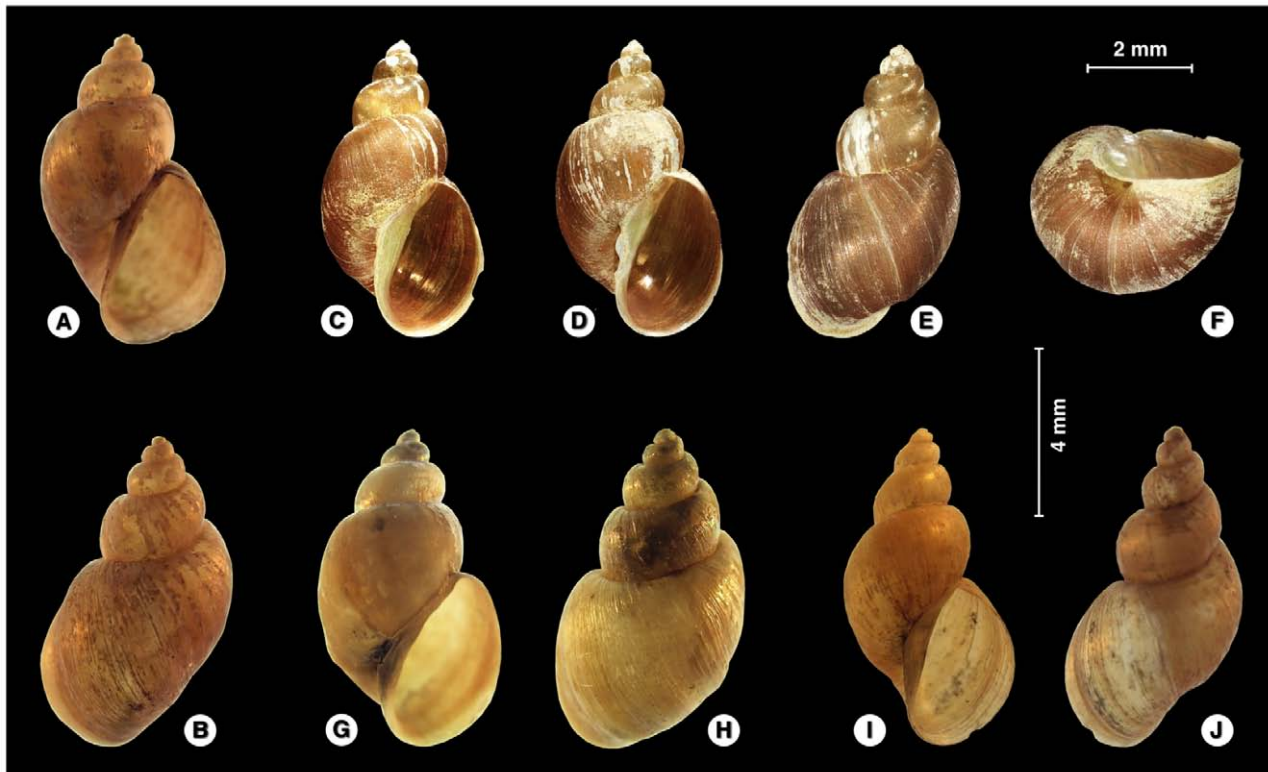
Interestingly, in none of the aforementioned geographical zones did this snail species appear to be the only lymnaeid present in the area. Its populations may appear mixed or close to populations of other lymnaeids (its smaller size may be a competing handicap with regard to other species). Accompanying lymnaeids were other morphologically and ecologically very similar species of the *Galba*/

*Fossaria* group inhabiting the same place or water body, or neighbouring localities within the same fascioliasis endemic areas. Thus, *Galba truncatula* was found in all the areas studied in the Old World (Iran, Egypt, Spain). In the New World, *Lymnaea cubensis* shared the same areas in the Caribbean (the Dominican Republic) and Mexico, *L. humilis* in Mexico, and *G. truncatula*, *L. cubensis*, *L. cousini* and *L. neotropica* in South America (Venezuela, Ecuador, Peru).

Worth mentioning was that specimens of *L. schirazensis* sometimes appeared so mixed or close to one another with specimens of *G. truncatula*, that one was convinced to deal with a population of only one species, e.g. in Spain (Figure 11 D,E).

### Selfing and egg cluster laying

Egg cluster laying was verified to occur in all of the specimens from different populations maintained individually isolated after hatching (Table 6). Age and size when laying began differed somewhat from one individual to another within a population, less in populations of the New World (Mexico) than in those of the Old World (Egypt, Spain). Despite range overlap, those from Mexico proved to be markedly sexually precocious in age when compared to those from Egypt and Spain. Snail size when laying began did not



**Figure 7. Shells of *Lymnaea schirazensis* in ventral, dorsal and from-below views, showing intraspecific variability: A,B) specimen (7.20 mm high) from Tiba, Delengate district, Behera governorate, Egypt; C) specimen (7.00 mm) from Albufera of Valencia, Valencia province, Spain; D–F) specimen (7.10 mm) from Albufera of Valencia, Valencia province, Spain; G,H) specimen (7.80 mm) from Nules-Moncofar, Castellon province, Spain; I,J) specimen (7.84 mm) from Laguna de Fe y Alegria, El Valle, Estado de Merida, Venezuela. Scale bars: A–E,G–J = 4 mm; F = 2 mm.**

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g007

**Table 4.** Lymnaeid shell measurement comparison between different natural populations of *Lymnaea schirazensis* and *Galba truncatula* from different countries.

Shell parameters (abbreviation)	Height (SH)	Maximum width (SW)	Aperture length (AL)	Aperture width (AW)	Last spire length (LSL)	Spiral angle (SSA)	Whorl number	SH/SW ratio	SH/AL ratio	SH/LSL ratio
<i>Lymnaea schirazensis</i> :										
Iran, Taleb Abad bridge (n = 30)	5.21–7.14 (5.91±0.53)	2.60–3.79 (3.24±0.31)	2.30–3.24 (2.68±0.25)	1.48–2.26 (1.83±0.19)	3.91–5.17 (4.44±0.33)	33.12–61–25 (46.13±6.39)	4–5 (4.27±0.45)	1.59–2.14 (1.83±0.13)	1.95–2.94 (2.24±0.22)	1.25–1.44 (1.33±0.05)
Egypt, El Kazza (n = 30)	5.10–6.91 (5.91±0.45)	2.65–4.11 (3.24±0.32)	2.19–3.12 (2.76±0.23)	1.41–2.29 (1.73±0.20)	4.06–5.40 (4.62±0.34)	27.75–55.20 (43.48±7.22)	4–5 (4.10±0.31)	1.67–2.01 (1.83±0.08)	1.96–2.34 (2.15±0.10)	1.22–1.38 (1.28±0.04)
Egypt, Tiba Delengate (n = 30)	5.45–7.21 (6.40±0.49)	2.87–4.03 (3.50±0.31)	2.33–3.6 (3.02±0.28)	1.45–2.66 (2.03±0.29)	4.21–5.89 (5.03±0.44)	34.36–56.55 (46.89±5.32)	4–5 (4.03±0.18)	1.63–2.13 (1.84±0.10)	1.91–2.42 (2.12±0.12)	1.22–1.37 (1.27±0.03)
Egypt, Bulin El Aly (n = 30)	4.43–6.82 (5.67±0.62)	2.53–3.67 (3.10±0.33)	2.13–3.25 (2.68±0.29)	1.31–1.93 (1.62±0.19)	3.37–5.25 (4.35±0.49)	33.89–56.21 (45.39±5.24)	4–5 (4.13±0.35)	1.62–1.98 (1.80±0.08)	1.95–2.35 (2.08±0.09)	1.22–1.38 (1.28±0.03)
Spain, Albufera Valencia (n = 30)	4.27–7.42 (5.89±0.61)	2.52–4.02 (3.28±0.34)	1.94–3.39 (2.75±0.30)	1.18–2.37 (1.79±0.22)	3.48–5.52 (4.57±0.42)	30.63–57.17 (46.30±5.54)	4–5 (4.17±0.38)	1.59–2.01 (1.80±0.09)	1.90–2.53 (2.15±0.13)	1.21–1.36 (1.29±0.04)
Spain, Castellón (n = 30)	5.25–7.80 (5.99±0.51)	2.92–4.31 (3.32±0.28)	2.56–4.12 (2.85±0.30)	1.48–2.30 (1.73±0.16)	4.12–5.98 (4.59±0.37)	34.61–56.28 (46.58±5.02)	4–5 (4.43±0.50)	1.62–2.18 (1.81±0.11)	1.89–2.31 (2.11±0.09)	1.26–1.35 (1.30±0.02)
Dominican Rep., Constanza (n = 30)	3.50–5.73 (4.94±0.54)	2.09–3.27 (2.80±0.31)	1.74–2.90 (2.50±0.32)	1.20–1.77 (1.52±0.16)	2.92–4.48 (3.87±0.42)	38.74–56.48 (48.09±5.55)	4 (4.00±0.00)	1.50–2.07 (1.76±0.10)	1.76–2.47 (1.98±0.15)	1.18–1.39 (1.27±0.05)
Mexico, Xalpatlaco (n = 33)	2.98–4.25 (3.57±0.38)	1.70–2.47 (2.08±0.18)	1.40–2.29 (1.80±0.23)	0.98–1.47 (1.17±0.12)	2.42–3.51 (2.89±0.30)	26.14–53.54 (41.10±6.15)	3–4 (3.42±0.51)	1.54–1.91 (1.71±0.10)	1.76–2.46 (1.98±0.14)	1.18–1.31 (1.23±0.03)
Mexico, Trinidad Tepango (n = 8)	4.02–5.37 (4.86±0.43)	2.50–3.01 (2.80±0.20)	2.05–2.67 (2.46±0.20)	1.43–1.71 (1.56±0.10)	3.30–4.19 (3.87±0.29)	34.44–45.48 (39.80±3.67)	4–5 (4.13±0.35)	1.61–1.81 (1.74±0.06)	1.93–2.02 (1.98±0.04)	1.22–1.28 (1.26±0.02)
Venezuela, Laguna, El Valle (n = 4)	5.93–8.06 (6.78±0.63)	3.10–4.12 (3.61±0.26)	2.47–3.84 (3.23±0.27)	1.74–2.62 (2.14±0.22)	4.60–6.09 (5.34±0.42)	29.21–55.68 (43.20±5.71)	4–5 (4.20±0.41)	1.66–2.26 (1.88±0.14)	1.78–2.71 (2.11±0.21)	1.19–1.38 (1.27±0.05)
Ecuador, Buena Esperanza (n = 30)	2.41–5.35 (3.37±0.83)	1.39–2.82 (1.77±0.38)	1.16–2.44 (1.62±0.36)	0.77–1.42 (1.00±0.18)	2.06–4.07 (2.68±0.57)	25.05–43.90 (34.52±4.72)	3–4 (3.40±0.50)	1.63–2.05 (1.89±0.10)	1.87–2.38 (2.08±0.15)	1.11–1.33 (1.25±0.05)
Ecuador, Guarandauco (n = 30)	5.76–7.27 (6.30±0.33)	2.88–3.82 (3.25±0.23)	2.53–3.41 (2.91±0.19)	1.46–2.27 (1.71±0.16)	4.45–5.53 (4.85±0.27)	23.66–48.47 (36.34±5.71)	4–5 (4.07±0.25)	1.71–2.15 (1.94±0.09)	1.99–2.41 (2.17±0.12)	1.25–1.35 (1.30±0.03)
Ecuador, Machachi (n = 30)	5.53–6.91 (5.88±0.31)	2.49–3.51 (2.96±0.19)	2.30–3.31 (2.56±0.24)	1.45–1.85 (1.61±0.10)	3.95–5.18 (4.37±0.24)	29.05–43.26 (35.37±3.34)	4–5 (4.23±0.43)	1.78–2.35 (1.99±0.11)	2.05–2.62 (2.30±0.14)	1.30–1.42 (1.35±0.03)
Peru, Baños del Inca (n = 4)	4.00–5.56 (4.79±0.86)	2.04–2.88 (2.47±0.39)	1.82–2.62 (2.20±0.42)	1.19–1.50 (1.35±0.17)	3.07–4.17 (3.62±0.62)	29.13–39.99 (34.57±4.56)	3–4 (3.75±0.50)	1.77–2.03 (1.94±0.12)	2.10–2.22 (2.18±0.05)	1.29–1.34 (1.32±0.02)
Peru, Río Lurín en Lima (n = 2)	3.82–3.89 (3.85±0.05)	1.99–2.20 (2.09±0.15)	1.67–1.78 (1.72±0.08)	1.05–1.14 (1.10±0.06)	3.04–3.08 (3.06±0.02)	32.56–36.52 (34.54±2.80)	4 (4.00±0.00)	1.77–1.92 (1.85±0.11)	2.15–2.34 (2.24±0.13)	1.24–1.28 (1.26±0.02)
<i>Galba truncatula</i> :										
Spain, Albufera Valencia (n = 30)	6.79–9.33 (7.73±0.64)	3.70–4.90 (4.29±0.29)	3.30–4.07 (3.58±0.20)	2.05–2.72 (2.40±0.17)	5.28–6.80 (5.78±0.40)	33.94–59.26 (42.73±5.34)	4–5 (4.67±0.48)	1.55–1.96 (1.80±0.09)	1.84–2.38 (2.16±0.14)	1.25–1.47 (1.34±0.05)
Marocco, Oued Tiout (n = 30)	6.57–8.29 (7.58±0.48)	3.79–4.60 (4.26±0.22)	3.29–4.29 (3.86±0.28)	2.40–3.15 (2.77±0.21)	5.19–11.09 (6.05±1.02)	40.91–61.66 (50.77±5.37)	4–5 (4.30±0.47)	1.64–2.02 (1.78±0.08)	1.84–2.14 (1.97±0.07)	0.69–1.36 (1.27±0.11)

Range include minimum and maximum extremes, with mean±standard deviation SD in parentheses. Measurements in mm. n=number of specimens measured. doi:10.1371/journal.pone.0024567.t004

show a similar correlation, suggesting that development speed and reaching a sufficient size may be more important for sexual activity.

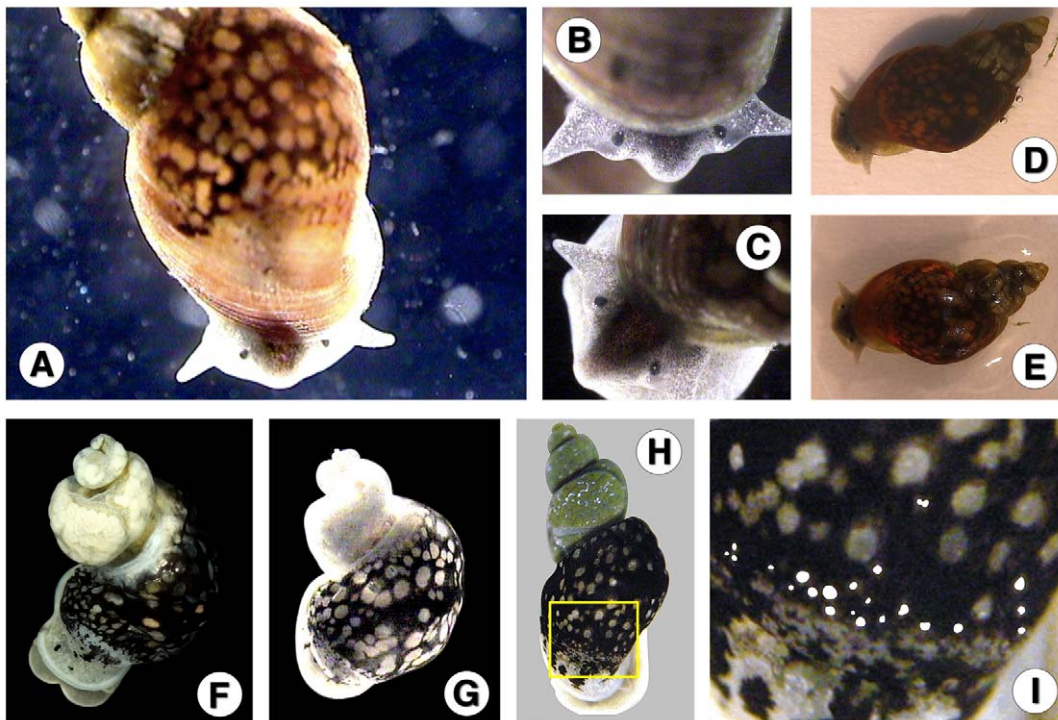
Comparison of the measurements of the first and first five clusters laid by each individual snail also showed that slight differences may be found according to the populations. Results indicated that there is no gradual increase in cluster size nor in the number of eggs per cluster within the laying of a snail specimen. Thus, sometimes the first egg cluster laid by a snail individual was larger and contained more eggs than those laid afterwards (2nd to fifth clusters) by the same specimen (Table 6). However, somewhat larger clusters including a slightly larger number of eggs/cluster were laid by older and larger snail specimens (up to 20 and 22 eggs/cluster in specimens from Egypt and Spain, respectively).

Snail life span was relatively short, of around 2.5–6.8 months. It includes a sexually active period of cluster laying lasting a total of 39–161 days, sometimes even only very few days before death.

However, the final postlaying period may reach slightly more than 1.5 months in given specimens (Table 6 and Table 7; Figure 12). Both life span and laying period appeared to be longer in Old World (Egypt, Spain) specimens than in the New World (Mexico) specimens.

This correlated with the number of clusters laid per snail, which was pronouncedly higher in Old than in New World specimens. Similar differences between Old and New World specimens were observed in the total laying capacity and the laying rate in the sexually active period.

