

**UNIVERSITAT DE  
VALÈNCIA**



**FACULTAT DE  
FARMÀCIA**

---

## **TESIS DOCTORAL**

**DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGÍA FARMACÈUTICA I  
PARASITOLÒGIA  
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

---

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

### **CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE *LYMNAEIDAE* Y *PLANORBIDAE* (MOLLUSCA: GASTROPODA), VECTORES POTENCIALES DE FASCIOLIASIS Y SCHISTOSOMIASIS URINARIA EN ESPAÑA**

por

**SONIA ADAM NAVARRO**

**Directores**

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

Catedrático de Parasitología

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

**Dra. María Dolores Bargues Castelló**

Catedrática de Parasitología

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

y

**Dr. Alberto Martínez Ortí**

Director del Museu Valencià d'Història Natural d'Alginet y Profesor Asociado  
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Valencia, Octubre de 2017



DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGÍA

Los abajo firmantes Prof. Dr. Dr. h. c. SANTIAGO MAS COMA y Prof. Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ, Catedráticos del Área de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, junto con el Dr. ALBERTO MARTÍNEZ ORTÍ, Profesor Asociado del citado departamento, por la presente:

**CERTIFICAN:** que Dña SONIA ADAM NAVARRO ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado “CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE *LYMNAEIDAE* Y *PLANORBIDAE* (MOLLUSCA: GASTROPODA), VECTORES POTENCIALES DE FASCIOLIASIS Y SCHISTOSOMIASIS URINARIA EN ESPAÑA” en el Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con el fin de optar al Grado de Doctora en Biología.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente el 20 de octubre de 2017, Valencia

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

Fdo.: Dra. María Dolores Bargues Castelló.....

Fdo.: Dr. Alberto Martínez Ortí.....



**ADAM NAVARRO (SONIA), 2017.- CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LYMNAEIDAE Y PLANORBIDAE (MOLLUSCA: GASTROPODA), VECTORES POTENCIALES DE FASCIOLIASIS Y SCHISTOSOMIASIS URINARIA EN ESPAÑA. TESIS DOCTORAL (DIRECTORES: S. MAS-COMA, M.D. BARGUES Y A. MARTÍNEZ-ORTÍ), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA, ESPAÑA.**

Fascioliasis y schistosomiasis son dos de las enfermedades parasitarias englobadas dentro del grupo de las “enfermedades tropicales desatendidas”, la importancia de las cuales recae en el hecho de haber sido muy poco prioritarias en los programas nacionales de salud en España. Se asocian principalmente a la pobreza causando discapacidades graves y deficiencias de por vida que suponen una enorme carga económica para los países endémicos. La fascioliasis es la enfermedad parasitaria de origen vectorial que presenta la más amplia distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal conocida a nivel mundial, constituyendo un importante problema de salud pública. Se estima que existen entre 2,4 y 17 millones de personas afectadas y es transmitida por moluscos gasterópodos de la familia *Lymnaeidae*. La schistosomiasis es la segunda enfermedad en importancia de la humanidad después de la malaria a nivel socioeconómico y de salud pública, y se transmite por moluscos vectores de la familia *Planorbidae*. Dadas las circunstancias y la situación actual de ambas enfermedades, el interés de los estudios del presente trabajo se centró en el análisis, bajo condiciones estándar de laboratorio, de la biología de *Bulinus truncatus*, *Planorbarius metidjensis* y *Lymnaea* sp. de España, cuya capacidad vectorial fue previamente verificada. El estudio de variabilidad intrapoblacional, oviposición, dinámica de crecimiento, y sus características de autofecundación, permitieron ampliar el conocimiento de su biología, con énfasis en aquellas características que demostraron ser útiles en la diferenciación de las especies vectoras tanto a nivel fenotípico como biológico. Los resultados experimentales obtenidos fueron comparados con otros trabajos de las mismas características o similares y demostraron su aplicabilidad en términos de transmisión de las trematodiasis aquí en cuestión y para el diseño de medidas de prevención del riesgo de introducción en España y su control a nivel local y regional.

**Palabras clave:** Fascioliasis, Schistosomiasis, *Lymnaeidae*, *Planorbidae*, crecimiento, autofecundación, moluscos vectores, transmisión enfermedad, riesgo de introducción, prevención y control, España.



# INDICE

	<u>Pag.</u>
<b>- Agradecimientos</b> .....	1
<b>1.- Introducción</b> .....	9
<b>2.- Antecedentes</b> .....	19
2.1.- La Schistosomiasis o Bilharziasis: principales especies causantes y sus características .....	21
2.1.1.- La Schistosomiasis urinaria o urogenital .....	24
2.1.1.1.- Agente causal, ciclo biológico y especies vectoras .....	24
2.1.1.2.- Distribución geográfica .....	28
2.1.1.3.- Epidemiología .....	29
2.1.1.4.- Patología y Clínica .....	30
2.1.1.5.- Diagnóstico .....	39
2.1.1.6.- Tratamiento .....	41
2.1.1.7.- Profilaxis individual y control general .....	42
2.1.2.- La epidemia reciente de Schistosomiasis urogenital en Córcega .....	44
2.1.2.1.- Especies introducidas .....	44
2.1.2.2.- Duración y lugar de la epidemia .....	45
2.1.2.3.- Molusco vector en Córcega .....	46
2.1.2.4.- Población humana afectada .....	46
2.1.2.5.- Estrategia de gestión de riesgo de Schistosomiasis .....	50
2.1.3.- El problema de una introducción inesperada .....	51
2.1.3.1.- La anamnesis en el diagnóstico .....	52
2.1.3.2.- El caracter zoonótico de la epidemia al tratarse de un híbrido .....	53
2.1.3.3.- El impacto del cambio global .....	55
2.1.3.4.- El impacto del cambio climático .....	56
2.1.3.5.- El riesgo de expansión a otros países europeos .....	57
2.2.- Fascioliasis humana y animal: principales especies causantes	

y sus características .....	58
2.2.1.- La Fascioliasis por <i>Fasciola hepatica</i> .....	60
2.2.1.1.- Agente causal, ciclo biológico y especies vectoras .....	60
2.2.1.2.- Distribución geográfica .....	63
2.2.1.3.- Epidemiología .....	65
2.2.1.4.- Patología y Clínica .....	69
2.2.1.5.- Diagnóstico .....	75
2.2.1.6.- Tratamiento .....	80
2.2.1.7.- Profilaxis individual y control general .....	82
2.2.1.8.- Casos reportados .....	83
2.2.2.- El problema de la expansión geográfica mundial de <i>Fasciola hepatica</i> ....	85
2.2.2.1.- Expansión pasiva de especies vectoras .....	86
2.2.2.2.- Expansión del parásito con especies reservorias de ganado ....	86
2.2.2.3.- El impacto del cambio global .....	89
2.2.2.4.- El impacto del cambio climático .....	89
<b>3.- Material y Metodos</b> .....	<b>99</b>
3.1.- Molucos vectores .....	101
3.1.1.- Lugares de prospección de planórbidos .....	101
3.1.2.- Lugares de prospección de lymnaeidos .....	102
3.1.3.- Recolección en la naturaleza y transporte "in vivo" .....	106
3.1.4.- Verificación de la ausencia de infección .....	107
3.1.5.- Lanzamiento de los cultivos experimentales: Adaptación y cultivo en el laboratorio .....	108
3.1.6.- Seguimiento cronológico de características malacológicas a estudiar .....	109
3.1.7.- Estudio de la anatomía interna de <i>Bulinus truncatus</i> .....	110
3.2.- Metodos morfométricos de fenotipaje de vectores .....	112
3.2.1.- Medición mediante Computer Image Analysis System (CIAS) .....	113
3.2.1.1.- Medición de conchas de adultos mediante CIAS .....	113
3.2.1.2.- Medición de clusters y huevos obtenidos a partir de cultivos puros .....	114
3.2.2.- Conservación de conchas .....	115