Usually, snails only laid one egg cluster on the days they laid. Two clusters were sometimes laid by a snail specimen in the same day, although this appeared to be very rare in Old World (Egypt, Spain) specimens and occurred almost never (only once) in the New World (Mexico) specimens. Throughout the laying period, the number of days when no cluster was laid was larger in Old World (Egypt, Spain) specimens than in New World (Mexico) specimens. This fact



**Figure 8. External aspect of *Lymnaea schirazensis*: A–E) living specimens showing (i) large, round, black eyes, (ii) long, slender tentacles and (iii) dark shell (A = lighted from down; B–D = lighted from above; F = epi- and infralighted simultaneously); F–I) dark brown to blackish mantle roof of specimens from Spain (F, G) and Mexico (H, I) showing small unpigmented white-greyish round spots, including several tiny circles (artificially remarked in white with computer effects in I) at the beginning of the border of the pulmonary region (I = yellow rectangle in H).**

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g008

seemed to be mainly related to the longer laying period in Old World specimens, as the differences in the maximum number of non-laying days between two laying days when comparing Old and New World specimens were too small (Table 7; Figure 12).

#### Natural infection studies and experimental transmission assays

Along the ten-year study period, none of the 8,572 snail specimens from the 20 localities of the 8 countries belonging to this lymnaeid species proved to be naturally infected with fasciolid larval stages. This is the opposite of what happened with other lymnaeid vector species also collected in the same endemic areas. In other species, naturally infected specimens were detected through cercarial shedding even despite the usual very low snail infection prevalences.

Several experimental infection assays including a total of 338 snail specimens from different geographical origins with miracidia from experimentally-reared strains of *F. hepatica* and *F. gigantica*, also from different geographical origins, did not allow for successful fluke larval development. None of the infected specimens appeared to become parasitised nor reached cercarial shedding (Table 8). Only in two specimens from Albufera of Valencia, Spain, infected with miracidia of *F. hepatica* from Poland, could a few rediae be observed by transparency through the snail shell at 23 dpi, although neither shed cercariae thereafter. In a subsequent experiment with the same snail- and fluke-strains for verification, no infection and not even rediae were obtained in spite of the higher number of lymnaeid specimens infected.

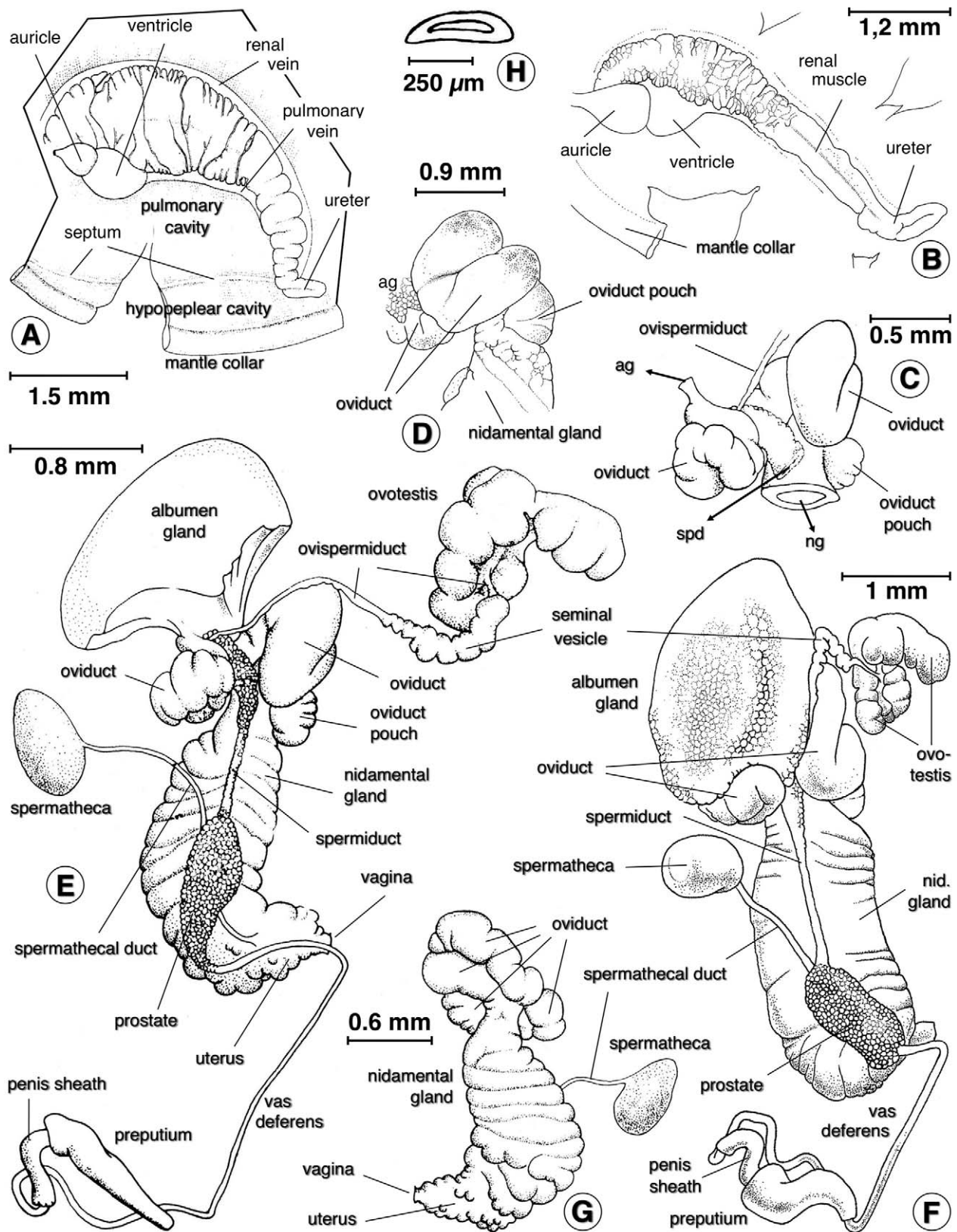
Results on survivorship of snails after infection showed pronounced differences according to snail strains and fluke species

and strains used. There were experiments in which no snail infected by either *F. hepatica* or *F. gigantica* was able to survive after 30 dpi, up to other experiments in which snails survived for more than 100 or even 150 dpi, thus suggesting no negative effects. Nonetheless, results suggested a lower survival rate in infections by *F. gigantica* than by *F. hepatica*. Furthermore, in *F. hepatica* infection assays, a faster and higher snail mortality rate appeared when using trimiracidial instead of monomiracidial infection (Table 8).

## Discussion

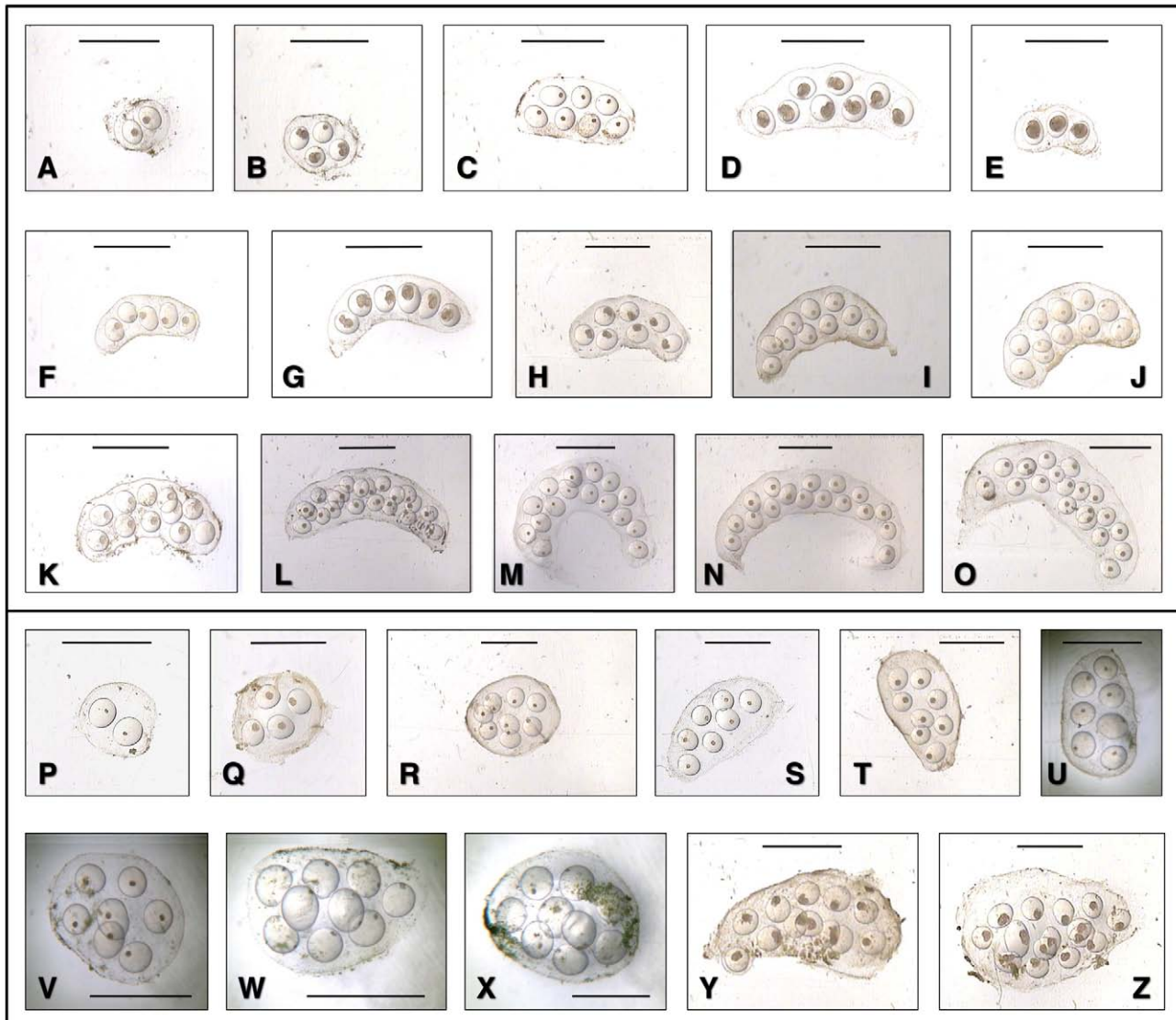
### Genetic distances

The twenty lymnaeid populations found in the eight countries of Asia, Africa, Europe, the Caribbean, North America and South America, show DNA sequences proving that all of them belong to the same species. The fact that this species presents an 18S rRNA sequence only is easily understandable given the slow evolution characteristics of this highly conserved gene [33,34]. The low number of nucleotide differences at rDNA ITS-2 and ITS-1 level fits within the known intraspecific variability ranges of these two species markers [1,16,39]. However, it poses a question mark when considering the very wide geographical distribution (Figure 1), markedly variable habitats (Figure 11), and ecology (e.g., large altitudinal range) this lymnaeid species shows. Even the low number of only two and four haplotypes in the mtDNA 16S and *cox1* gene fragments, respectively, including but a very few variable positions in both genes, is also surprising given the faster evolution of these mtDNA genes when compared to nuclear rDNA genes and spacers in invertebrates in general [46] and in lymnaeids in particular [45].



**Figure 9.** Aspects of soft part anatomy of *Lymnaea schirazensis*: A, B) renal tube and ureter in renal region extending between pericardium and mantle collar; C) carrefour in detail, with arrows indicating ducts to albumen gland (ag), spermiduct (spd) and nidamental gland (ng); D) oviducal crown turned to show detail of the region of oviduct pouch; E, F) reproductive system in two ventral views; G) female complex in dorsal view; H) prostate section showing absence of internal folds. Scale bars: A = 1.5 mm; B = 1.2 mm; C = 0.5 mm; D = 0.9 mm; E = 0.8 mm; F = 1 mm; G = 0.6 mm; H = 250  $\mu$ m (drawings R. Rojas; plate configuration S. Mas-Coma).  
doi:10.1371/journal.pone.0024567.g009





**Figure 10. Gradual evolution of egg cluster lays in experimentally raised *Lymnaea schirazensis* and *Galba truncatula*:** A–O) *L. schirazensis*: note trend to kidney shape in early lays (E–K) and final trend to banana-shape in late trends (L–O); only in very early lays, when shape is still round-oval (A, B) and may sometimes become elongate (C, D), it can be confused with clusters of *G. truncatula*. P–Z) *G. truncatula*: note general trend to round-oval shape (P–R, V–X) and occasional variation to elongate shape (S–U, Y, Z). Materials of *L. schirazensis* from strains originally collected in Xalpatlaco, Mexico (A, B, F, I, J), Jiutepec, Mexico (C), Albufera of Valencia, Spain (D, E, G, L, O), Tiba, Egypt (H), Escuela Obregón, Mexico (K). Materials of *G. truncatula* from strains originally collected in Qued Tiout, Marrakesh, Morocco (P–T, Y, Z) and Albufera of Valencia, Spain (U–X). Scale bar = 2 mm.  
doi:10.1371/journal.pone.0024567.g010

The interspecific comparison of the sequences of the snail species here in question demonstrates that it is a unique lymnaeid. It is genetically well different from *G. truncatula* and other species of the *Galba/Fossaria* group, as well as from stagnicolines and *P. columella*. At 18S rRNA level, *L. schirazensis* presents peculiar nucleotides in the helix E10–1 of the variable V2 area, which clearly differs from all other species (Figure 2). This fact in a well conserved gene such as 18S is worth mentioning [34]. At ITS-2 and ITS-1 level, the two main markers for species distinction [1,16,39], the very high number of nucleotide differences *L. schirazensis* shows when compared to all other lymnaeids must be highlighted. This is surprising when considering the pronounced morphological similarity of *L. schirazensis* with other lymnaeid species, mainly of the *Galba/Fossaria* group.

Concerning the sequences of the 16S and *cox1* gene fragments, nucleotide differences between *L. schirazensis* and all other lymnaeids are also numerous (Figure 3 and Table S4), although less pronounced than those appearing in both ITSs despite the faster evolution of mtDNA. This may be related to the well known saturation of nucleotide positions in these two mitochondrial genes, a phenomenon previously described in Lymnaeidae [45].

The aforementioned surprising genetic distance results shown by the nuclear rDNA and mtDNA markers used can only be explained if the following conclusions are accepted:

- the very high interspecific variation suggests an old evolutionary divergence of *L. schirazensis* from other lymnaeid species of the *Galba/Fossaria* group as well as from stagnicolines and *P. columella*;

**Table 5.** Egg cluster and egg measurement comparison between different experimentally-maintained populations of *Lymnaea schirazensis* and *Galba truncatula* from different geographical origins.

Species and populations	Clusters					Eggs				
	Area (CA)	Roundness (CR)	Length (CL)	Maximum Width (CW)	CL/CW ratio	No. of eggs/cluster (CEN)	CEN/CA ratio	Length (EL)	Width (EW)	EL/EW ratio
<b><i>Lymnaea schirazensis</i>:</b>										
Tiba, Delengate, Egypt (n = 30 clusters+189 eggs)	4.77–13.27 (8.31±2.14)	1.46–3.63 (2.22±0.53)	3.34–6.88 (4.74±0.94)	1.96–4.33 (3.01±0.65)	1.08–2.52 (1.61±0.32)	6–19 (11.50±3.30)	1.02–2.10 (1.40±0.28)	0.62–0.87 (0.72±0.04)	0.53–0.72 (0.61±0.03)	1.08–1.41 (1.18±0.06)
Albufera, Valencia, Spain (n = 30 clusters+195 eggs)	4.55–12.72 (7.77±1.89)	1.23–2.21 (1.70±0.23)	2.81–6.07 (4.33±0.70)	1.94–3.78 (2.61±0.49)	1.19–2.14 (1.68±0.26)	6–23 (14.00±4.63)	1.32–2.48 (1.78±0.27)	0.63–0.82 (0.72±0.04)	0.52–0.65 (0.59±0.03)	1.11–1.35 (1.21±0.05)
Laguna, Atlixco, Mexico (n = 30 clusters+130 eggs)	1.80–6.49 (3.87±1.33)	1.31–2.08 (1.55±0.17)	2.07–4.47 (3.10±0.61)	1.19–2.46 (1.71±0.36)	1.43–2.28 (1.83±0.23)	3–12 (7.07±3.00)	1.29–2.19 (1.78±0.25)	0.57–0.71 (0.65±0.03)	0.46–0.59 (0.53±0.02)	1.12–1.35 (1.23±0.06)
Esc. Obregon, Trinidad Tep., Mexico (n = 30 clusters+92 eggs)	1.47–6.33 (3.69±1.29)	1.22–1.63 (1.42±0.12)	1.73–4.21 (2.96±0.61)	1.01–2.03 (1.62±0.28)	1.47–2.42 (1.83±0.22)	2–10 (5.87±2.13)	1.11–2.02 (1.59±0.25)	0.60–0.83 (0.67±0.03)	0.48–0.65 (0.59±0.02)	1.11–1.36 (1.21±0.06)
Xalpatlaco 1, Atlixco, Mexico (n = 30 clusters+98 eggs)	1.34–7.22 (4.22±1.80)	1.13–1.76 (1.38±0.12)	1.72–4.19 (3.01±0.75)	1.02–2.48 (1.76±0.38)	1.33–2.05 (1.70±0.19)	2–10 (6.67±2.37)	1.11–2.24 (1.64±0.32)	0.56–0.83 (0.69±0.07)	0.46–0.69 (0.56±0.06)	1.12–1.40 (1.23±0.06)
Xalpatlaco 2, Atlixco, Mexico (n = 30 clusters+136 eggs)	2.04–7.49 (4.79±1.50)	1.25–2.05 (1.52±0.18)	2.02–4.41 (3.33±0.62)	1.19–2.92 (1.94±0.41)	1.39–2.02 (1.73±0.18)	3–18 (8.60±3.29)	1.00–2.40 (1.78±0.30)	0.58–0.79 (0.65±0.04)	0.48–0.68 (0.54±0.03)	1.12–1.35 (1.21±0.05)
Jiutepec, Morelos, Mexico (n = 30 clusters+106 eggs)	1.67–6.77 (4.54±1.47)	1.01–2.34 (1.43±0.31)	1.75–4.15 (3.21±0.64)	1.20–2.90 (1.87±0.35)	1.23–2.29 (1.72±0.22)	2–10 (6.13±1.93)	1.03–2.29 (1.39±0.36)	0.61–0.86 (0.74±0.07)	0.50–0.69 (0.59±0.06)	1.14–1.49 (1.25±0.07)
TOTAL	1.34–13.27 (5.31±2.41)	1.01–3.63 (1.60±0.39)	1.72–6.88 (3.53±0.96)	1.01–4.33 (2.07±0.65)	1.08–2.52 (1.71±0.26)	2–23 (8.55±4.17)	1.00–2.48 (1.62±0.33)	0.56–0.87 (0.69±0.06)	0.46–0.72 (0.57±0.05)	1.08–1.49 (1.22±0.06)
<b><i>Galba truncatula</i>:</b>										
Albufera, Valencia, Spain (n = 15 clusters+92 eggs)	2.35–6.54 (4.58±1.29)	1.08–1.30 (1.18±0.06)	1.84–3.69 (2.73±0.53)	1.58–2.48 (2.11±0.26)	1.10–1.66 (1.29±0.18)	2–9 (6.13±2.23)	0.83–1.74 (1.31±0.21)	0.55–0.93 (0.71±0.07)	0.51–0.73 (0.60±0.04)	1.03–1.53 (1.18±0.10)
Oued Tiout, Essaouira, Marruecos (n = 42 clusters+100 eggs)	3.82–11.67 (6.45±1.48)	1.00–1.82 (1.24±0.15)	2.42–4.79 (3.39±0.60)	1.90–3.27 (2.43±0.29)	1.03–2.17 (1.45±0.28)	5–15 (7.81±2.37)	0.81–1.84 (1.21±0.24)	0.62–0.87 (0.75±0.05)	0.52–0.77 (0.62±0.05)	1.09–1.32 (1.20±0.05)
TOTAL	2.35–11.67 (5.95±1.64)	1.00–1.82 (1.22±0.13)	1.84–4.79 (3.29±0.67)	1.58–3.27 (2.34±0.32)	1.03–2.17 (1.41±0.26)	2–15 (7.37±2.43)	0.81–1.84 (1.24±0.23)	0.55–0.93 (0.73±0.06)	0.51–0.77 (0.61±0.05)	1.03–1.53 (1.19±0.08)

Range include minimum and maximum extremes, with mean±standard deviation SD in parentheses. Measurements in mm (area in mm<sup>2</sup>). n=number of specimens measured.

- the morphological similarity of *L. schirazensis* with other lymnaeid species of the *Galba/Fossaria* group indicates it to be a cryptic species by evolutionary convergence, probably as a consequence of adaptation to a similar amphibious way of life and similar habitats;
- the very low intraspecific variability of *L. schirazensis* suggests a very recent worldwide spread from only one original strain and geographical source.

*Galba truncatula* is the lymnaeid species on which the largest number of studies has focused for decades, and one of the snail species with the largest body of literature and longer list of synonyms among molluscs in general. This very wide multidisciplinary body of literature is related to its applied importance as the main vector of *F. hepatica* throughout many countries [12,29], in a life cycle which was the first to be elucidated among trematodes [72]. Thus, it is surprising that another widely distributed lymnaeid species, similar in morphology, biology and ecology, has always been confused with and kept masked under *G. truncatula* until now.

### Species ascription and specimen classification confusion

The very long list of species and varieties described long ago and later synonymised with *G. truncatula* [73] has been reviewed to analyse whether a species description published in the past

could fit the characteristics of the lymnaeid species here in question. The older species name, fully fitting our material, appears to be *Lymnaea schirazensis*, described in 1862–1863 [71] from material collected in the locality of Shiraz, Iran, by von dem Busch who never published the description of his snail material (see Figure S2 and Figure S3). Consequently, the decision has been taken to ascribe the material described herein to the binomial *Lymnaea schirazensis* Küster, 1863. This species cannot be found in the literature published in recent decades. This ‘disappearance’ was undoubtedly due to its synonymy with *G. truncatula*, a proposal of Hubendick [73] apparently accepted by other specialists. *Lymnaea schirazensis* appears to have been given systematic validity and reported separately from *G. truncatula* only in Russia [74].

An exhaustive analysis of the old literature (see numerous references in [73]) suggests that several old species and variety names also synonymised with *G. truncatula* probably referred to *L. schirazensis* instead of to *G. truncatula*. The following items, in chronological order, are worth listing given the geographical locality the type materials came from:

- the four *G. truncatula* varieties distinguished in Algeria [75] suggest that at least one of them could be the species here in question: *major* (not that of Moquin-Tandon) from Mostagha-



**Figure 11. Environments of localities where *Lymnaea schirazensis* was collected:** A) Garden of the Medicine Faculty, Rasht, Gilan province, Iran; B) Taleb Abad river, Bandar Anzali, Iran; C) El Kazza, Behera governorate, Egypt; D) Nules-Moncofar, Castellon province, Spain; E) Albufera of Valencia, Valencia province, Spain; F) Constanza, Departamento de La Vega, the Dominican Republic; G) Río Grande, Constanza, Departamento de La Vega, the Dominican Republic; H) Xalpatlaco, Atlixco, Mexico; I) Escuela A. Obrego, La Trinidad Tepango, Atlixco, Puebla, Mexico; J) Laguna de Fe y Alegría, El Valle, Merida, Venezuela; K) Hotel Valle Grande, El Valle, Merida, Venezuela; L) Guarandauco, Chillolgallo, Ecuador; M) Machachi, Santo Domingo, Ecuador; N) Baños del Inca, Cajamarca, Peru.

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g011

**Table 6.** Characteristics of the first and five first egg clusters laid by experimentally-maintained *Lymnaea schirazensis* specimens of four populations from different geographical origins, followed up from the day of their individual isolation immediately after hatching.

POPULATIONS	SNAILS		CLUSTER Order No.	CLUSTER CHARACTERISTICS						
	Age (prelaying period in days)*	Size (height)**		Area (CA)	Roundness (CR)	Length (CL)	Maximum Width (CW)	CL/CW ratio	No. of eggs/cluster (CEN)	CEN/CA ratio
Tiba, Delengate, Egypt (n = 10 snails)	35–50 (44.30±5.54)	2.84–3.91 (3.45±0.30)	1st	3.79–7.98 (5.94±1.47)	1.26–2.62 (1.93±0.46)	2.74–4.77 (3.79±0.66)	1.83–2.91 (2.41±0.28)	1.09–1.75 (1.58±0.22)	2–12 (6.40±3.17)	0.44–2.06 (1.08±0.50)
			1st to 5th	0.69–10.91 (4.43±2.31)	1.26–4.38 (2.15±0.67)	1.67–4.92 (3.25±0.86)	0.66–3.23 (2.08±0.67)	1.09–2.62 (1.64±0.36)	1–14 (5.23±3.33)	0.39–6.04 (1.35±0.05)
Albufera, Valencia, Spain (n = 10 snails)	25–44 (37.40±6.48)	4.46–5.82 (5.05±0.41)	1st	3.93–7.11 (5.13±1.24)	1.24–2.36 (1.52±0.37)	2.87–4.69 (3.44±0.59)	1.64–2.40 (1.99±0.25)	1.54–2.09 (1.73±0.16)	2–10 (7.40±2.76)	0.50–2.35 (1.45±0.53)
			1st to 5th	2.89–8.10 (5.00±1.29)	1.16–2.36 (1.45±0.21)	2.34–5.09 (3.38±0.56)	1.49–2.42 (1.95±0.23)	1.27–2.10 (1.73±0.16)	2–17 (8.91±2.87)	0.50–3.68 (1.86±0.68)
Esc. Obregon, Trinidad Tep., Mexico (n = 10 snails)	33–41 (35.40±2.67)	3.21–4.33 (4.01±0.31)	1st	1.08–3.73 (2.22±0.84)	1.24–1.71 (1.39±0.13)	1.52–3.07 (2.17±0.49)	0.91–1.64 (1.31±0.21)	1.34–1.94 (1.65±0.18)	4–10 (6.50±1.84)	2.15–5.54 (3.18±1.21)
			1st to 5th	1.08–8.93 (3.35±1.43)	1.19–1.92 (1.37±0.14)	1.52–4.45 (2.68±0.60)	0.91–2.61 (1.60±0.31)	1.34–2.07 (1.68±0.17)	2–10 (6.32±1.66)	0.90–5.54 (2.12±0.93)
Jiutepec, Morelos, Mexico (n = 10 snails)	27–35 (30.80±2.44)	4.51–5.69 (5.04±0.44)	1st	3.14–7.33 (5.08±1.50)	1.31–2.86 (2.09±0.56)	2.44–5.43 (3.73±0.91)	1.58–3.17 (2.18±0.45)	1.21–2.39 (1.74±0.43)	5–13 (9.40±2.88)	1.21–2.64 (1.89±0.50)
			1st to 5th	1.33–9.08 (4.91±1.88)	1.21–3.55 (1.72±0.53)	1.62–5.43 (3.50±0.89)	1.03–3.17 (2.01±0.49)	1.21–2.39 (1.75±0.27)	2–13 (8.66±2.83)	0.40–4.54 (1.97±0.86)
TOTAL(n = 40 snails)	25–50 (36.98±6.64)	2.84–5.82 (4.39±0.78)	1st	1.08–7.98 (4.59±1.89)	1.24–2.86 (1.73±0.49)	1.52–5.43 (3.28±0.93)	0.91–3.17 (1.97±0.51)	1.09–2.39 (1.67±0.27)	2–13 (7.43±2.87)	0.44–5.54 (1.90±1.08)
			1st to 5th	0.69–10.91 (4.40±1.84)	1.16–4.38 (1.63±0.51)	1.52–5.43 (3.18±0.79)	0.66–3.23 (1.89±0.47)	1.09–2.62 (1.70±0.24)	1–17 (7.38±3.06)	0.39–6.04 (1.86±0.91)

Cluster measurement range include minimum and maximum extremes, with mean±standard deviation SD in parentheses. Measurements in mm (area in mm<sup>2</sup>). n=number of specimens measured; \* Days elapsed from day of hatching to day when first cluster was laid; \*\* Length of snail in the day it laid the first cluster. doi:10.1371/journal.pone.0024567.t006

nem, *minutissima* from Alger, Géryville and Bône, *submalleata* from Djelfa, and *lancoolata* from Alger;

- *L. persica* from the same type locality of Shiraz, Iran [76] is a synonym already previously proposed [77];
- *L. hordeum* from River Euphrates, Mesopotamia [78];
- *L. delaunayi* from Pasajes, northern Spain [79];
- the variety *thiesseae* from Euboea, Greece [80] is very probably synonymous; this synonymy was already aptly discussed [81];
- the two varieties *neapolitana* from Sebeto, near Naples, Italy [82] and *telouetensis* from Mount Atlas [83] merit further analysis.

The insufficient original description of *L. zрманjae* from Zрманja river, Dalmatian Croatia [84] may also lead to suspect a synonymy, although erroneously, as the latter indeed belongs to the family Hydrobiidae, as verified by the same author somewhat later (Brusina, 1902 in [85]) (see also Table S1).

These old names proposed in Europe and the Near East should be reviewed, but also more recent ones proposed for similar *Galba/Fossaria* lymnaeids in Europe, Asia and North America, so that further valuable information about the geographical distribution and worldwide spread of *L. schirazensis* can be obtained.

The coexistence with other very similar lymnaeid species of the *Galba/Fossaria* group within the same fascioliasis endemic areas, such as *G. truncatula* in the Old World, and *L. cubensis*, *L. humilis*, *L. cousini* and *L. neotropica* additionally to *G. truncatula* in the New World, suggests that a wider distribution of *L. schirazensis* may have been masked by lymnaeid specimen misclassifications. All of the aforementioned lymnaeids are vectors of fascioliasis and very easily confused when only classified from external characteristics

or by non-expert scientists, mainly when specimens are small or mid-sized [15]. A size larger than the one of *L. schirazensis* is reached by *Galba truncatula* [29], *L. cubensis* [86], *L. humilis* [87], and *L. cousini* [88,89]. Only *L. neotropica* is of a size similar to that of *L. schirazensis* [15]. *Galba truncatula* is present in the Gilan province of Iran [89], in the Nile Delta region [90,91], along the Mediterranean coast of the Valencian Community, Spain [1,92], and in Merida State of Venezuela [93]. *Lymnaea cubensis* is known throughout Hispaniola, including both the Dominican Republic [94] and Haiti [95], Puebla province of Mexico [96] and Merida State of Venezuela [93,97]. *Lymnaea humilis* is the species most frequently mentioned to be involved in fascioliasis transmission in Mexico (see review in [45]), sometimes under the names of *L. modicella* and *L. obrussa* [28,98], both synonymised with *L. humilis* [73], and also reported in Puebla State [96]. *Lymnaea cousini* has been reported in fascioliasis endemic Andean areas of Ecuador [55,73,99], and also in Merida State of Venezuela [88,93]. However, this Venezuelan material later proved to belong to another species, namely *L. meridensis* [55]. *Lymnaea neotropica* has been reported, under the name of *L. viatrix* [15], in several fascioliasis endemic Andean valleys of Peru, as is the case of Cajamarca [100,101].

#### Genotypic and phenotypic differentiation between *L. schirazensis* and *G. truncatula*

Henceforth, when DNA sequencing techniques are used, the molecular differentiation of *L. schirazensis* and *G. truncatula* can be easily made by comparison with the following sequences already available at GenBank/EMBL:

**Table 7.** Life span, selfing reproduction capacity and egg-cluster laying characteristics of isolately-maintained *Lymnaea schirazensis* specimens of four populations from different geographical origins, experimentally followed up from the day of their individual isolation immediately after hatching.

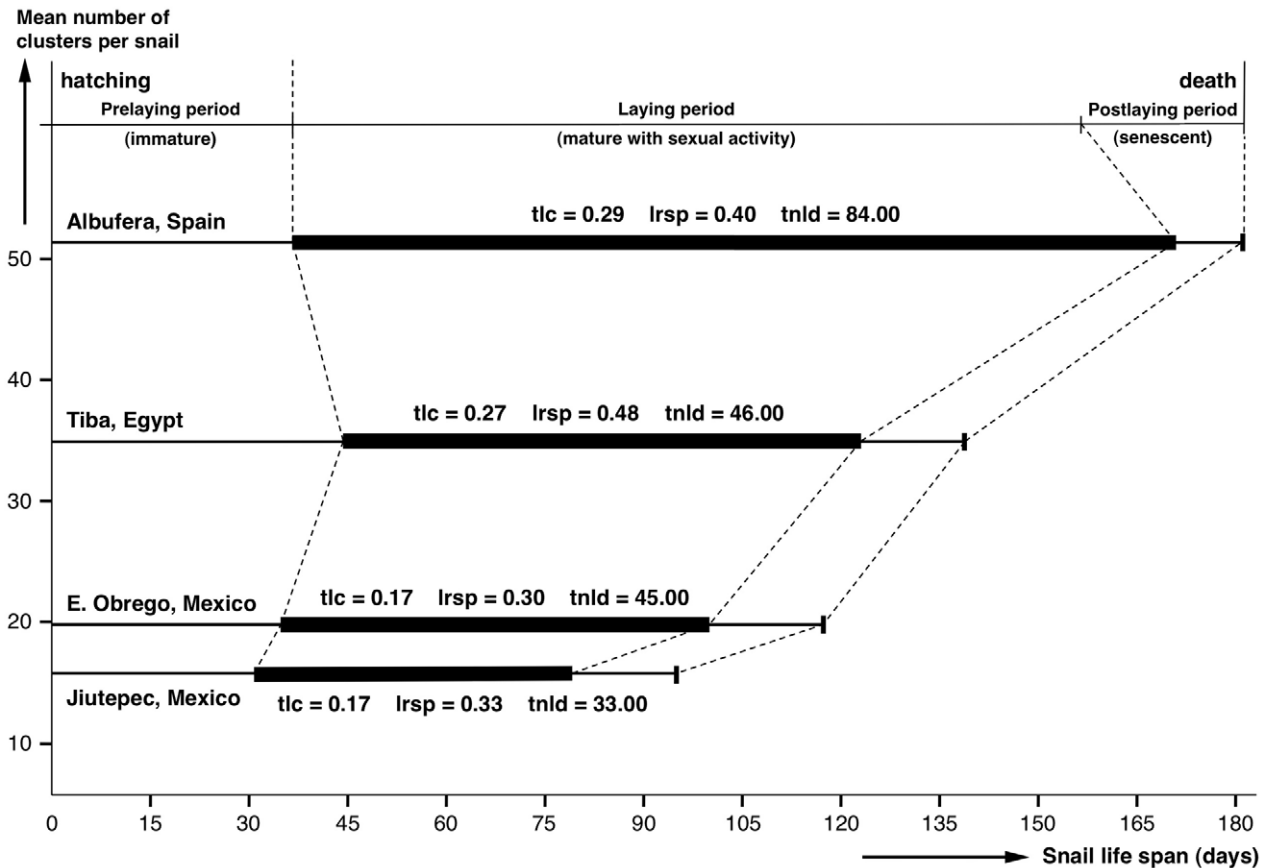
POPULATIONS	Snail life span* (days)	Laying period** (days)	Number of clusters laid per snail	Total laying capacity (No. clusters/life span in days)	Laying rate in sexual period (No. clusters/laying period in days)	No. of days in which only one cluster was laid	No. of days in which two clusters were laid	Total non-laying days within laying period	Max. No. of non-laying days between two laying days	Postlaying period*** (days)
Tilba, Delengate, Egypt (n = 10 snails)	102–198 (138.80±33.88)	51–136 (78.90±26.61)	23–54 (34.80±10.18)	0.12–0.45 (0.27±0.11)	0.21–0.72 (0.48±0.18)	23–46 (32.00±7.00)	0–4 (1.50±1.65)	23–101 (46.00±28.00)	2–36 (12.00±12.00)	6–37 (17.00±11.00)
Albufera, Valencia Spain (n = 10 snails)	157–205 (181.40±16.59)	100–161 (133.70±20.20)	38–70 (51.50±12.62)	0.20–0.43 (0.29±0.07)	0.26–0.60 (0.40±0.12)	37–66 (48.00±10.00)	0–7 (1.90±2.02)	49–112 (84.00±23.00)	6–34 (17.00±11.00)	1–33 (12.00±10.00)
Esc.Obregon, Trinidad T. Mexico (n = 10 snails)	88–139 (117.80±18.60)	45–90 (65.00±16.15)	9–35 (19.90±7.69)	0.10–0.25 (0.17±0.04)	0.20–0.42 (0.30±0.08)	9–35 (19.90±7.69)	0–0 (0±0)	34–69 (45.00±12.00)	6–24 (15.00±7.00)	3–37 (18.00±11.00)
Jiutepec, Morelos Mexico (n = 10 snails)	75–125 (94.80±16.02)	39–69 (48.50±8.61)	13–26 (16.20±3.65)	0.13–0.22 (0.17±0.02)	0.29–0.38 (0.33±0.03)	13–26 (16.00±4.00)	0–1 (0.20±0.42)	25–43 (33.00±5.00)	5–11 (8.00±2.00)	7–49 (17.00±12.00)
TOTAL (n = 40 snails)	75–205 (133.20±38.86)	39–161 (81.53±37.21)	9–70 (30.60±16.63)	0.10–0.45 (0.22±0.09)	0.20–0.72 (0.38±0.13)	9–66 (28.8±14.5)	0–7 (0.90±1.52)	23–112 (51.83±27.00)	2–36 (12.90±9.06)	1–49 (16.03±11.01)