3.2.3.- Métodos estadísticos .....	115
3.3.- Trematodos parásitos .....	116
3.3.1.- Especies de <i>Schistosoma</i> de pacientes infectados en Córcega .....	116
3.3.1.1.- Obtención de cepas .....	117
3.3.1.2.- Infección experimental de Planórbidos .....	117
3.3.1.3.- Seguimiento de la infección .....	118
3.3.2.- Cepa de <i>Fasciola</i> obtenida en bovino .....	118
3.3.2.1.- Obtención de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> .....	118
3.3.2.2.- Embrionación de los huevos . .....	119
3.3.2.3.- Infección experimental de lymnaeidos .....	120
3.3.2.4.- Cronología de emisión y conservación de metacercarias .....	121
<b>4.- Resultados</b> .....	<b>131</b>
4.1.- Especímenes de <i>Bulinus</i> .....	133
4.1.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	133
4.1.2.- Estudio de autofecundación .....	133
4.1.3.- Estudio cronológico de puestas .....	134
4.1.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	134
4.1.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	134
4.1.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos .....	135
4.1.7.- Estudio eufalía/afalía de <i>Bulinus</i> de Cerdeña (Italia) .....	135
4.2.- Especímenes de <i>Planorbarius</i> .....	136
4.2.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	136
4.2.2.- Estudio de autofecundación .....	136
4.2.3.- Estudio cronológico de puestas .....	137
4.2.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	137
4.2.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	137
4.2.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos .....	138
4.3.- Especímenes de <i>Lymnaea</i> .....	139
4.3.1.- Estudios sobre la variabilidad de la concha .....	139

4.3.2.- Estudio de autofecundación .....	139
4.3.3.- Estudio cronológico de puestas .....	140
4.3.4.- Estudio cuantitativo de puestas .....	140
4.3.5.- Estudios sobre la variabilidad de las puestas .....	140
4.3.6.- Estudios sobre la viabilidad de los huevos .....	141
<b>5.- Discusión .....</b>	<b>161</b>
5.1.- Análisis morfológico comparado de las poblaciones .....	163
5.1.1.- Caracterización de las conchas .....	163
5.1.2.- Caracterización de los clusters .....	166
5.1.3.- Caracterización de los huevos .....	168
5.2.- Análisis biológico comparado de las poblaciones .....	169
5.2.1.- Caracterización de la autofecundación .....	170
5.2.2.- Caracterización de la cronología de las puestas .....	174
5.2.3.- Caracterización cuantitativa de las puestas .....	176
5.2.3.- Caracterización de la viabilidad de la progenie .....	176
5.3.- Aplicabilidad de los estudios efectuados .....	178
5.3.1.- Interés en sistemática .....	180
5.3.1.1.- Diferenciación de poblaciones y especies .....	181
5.3.2.- Interés en epidemiología y control .....	182
5.3.2.1.- Aspectos relacionados con expansión geográfica .....	184
5.3.2.2.- Aspectos relacionados con epidemias .....	186
<b>6.- Conclusiones .....</b>	<b>199</b>
<b>7.- Bibliografía .....</b>	<b>207</b>

## **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

En contadas ocasiones se tiene la oportunidad de mostrar gratitud y expresar agradecimiento de manera colectiva. Es por ello que deseo transmitir mi sincero agradecimiento a un gran número de personas que de manera directa o indirecta me ofrecieron su apoyo en lo personal, científico y material en el proceso de elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. Dr. Dr. Honoris Causa SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, por haber aceptado la dirección de esta Tesis Doctoral incorporándome a sus líneas de investigación dentro de este Departamento, fundamentada en la “Caracterización Biológica de Moluscos Vectores Potenciales de Fascioliasis y Schistosomiasis” y el estudio de los “Ciclos Biológicos de Trematodos Digénidos”. Gracias por la confianza depositada y el tiempo dedicado durante mi aprendizaje inicial. Asimismo, quiero agradecer la cercanía y los tan útiles consejos en todos estos años tanto a nivel académico como personal. Su soporte inicial nos permitió, junto con apoyos institucionales, obtener el financiamiento preliminar y posterior para llevar a cabo esta Tesis Doctoral. Además, no quiero terminar sin agradecerle la formación alcanzada durante este tiempo. Por todo ello, confío en que encuentre aquí mi más sincero agradecimiento.

En segundo lugar, deseo citar a la Prof. Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ, Catedrática de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, por haber aceptado la dirección de esta Tesis Doctoral. Deseo agradecerle la oportunidad de permitir sumarme a sus líneas de investigación desde el primer momento, no sólo desde el trabajo experimental de laboratorio, sino desde el elemental trabajo de campo. Todo ello me permitió conocer desde una perspectiva científica, los distintos desafíos y matices que adquieren las enfermedades parasitarias. Gracias por el tiempo y la confianza ofrecida en todos estos años, por transmitirme el gusto por el trabajo bien hecho y el entusiasmo permanente en el trabajo que, bajo una dirección científica cercana, posibilitó mantener el entusiasmo inicial.

En tercer lugar, me gustaría citar al Prof. Dr. ALBERTO MARTÍNEZ ORTÍ, Director, Conservador e Investigador del Museu Valencià d’Història Natural, Profesor vinculado al Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, por aceptar codirigir esta Tesis Doctoral. Deseo agradecerle sus aportaciones en lo que respecta al material malacológico debidamente recolectado y

transportado al laboratorio del departamento con su posterior identificación taxonómica. Le agradezco la paciencia y confianza depositadas a lo largo de todo este tiempo. Gracias por el apoyo y ayuda brindados, por su cercanía y accesibilidad a cada momento y por transmitir el rigor y la motivación en el trabajo, permitiendo así incrementar mi entusiasmo en los estudios llevados a cabo y en otros campos relacionados, haciéndome partícipe en todo momento, permitiéndome así completar mi formación como investigadora. Por todo ello, espero que encuentre aquí toda mi gratitud hacia él.