Range include minimum and maximum extremes, with mean±standard deviation SD in parentheses, n = number of specimens measured; \* life span = days elapsed from day of hatching up to day of death; \*\* laying period = days of sexual activity elapsed from first to last days when clusters were laid by the snail specimen, inclusive; \*\*\* postlaying period = time elapsed between last laying day and death.  
doi:10.1371/journal.pone.0024567.t007

- *L. schirazensis*: specific classification can be based on the nucleotide sequences of ITS-2 rDNA, ITS-1 rDNA, mtDNA 16S, and mtDNA *cox1*; for supraspecific classification, the nucleotide sequences of the 18S rDNA and of both ITSs can be used (Table 1); the amino-acid sequence of the mtDNA COX1 protein does not appear to be helpful for any discrimination.
- *G. truncatula*: specific classification can be based on the nucleotide sequences of ITS-2 rDNA [1,15,35]; ITS-1 rDNA [15,35,39], and mtDNA *cox1* [15,57]; for supraspecific classification, the nucleotide sequences of the 18S rDNA [33] and of both ITSs can be used; the mtDNA COX1 amino-acid sequences [15,57] do not appear to be useful at any level.

When DNA sequencing techniques are not available, to avoid further confusion between *L. schirazensis* and *G. truncatula* given the evident difficulty in distinguishing both species due to the morphological variability of their very similar shell, the following differential phenotypic characteristics ought to be considered:

- Shell size: smaller in *L. schirazensis* (Table 4), reaching a shell length of up to 12.00 mm in *G. truncatula* [29], whereas it shows a maximum of only 8.06 mm in *L. schirazensis*; other shell characteristics may be helpful, such as the regularly convex whorls and straight columella in *L. schirazensis* (Figure 7 A–D) when compared to the stepped whorls and folded columella in *G. truncatula* (Figure 13 A–F); however, shell variability may easily give rise to confusion when based only on these aspects;
- Tentacles: of different form, being elongate, slender and with a narrow base in *L. schirazensis* (Figure 8 A–E), whereas they are wider and with a wide base in *G. truncatula* (Figure 13 G);
- Eyes: of different size, being relatively big and markedly larger in *L. schirazensis* than in *G. truncatula* (Figure 13 H,I);
- Egg clusters: of different shape trend, showing an evident trend from kidney- to banana-like, the more curved, elongated and narrow the more numerous are the eggs inside, in *L. schirazensis* (Figure 10 A–O); clusters tend to keep a rounded to oval shape even when containing more eggs, in *G. truncatula* (Figure 10 P–Z);
- Egg number per cluster: although no significant differences were found between both species in our study, according to the literature it appears that a higher mean egg number per cluster of 12–15 may be the usual rule in *G. truncatula*, with exceptions of a lower number depending on the soils of the different areas and sometimes even on the season [29]; this mean number shows a lower level range of around 6–14 in *L. schirazensis* (Table 5);
- Mantle colour: mantle roof from dark brown to blackish throughout, with unpigmented white-greyish round spots, this black pigmentation giving a dark appearance to the shell of living specimens by transparency in *L. schirazensis* (Figure 8 D–I); in *G. truncatula* the hypopeplear region of the mantle roof shows larger unpigmented whitish spots giving a pale appearance to the shell of living specimens by transparency (Figure 13 I–K);
- Radula: first bilateral teeth bicuspid in most populations, although in given populations a small associated denticle appears thus becoming tricuspid in *L. schirazensis*, whereas it appears tricuspid in *G. truncatula*;
- Male organs: with different praeputium length/penis sheath length ratio, which is of 1.20–2.23 (mean 1.60) in *L. schirazensis* (Figure 9 E,F and Figure S1 E,F); in *G. truncatula* the length of the praeputium is 0.82–2.80 mm (mean 1.41 mm) and that of the penis sheath is 0.22–0.64 mm (mean 0.37 mm), with a praeputium length/penis sheath length ratio of 2.50–5.90



**Figure 12. Comparison showing interpopulational differences of mean characteristics of life span and selfing reproduction capacity of isolately-maintained *Lymnaea schirazensis* specimens of four populations from different geographical origins, experimentally followed up from the day of their individual isolation immediately after hatching.** Populations studied: Albufera of Valencia, Valencia, Spain; Tiba, Delengate district, Egypt; Escuela A. Obrego, La Trinidad Tepango, Atlixco, Puebla, Mexico; and Jiutepec, Morelos, Huauchinango, Mexico.  $n = 10$  snail specimens followed per population (for details on intrapopulational variability ranges during the laying period, see Table 6 and Table 7);  $tlc$  = mean total laying capacity (number of clusters/life span in days);  $lrsp$  = mean laying rate in sexually active period (number of clusters/laying period in days);  $tnld$  = mean total non-laying days within laying period. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g012

(mean 3.44), according to data obtained by measuring specimens from Öland, (Sweden), Kühren, Ettenheim and Reusten (Germany), and Scharflinge (Austria) (Figure 13 M,N);

- Ecology: with different water dependence, showing marked amphibious characteristics with a pronounced terrestrial behaviour in *L. schirazensis* (see habitat types in Figure 11 A–M), whereas aquatic inside freshwater borders or amphibious but more water-dependent in *G. truncatula*.

### Phylogenetic relationships and supraspecific classification

The phylogenetic analyses performed (Figure 5 A,B and Figure 6 A,B) confirms the ascription of *L. schirazensis* to the *Galba/Fossaria* group, as already suggested by the morphoanatomic characteristics of this species. Thus, its transfer to the genus *Radix* as proposed by some researchers (e.g., <http://clade.ansp.org/malacology/collections/search.php?mode=browsetypes&targetfamily=Lymnaeinae>) does not appear supported.

Unfortunately, there is great confusion around the generic names proposed for *truncatula* and proximal species in the Americas (the Central American *cubensis*, the North American *humilis* and *bulimoides*, and the South American *viatrix* and *diaphana*, only to

mention the most important), all of which share the capacity of transmitting *F. hepatica* [1]. Besides the genus *Galba* Schrank, 1803 (type species: *truncatula*) [1,14,20,34,102,103], in which it was included [50], other genera having frequently been used to include the New World *Galba/Fossaria* species, such as *cubensis* and *viatrix*, are: *Fossaria* Westerlund, 1885 (type species: *truncatula*) [104–107], *Nasonia* Baker, 1928 (type species: *cubensis*) (see [73]), the subgenus *Fossaria (Bakerilymnaea)* Weyrauch, 1964 (type species: *cubensis*) [104,106,108], and the subgenus *Lymnaea (Afrogalba)* Kruglov et Starobogatov, 1985 (type species: misassigned to *cubensis*; correct type species is *mweruensis* Connolly, 1929) [109].

In the many phylogenetic reconstruction assays performed, *L. schirazensis* appeared in three different positions:

- In the same clade with *L. humilis*, *L. cousini* and *L. meridensis*: That situation was the one obtaining higher support values, appearing in a higher number of phylogenetic trees, and supported by both rDNA (ITSs) and mtDNA (16S–*cox1*) sets. This may support the classification of *L. schirazensis* within the genus *Pseudogalba* Baker, 1913 (new name proposed for *Simpsonia* Baker, 1911; type species: *humilis*) (see [73]). However, the node branching *L. schirazensis* together with *L. humilis*, *L. cousini* and *L. meridensis* never appeared with sufficiently high support values.

**Table 8.** Characteristics and results of experimental infection assays of *Lymnaea schirazensis* from different geographical origins with miracidia from experimentally-reared strains of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* also from different geographical origins.

Experiment No.	Snail strain origin	Infected snail No.	Size of snails infected (height in mm)	<i>Fasciola</i> species used in infection assay	<i>Fasciola</i> strain origin	Miracidial dose (No.)	No. snails surviving at 30 dpi* (%)	Postinfection survival** (days)	Infection results
1	El Kazza, Egypt	30	3.5–5.0	<i>F. hepatica</i>	Pachago, Peru	1	26 (86.67%)	9–152 (81.4)	no snail infected
2	Valencia Albufera, Spain	65	3.5–6.5	<i>F. hepatica</i>	Hosh Essa, Egypt	1	6 (9.23%)	6–70 (17.2)	no snail infected
3	Valencia Albufera, Spain	30	3.5–6.0	<i>F. gigantica</i>	Gizza, Egypt	1	0 (0%)	9–29 (13.0)	no snail infected
4	Valencia Albufera, Spain	117	5.0–7.5	<i>F. gigantica</i>	Gizza, Egypt	1	0 (0%)	9 (9.0)	no snail infected
5	Valencia Albufera, Spain	10	4.5–6.0	<i>F. hepatica</i>	Bialowieza, Poland	1	6 (60%)	23–91 (60.7)	2 snails showing few rediae*** at 23 dpi*
6	Valencia Albufera, Spain	56	4.0–6.5	<i>F. hepatica</i>	Bialowieza, Poland	1	54 (96.4%)	30–111 (65.8)	no snail infected
7	Valencia Albufera, Spain	10	4.6–5.4	<i>F. hepatica</i>	Cajamarca, Peru	3	0 (0%)	17–30 (25.1)	no snail infected
8	Tiba Delengate, Egypt	20	3.6–6.1	<i>F. gigantica</i>	Quy Nhon, Vietnam	1	14 (70.0%)	14–78 (37.7)	no snail infected

\*dpi = days postinfection; \*\* = range include minimum and maximum extremes, with mean in parentheses; \*\*\* = rediae in these two snail specimens never produced cercarial shedding.

doi:10.1371/journal.pone.0024567.t008

- Basal to all other *Galba/Fossaria* members: This situation does not appear to fit any of the genera erected within *Galba/Fossaria* so far.
- Clustering together with *G. truncatula*: This relationship supporting its inclusion in the genus *Galba* is the one appearing in fewer trees.

Consequently, prudence suggests to keep *L. schirazensis* within the genus *Lymnaea sensu lato* for the time being.

### Ecological adaptability, migration capacity and geographical distribution

Ecological characteristics of *L. schirazensis* are peculiar when compared to other Lymnaeidae. The amphibious behaviour differ between lymnaeid groups. *Radix* and stagnicoline species prefer permanent, larger and deeper water bodies, which they leave only sporadically. On the opposite, *Galba/Fossaria* species may be found on mud or wet sites very close to water in both temporary and permanent water bodies [1,5]. This approaches *L. schirazensis* to *Galba/Fossaria*. However, no other lymnaeid shows such a preferential terrestrial behaviour.

Its amphibious characteristic and wide habitat range, mainly its presence in habitats with very small amounts of freshwater, suggest a great adaptation capacity. Additionally, its frequency in antropophilic and man-made habitats and its survival capacity outside water suggests that this snail can be passively transported by livestock and/or human activities, as demonstrated in *G. truncatula* [12], which shows similar habitat characteristics [29].

Selfing in *L. schirazensis* remembers the autofecundation preference in *G. truncatula* [29,110–113] and other *Galba/Fossaria* species (Khoubbane et al., unpublished). Its laying capacity (Table 6 and Table 7) appears to be greater than in *G. truncatula* [29], with a higher number of clusters/month laid per specimen along the laying period. Both selfing and high laying capacity will undoubtedly facilitate its capacity to colonise neighbouring or distant places and expand geographically. Selfing, high egg laying,

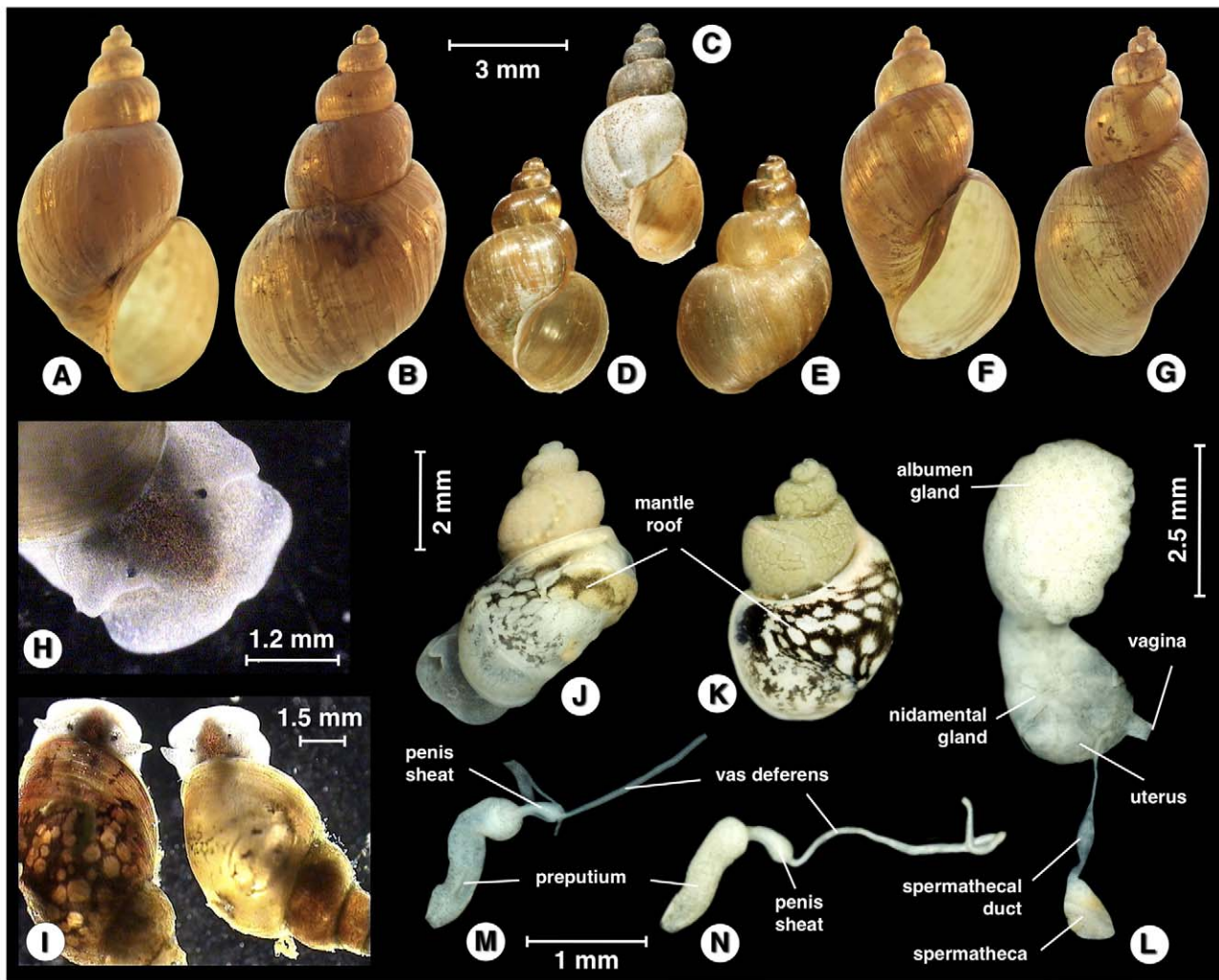
short life span, great spreading and colonisation capacity are typical of r-strategist organisms (see review on r/K selection in [114]).

This suggests that *L. schirazensis* may be far more widespread. Such a wider distribution may not only concern the eight countries noted, but also neighboring countries and others further north or south. However, studies are needed to assess whether its terrestrial life trend, outside water, may restrict its capacity to colonise colder areas, contrary to *G. truncatula* which inhabits high latitude regions [29,73]. In Asia, *L. schirazensis* has been noted to have a distribution covering Iran, Afghanistan, mid-Asia and the Caucasus [74]. Although the geographical proximity suggests that it may be present further away from Iran, the more northern, colder latitudes indicate that a molecular verification of these Asian lymnaeids is indispensable.

### Phylogeography and continental spread during the historical postdomestication period

The wide distribution of *L. schirazensis* in different continents is bewildering. The very low variability in its DNA sequences indicate that such a distribution was reached relatively recently. Molluscs are known to be able to follow long-distance dispersal, transported by migrating birds but mainly by human activities. Certain freshwater snail vectors have been reported even very far away from their area of origin (e.g., different continents) [115], including examples of lymnaeids [12,35,36]. A few bird species cross the Atlantic Ocean [116,117], but the probability of a lymnaeid transport by a bird is very low owing to the low number of bird individuals undertaking this journey every year. Yet, proof of an incredible transequatorial dispersal of snails by birds is there [118].

Evidence suggests that *G. truncatula* may remain in dried mud stuck to the feet of ruminants, then go into hibernation or estivation, and be able to reactivate once in a new location following contact with water or sufficient humidity [12]. Thus, livestock import/export appears related to the continental spread



**Figure 13.** *Galba truncatula*: A–G) Shells in ventral and dorsal views of specimens from Albufera of Valencia in Spain (A,B: 9.33 mm high), Sachsen in Germany (C: 6.20 mm), Nules in Spain (D,E: 6.00 mm), and Qued Tiout in Morocco (F,G: 8.29 mm). H) Eyes and tentacles in living specimen. I) Comparison of living *L. schirazensis* (left) and *G. truncatula* (right) showing differences in (i) eyes, (ii) tentacles and (iii) mantle roof colour through the shell (by infralighting). J,K) Mantle roof in specimens from Nules, Spain (J) and Iran (K). L) Part of reproductive system in ventral view. M,N) Male terminal organs in specimens from Nules, Spain (M) and Iran (N). Scale bars: A–G=3 mm; H=1.2 mm; I=1.5 mm; J,K=2 mm; L=2.5 mm; M,N=1 mm. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g013

of *G. truncatula*. Results from our field and laboratory work suggest that *L. schirazensis* has spread following the same passive transport way of *G. truncatula*: (i) similarity of livestock-frequented habitats (usually found in mud poached by livestock hooves), (ii) long survival outside freshwater (allowing for long distance transport), (iii) selfing (facilitating invasion of new areas), and (iv) high and fast egg laying capacity (facilitating establishment in a new area). Hence, a review of human history, commercial routes and livestock import/export between the countries inhabited by *L. schirazensis* offers a likely way of understanding its recent spread (Figure 14 and Figure 15). This chronological spread shows a clear parallelism with the origin and spread of *F. hepatica* and also in part with the spread followed by *G. truncatula* [12].

**Spreading origin in the Fertile Crescent.** Historical evidence suggests that the original area from where *L. schirazensis* spread may have been in the Near East, around 10,000 years ago at the dawn of the Neolithic in the region known as the Fertile Crescent, including modern-day Israel, Jordan, Lebanon, western

Syria, southeast Turkey, Iraq and western Iran [119]. This region was a major domestication center of livestock, mainly goats and sheep, but also cattle and pigs [120,121]. The presence of *L. schirazensis* in Gilan, Iran, and the probable synonyms of *L. persica* from Shiraz, Iran [76,77] and *L. hordeum* from River Euphrates, Mesopotamia [78] agree with such an origin (Figure 14). This Neolithic culture expanded geographically 6,400 years ago [12].

**Old World spread into Africa, Europe and Asia.** A first spreading of *L. schirazensis* probably occurred into northern Egypt together with sheep and goats from the 7th millenium BC [122,123].

Its introduction into Spain may be related to the extensive use of a Mediterranean route by sea and/or along Mediterranean coastal regions [124]. The genetic diversity in Portuguese sheep suggests a flow from the Fertile Crescent to the Iberian Peninsula, occurred with the Phoenicians, Greeks and/or Romans [125], and also later in the 11th and 12th centuries, without forgetting the well-documented exchange between Iberia and the Maghreb during





**Figure 14. Old World spread of *Lymnaea schirazensis* combined haplotype ITS-2 H1-ITS-1 HA-16S HA-cox1 Ha during the livestock postdomestication 10,000-year period from the "Fertile Crescent" region of origin in the Near East, including expansion route into the New World from southern Spain during the early period of colonization about 500–400 years ago (green lines and red dots).** For historical and archeological data supporting this recent spread, see text. Green dot of Shiraz, Iran = type locality of *L. schirazensis*; black lines = spreading routes into Europe and Africa to cover the geographical distribution suggested by the presumed species and variety synonyms (see text) and "resistant" *Galba truncatula* populations described in France [29]; brown lines = spreading routes into Asia according to the geographical distribution noted by Kruglov [50].

doi:10.1371/journal.pone.0024567.g014

the Moslem period [124]. The high diversity of Iberian goat breeds [126] and cattle migration along the Mediterranean coast [127], further substantiate the importance of the Mediterranean in past livestock movements by connecting Iberia to the Near East, North Africa, and southern Europe [125,128].

These trans-Mediterranean and circum-Mediterranean ancient livestock movements may also explain the likely presence of *L. schirazensis* in Greece, southern Italy, and northern Spain, as well as northwest Africa, namely in Algeria and also Morocco, if the probable synonyms here proposed are molecularly confirmed in the future. The quotations of *L. schirazensis* in Russia [74], if molecularly verified in the future, may be attributable to the ancient exchange between Asian and European sheep [129]. The Silk Road, active from around 138 years BC until the 15th century, connected eastern China with the Near East by three routes through Kirgistan, Tajikistan, Uzbekistan and Turkmenistan [130]. Camels, taurine and zebu cattle were mainly used for the transportation of goods and merchandise [131] (Figure 14).

**Trans-Atlantic spread into the Americas.** The spread of *L. schirazensis* into the Americas may have benefitted from livestock transported by the Spanish conquerors during the early colonisation period. Cattle and sheep were the species most transported, although goats were also included. Livestock continued to be exported from the Old World to the Americas during the 16th, 17th and 18th centuries taking advantage of an intense regular commercial exchange [12].

In the Caribbean, a founding population of approximately 300 cattle was first introduced in Hispaniola in 1493. Cattle mostly originated from Andalusia [132]. Sevilla, with its fluvial port, was the point of ship departure, which suggests that *L. schirazensis* may be present in southern Spain, too. Hispaniola was used as base station for further expeditions [133]. Thus, livestock multiplied pronouncedly on Hispaniola and animals were taken from there and introduced first into Cuba, then Puerto Rico and

later Jamaica [134]. This suggests that *L. schirazensis* may also be present on those large islands, confused with *L. cubensis* as in the Dominican Republic.

By 1525, cattle had already spread throughout much of Central and South America. A similar intense livestock introduction process followed to present-day Mexico, Venezuela and Peru. Livestock was initially imported into Mexico from the Caribbean, mainly Cuba [135] but later also directly from Spain [136]. Thus, Puebla became a thriving agricultural area from the early period [133]. However, South America was colonised "from the back" instead of directly from Europe [133], including first Peru, entering through the northern Tumbes and taking advantage of the rural Andean routes of the Inca people after a maritime route through Panama [133,137]. Later, directly entering through the Caribbean Sea, it was Venezuela, where livestock multiplied in the Merida mountainous area in the 1600s [138]. In the early colonisation period, ship exchange activities between the Peruvian Tumbes area and Mexico and southern Central America took place.

Although a trans-Andean livestock introduction route was launched between western Andean Venezuela and Colombian Bogota and also further southward [139], the introduction of *L. schirazensis* with livestock and humans is very likely to have occurred from northern Peru. Livestock trade between Quito and Lima through Cajamarca became very intense at a certain period [133]. Nevertheless, the presence of *L. schirazensis* in Colombia should not be ruled out, as indeed the only published report of non-infected *G. truncatula* in Aguas Tibias, Purace municipality, Coconuco, may also be a misclassification [140] (Figure 15).

#### Implications for fascioliasis

**A *Galba/Fossaria* species unique due to its unsuitability for fasciolid transmission.** In the fascioliasis endemic areas analysed, our studies demonstrated that the pronouncedly



**Figure 15. New World spread of the different combined haplotypes of *Lymnaea schirazensis* from remote Old World source(s) in Europe (only or mainly southern Spain) during the early period of colonization about 500–400 years ago (green lines and red dots), illustrating the dispersal role played by Hispaniola island.** Combined haplotype ITS-2 H2-ITS-1 HB: (i) origin whether in Mexico itself after introduction from Hispaniola (green broken line) or from an unknown European source (yellow ? broken line), and (ii) subsequent introduction into Ecuador and Peru by a sea route from Mexico. Introduction of ITS-2 H1 in northern Peru whether by a maritime route through southern Central America (Panama isthmus) or by a terrestrial route from Venezuela (alternative dark broken lines). For historical and archeological data supporting this recent spread, and further details on mtDNA gene isolated haplotypes (16S HB and *cox1* Hb, c and d), see text. doi:10.1371/journal.pone.0024567.g015

different susceptibility/resistance characteristics of *Galba/Fossaria* species, initially considered to be related to different strains of both lymnaeids and *F. hepatica*, were indeed due to the presence of a hitherto-overlooked lymnaeid species. This unnoticed species was mixed and confused with *G. truncatula* and other lymnaeids whose transmission capacity was experimentally assessed.

In these areas, a naturally-infected *L. schirazensis* specimen was never found, despite (i) inhabiting localities where high fascioliasis prevalences are known, and (ii) being present in habitats where *G. truncatula* and other *Galba/Fossaria* species are typically found to be infected (e.g., mud frequented by livestock). This absence of natural infection agrees with the total lack of susceptibility to laboratory infection by different geographical strains of *F. hepatica* and *F. gigantica*. Experimental assays have shown that fasciolid larval stages do not develop until cercarial shedding inside *L. schirazensis*. In several experiments, snails showed a short survival after infection, whereas in other assays the long post-infection survival of snails indicated no negative effects due to infection. These results were independent of snail age and size (Table 8).

When considering the infection incompatibility of *L. schirazensis*, its phylogenetic relationships are surprising (Figure 5 and Figure 6).

The phylogenetic trees locate it inside the *Galba/Fossaria* group, whose members are all *F. hepatica* transmitters [15], as *L. humilis* and *L. cousini* [45,55], with which it shares the same branch. The terrestrial trend of *L. schirazensis* may have evolutionarily been the original cause of susceptibility loss due to the very low fasciolid miracidium contact likelihood in a lymnaeid entering water only very sporadically.

**Geographical distribution of *G. truncatula* and other similar *Galba/Fossaria* vector species.** *Lymnaea schirazensis* has always been confused with *G. truncatula* in the Old World (with the exception of Russia and neighbouring countries, where its classifications should, however, be molecularly verified [74]) and with *G. truncatula* or other *Galba/Fossaria* species in the Americas. Hence, the distribution of these *F. hepatica* vectors [29,73] should be re-assessed.

The strict *Fasciola* sp./lymnaeid sp. specificity [1] has allowed for the use of lymnaeid vectors as biomarkers of the distribution of the disease in humans and animals [16,141]. Relationships between lymnaeid vector species and the different epidemiological scenarios and transmission patterns of fascioliasis are worth emphasizing [12]. Factors important for fascioliasis epidemiology

and control such as type of water habitats, population dynamics, temperature thresholds, seasonality, or infection susceptibility differ depending on the different lymnaeid species. Fascioliasis forecast mathematical indices are based on lymnaeid-interacting climatic factors such as air temperature, rainfall/irrigation and/or potential evapotranspiration [7,8,142–144]. Forecasting by Remote Sensing (RS) and Geographical Information System (GIS) methods is based on a more complex suite of lymnaeid-interacting environmental factors, such as surface hydrology, vegetation indices and temperature data [13,145–149]. Henceforth, when evaluating the local accurateness of mapping results, potential confusion of lymnaeid species ought to be verified. Such confusion throughout different zones inside an endemic area may explain local disease data which do not fit lymnaeid distribution maps. Similarly, the parallelism between the geographical distribution of *F. hepatica* and *G. truncatula* in low resolution maps is to be reassessed once more data on the distribution of *L. schirazensis* become available.

**A new biomarker for the follow-up of livestock movements and fascioliasis spread.** Genetic data, and paleontological, archeological and historical records, have shown a worldwide spread linking livestock (transportation, transhumance and trade of mainly cattle, sheep and goats), parasites (*F. hepatica* and *F. gigantica*), and lymnaeid vectors (*G. truncatula*) during the animal post-domestication period (last 10,000 years) [12]. Our results in field and laboratory studies suggest that *L. schirazensis* is another species having been involved in the same evolutionary framework. Its link with livestock movements indicates that *L. schirazensis* may be a good biomarker for the follow-up of fascioliasis spread. Fascioliasis introduction into the Dominican Republic, where *G. truncatula* is absent, is an example.

**Fasciolid susceptibility/resistance in *G. truncatula* and other lymnaeid vectors.** Trematode-snail specificity is a complex phenomenon related to infectivity, susceptibility, resistance, immunity, compatibility, host attraction, finding and recognition, phylogeny, and genetic variability [150]. In *F. hepatica* and *F. gigantica*, lymnaeid spectrum limits are not clear [1,16]. Contradictory results have always been related to different susceptibilities of different allopatric populations [12].

When experimentally comparing different *G. truncatula* populations, all were susceptible to *F. hepatica* infection [26,27,151]. However, different infectivity rates appear regarding the same geographical strain of *F. hepatica*, even including marked snail inter- and intrapopulation differences within a reduced endemic area [152]. Similar results also appear in other lymnaeid species concerning both fasciolids [29,30]. *Galba truncatula* populations never showing cercarial shedding in endemic zones and resistant to *F. hepatica* in the laboratory have been described [29]. Differences in miracidium infection capacity related to different geographical *F. hepatica* strains [153] and different definitive host species [29] have been discussed.

However, assumptions on *F. hepatica*/*G. truncatula* susceptibility/resistance in endemic areas might be erroneous due to overlooked confusion with *L. schirazensis*. In the field, misclassifications can be easily understood due to (i) morphological similarity, (ii) habitat resemblance, and (iii) even mixing of the two species within what appears to be only one population (as in Nules-Moncofar, Spain). In the laboratory, confusion is also easy because in *L. schirazensis* miracidium penetration is successful. Molecular and morphological tools allowing for the distinction of *L. schirazensis* have to be applied henceforth in susceptibility/resistance studies. The three “resistant” *G. truncatula* populations described in France [29,154] are examples to be verified in that way.

**A new laboratory model for studies on susceptibility/resistance in *F. hepatica*/lymnaeid interaction.** Trematode/snail interactions is a research field with disease control applications. *Lymnaea schirazensis* assembles features to become a good model for studies on genomics and proteomics characteristics of resistance to fasciolid infection: A) host attraction, finding and recognition by the *F. hepatica* miracidium take place; B) miracidium penetration and a certain sporocyst-redial development occurs, opening for studies on larval development abortion; C) its genetic link with *Galba/Fossaria* suggests functional aspects and genetic basis of immunological response similar to those in the main *F. hepatica* vectors; D) amphibious resemblance with *Galba/Fossaria* members suggest physiological similarities with the main *F. hepatica* vectors; E) its laboratory rearing is easier than in *G. truncatula* and other *Galba/Fossaria* vectors, owing to: (i) easy adaptation to experimental conditions, (ii) sexual precocity, (iii) high fecundity, (iv) short adult life span, and (v) selfing permitting the launch of genetically pure laboratory strains; F) postinfection survival allows for reinfection assays to assess immunological sensitisation.