Quiero hacer una mención especial a la Catedrática de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, Dra. MARÍA ADELA VALERO ALEIXANDRE, por haberme permitido colaborar en su labor científica, y por la incorporación de significativas aproximaciones metodológicas en el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. PATRICIO ARTIGAS BASCUR, profesor vinculado al Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, por su gentileza y ayuda incondicional, por sus tantos y tan buenos consejos, así como por su cálida acogida durante la primera etapa en el laboratorio. También debo agradecerle su trabajo en lo que concierne a los estudios aportados de biología molecular de moluscos tan útiles y relevantes para el avance de parte de nuestra labor de investigación. Gracias por su sentido del humor y la alegría transmitidas a diario en nuestro lugar de trabajo, haciendo el día a día más fácil y llevadero. Por todo ello y mucho más, confío en que encuentre en estas palabras mi más sincero agradecimiento.

Por supuesto, quiero expresar mi agradecimiento al resto de Catedráticos, Profesores Titulares y Asociados de Parasitología que forman parte de este Departamento, Dr. JOSÉ GUILLERMO ESTEBAN SANCHÍS, Dr. ANTONIO MARCILLA DÍAZ, Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO, Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLÍ-CANDELA, Dr. MÀRIUS VICENT FUENTES I FERRER, Dra. MARÍA TERESA GALÁN PUCHADES, a la Profesora contratada Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA y a los Profesores Asociados VERÓNICA AGRAMUNT HERNÁNDEZ y MIROSLAVA PANOVA MIRKOVA, Profesores a los que siempre he podido recurrir más allá de la etapa de formación académica, por su colaboración y múltiples muestras de afecto y consideración.

Por supuesto, no puedo olvidarme de agradecer la colaboración del Prof. Dr. JÉRÔME BOISSIER y del Prof. Dr. GUILLAUME MITTA del Laboratorio de Ecología, Biología de la Evolución y Parasitología de la Universidad francesa de Perpignan,

Francia, por su colaboración y aportaciones derivadas de sus estudios con el trematodo *Schistosoma haematobium* y su molusco vector *Bulinus truncatus*, así como también deseo agradecer la colaboración del Dr. GIOVANNI GARIPPA del Departamento de Medicina Veterinaria de Sassari, Italia, por su valiosa y amable aportación de material malacológico a nuestro estudio.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. MESSAOUD KHOUBBANE, por instruirme de forma continua en las distintas y en ocasiones complejas técnicas malacológicas y parasitológicas, técnicas y experimentos que resultan fundamentales para la evaluación y seguimiento de los ciclos biológicos de trematodos y el mantenimiento y desarrollo de los moluscos vectores procedentes de países tan distintos de los cuales disponemos en nuestro laboratorio. Quiero agradecer su infinita paciencia al explicar los distintos procedimientos a seguir, su entrega y la bondad y confianza depositadas en mi. Por todo ello, deseo que encuentre aquí mi más sincero agradecimiento.

Quiero también agradecer al Profesor Docente Investigador del Departamento de Zoología de la Universitat de València, JESÚS SELFA ARLANDIS, por mostrar la amabilidad de facilitarnos el material necesario para llevar a cabo de forma mucho más precisa, las medidas de los parámetros del agua en donde se recolectaban los moluscos en el campo. Además, agradecer también al Profesor Titular RICARDO GARILLETI ÁLVAREZ por su ofrecimiento desinteresado a ayudarnos en la identificación de gran parte de la vegetación de los lugares de recolección de moluscos vectores de agua dulce. Sin olvidar a la Dra. MARIA LUISA CERVERA SANZ, Catedrática de la Universitat de València y miembro del grupo "Soluciones e innovación en Química Analítica" por su ayuda, comprensión y sus tan valiosos consejos.

Y como no, agradecer a aquellas personas anónimas, entre las que se encuentran ciudadanos de las localidades visitadas durante la recolección de moluscos, agricultores y también granjeros, que con tanto cariño y amabilidad nos ofrecieron muy humildemente y de forma desinteresada los sabios conocimientos adquiridos a lo largo de su profesión, permitiendo conocer así, las zonas más frecuentadas por los moluscos, cada uno de los pasos seguidos en el cultivo del arroz, y de más información realmente útil para nuestra labor.

Deseo expresar mi especial gratitud con las que fueron en su momento compañeras del programa de Doctorado de Parasitología Humana y Animal de la Universitat de València y que a día de hoy, aunque cada una siga su camino en distintos campos de la ciencia, considero como grandes amigas, que no me cabe duda que serán para toda la vida, a ALBA CORTÉS, MARÍA JOSÉ IRISARRI, VIVIAN CHAGAS, LUCÍA MATEO, MARÍA ÁNGELES MARTÍNEZ y ROSMARY FLORES por hacer más agradable el

trabajo diario, por compartir conmigo momentos entrañables y por la gran ayuda y apoyo brindados durante estos años.

También quisiera agradecer la grata convivencia y amistad que brindaron en distintos momentos del desarrollo de este trabajo otros compañeros que formaron parte de nuestro equipo en diferentes momentos de mi trayectoria. Gracias DAVID OSCA, RAI SEGUÍ, CARLA QUESADA, PALOMA PÉREZ, ALICIA GALIANO, MARTA REGUERA, ELENA BARRIO, JAVI ROIG y RODRIGO MUÑOZ. Gracias a todos ellos por permitirme conocerles y compartir tanto conmigo y a toda esa gente anónima que a su paso por el departamento me permitió conocer otras culturas y compartir experiencias. A todos y cada uno de ellos, gracias.

Habría sido imposible realizar todo este trabajo sin la labor desarrollada por el Personal de Administración y Servicios del Departamento D. CLEMENTE BAÑULS RODILLA, Dña. INMACULADA LAHUERTA CARRERAS, Dña. LUISA CALDERERO GOICOECHEA, Dña. PILAR LASO COLLADO, así como los técnicos de laboratorio básico D. JOSE ANTONIO LATORRE LÓPEZ, Dña. RAQUEL MONTON MOLINA y Dña. ARACELI TERRONES SIMAL y por supuesto también, a la técnico medio de laboratorio Dña. CARMEN OLMOS BARBERAN. No puedo olvidar agradecer al personal de mantenimiento MARINA y CLARA por su buen humor y amabilidad tantas jornadas en el laboratorio.

Me gustaría agradecer a los amigos más cercanos por sus palabras de apoyo y por darme ánimos en los momentos difíciles. Gracias ELENA ALBERT, DAVINIA GARRIGUES, PARIS ALEMANY, JONATHAN CANTOS, JENNY CARRILLO y ROBERTO BUSTILLOS por estar a mi lado.