## Supporting Information

**Figure S1** Photographs showing soft parts of *Lymnaea schirazensis*: A, B) part of reproductive system in ventral view (prostate removed in B); C) prostate and beginning of vas deferens; D) section of prostate showing absence of internal folds; E, F) male terminal organs. (TIFF)

**Figure S2** Original description of *Lymnaea schirazensis* by Küster in 1863 [71] according to snail materials collected by von dem Busch in the locality of Shiraz, Iran (described under species number 78, page 53, issue 184, year 1863). (TIFF)

**Figure S3** Original figures of *Lymnaea schirazensis* by Küster in 1862 [71] according to snail materials collected by von dem Busch in the locality of Shiraz, Iran (drawings in plate 11: figure numbers 28 and 29 showing natural size specimens and figures 30 and 31 showing enlarged specimen, in issue 182, year 1962). (TIFF)

**Table S1 List of species (and subspecies) of molluscs and trematode parasites included in this study according to the zoological nomenclature, in alphabetical order according to names used in the text.** Clarification notes in brackets; *s.l.* = *sensu lato*. (PDF)

**Table S2 Pairwise distances between rDNA ITS-2 nucleotide sequences according to PAUP, including the *Lymnaea schirazensis* sequences obtained, together with species of the *Galba/Fossaria* group and selected species representing stagnicolines and *Pseudosuccinea* available in GenBank.** Below diagonal = total character differences; above diagonal = mean character differences (adjusted for missing data). (PDF)

**Table S3 Pairwise distances between rDNA ITS-1 nucleotide sequences according to PAUP, including the *Lymnaea schirazensis* sequences obtained, together with species of the *Galba/Fossaria* group and selected species representing stagnicolines and *Pseudosuccinea* available in GenBank.** Below diagonal = total character differences; above diagonal = mean character differences (adjusted for missing data). (PDF)

**Table S4 Pairwise distances between mtDNA *cox1* nucleotide sequences according to PAUP, including the lymnaeid species studied, together with species of the *Galba/Fossaria* group and other proximal lymnaeid species available in GenBank (only *cox1* sequence fragments of a length similar to that of sequences obtained in present paper).** Below diagonal = total character differences; above diagonal = mean character differences (adjusted for missing data). Haplotype codes only provisional due to incomplete sequences of the gene.  
(PDF)

**Table S5 Lymnaeid shell measurement comparison between different experimentally-maintained populations of *Lymnaea schirazensis* from different geographical origins of Mexico.** Range include minimum and maximum extremes, with mean  $\pm$  standard deviation SD in parentheses. Measurements in mm. n = number of specimens measured.  
(PDF)

## Acknowledgments

The authors dedicate this article to Dr. Daniel Rondelaud (Limoges, France), at the occasion of his retirement, a scientist who significantly

## References

- Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, et al. (2001) European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect Genet Evol* 1: 85–107.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 35: 1255–1278.
- World Health Organization (1995) Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series 849: 1–157.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2008) Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev Sci Tech* 27: 443–457.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet Parasitol* 163: 264–280.
- Ollerenshaw CB, Smith LP (1969) Meteorological factors and forecast of helminthic diseases. *Adv Parasitol* 7: 283–232.
- Ollerenshaw CB (1974) Forecasting liver-fluke disease. In: Taylor AR, Muller R, eds. *The Effects of Meteorological Factors upon Parasites*, Symposium of the British Society for Parasitology. Vol. 12. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp 33–52.
- Fuentes MV, Valero MA, Bargues MD, Esteban JG, Angles R, et al. (1999) Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 835–850.
- Valero MA, 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 MA, Darce NA, 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 (1-2): 85–100.
- Mas-Coma S (2005) Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 79: 207–216.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69: 41–146.
- Fuentes MV, Malone JB, Mas-Coma S (2001) Validation of a mapping and predicting model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Trop* 79: 87–95.
- Bargues MD, Horak P, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, et al. (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 MD, Artigas P, Mera y Sierra R, Pointier JP, Mas-Coma S (2007) 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 MD, Mas-Coma S (2005) Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J Helminthol* 79: 257–267.
- Burch JB (1968) *Erimna newcombi* of Hawaii and *Limnaea onychia* of Japan. *Malacol Rev* 1: 15–30.
- Burch JB, Lindsay GK (1973) Apparent hybrids from a laboratory culture of *Lymnaea stagnalis* and *Bulinna megasoma*. *Malacol Rev* 6: 61–62.
- Samadi S, Roumeigoux A, Bargues MD, Mas-Coma S, Yong M, et al. (2000) Morphological studies of lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. *J Moll Stud* 66: 31–44.
- Glöer P, Meier-Brook C (1998) Süßwassermollusken. Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland (12th Edition). Hamburg: Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung. 136 p.
- International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) (1998) Opinion 1896. *Galba* Schrank, 1803 (Mollusca, Gastropoda): *Buccinum truncatum* Müller, 1774 designated as the type species. *Bull Zool Nomencl* 55: 123.
- Wright CA (1973) Flukes and snails. New York: Macmillan.
- Kalbe M, Haberl B, Haas W (1997) Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitol Res* 83: 806–812.
- Adema CM, Loker ES (1997) Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In: Fried B, Graczyk TK, eds. *Advances in Trematode Biology*. Boca Raton: CRC Press, pp 229–253.
- Rollinson D, Southgate VR (1985) Schistosome and snail populations: genetic variability and parasite transmission. In: Rollinson D, Anderson RM, eds. *Ecology and Genetics of Host-Parasite Interactions*. London: Academic Press, pp 91–109.
- Boray JC (1966) Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. *Ann Trop Med Hyg* 60: 114–124.
- Boray JC (1978) The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. *Vet Parasitol* 4: 127–141.
- Perez-Reyes R, Jimenez-Nava JJ, Varela-Ramirez A (1985) Fascioliasis en el Estado de Chihuahua, México. I. Susceptibilidad de *Fossaria modicella* (Say, 1825), huésped intermedio local. *Rev Latino-Amer Microbiol* 27: 367–372.
- Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G (2009) La limnée tronquée, un mollusque d'intérêt médical et vétérinaire. Limoges: Presses Universitaires de Limoges. 283 p.
- Kendall SB, Parfitt JW (1959) Studies on the susceptibility of some species of *Lymnaea* to infection with *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Ann Trop Med Parasitol* 53: 220–227.
- Gutierrez A, Pointier JP, Yong M, Sanchez J, Theron A (2003) Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba. *Parasitol Res* 90: 129–134.
- Ueno H, Arandia R, Morales G, Medina G (1975) Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano region of Bolivia. *Nat Inst Anim Health Quart* 15: 61–67.

33. Bargues MD, Mas-Coma S (1997) Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 14: 569–577.
34. Bargues MD, Mangold AJ, Muñoz-Antoli C, Pointier JP, Mas-Coma S (1997) SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *J Parasitol* 83: 1086–1092.
35. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD (2001) *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 123: S115–S127.
36. Pointier JP, Cousteau C, Rondelaud D, Theron A (2007) *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitol Res* 101: 1389–1392.
37. Stothard JR, Bremond Ph, Andriamaro L, Loxton NJ, Sellin B, et al. (2000) Molecular characterization of the freshwater snail *Lymnaea natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) on Madagascar with an observation of an unusual polymorphism in ribosomal small subunit genes. *J Zool* 252: 303–315.
38. Remigio EA, 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.
39. Bargues MD, Artigas P, Jackiewicz M, Pointier JP, Mas-Coma S (2006) Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda). *Heldia* 6: 29–40.
40. Pusednik L, Ponder WF, Dowton M, Davis AR (2009) Examining the phylogeny of the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. *Mol Phylogenet Evol* 52: 643–659.
41. Gutierrez A, Pointier JP, Fraga J, Jobet E, Modat S, et al. (2003) *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Exper Parasitol* 105: 211–218.
42. Remigio EA, Blair D (1997) Molecular systematics of the freshwater snail family Lymnaeidae (Pulmonata: Basommatophora) utilising mitochondrial ribosomal DNA sequences. *J Moll Stud* 63: 173–185.
43. Remigio EA (2002) Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitol Res* 88: 687–696.
44. Remigio EA, Hebert PD (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Mol Phylogenet Evol* 29: 641–647.
45. Bargues MD, Artigas P, Dillon RT Jr., Mas-Coma S (2011) Fascioliasis in North America: multigenic characterization of a major vector and evaluation of the usefulness of rDNA and mtDNA markers for lymnaeids. *PLoS ONE*. In press.
46. Mas-Coma S, Bargues MD (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.
47. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. Vols. I, II & III: 1647.
48. Simon C, Franke A, Martin A (1991) The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW, eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag, pp 329–355.
49. 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 Marine Biol Biotech* 3: 294–299.
50. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467.
51. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673–4680.
52. Tamura K, Dudley J, Nei MB, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
53. Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2001) Sequence assembly and finishing methods. *Methods Biochem Analysis*, 43: 302–322.
54. Swofford DL (2002) PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other Methods). Version 4. Computer program distributed by the Smithsonian Institution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
55. Bargues MD, Artigas P, Khoubbane M, Mas-Coma S (2011) DNA sequence characterisation and phylogeography of *Lymnaea cousini* and related species, vectors of fascioliasis in northern Andean countries, with description of *Lymnaea meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasites & Vectors* 4: 132.
56. Wethington AR, Lydeard C (2007) Molecular phylogeny of Physidae (Gastropoda: Basommatophora) based on mitochondrial DNA sequences. *J Moll Stud* 73: 241–257.
57. 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.
58. Mera y Sierra R, Artigas P, Cuervo P, Deis E, Sidoti L, et al. (2009) Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Vet Parasitol* 166: 73–79.
59. Winnepennickx B, Backeljau T, Van de Peer Y, De Wachter R (1992) Structure of the small ribosomal subunit RNA of the pulmonate snail, *Limnolalia kambeul*, and phylogenetic analysis of the Metazoa. *FEBS Letters* 309: 123–126.
60. De Rijk P, Neefs JM, Van de Peer Y, De Wachter R (1992) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl Acids Res* 20: 2075–2089.
61. Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *Ieee Trans Autom Cont* 19: 716–723.
62. Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53: 793–808.
63. Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
64. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
65. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
66. Lin CP, Danforth BN (2004) How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol Phylogenet Evol* 30: 686–702.
67. Ballard JWO, Rand DM (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Ann Rev Ecol Evol System* 36: 621–642.
68. De Jong RJ, Morgan JAT, Paracense WL, Pointier JP, Amarista M, et al. (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.
69. Valero MA, Panova M, Mas-Coma S (2005) Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *J Helminthol* 79: 217–225.
70. Anonymous (2001) The proven solution for image analysis. Image-Pro® Plus, Version 4.5 for Windows™, Start-Up Guide. Silver Spring: Media Cybernetics, Inc. 8/1-8/16.
71. Küster HC (1862) Die Gattungen *Limnaeus*, *Amphipeplea*, *Chilina*, *Isidora* und *Physopsis*. In: Martini, Chemnitz, eds. *Systematisches Conchylien-Cabinet* 2nd Edition, Bauer & Raspe, Nürnberg I.17 b: issues 180-182: 1-48pls. 1-11 (1862); issue 184: 49-77, pl. 12 (1863).
72. Andrews SJ (1999) The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, ed. *Fasciolosis*. Wallingford Oxon: CAB International Publishing, pp 1–29.
73. Hubendick B (1951) Recent Lymnaeidae. variation Their, morphology, taxonomy, nomenclature, eds. and distribution. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, Fjärde Serien* 3: 1-223+5 pl.
74. Kruglov ND (2005) Molluscs of the Family Lymnaeidae (Gastropoda, Pulmonata) in Europe and Northern Asia. Smolensk: SGPU Publishing, 507 p.
75. Bourguignat JR (1863) Malacologie de l'Algérie ou histoire naturelle des animaux mollusques terrestres et fluviatiles recueillis jusqu'à ce jour dans nos possessions du nord de l'Afrique. Paris: Challamel Ainé. Tome 1: fasc. 1: 1-80, pls. I-VIII (May 1863); fasc. 2: 81-192, pls. IX, X, XIII-XVIII (June 1863); fasc. 3: 193-294 pls. XI, XII, XIX-XXXII (Nov. 1863); Tome 2: fasc. 4: 1-144, pls. I-V, VII (Jan. 1864); fasc. 5: 145-232, pls. VI, VIII-XI, XV, XVI, XVIII-XXVI (Apr. 1864); fasc. 6: I-XII (to be bound prior to fasc. 1) (with replacement pages 9-32 in fasc. 1) 233-380, cartes 1-4, pls. XII-XIV, XVII (Dec. 1864).
76. Sowerby GB II (1872) Monograph of the genus *Limnaea*. In: G.B. Sowerby II. *Conchologia Iconica*. London: L. Reeve & Co. 18 (1872-1873): Title+15 plates with descriptive letterpress+2. Index.
77. Westerlund CA (1885) *Fossaria* W. In: Fauna der in der Paäarctischen Region lebenden Binnenconchylien. V. Fam. Succinidae, Auriculidae, Limnaeidae, Cyclostomidae & Hydrocenidae. Lund: Hakan Ohlsson's Buchdruckerei. pp 49–53.
78. Mousson A (1874) Coquilles terrestres et fluviatiles recueillies par M. le Dr Alex. Schlaefli en Orient. *J Conchyliol Paris* 22: 5–60.
79. Folin L de (1878) Description d'une espèce nouvelle appartenant au genre *Limnaea*. *J Conchyliol Paris* 3ème Sér. Tome 18 Vol. 26: 329-330, pl. X, fig. 3.
80. Clessin S (1879) Aus meiner Novitäten-Mappe. *Malakozoologische Blätter, Neue Folge*, 1: 3-16, pl. 1.
81. Clessin S (1880) Die Gruppe der *Limnaea truncatula*. *Malakozoologische Blätter, Neue Folge*, 3 (1881): 77–85.
82. Bellini R (1904) The freshwater shells of Naples and the neighbourhood. *J Conchol* 11: 33–44.
83. Pallary P (1922) Faune malacologique du Grand Atlas. *J Conchyliol Paris* 66, 30 March 1921, 2: 89-154, pls 3-5; 20 June 1921, 3: 185–217.
84. Brusina S (1866) Contribuzione pella fauna dei molluschi Dalmati. *Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien, Vienna*, 16, Beigabe zu Heft 1/2: [3]+134 p., 1 pl.
85. Schlickum WR (1974) Die Gattung *Tanousia* Servain. *Archiv für Molluskenkunde, Frankfurt am Main* 104: 73–79.
86. Yong M, Gutierrez A, Perera G, Sanchez J (1995) Tablas de vida de tres poblaciones de *Fossaria cubensis* (Pulmonata: Lymnaeidae) en condiciones de laboratorio. *J Med Appl Malacol* 7: 17–22.
87. McCraw BM (1961) Life history and growth of the snail *Lymnaea humilis* Say. *Trans Amer Microscop Soc* 80: 16–27.
88. Pointier JP, Noya O, Amarista M, Theron A (2004) *Lymnaea cousini* Jousseaume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae): first record for Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 567–569.

89. Ashrafi K, Massoud J, Holakouie Naieni K, Jo-Afshani MA, et al. (2007) Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. Iranian J Publ Health 36: 42–49.
90. Van Damme D (1984) The freshwater mollusca of Northern Africa-Distribution, biogeography and paleoecology. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers. 164 p.
91. Brown D (1994) Freshwater Snails of Africa and Their Medical Importance. 2nd Edition. London: Taylor & Francis Ltd. 608 p.
92. Valero MA, Marti R, Marcos MD, Robles F, Mas-Coma S (1998) Le mollusque *Lymnaea truncatula* (Lymnaeidae) dans les rizières de l'Est de l'Espagne. Vie et Milieu, 48: 73–78.
93. Pointier JP, Noya O, Alarcon de Noya B, Theron A (2009) Short Communication: Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of *Fasciola hepatica* in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 790–796.
94. Gomez JD, Vargas M, Malek EA (1986) Freshwater mollusks of the Dominican Republic. The Nautilus 100: 130–134.
95. Robart G, Mandahl-Barth G, Ripert C (1976) Inventaire, repartition géographique et écologie des mollusques dulçaquicoles d'Haiti (Caraïbes). Haliotis 8: 159–171.
96. Rojas-García R (2000) Estudio de las especies del género *Fossaria* Westerlund 1885 (Gastropoda: Pulmonata) de las cuencas Atoyac y Nexapa del Estado de Puebla. Tesis para la Obtención del Título de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico. 58 p.
97. Morales G, Pino LA (1983) Infection de *Lymnaea cubensis* par *Fasciola hepatica* dans une région d'altitude, au Venezuela. Ann Parasitol Hum Comp 58: 27–30.
98. Mazzotti L (1955) *Lymnaea obrussa* Say, intermediate host of *Fasciola hepatica*. Rev Inst Salub Enf Trop México 15: 163–165.
99. Villavicencio A, Carvalho de Vasconcellos M (2005) First report of *Lymnaea cousini* Jousseau, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 735–737.
100. Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Amoros C, Delgado E, et al. (1997) The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. Parasitol Int 46: 281–288.
101. Claxton JR, Sutherst J, Ortiz P, Clarkson MJ (1999) The effect of cyclic temperatures on the growth of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea viatrix*. Vet J 157: 166–171.
102. Jackiewicz M (1998) European species of the family Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora). Genus 9: 1–93.
103. Falkner G, Ripken TEJ, Falkner M (2002) Mollusques continentaux de France. Liste de référence annotée et bibliographique. Patrimoines Naturels (Mus Nat d'Hist Nat Paris) 52: 1–350.
104. Burch JB (1982) Freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) of North America (North of Mexico). Cincinnati, Ohio: Environmental monitoring and support laboratory office of research and development. Environmental Protection Agency. 249 p.
105. Malek EA (1985) Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Washington: Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 478 p.
106. Burch JB, Cruz-Reyes A (1987) Clave genérica para la identificación de Gasterópodos de agua dulce en México. México DF: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma (UNAM). 46 p.
107. Cruz-Reyes A, Malek EA (1987) Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 24: 203–210.
108. Burch JB (1982) North American freshwater snails. Identification keys, generic synonymy, supplemental notes, glossary, references, index. Walkerana Trans POETS Soc 1: 216–365.
109. Kruglov ND, Starobogatov YI (1985) The volume of the subgenus *Galba* and of the other *Lymnaea* (Gastropoda, Pulmonata) subgenera, similar to it. Zoologich Zh 64: 24–35.
110. Meunier C, Tirard C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Bargues MD, et al. (2001) Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. Mol Ecol 10: 1333–1340.
111. Meunier C, Hurtrez-Bousses S, Jabbour-Zahab R, Durand, Rondelaud D, et al. (2004) Field and experimental evidence of preferential selfing in the freshwater mollusc *Lymnaea truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). Heredity 92: 316–322.
112. Meunier C, Hurtrez-Bousses S, Durand P, Rondelaud D, Renaud F (2004) Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). Mol Ecol 13: 2535–2543.
113. Trouve S, Degen L, Goudet J (2005) Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. J Evol Biol 18: 358–370.
114. Mas-Coma S, Bargues MD, Gracenea M, Montoliu I (1987) Las estrategias etoológicas generales y específicas en el ciclo biológico de los Digénidos Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylaimoidea) y el concepto de selección r/K. In: Sans-Coma V, Mas-Coma S, Gosálbez J, eds. Mamíferos y Helmintos. Volumen Homenaje al Prof. Dr. Dr. Herman Kahmann en su 81 Aniversario. Barcelona: Ketres Editora, S.A. pp 253–317.
115. Madsen H, Frandsen F (1989) The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. Acta Trop 46: 139–146.
116. Cramp S, Simmons KEL (1977) Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: the Birds of the Western Palearctic. Oxford: Oxford University Press.
117. Kear J (2005) Bird Families of the World: Ducks, Geese, Swans and Screamers. Oxford: Oxford University Press.
118. Gittenberger E, Groenenberg DSJ, Kokshoorn B, Preece RC (2006) Molecular trails from hitch-hiking snails. Nature 439: 409.
119. Mac Hugh DE, Bradley DG (2001) Livestock genetic origins: goats buck the trend. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 5382–5384.
120. Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutierrez-Gil B, San Primitivo F, et al. (2005) Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. Proc Roy Soc B 272: 2211–2217.
121. Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, et al. (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 5927–5932.
122. Clark D (2004) Africa. In: De Laet SJ, director. Historia de la Humanidad, Prehistoria e Inicios de la Civilización. La aparición del Hombre. Paris-London: Editorial Planeta-UNESCO, Vol. 1: 210–224.
123. Bökönyi S (2004) Domesticación de los animales del inicio de la producción de alimentos hasta hace aproximadamente 5.000 años: una visión general. In: De Laet SJ, director. Historia de la Humanidad, Prehistoria e Inicios de la Civilización. La aparición del Hombre. Paris-London: Editorial Planeta-UNESCO, Vol. 1: 392–398.
124. Pereira F, Davis SJM, Pereira L, McEvoy B, Bradley DG, et al. (2006) Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. Mol Biol Evol 23: 1420–1426.
125. Gamrani M (2008) Chroniques africaines. In: Blandin C, ed. L'Atlas des Migrations-Les Routes de l'Humanité. Paris: Le Monde Hors-Série, Monde SA, Malesherbes Publications SA and Sciences-Po. pp 28–29.
126. Pereira F, Pereira L, Van Asch B, Bradley DG, Amorim A (2005) The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (*Capra hircus*) breeds: high diversity of female lineages at the western fringe of European distribution. Mol Ecol 14: 2313–2318.
127. Cymbron T, Freeman AR, Malheiro MI, Vigne JD, Bradley DG (2005) Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. Proc Roy Soc London B 272: 1837–1843.
128. Duchemin I (2008) La grande épopée arabo-musulmane. In: Blandin C, ed. L'Atlas des Migrations-Les Routes de l'Humanité. Paris: Le Monde Hors-Série, Monde SA, Malesherbes Publications SA and Sciences-Po. pp 24–25.
129. Chen SY, Duan ZY, Sha T, Xiangyu J, Wu SF, et al. (2006) Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. Gene 376: 216–223.
130. De la Brosse G (2008) En suivant le fil de la soie. In: Blandin C, ed. L'Atlas des Migrations-Les Routes de l'Humanité. Paris: Le Monde Hors-Série, Monde SA, Malesherbes Publications SA and Sciences-Po. pp 38–39.
131. Bulliet RW (2004) Comunicación y transporte. In: Al-Bakhit MA, Bazin L, Cissoko SM, directors. Historia de la Humanidad, Del Siglo VII al Siglo XVI. Del Nacimiento del Islam al Descubrimiento de América. Paris-London: Editorial Planeta-UNESCO, Vol. 4: 95–109.
132. Mirol M, Giovambattista G, Liron JP, Dulout FN (2003) African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. Heredity 91: 248–254.
133. Serrera RM (1990) La conquista. In: Dominguez A, director. Historia de España. Vol. 8 DescubrimientoColonización y Emancipación de América. Barcelona: Editorial Planeta S.App. pp 127–185.
134. Moya Pons F (2008) Historia del Caribe. Azúcar y Plantaciones en el Mundo Atlántico. Santo Domingo: Editora Búho. 540 p.
135. Diaz del Castillo B (1955) Historia Verdadera de la Conquista de la Nueva España. Buenos Aires: Espasa-Calpe, Colección Austral.
136. Benavente T de (1994) Relaciones de la Nueva España. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
137. Lavalley B (2005) Francisco Pizarro y la conquista del Imperio Inca. Pozuelo de Alarcón: Editorial Espasa Calpe S.A. 338 p.
138. Simon P (1992) Noticias Historiales de Venezuela, Tomo II. Caracas: Biblioteca Ayacucho. 491 p.
139. Oviedo y Baños J de (1965) Historia de la Conquista y Población de la Provincia de Venezuela. G Morón, ed. editor. Madrid: Ediciones Atlas. Vol. 2 p. 82 and Vol. VII p. 233.
140. Longo M, Zamora H, Vasquez R, Velasquez LE (2005) Aspectos ecológicos de *Limnaea* (Mollusca: Lymnaeidae) en la region de Aguas Tibias, municipio de Purace-Coconuco. Rev Asoc Colombiana Cien Biol 17: 47–58.
141. Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, et al. (1999) The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. Trop Med Int Health 4: 454–467.
142. Malone JB, Williams TE, Muller RA, Geaghan JP, Loyacano AF (1987) Fascioliasis in cattle in Louisiana: development of a system to predict disease risk by climate, using the Thornthwaite water budget. Am J Vet Res 48: 1167–1170.
143. Malone JB, Gommers R, Hansen J, Yilma JM, Slingenberg J, et al. (1998) A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in east Africa based on Food and Agriculture Organization databases. Vet Parasitol 78: 87–101.

144. Durr PA, Tait N, Lawson AB (2005) Bayesian hierarchical modelling to enhance the epidemiological value of abattoir surveys for bovine fasciolosis. *Prevent Vet Med* 71: 157–172.
145. Huh OK, Malone JB (2001) New tools: potential medical applications of data from new and old environmental satellites. *Acta Trop* 79: 35–47.
146. Malone JB, Yilma JM (1999) Predicting outbreaks of fasciolosis: from Ollerenshaw to satellites. In: Dalton JP, ed. *Fasciolosis*. Wallingford, Oxon: CAB International Publishing, pp 151–183.
147. Tum S, Puotinen ML, Skerratt LF, Chan B, Sothoeun S (2007) Validation of a geographic information system model for mapping the risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Vet Parasitol* 143: 364–367.
148. Rapsch C, Dahinden T, Heinzmann D, Torgerson PR, Braun U, et al. (2008) An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Vet Parasitol* 154: 242–249.
149. Dutra LH, Molento MB, Naumann CRC, Biondo AW, Fortes FS, et al. (2009) Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet Parasitol* 169: 76–81.
150. Lockyer AE, Jones CS, Noble LR, Rollinson D (2004) Trematodes and snails: an intimate association. *Can J Zool* 82: 251–269.
151. Boray JC (1969) Experimental fascioliasis in Australia. *Adv Parasitol* 7: 95–210.
152. Rondelaud D (1993) Variabilité interpopulationnelle de l'infestation fasciolienne chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. Influence du contact préalable de la population avec le parasite. *Bull Soc Zool France* 118: 185–193.
153. Gasnier N, Rondelaud D, Abrous M, Carreras F, Boulard C, et al. (2000) Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *Int J Parasitol* 30: 573–578.
154. Rondelaud D, Dreyfuss G, Vareille-Morel C, Moukrim A (1997) Les populations de *Lymnaea truncatula* Müller vivant sur les berges des rivières. Etude expérimentale de leur aptitude à l'infestation par *Fasciola hepatica* Linné. *Rev Méd Vét Toulouse* 148: 329–332.



6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
**LIMNOLOGY AND AQUATIC BIRDS**  
*Monitoring, Modelling and  
Management*

HUESCA, Spain, 27-30 October 2009

---





6<sup>th</sup> International  
Symposium on  
Limnology and  
Aquatic Birds

6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM

HUESCA, Spain, 27-30 October 2009

# LIMNOLOGY AND AQUATIC BIRDS

Monitoring, Modelling and Management

---



CSIC



GOBIERNO  
DE ARAGON

Departamento de Ciencia,  
Tecnología y Universidad



SIL Working Group on Limnology and Aquatic Birds

6th International Symposium  
on  
Limnology and Aquatic Birds:  
Monitoring, Modelling and Management

Huesca, Spain.  
26-31 October 2009

**PROCEEDINGS**

# Presence of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in wild populations of *Galba truncatula*, main vector of Fascioliasis in Europe

Artigas P., M. Khoubbane, R. Flores, F. Urrea, M.D. Bargues & S. Mas-Coma

Department of Parasitology, University of Valencia, Av. V.A. Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. (Patricio.Artigas@uv.es)

## INTRODUCTION

*Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) is an oligochaete that is normally found in many freshwater snails, living as commensal or parasite, arranged preferably in the mantle cavity, or lung cavity housed in the mucosa of the foot<sup>1,2</sup>. This organism feeds on particles that are removed by snails and invertebrates that swim nearby<sup>3</sup>.

Several studies suggest that *C. limnaei* could prevent infection by the major disease-causing parasitic flukes which may cause important health and economic problems such as schistosomiasis and fascioliasis<sup>1,4-6</sup>.

The study of fascioliasis requires, in many instances, to establish an experimental culture of *Galba truncatula* from wild populations<sup>7</sup>.

## METHODS

For the present study, 500 wild snails were collected, not infected by trematodes, from 3 different ecotopes of Burriana - Castellon, Spain. They were morphologically identified as *G. truncatula* and confirmed by sequencing of the second internal transcribed spacer (ITS-2) of rDNA.

### Molecular technique

The rDNA ITS-2 sequence was obtained from 6 lymnaeid specimens collected, 2 for each locality. DNA extraction procedure steps were performed according to methods outlined previously<sup>8,9</sup>. Total DNA was isolated according to the phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation method, the ITS-2 fragment was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR), sequencing performed by the dideoxy chain-termination method, and sequences were aligned using CLUSTAL-W version 1.8<sup>8,9</sup>. The following ITS-2 sequences present in GenBank were used for comparisons: *G. truncatula* haplotype H-1 of Spain, Portugal and Corsica (France) (Accession No. AJ296271)<sup>10</sup>, *G. truncatula* haplotype H-2 of Spain, Portugal and Switzerland (Accession No. AJ243017)<sup>10</sup>. Homologies were performed using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### Taxonomic identification

The taxonomic identification of Naididae individuals was carried out according to Brinkhurst (1971)<sup>11</sup> and Brinkhurst & Jamieson (1971)<sup>12</sup>. Phenotypes were analyzed using standard microscopy and documented using a Nikon SMZ-1500 stereo microscope and Sony Camcorder SSC-DC80p.

### Support and maintenance conditions

They were kept along with a control group ( $n=200$ ) from the same source, in a climatic chamber at 20°C temperature, 90% RH and a photophase of 12h/12h day/night. The snails were fed with lettuce *ad libitum*.

## RESULTS AND DISCUSSION

A single observation under the microscope was performed every 3 days. The first day, 76% were colonized by *C. limnaei* (4-20;  $10.82 \pm 4.03\sigma^2$ ). A greater parasitic load in the larger snails was observed. Moreover, the remaining 24% showed to be parasite-free individuals whose size was less than 2 mm.

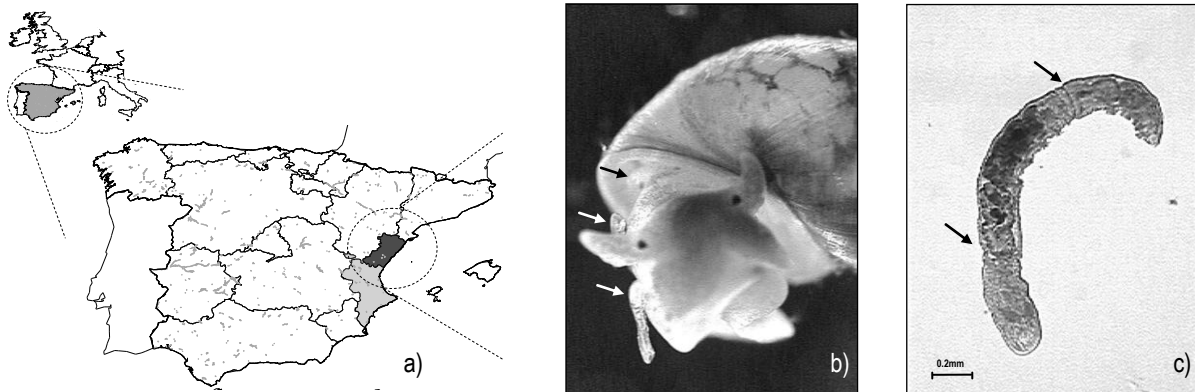


Fig. 1. Sample location map (a); *C. limnaei* arranged in the mantle cavity (black arrow), and the mucosa of the foot (white arrows) in *G. truncatula* (b); An alive specimen of *C. limnaei* undergoing partial longitudinal contraction, fission zones (black arrow), dorsal setae absent.

## CONCLUSIONS

Individuals with *C. limnaei* showed a maximum of 2 weeks of survival compared with the control group (12 weeks average). Moreover, the oligochaete-free individuals appeared to be smaller (less than 2 mm). This could be explained by the need of minimal space for the oligochaete to be attached in the mantle cavity or the mucosa of the foot. Then, it could be possible to obtain a oligochaete-free colony *in vitro* of *G. truncatula* only by the selection of the smaller individuals (those who are less than 2mm).

Although this lower survival rate seems to not alter the ability for egg-laying, the establishment of experimental cultures with these *C. limnaei*-carrying snails appears to be more difficult and requires a longer procedure.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Studies funded by Projects Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET (Projects Nos. C03/04, ISCIII2005-PI050574 and ISCIII-RETIC RD06/0021/0017, Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa), FIS, Ministerio de Sanidad, Madrid, and Projects No. BOS2002-01978 and No. SAF2006-09278 of Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid.

## REFERENCES

1. Fashuyi S.A., Williams M.O. (1977). The role of *Chaetogaster limnaei* in the dynamics of trematode transmission in natural populations of freshwater snails. *Z Parasitenkd* 54(1):55-60.

2. Fernandez J., Goater T.M., Esch G.W. (1991). Population dynamics of *Chaetogaster limnaei limnaei* (Oligochaeta) as affected by a trematode parasite in *Helisoma anceps* (Gastropoda). *Am Midl Nat* 125:195-205.
3. Sapaev E.A. (1977). A study of feeding habits in two subspecies of *Chaetogaster limnaei* Oligochaeta Naididae. *Zoologicheskii-Zhurnal* 56:1145-1149.
4. Ibrahim M.M. (2007). Population dynamics of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community. *Parasitology Research* 101, 25-33.
5. Rajasekariah G.R. (1978). *Chaetogaster limnaei* K von Baer 1872 on *Lymnaea tomentosa*: ingestion of *Fasciola hepatica* cercariae. *Experientia* 32, 1458-1459.
6. Wesenberg-Lund C. (1934). Contributions to the development of the Trematode Digenea. II. The biology of the freshwater cercariae in Danish freshwater waters. Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematisk Afhandlinger, 9, 1-223.
7. Khoubbane M., Artigas P., Periago M.V., Garcia Bodelon M.A., Arocas M., El Sayed M., Hahat A. El S., Wakeel A. El, Barduagni P., Valero M.A., Bargues M.D., Mas-Coma S. (2004). Viabilidad e infectividad del aislado humano de la zona endémica de fascioliasis del delta del Nilo (Behera governortate, Egipto) *Enf. Emerg.*, 6 (3):171.
8. Bargues M.D., Vigo M., Horak P., Dvorak J., Patzner R.A., Pointier J.P., Jackiewicz M., Meier-Brook C. and Mas-Coma S. (2001). European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences, *Infect. Genet. Evol.*, 1: 85-107.
9. Artigas P., Ashrafi K., Massoud J., Holakouie Naieni K., Mahmoodi M., Jo-Afshani M.A., Rezvani S.M., Khoubbane M., Bargues M.D. & Mas-Coma S. (2005). Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of *Fasciola hepatica* and *G. truncatula* in natural infection in Gilan province, Iran. *Acta Parasitol. Port.*, 12 (1-2): 408-409.
10. 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.
11. Brinkhurst R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic Oligochaeta. *Scient. Publs Freshwat. biol. Ass.* 22:1-55.
12. Brinkhurst R.O. & Jamieson, B.G.M. (1971). Aquatic Oligochaeta of the World. Oliver and Boyd, Edinburgh.



COF  
CS

Col·legi Oficial  
de Farmacèutics  
de Castelló

Nº 4

TERCERA TEMPORADA

**OTOÑO PARA LA  
FARMACIA**  
PAG. 4

**JUAN CARLOS  
PAVÍA / REPORTAJE**  
PAG. 6

**CAMBIO  
CLIMÁTICO**  
CURIOSIDADES  
PAG. 20

**ALOPECIA  
FEMENINA** CIENCIA Y  
PROFESIÓN  
PAG. 16



**Director**

Sergio Marco Peiró

**Comité de redacción**

Araceli d'Ivernois

Rodríguez

Inma Adelantado Roca

Tono Esteller Bovaira

Jaime Alcalá Giner

Manuel Adell Alegre

Laia Nabàs Cambroneró

**Maquetación**

Dpto. Comunicación

del COFCS

**Edita**

Ilustre Colegio Oficial de

Farmacéuticos de

Castellón

C/ Ebanista Hervás, 51

12004

Castellón de la Plana

Teléfono

964236470

Fax

964 223194

cofcastellon@redfarma.org

revista@cofcastellon.org

www.cofcastellon.org

**Revista Digital**

www.cofcastellon.org

**Blog**

blog.cofcastellon.org

**Depósito legal**

CS-207-2011

# SUMARIO

WWW.COFCASTELLON.ORG

- 4 Opinión  
Otoño para la farmacia  
**Sergio Marco Peiró**  
*Vicepresidente del COFCS*
- Farmacéutico 2.0  
**Jaime Alcalá Giner**  
*Colegiado del COFCS*

- 6 Reportaje  
Juan Carlos Pavía  
*Farmacéutico y enólogo*

- 10 Entrevista  
Eugenio Ghirardi  
*Medios Sociales,  
Falacia o Realidad.*

- 18 Ciencia y profesión  
Alopecia Femenina

- 14 Mostrador
- 16 Ciencia y profesión  
Champú de caballo... para burros!!
- 23 Informe de secretaría  
Altas y bajas
- 20 Curiosidades  
Cambios Climático y Global
- 28 Farmacia y Sociedad  
Noticias
- 29 Farmacias del Mundo
- 30 El Cofcs en las redes sociales



# CAMBIOS CLIMÁTICO Y GLOBAL.

## LA INTRODUCCIÓN Y EXPANSIÓN DE MOSQUITOS VECTORES DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN EUROPA

Por: Verónica Hernández Agramunt,  
José M. Latorre, Rosmary Flores,  
Santiago Mas-Coma y M. Dolores BARGUES  
*Departamento de Parasitología, Centro Colaborador de la  
OMS SPA-37, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Valencia*



Las modificaciones antropogénicas que producen alteraciones en el medio ambiente a nivel mundial, formando parte del fenómeno conocido por el término de cambio global, así como el cambio climático y sus influencias e impacto, tienen un gran potencial para intensificar o cambiar la distribución geográfica, las prevalencias y las intensidades de ciertas enfermedades infecciosas, muy especialmente las enfermedades transmitidas por vectores. Es bien sabido que patógenos transmitidos por vectores son particularmente sensibles al cambio climático y que consiguientemente el cambio climático puede modificar la incidencia de su transmisión, alterando los patrones epidemiológicos actuales de las enfermedades. Entre estos vectores son de especial importancia los Artrópodos hematófagos que transmiten enfermedades por picadura.