Quisiera agradecer muy especialmente a mi familia que, aunque no siempre entendieron o compartieron el esfuerzo y el coste llevado a cabo, creyeron en mí desde el inicio de este proyecto y me apoyaron incondicionalmente a cada paso que di. Es por eso que les debo el haber llegado hasta aquí, ya que de alguna manera soy quién soy gracias a ellos. Gracias, sobre todo a mi madre, a mi hermano, a mi abuela y a mi tío, que son y siempre serán los pilares fundamentales de mi vida, y como no a ANDRÉS, mi compañero de viaje y de vida, por brindarme su ayuda de forma incondicional, por motivarme a seguir y por su infinita paciencia permaneciendo siempre a mi lado.

Tanto los trabajos de campo efectuados en las zonas de recolección de moluscos y en algunas zonas de endemia, 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 de Investigación en Salud No. PI16/00520 titulado "Emergencias de Schistosomiasis y Fascioliasis: Estrategia multidisciplinar frente a desafíos por trematodos híbridos y riesgos por cambios climático y global", financiado por la Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, España (2017-2019);
- 2) Proyecto ISCIII-RETICS RD16/0027/0023 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 (2017-2020);
- 3) Proyecto PROMETEO No. 2016/099, del programa de Ayudas para Grupos de Investigación de Excelencia, Generalitat Valenciana, Valencia, España (2016-2019);
- 4) Proyecto SAF2010-20805 titulado "Epidemiología molecular y cambios climático y global en el impacto emergente de la fascioliasis humana a nivel mundial", financiado por la Dirección General de Investigación, Ministerio de Innovación y Ciencia (MICINN), Madrid, España (2011-2013);
- 5) Proyecto titulado "Global Water Pathogen Project (GWPP)", liderado por el International Hydrological Programme de la UNESCO, Sede Central de Paris, Francia, y la Michigan State University, Michigan, USA, y financiado por el Midland Research Institute for Value Chain Creation de USA (2014-2018).
- 6) Proyecto COST Action No. FA1408 titulado "A European Network for Foodborne Parasites (Euro-FBP)", financiado por la European Cooperation in Science and Technology (Food and Agriculture), EU RTD Framework Programme, European Commission, Bruselas, Belgica (2014-2019).

Finalmente, cabe citar que las investigaciones realizadas dentro de la presente Tesis Doctoral forman parte de la Activity 1 (Studies on the disease epidemiology in human fascioliasis endemic areas of Latin America, Europe, Africa and Asia), Activity 2

(Molecular, Genetic and Malacological Characterization of Lymnaeid Snails), y Activity 3 (Studies on pathology, immunology and community impact of human fascioliasis), dentro del Work Plan 2011-2015, así como de la Activity 4 (Impact of climate change and anthropogenic environment modifications - ID 21554), Activity 5 (Characterization of hybrid flukes in human endemic areas of Asia and Africa- ID 21555), and Activity 6 (Characterization of lymnaeid snail vectors in human endemic areas of Asia and Africa - ID 21556) dentro del Work Plan 2015-2018) del "WHO Collaborating Centre on Fascioliasis and Its Snail Vectors" (Ref. SPA-37, WHO Headquarters Geneva, Suiza) de la Unidad de Parasitología Sanitaria del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia.

Asimismo, las investigaciones incluidas en la presente Memoria forman parte de las actividades llevadas a cabo por el FAO/United Nations Reference Centre for Parasitology (Zoonotic Helminthiases), en los periodos de 2013-2016 y 2017-2020, de la Unidad de Parasitología Sanitaria del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCION**



## 1.- INTRODUCCION

Las “enfermedades tropicales desatendidas” (NTDs en inglés) constituyen un grupo de 18 enfermedades que están entre las infecciones crónicas más comunes en las personas más pobres del mundo. En conjunto, estas enfermedades, en los últimos años, han mostrado que su impacto en el subdesarrollo mundial es similar o incluso mayor que el impacto producido por las denominadas tres grandes, malaria, tuberculosis y SIDA (Hotez *et al.*, 2007, 2008a). Este tipo de enfermedades se dan sobre todo en áreas rurales y en algunos entornos urbanos pobres de países con bajos ingresos de África subsahariana, Asia y Latino América. Las enfermedades tropicales desatendidas conducen a la discapacidad a largo plazo y a la pobreza (Molineaux *et al.*, 2005; Hotez *et al.*, 2006a, 2006b; Hotez, 2006; Lammie *et al.*, 2006). Además, este tipo de enfermedades causa aproximadamente 534.000 muertes al año (Hotez, 2006).

Formando parte de las NTDs, en su mayoría parasitarias, se incluyen las “Trematodiasis transmitidas por el agua y de origen alimentario” (“waterborne and foodborne trematodiasis”). Dentro de dichas Trematodiasis se toman en cuenta las Trematodiasis sanguíneas y hepáticas como las más importantes por sus efectos patológicos. Y dentro de las mismas se toma en cuenta la Schistosomiasis y la Fascioliasis (Hotez *et al.*, 2007, 2008a), las características de las cuales serán desarrolladas con más detalle en el siguiente capítulo.

La schistosomiasis es una de las enfermedades parasitarias humanas más extendidas, siendo la segunda enfermedad en importancia de la humanidad después de la malaria a nivel socioeconómico y de salud pública, en áreas tropicales y subtropicales. Es considerada la más prevalente de las enfermedades transmitidas a través del agua y uno de los mayores riesgos para la salud en áreas rurales y países en vías de desarrollo. En 1996, la schistosomiasis se reportó como endémica en 74 países tropicales, estimándose que más de 200 millones de personas de áreas rurales y agrícolas, estaban infectadas. Se consideró que entre 500 y 600 millones de personas estaban en riesgo de infestarse.

Considerada principalmente como una enfermedad rural y a menudo ocupacional, la schistosomiasis afecta principalmente a gente que es incapaz de evitar el contacto con el agua, debido o bien a su profesión (agricultura o pesca) o bien a la falta de una fuente fiable de agua segura para beber, lavar y bañarse. Como resultado de un bajo nivel de resistencia y de un contacto intensivo con el agua cuando juegan y nadan, los niños de edad comprendida entre los 10 y los 15 años son los que se infestan con más fuerza. El aumento de los movimientos de la población ayuda a la diseminación de la

enfermedad. La schistosomiasis se está dando cada vez más en áreas periurbanas. Aunque mucha gente en áreas de endemidad presenta infecciones ligeras sin síntomas, los efectos de la schistosomiasis en la salud y la economía del país, donde está presente, son serios. En diversas áreas (noreste de Brasil, Egipto, Sudán), la habilidad de trabajo de los habitantes rurales se reduce drásticamente como resultado de la debilidad y letargo causados por dicha enfermedad (Rozendaal, 1997).

Paralelamente y considerada como un problema veterinario bien conocido de distribución mundial, la fascioliasis es la enfermedad parasitaria de origen vectorial que presenta la más amplia distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal, conocida en el presente (Mas-Coma *et al.*, 2003, 2005). En las dos últimas décadas muchas encuestas han mostrado que la fascioliasis es un importante problema de salud pública (Chen & Mott, 1990; WHO, 1995; Mas-Coma *et al.*, 1999a, 2009), incluyéndose estimaciones de 2,4 millones y hasta 17 millones de personas afectadas, o incluso valores más altos, dependiendo de las situaciones hasta ahora desconocidas principalmente en diversas regiones de Asia y África (Mas-Coma, 2004). El creciente número de casos humanos reportados en muchos países de los cinco continentes y los resultados de los estudios de patogenicidad e inmunidad, principalmente en la fase crónica de la enfermedad, son las razones por las que se ha decidido considerar la fascioliasis como una importante enfermedad parasitaria humana (Mas-Coma *et al.*, 1999b) e incluirla como enfermedad causada por trematodos y transmitida por los alimentos prioritariamente dentro de la agenda de la Organización Mundial de la Salud - World Health Organization (WHO, 2013). Por un lado, la fascioliasis animal es de gran importancia en el campo veterinario en todo el mundo. Por otro lado, la fascioliasis humana, una distomatosis típicamente rural, fue considerada como una enfermedad secundaria hasta finales de los años 80 (Chen & Mott, 1990). Sin embargo, la importancia de la infección por *Fasciola* aumentó a partir de los años 90, cuando se empezaron a describir áreas de endemia humana y cuando el número de casos reportados de la enfermedad se incrementó (Mas-Coma *et al.*, 1999a, b, c, 2005; Mas-Coma, 2005). La rareza de la infección humana por fasciólidos es la razón por la cual esta enfermedad había sido olvidada. Ya en Francia empezó a recibir atención entre los años 1950 y 1990 como consecuencia de los varios miles de pacientes que fueron diagnosticados en hospitales durante ese período (Danis *et al.*, 1985; Gaillet, 1982; Gaillet *et al.*, 1983).

Aunque la situación ha cambiado desde los años 90, el concepto tradicional de “enfermedad de ovejas y vacas” aún permanece. Esto no solo causa problemas

cuando se intenta convencer a los políticos y a las autoridades sanitarias sobre la importancia de la infección humana en algunos países, y de la necesidad de implementar medidas de control, sino que también causa problemas y confusiones entre los expertos científicos y en la literatura referente a la salud (Mas-Coma *et al.*, 2009a).

El incremento en la demanda de comida exótica y cruda es una de las razones por las que los reportes de infecciones transmitidas a través de los alimentos, especialmente parasitosis transmitidas por el agua, se han incrementado en los últimos años (Brogia *et al.*, 2011). La cantidad de parásitos transmitidos por los alimentos que pueden ser distribuidos por la globalización, ha sido recientemente reconocida y supondrá desafíos para los médicos, veterinarios, diagnosticadores y cualquier persona vinculada con la seguridad alimentaria. En el caso de la fascioliasis, la elevada longevidad y viabilidad de la forma infectante (metacercaria) para el mamífero hospedador definitivo implica un riesgo potencial, al permitir la supervivencia de la misma aún durante un largo transporte, como puede ser entre países de distintos continentes (Valero & Mas-Coma, 2000). Todo este preocupante escenario actual subyace en las decisiones de la Organización Mundial de la Salud que incluye la fascioliasis en la lista de enfermedades humanas importantes (WHO, 2008) y en la reciente hoja de ruta de 2015-2020 para el control de enfermedades tropicales olvidadas (WHO, 2013).

Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral son:

- determinar la dinámica de crecimiento de tres especies de moluscos vectores de dos enfermedades parasitarias, concretamente dos especies vectoras de schistosomiasis (*Bulinus truncatus* y *Planorbarius metidjensis*) y una de fascioliasis (*Lymnaea* sp.);
- determinar la capacidad de autofecundación de cada una de las especies, así como también;
- determinar la tasa de reproducción de cada una de las especies.

Estos tres objetivos son previos a la determinación de la susceptibilidad y compatibilidad de los moluscos vectores frente a la infección con cepas de los trematodos *Schistosoma haematobium* y *Fasciola hepatica*.

Para cada uno de los antedichos fines generales, se procedió a definir los diferentes objetivos específicos que abarcan, para el caso de la dinámica de crecimiento, desde precisar la longevidad y mortalidad en cautividad de cada una de las tres generaciones analizadas para cada una de las especies objeto de estudio, hasta dilucidar la

presencia/ausencia de una relación entre la época de nacimiento y su dinámica de crecimiento, analizando distintas características morfométricas de la concha de los moluscos, comparando entre generaciones de una misma especie y entre especies.

Del mismo modo, con el objetivo general de determinar la capacidad de autofecundación y tasa de reproducción de los moluscos vectores, los objetivos específicos se centraron en definir la edad a la que éstos alcanzaban la madurez sexual, estudiar la cronología de emisión de las puestas y la cantidad emitida de las mismas por ejemplar a lo largo de toda su vida y en total para cada generación, así como también especificar la proporción de puestas viables respecto a las emitidas, y determinar las características morfométricas de las puestas y huevos con la intención además de precisar si existían o no diferencias entre las generaciones de una misma especie y entre especies.

Estos resultados habrán de proporcionar una base de conocimientos esencial sobre la cual partir para evaluar el grado de susceptibilidad de los moluscos vectores frente a la infestación, incluyendo desde determinar tanto el grado de compatibilidad hospedador-parásito como el tamaño idóneo al que los moluscos pueden ser infectados permitiendo el completo desarrollo de las fases larvarias del parásito en su interior, hasta determinar el papel que juegan como vectores potenciales las especies de moluscos estudiadas en la transmisión de la schistosomiasis y fascioliasis tanto en España como en Europa.

Aunque la especie de molusco *B. truncatus*, vector de la schistosomiasis, causada por *Schistosoma haematobium*, ya era endémica en algunas zonas de España, el hallazgo de dos nuevas localizaciones para esta especie en el levante mediterráneo da importancia a nuestros estudios ya que, este hecho se traduce en una ampliación de las zonas de dispersión del molusco vector. Lo que en un principio puede considerarse como una simple expansión de las poblaciones de *B. truncatus* en algunas zonas de España, podría llegar a suponer en un futuro próximo, un grave problema de salud pública. Hay que tener en cuenta el inesperado brote epidémico de schistosomiasis urogenital acontecido en la isla de Córcega en el verano de 2013 y que la zona del levante mediterráneo se ve bastante influenciada por los cambios en el clima. Es por todo ello por lo que se planteó la posibilidad de una posible introducción de la schistosomiasis en España.

En toda la zona del mediterráneo la temperatura es favorable tanto para la supervivencia y dispersión del molusco hospedador intermediario como para el desarrollo y supervivencia de las fases larvarias de vida libre del parásito. De modo que, dado el brote epidémico ocurrido en Córcega y teniendo en cuenta que como ya

se ha nombrado con anterioridad, en 2014 se hallaron dos nuevas localizaciones para *B. truncatus* en España (Alicante y Almería); si a una temperatura favorable se le suma el hecho de que el molusco planórbido *B. truncatus* es endémico en algunas regiones cercanas o bañadas por el mar Mediterráneo, la presencia del molusco vector específico para el parásito y el fenómeno de inmigración de personas infestadas desde zonas endémicas a zonas no endémicas, estaríamos frente a la combinación perfecta de factores que podrían permitir la introducción de la schistosomiasis urogenital en España, estableciéndose así una transmisión autóctona.