En los últimos años ha surgido en Europa un creciente interés sobre la distribución de los mosquitos y su capacidad de transmitir enfermedades, debido a los posibles efectos de los cambios climático y global sobre estos insectos y los patógenos que éstos transmiten. Por lo tanto, la caracterización de las actuales poblaciones de vectores potenciales resulta ser de gran trascendencia en los países del sur de Europa, donde se predice que el impacto del calentamiento global sea mayor.

En este sentido, los actuales mapas de distribución de mosquitos vectores de enfermedades publicados por el Centro Europeo de Control de

Enfermedades (ECDC Estocolmo), ponen en evidencia la presencia en Europa de hasta cinco especies exóticas, incluyendo el bien conocido mosquito tigre (*Aedes albopictus*) de origen asiático e introducido en Europa hace varios años, y ya extendido ampliamente en España por toda la zona costera de Cataluña y también en la región de Murcia (Figura 1), además de otras especies también introducidas en Europa como son los casos de *Aedes aegypti*, *A. japonicus*, *A. atropalpus* y el más raro *A. koreikus*. Todos estos mosquitos son vectores de enfermedades infecciosas entre las que se incluyen desde el dengue, la fiebre amarilla, el virus de del Nilo Occidental, el virus Cikungunya, hasta otros virus causantes de encefalitis y fiebres hemorrágicas.

Desde su primera aparición en Albania en 1979 y luego en Italia en 1990, *Aedes albopictus* ha sido reportado ya en más de 15 países europeos. Este vector está clasificado como una de las 100 especies invasoras por el Grupo de Especialistas en Especies Invasoras y se considera que es la especie de mosquito más invasora del mundo. Entre otras razones que explican su difusión está la globalización del comercio de neumáticos usados por transporte marítimo, los cuales albergan a menudo focos larvarios en sus concavidades llenas de agua, además de la importación de bambú con la dispersión adicional a través de vehículos de carretera.



## Cambio Climático

Los cambios en las condiciones climáticas, incluyendo temperatura, evapotranspiración y pluviometría (disponibilidad de agua en superficie), factores cruciales para determinar la abundancia y supervivencia de los mosquitos, pueden incrementar el periodo favorable para el desarrollo de mosquitos vectores, así como también producir cambios en la epidemiología de las enfermedades que éstos transmiten. Un ejemplo evidente se da en la Malaria o Paludismo, la enfermedad infecciosa más importante de la humanidad y la causante del subdesarrollo en amplias regiones del mundo. El Plasmodium, agente causal intracelular que se desarrolla en hígado (hepatocitos) y sangre (eritrocitos), se transmite por la picadura de mosquitos del género Anopheles. España fue un país endémico hasta mitad del siglo pasado.

En el Delta del Ebro, una zona históricamente endémica, hemos detectado la presencia de una sola especie de mosquito vector, *Anopheles atroparvus* (Figura 2), con densidades actuales, similares a las existentes cuando la Malaria era endémica en dicha zona. Esta situación difiere pronunciadamente de otros países mediterráneos como Francia o Italia, donde diferentes especies de *Anopheles* coexisten y diferentes especies vectoras predominan según las zonas

Los estudios entomológicos y climatológicos que hemos realizado en el Delta del Ebro han demostrado que el incremento de temperatura ha favorecido el incremento del riesgo potencial de

transmisión de la Malaria al aumentarse el número de meses en los cuales sería posible dicha transmisión (desde Mayo a Septiembre para *Plasmodium falciparum* y desde Mayo a Octubre para *P. vivax*) en comparación con la ventana de meses (Julio-Agosto) en los cuales tenía lugar la transmisión cuando la Malaria fue endémica en dicha zona (Figura 3). De todos modos, el riesgo de reaparición y transmisión de la Malaria en la región del Delta del Ebro cabe considerarlo hoy en día bastante improbable o mejor despreciable, habida cuenta las infraestructuras sanitarias actuales.

## Cambio Global

Sorprendentemente, el amplio estudio multidisciplinar que recientemente realizó nuestro equipo en dos zonas que fueron tradicionalmente palúdicas, la Albufera de Valencia y el Delta del Ebro, a priori semejantes en cuanto a características del medio cara a la transmisión de la Malaria (amplias extensiones de cultivos de arroz), demostró una gran diferencia en el resultado del análisis del riesgo de reemergencia de Malaria. La caracterización climática y territorial, los estudios entomológico y molecular de los mosquitos presentes, el análisis histórico de la enfermedad (revisión bibliográfica y casos reportados), así como un estudio de las actividades humanas y su influencia en la evolución del Paludismo, nos han demostrado diferencias significativas entre ambas zonas. Así, mientras en el Delta del Ebro sigue existiendo hoy en día una muy importante población de *Anopheles atroparvus* con capacidad de

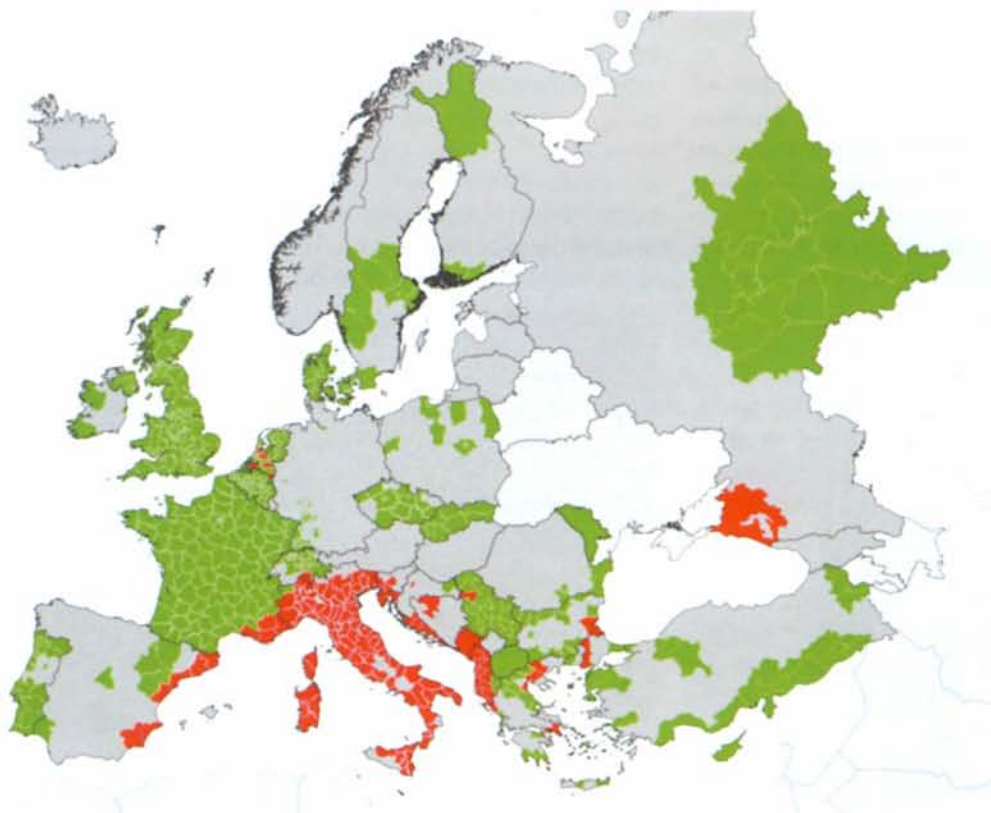


Figura 1.- Distribución actual del mosquito tigre *Aedes albopictus* en Europa. En rojo: presencia confirmada; en verde: ausencia; en gris oscuro: sin datos; en gris claro: se desconoce (mapa ECDC 2012/ VBORNET).

transmisión de la enfermedad durante algunos meses del año, en la Albufera la distinta forma de cultivo del arroz, la calidad del agua de riego y los tipos de tratamientos agrícolas han constituido factores que, a lo largo del tiempo, permiten explicar la desaparición de Anopheles vectores en la actualidad. El riesgo de reemergencia en la Albufera resulta pues menor, ya que se precisaría no únicamente de la reintroducción del Plasmodium, sino además de la reintroducción de mosquitos Anopheles vectores, lo que en las actuales circunstancias medioambientales de la Albufera y zonas circundantes no parece hoy en día plausible. A pesar de que muchos autores consideran que el clima es la principal razón de la recrudescencia de las enfermedades vectoriales, este estudio corrobora que las modificaciones ambientales unidas a los cambios antropogénicos (cambio global) pueden influir de forma mucho más rápida y decisiva sobre las poblaciones de vectores y, en consecuencia, en el riesgo potencial de reaparición o introducción de las enfermedades de transmisión vectorial.

### La Situación en Europa y España

Los mosquitos transmiten diferentes tipos de agentes infecto-contagiosos causantes de enfermedades en humanos y animales y por tanto de interés en Medicina, Veterinaria y salud pública en general.

Entre los parásitos protozoos está el caso de la Malaria transmitida por mosquitos Anopheles, cuya distribución, expansión y capacidad vectorial condicionan la reaparición o introducción de la Malaria. En Europa la situación de riesgo de esta enfermedad viene condicionada por varios factores, tales como: a) más de 144 mil casos importados, destacando países como Reino Unido, Alemania, Francia, Italia o España; b) reportes de casos autóctonos en antiguas repúblicas soviéticas, en Francia, Italia, Alemania o Grecia e incluso recientemente en España; c) el incremento de la temperatura de los meses de invierno en los países nórdicos; y d) la posibilidad de que una especie

vectora del continente africano llegue y se establezca en Europa debido a los cambios climático y global.

## Entre los parásitos protozoos está el caso de la Malaria transmitida por mosquitos Anopheles

Entre las enfermedades causadas por parásitos helmintos del grupo de los nematodos cabe citar el ejemplo de la *Dirofilariasis* humana y animal (conocida como el gusano del corazón del perro), causada por especies del género *Dirofilaria* y transmitida por mosquitos, cuya expansión ha sufrido un efecto alarmante en los últimos años. Concretamente, en los últimos diez años, las especies de *Dirofilaria* han sido detectadas con mayor frecuencia en países considerados no endémicos hasta ahora (tales como en Europa oriental). Así, casos autóctonos de *Dirofilariasis* humana y/o animal y/o infecciones naturales de los mosquitos vectores han sido detectados hasta la fecha ya en al menos 34 nuevos países o territorios en este periodo. Varias especies de los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Mansonia* y *Coquillettidia* se relacionan con la transmisión de esta enfermedad. Los movimientos migratorios humanos y de animales reservorios y el cambio climático podrían facilitar la introducción de nuevos vectores de *Dirofilaria* competentes en regiones específicas. El mosquito de origen asiático, *Aedes albopictus*, también ha demostrado recientemente ser capaz de jugar un papel importante en la transmisión de *Dirofilaria* en distintos países europeos.

Entre otros agentes infecto-contagiosos están los de tipo viral, tales como el virus del Nilo Occidental, que desde que causó en Rumanía en 1996 una gran epidemia, se ha convertido en una importante causa



Figura 2.- El mosquito culicido *Anopheles atroparvus* del Delta del Ebro: A) cabeza de espécimen macho; B) cabeza de espécimen hembra; C) ala; D) abdomen (preparaciones entomológicas y microfotografías R. Flores).

Figura 3.- Comparación del periodo mensual de transmisión de Malaria en el pasado endémico (arriba) con el posible riesgo de transmisión en la actualidad (abajo) en el Delta del Ebro, mostrando la ampliación de la ventana de potencial transmisión debida al calentamiento global. Temperaturas mínimas requeridas para el desarrollo de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* dentro del mosquito representadas por las líneas roja (18°C) y azul (15°C), respectivamente.

de preocupación en salud pública en Europa, así como también el ya mencionado virus del Dengue o el virus del Chikungunya, transmitidos todos ellos por mosquitos Culicidae cuya epidemiología se ve afectada por los cambios climático y global. Las notificaciones recientes de casos autóctonos de Dengue y Chikungunya demuestran que Europa es vulnerable a estas enfermedades, especialmente en zonas donde el vector (*Aedes albopictus*) está presente. Esta especie de mosquito fue la responsable de los brotes de Chikungunya en la isla de La Reunión en 2005-2007, Italia en 2007 y Francia en 2010, así como de los brotes de Dengue en Reunión en 1977-78, en Isla Mauricio en 2009, y en Francia y Croacia en 2010. Un ejemplo alarmante de la expansión del virus del Nilo Occidental es el caso de Estados Unidos, donde desde 1991 en que se reportaron solo 62 casos, hasta principios de 2012 habían sido reportados un total de 1118 casos humanos confirmados, distribuidos en 38

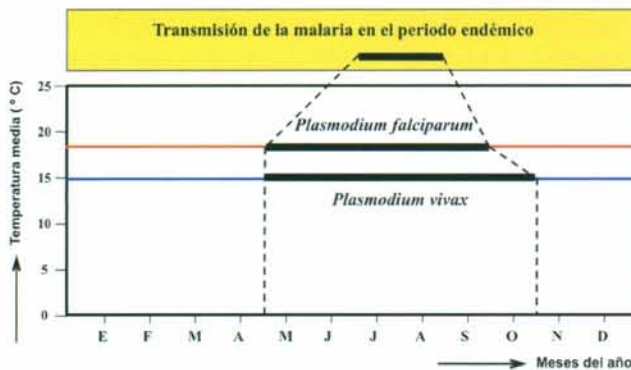


Figura 3.

estados de los cuales 41 han sido casos fatales en 2012, con un inesperado incremento en los meses recientes del presente año. Entre los mosquitos responsables de la transmisión de este virus se encuentran varias especies de los géneros *Culex* y *Aedes*.

*Aedes aegypti* es otra especie invasora de mosquito que podría tener un impacto en la salud pública europea y que ya ha sido detectado en Francia y Madeira, además de en el suroeste de Rusia. Es el principal vector del virus del Dengue en las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, y que también fue responsable de las grandes epidemias de Dengue en Grecia en 1927-1928. Esta especie de *Aedes* es también vector del virus de Chikungunya y se sabe que puede ser un vector muy eficaz del virus de la Fiebre Amarilla, una enfermedad que se encuentra en el oeste, centro y este de África, donde las grandes epidemias graves han registrado decenas de miles de muertos, además de en América del Sur. Adicionalmente, *A. aegypti* transmite también fiebres hemorrágicas virales.

Otros virus causantes de fiebre hemorrágica viral, como el virus del Valle del Rift, son también de transmisión vectorial, si bien lo son por la picadura de mosquitos de otro grupo conocido como los flebotomos o beatillas. Los flebotomos son bien conocidos por su papel principal es la transmisión de protozoos kinetoplásticos de las especies del

género *Leishmania*. Cabe esperar en el caso de estos flebotomos vectores también una respuesta al cambio climático, esencialmente al fenómeno del calentamiento global, que puede llevar a una expansión geográfica de los mismos hacia el Norte de Europa a partir de sus áreas originales de distribución en el Sur de Europa. El riesgo de expansión de la Leishmaniasis hacia el Norte de Europa en un futuro inminente es evidente, caso de seguir el incremento de temperaturas en el viejo continente, tal y como resulta patente en los últimos años.

Lo cierto es que estas enfermedades infecto-contagiosas transmitidas por mosquitos deben preocuparnos también en España. En primer lugar porque debemos mantenernos siempre alerta ante la posible aparición de casos importados que podrían generar pequeños brotes en nuestro país. En segundo lugar, porque tras la descripción de varias especies de mosquitos en nuestra geografía, resulta evidente que tenemos vectores eficaces en nuestro territorio.

## Las Nuevas Tecnologías

Actualmente se dispone de un amplio abanico de nuevas tecnologías, que permiten la realización de estudios multidisciplinares capaces ya no solamente de evaluar adecuadamente la evolución pasada y reciente de las enfermedades infecciosas de transmisión vectorial, sino también de llevar a cabo análisis significativos de predicción de la evolución futura de dichas enfermedades. Ello permite los apropiados análisis de riesgo y la posibilidad de poner en marcha medidas de contención futura en el lugar y momento que se estimen adecuados.

Formando parte de estas nuevas tecnologías se encuentran los modelos matemáticos de predicción, que cuentan con una gran capacidad de análisis simultáneo e interrelacional de numerosos parámetros gracias al gran potencial computacional de los actuales ordenadores. Pero en los últimos años son los estudios de Teledetección Satelital (RS, de las siglas inglesas de Remote Sensing) y los Sistemas de Información Geográfica (SIG) basados en el solapamiento de mapeos georreferenciados de diferentes características y parámetros del medio y del clima, en gran parte proporcionados por satélites espaciales tanto los geoestacionales como los de órbita circumpolar, de la enfermedad, y de las poblaciones humanas, de los animales reservorios y de los insectos vectores, los que están demostrando una mayor aplicabilidad y eficacia.

A las tecnologías medioambientales antes citadas cabe añadir las tecnologías moleculares, que permiten la caracterización genética exhaustiva de cada una de las especies vectoras y hospedadoras involucradas en las enfermedades en cuestión, posibilitando el análisis dinámico de cepas geográficas y, consiguientemente, la dilucidación de orígenes, introducciones y expansiones de dichas enfermedades, en una capacidad que no se disponía tiempo atrás.