En el caso de la fascioliasis, el hallazgo en la Comunidad Valenciana de una especie de lymnaeido inhabitual, *Lymnaea* sp., dió la voz de alarma ante lo que se podría considerar la introducción de una nueva especie de lymnaeido en nuestro país. De modo que, ante la posibilidad de estar frente al segundo vector de la fascioliasis en Europa, después de *Galba truncatula*, que es el molusco vector de la fascioliasis por excelencia; se vió necesario a la par que interesante la realización de una serie de estudios determinados basados en los objetivos anteriormente descritos.

Dadas las circunstancias y la situación actual para ambas enfermedades parasitarias, nuestra motivación se centró en estudiar la dinámica y la tasa de crecimiento de dos especies vectoras de planórbido y una de lymnaeido. También tuvimos interés en el estudio de la morfometría de la concha, puestas y huevos, en la capacidad de autofecundación de las distintas especies, en el seguimiento cronológico de la emisión de las puestas, así como también nos centramos en el estudio cuantitativo de las puestas y el estudio de la viabilidad de los huevos contenidos en las puestas, sin dejar de lado el examen de algunos aspectos de la anatomía interna y externa que podrían ser útiles para diferenciar los moluscos a nivel de género.

Se decidió llevar a cabo este tipo de estudios porque, conocer la dinámica de crecimiento de cada una de las especies de interés permite conocer los períodos de mayor crecimiento, los de crecimiento más rápido y aquellos en los que éste se estabiliza o estanca hasta cesar. De modo que, conociendo las épocas o períodos en los que se da el mayor y menor crecimiento, se pueden diseñar estrategias de prevención y control más eficaces, precisas y adecuadas, para la eliminación del molusco vector y en consecuencia para las enfermedades que éstos transmiten. La tasa de crecimiento aporta información sobre la mayor o menor rapidez con la que dichos moluscos alcanzan un tamaño adecuado para poder, por un lado, emitir su primera puesta una vez alcanzada la madurez sexual y, por otro lado, permitir el

desarrollo y supervivencia de las fases larvianas del parásito en su interior. El estudio de la variabilidad de la concha, puestas y huevos mediante la realización de determinadas medidas morfométricas resulta útil para estandarizar características morfológicas y poder así discriminar más fácilmente entre géneros e incluso en ocasiones entre especies. Por su parte, estudiar la capacidad de autofecundación y la tasa de reproducción de las especies de moluscos, permite deducir su capacidad de expansión y transmisión de la enfermedad.

El análisis de la cronología de emisión de las puestas ofrece información sobre las épocas de mayor y menor reproducción, pudiendo estimar así las épocas de mayor y menor riesgo de transmisión de la enfermedad en caso de que se dieran las condiciones óptimas para ello. Así pues, el estudio de la cantidad y viabilidad de las puestas permite estimar la capacidad de los moluscos para diseminar la enfermedad y más concretamente su potencial como vectores y con ello el mayor o menor riesgo de dispersión de la enfermedad. Con las infecciones experimentales se determina la susceptibilidad de los moluscos frente al parásito y por ende, la compatibilidad hospedador-parásito; así como también la capacidad del vector para transmitir la enfermedad en base a la cronobiología de emisión cercariana y en consecuencia el rol que presenta en la transmisión.

Con todo lo dicho anteriormente, la importancia de los estudios llevados a cabo radica básicamente en la valiosa y abundante información que se puede obtener acerca de la biología de los moluscos vectores y que es de tanta utilidad en términos de epidemiología, prevención y control para, en este caso, la schistosomiasis y la fascioliasis.

Con los objetivos antes enumerados, se ha estructurado la exposición de la presente Tesis Doctoral en 7 capítulos. Tras el breve Primer Capítulo de la Introducción, se incluye un Segundo Capítulo para comprender una amplia y suficiente base de Antecedentes, incluyendo (i) inicialmente una descripción detallada de la schistosomiasis urinaria o urogenital centrándose en el ciclo biológico, distribución geográfica, aspectos importantes de la epidemiología, patología y clínica; así como también prestando atención al diagnóstico, tratamiento, profilaxis y control de la enfermedad, (ii) después una descripción de la situación actual, haciendo referencia a la reciente epidemia de schistosomiasis urogenital en Córcega, con especial hincapié en las especies introducidas, duración y lugar de la epidemia, características del caracol vector en Córcega y población humana afectada, (iii) una descripción de la estrategia de gestión de riesgo de la schistosomiasis implantada a partir de la epidemia

acontecida, (iv) una exposición de los aspectos relacionados con el problema de una introducción inesperada de la enfermedad, que incluye el impacto del cambio global y del cambio climático, así como el riesgo de expansión de la enfermedad a otros países europeos, sin dejar de lado aspectos como la anamnesis en el diagnóstico y el carácter zoonótico de la epidemia al tratarse de un híbrido; seguidamente, (v) una descripción minuciosa de la enfermedad de la fascioliasis causada por *F. hepatica* centrándose en las características del agente causal, su ciclo biológico y especies vectoras, distribución geográfica, aspectos epidemiológicos, patología y clínica junto con el diagnóstico y tratamiento, sin olvidar la profilaxis y control de la enfermedad, y por último, (vi) la exposición de casos reportados importantes, seguida de (vii) una explicación del problema de la expansión geográfica mundial de *Fasciola hepatica*, con especial énfasis en la expansión pasiva de especies vectoras, expansión del parásito con especies reservorias de ganado y el impacto del cambio global y del cambio climático.

El Material y Métodos constituye el Tercer Capítulo, dividiéndose en tres bloques, distinguiéndose en el primero de ellos, los correspondientes apartados para (i) las especies de moluscos vectores estudiadas, concretamente dos especies de planorbidos y un lymnaeido, describiendo primero los distintos lugares de prospección y explicando el método de recolección llevado a cabo en la naturaleza, el transporte al laboratorio con la posterior verificación de la ausencia de infección, describiendo más tarde el lanzamiento de los cultivos experimentales y la posterior adaptación de los moluscos en el laboratorio, para poder ya por último explicar cómo se realizó el seguimiento cronológico de las características malacológicas a estudiar; (ii) en el segundo bloque nos referimos a las cepas de *Schistosoma* y *Fasciola* previstas para las infecciones experimentales, describiendo la procedencia y la obtención de las cepas, así como también el método de realización de las infecciones y el seguimiento de las mismas (cuyos resultados no forman parte de esta Tesis), y finalmente (iii) en el tercer bloque se describen los métodos morfométricos de fenotipaje de vectores llevados a cabo y los métodos estadísticos con los que fueron tratados los datos obtenidos.

Los Resultados se incluyen dentro del Cuarto Capítulo, dividiéndose según resultados pormenorizados obtenidos para cada una de las tres especies de moluscos vectores estudiadas. *B. truncatus* y *P. metidjensis* como vectores de la schistosomiasis y *L. sp.* como vector de la fascioliasis. Para cada una de las tres especies mencionadas con anterioridad, se analizan los estudios sobre la

variabilidad de la concha, la autofecundación, la cronología de las puestas y la cantidad emitida de las mismas por parte de los moluscos, seguido de los estudios sobre la variabilidad de las puestas y la viabilidad de los huevos.

El Quinto Capítulo que incluye la Discusión, se dedica (i) al análisis morfológico comparado de las poblaciones de cada una de las tres especies, incluyendo la caracterización de las conchas, clusters y huevos, (ii) al análisis biológico comparado de las poblaciones, centrándose en la caracterización de la autofecundación, cronología de las puestas, en la caracterización cuantitativa de las puestas y de la viabilidad de la progenie, seguido de (iii) la descripción de la aplicabilidad de los estudios efectuados, prestando especial atención al interés en sistemática, haciendo referencia a la diferenciación de poblaciones y especies y al interés en epidemiología y control, incluyendo la exposición de aspectos relacionados con expansión geográfica y con epidemias.

La enumeración de las Conclusiones comprende el Sexto Capítulo, abarcando el Séptimo Capítulo el total de referencias citadas en el texto formando parte de la Bibliografía.

**CAPITULO II**  
**ANTECEDENTES**



## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- LA SCHISTOSOMIASIS O BILHARZIASIS: PRINCIPALES ESPECIES CAUSANTES Y SUS CARACTERÍSTICAS

La schistosomiasis es una enfermedad parasitaria transmitida por moluscos de agua dulce y que es endémica en regiones tropicales y subtropicales, sobre todo en aquellas comunidades pobres sin acceso a agua potable segura ni a saneamiento adecuado. Los parásitos del género *Schistosoma* se caracterizan por ser parásitos estrictos de mamíferos. Los schistosomas son conocidos como trematodos de la sangre, ya que su hábitat en el hospedador definitivo es el sistema vascular, normalmente las venas mesentéricas y vesicales (Sheehan *et al.*, 1984). Son cinco las especies de gran importancia en parasitología humana, aunque de las cinco, son tres especies del género las responsables principales de este tipo de afección parasitaria, *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum* (Fig. 1). Se distinguen entre sí por algunos caracteres morfológicos y también por la morfología de los huevos (Fig. 2) y la vía de eliminación de los mismos. Cada una de ellas presenta un molusco hospedador intermediario específico, en el cual se desarrollan algunas fases larvarias del parásito (Gállego-Berenguer, 2006).

#### ***Schistosoma haematobium***

Es el agente causal de la schistosomiasis urogenital y se trata de una antroponosis ampliamente extendida por gran parte del Continente Africano, especialmente Madagascar, Península Arábiga, Irak, Irán, Siria, Líbano, Turquía y focos limitados en Goa e India (Ash & Orihel, 2010; Gállego-Berenguer, 2006).

Los machos adultos miden entre 10 y 15 mm de longitud y las hembras aproximadamente 20 mm (Ash & Orihel, 2010). Los machos presentan el tegumento finamente espinoso y los ciegos se fusionan hacia la mitad de su longitud corporal. Los machos poseen de cuatro a cinco testículos localizados en la porción anterior del cuerpo, por detrás de la ventosa ventral y las hembras tienen el ovario en su mitad posterior pudiendo contener entre 20 y 100 huevos en su útero (Gállego-Berenguer, 2006). Los huevos son voluminosos, carentes de opérculo y tienen una cubierta transparente con un agudo espolón terminal, miden de 112 a 170  $\mu\text{m}$  por 40-70  $\mu\text{m}$  (Ash & Orihel, 2010).

La puesta de huevos tiene lugar en los plexos venosos de la región pélvica, fundamentalmente en los que irrigan la pared de la vejiga urinaria, y son eliminados con la orina (Gállego-Berenguer, 2006), aunque en ocasiones se los puede encontrar en las heces. El período previo a los síntomas es de 8-12 semanas (Ash & Orihel, 2010).

Sus hospedadores intermediarios son moluscos pulmonados dulceacuícolas, pertenecientes al género *Bulinus*, el cual se caracteriza por poseer una concha cónica, de color gris oscuro y que mide alrededor de 1 cm de longitud (Ash & Orihel, 2010; Gállego-Berenguer, 2006).

### ***Schistosoma mansoni***

Es el agente causal de la schistosomiasis intestinal y es endémica de África, aunque también se distribuye por Arabia, numerosas islas del Caribe incluido Puerto Rico, República Dominicana, Guadalupe, Martinica, etc. Con el tráfico de esclavos se dispersó por América del Sur (Brasil, Surinam y Venezuela). Además del hombre, los perros, gatos y ratas pueden ser infestados por el parásito.

Se distingue por el tegumento dorsal de sus machos, provisto de pequeños tubérculos espinosos y por la fusión anterior de sus ciegos. Los machos poseen de 6 a 9 testículos, localizados en la mitad anterior del cuerpo y las hembras se caracterizan por la situación muy anterior de su ovario y un número muy escaso de huevos uterinos, por lo que sus glándulas vitelógenas ocupan los dos tercios distales de su cuerpo (Gállego-Berenguer, 2006)

Los machos son robustos y miden de 6,4 a 12 mm de longitud y las hembras de 7,2 a 17 mm. Los huevos son grandes, miden de 114 a 175  $\mu\text{m}$  por 45-70  $\mu\text{m}$ , carecen de opérculo y tienen una cubierta transparente y un pronunciado espolón lateral (Ash & Orihel, 2010).

Los plexos venosos de la región final del colon y los del íleon inferior son los lugares de elección para la puesta de los huevos que se eliminan fecalmente (Gállego-Berenguer, 2006). El período previo a los síntomas es de 6-8 semanas y los vermes adultos pueden vivir hasta 25 años (Ash & Orihel, 2010).

Sus hospedadores intermediarios son moluscos pulmonados acuáticos del género *Biomphalaria*, los cuales se caracterizan por poseer una concha discoidal plana marrón oscuro o rojiza con un diámetro de entre 7-22 mm (Ash & Orihel, 2010; Gállego-Berenguer, 2006).

### ***Schistosoma japonicum***

Es el agente causal de la schistosomiasis arteriovenosa. La infección con *S. japonicum* es una infección zoonótica con múltiples reservorios como son roedores, perros, ganado, búfalos de agua, cerdos, caballos, ovejas y cabras., desafiando los esfuerzos para su eliminación, siendo ésta mucho más costosa (Gállego-Berenguer, 2006). *S. japonicum* se presenta en China, Filipinas, Indonesia y Tailandia (Ash & Orihel, 2010).

Los adultos se caracterizan por su tegumento desnudo, carente de tubérculos y porque sus ciegos se fusionan en el tercio posterior (Gállego-Berenguer, 2006). Los machos y las hembras miden de 12 a 20 mm de longitud según el hospedador animal en el que se encuentren. Los huevos presentan una espina lateral rudimentaria, poco visible. En el caso de *S. japonicum* los huevos son grandes, redondeados y sin opérculo; miden de 70 a 100  $\mu\text{m}$  por 55-65  $\mu\text{m}$  (Ash & Orihel, 2010).

Las hembras tienen el ovario situado en la región media de su cuerpo y pudiendo contener su útero de 50 a 200 huevos o más. el útero y los machos normalmente tienen 7 u 8 testículos (Gállego-Berenguer, 2006).

Las formas adultas de esta especie del parásito desovan en los plexos venosos y arteriales que irrigan el intestino delgado, más raramente en los renales y esofágicos, y los huevos salen al exterior con las deyecciones. Los hospedadores intermediarios son moluscos del género *Oncomelania* (Gállego-Berenguer, 2006).

Además de las tres especies precedentes son otras especies del género *Schistosoma* las que también son agentes causales de schistosomiasis humanas de tipo zoonótico como son *S. mekongi* y *S. intercalatum* que serán descritas a continuación de forma más breve.

### ***Schistosoma mekongi***

Esta especie vive en las venas mesentéricas superiores que drenan el intestino delgado. Su área de distribución se reduce a lo largo del río Mekong, en el sudeste de Asia, en países como Laos, Camboya y Tailandia (Gállego-Berenguer, 2006). Los vermes adultos de *S. mekongi* son semejantes en tamaño y morfología a los de *S. japonicum*. En el caso de *S. mekongi*, los huevos, aunque muy parecidos a los de *S. japonicum* son de dimensiones más reducidas (51-78  $\mu\text{m}$  por 39-66  $\mu\text{m}$ ). Los moluscos

que actúan como hospedador intermediario son moluscos hidróbidos del género *Neotricula*. (Ash & Orihel, 2010).

En Malasia se ha descrito recientemente otra especie a la que se le ha dado el nombre de *S. malayensis*.

### ***Schistosoma intercalatum***

Es el agente causal de la schistosomiasis intestinal, vive en los plexos mesentéricos del intestino grueso. (Ash & Orihel, 2010). Se distribuye por las zonas de pluvisilva de África central (World Health Organization, 2017). Su distribución abarca el Gabón, Camerún y la República Centroafricana. El molusco hospedador intermediario es del género *Bulinus* (Gállego-Berenguer, 2006). Los huevos presentan un espolón terminal y suelen ser más grandes (140-240 µm por 50-85 µm) que los huevos de *S. haematobium* y se encuentran en las heces no en la orina. Dichos huevos presentan una curvatura ecuatorial, la prominencia de la cual es variable. La espícula terminal suele ser más larga, ligeramente curva y mucho más angulosa que en *S. haematobium* y son eliminados en las heces (Ash & Orihel, 2010).

Algunas poblaciones de esta especie se ha visto recientemente que muestran diferencias a nivel específico, habiéndose descrito una nueva especie, *S. guineensis*. Con ella resultan ya siete las especies de *Schistosoma* detectadas afectando a humanos.

## **2.1.1.- LA SCHISTOSOMIASIS URINARIA O UROGENITAL**

### **2.1.1.1.- AGENTE CAUSAL, CICLO BIOLÓGICO Y ESPECIES VECTORAS**

#### **Agente causal**

El agente causal de la schistosomiasis urogenital es *S. haematobium*. A diferencia de lo que ocurre con otros trematodos, las especies del género *Schistosoma* presentan sexos separados, es decir, hay un macho y una hembra presentando ambos diferentes características morfológicas (Hillyer, 1982; Loker, 1983).

De forma general, por un lado, los machos (Fig. 3 a) presentan, por lo general, la cubierta externa del tegumento ornamentada con tubérculos y espinas cortas con el

cuerpo de aspecto pseudocilíndrico e incurvado por el repliegue de sus bordes para formar el canal ginecóforo, en el que la hembra permanece durante la cópula hasta que inicia la puesta de sus huevos. La longitud de los machos oscila entre los 10 y 20 mm en tanto que su diámetro es tan sólo de 0,5-1 mm (Gállego-Berenguer, 2006). Poseen las ventosas bastante próximas, y los testículos post-acetabulares cada uno con su conducto eferente reuniéndose en un espermiducto común que se dilata en una vesícula seminal y que a su vez desemboca en el poro genital post-acetabular (Hillyer, 1982; Loker, 1983; Gállego-Berenguer, 2006).

Por otro lado, las hembras (Fig. 3 b-c), que son más largas y finas que los machos (15-25 x 0,25-0,30 mm), se alojan en el canal ginecóforo del macho. Presentan la cubierta externa lisa o casi lisa con pequeñas o diminutas espinas. El ovario oval tiene una situación subecuatorial que es más o menos anterior o posterior según las especies. Del borde posterior del ovario parte el oviducto que se dobla hacia delante del ovario y da paso al ootipo del que nace un útero recto y tubular cuyo poro se abre por detrás del acetábulo y que contiene un número reducido de huevos. Al ootipo confluye un largo viteloducto, también rectilíneo, que ocupa toda la región postovárica de su cuerpo, en cuyos lados se sitúan los folículos vitelógenos (Hillyer, 1982; Loker, 1983; Gállego-Berenguer, 2006).

Los huevos son de grandes dimensiones (hasta 200  $\mu$ m de largo) y se distinguen por la presencia, lateral o apical posterior, de un desarrollado espolón y conteniendo ya un miracidio bien desarrollado en el momento de ser puestos por la hembra (Gállego-Berenguer, 2006).

## **Ciclo biológico**

En su ciclo biológico, las especies del género *Schistosoma* son alternativa y obligatoriamente parásitos de un vertebrado (mamífero) y de un invertebrado (molusco gasterópodo).

Las formas adultas del parásito viven en vasos sanguíneos del sistema porta donde tiene lugar la reunión del macho y la hembra y su cópula. Una vez que ésta ha tenido lugar, las parejas inician una emigración hacia los plexos venosos que irrigan diversos órganos (los de la región pélvica y vejiga urinaria, o los de distintas zonas del tubo digestivo), hacia los cuales cada especie muestra una notoria selectividad, que en el caso de *S. haematobium* es la vejiga urinaria.

El ciclo biológico (Fig. 4) se inicia con la puesta de los huevos, para la cual las hembras abandonan el canal ginecóforo de los machos y, gracias a su pequeño diámetro, penetran en vasos de pequeño calibre en cuya luz van depositando sus huevos, retrocediendo mientras los ponen para pasar a otros pequeños vasos y repetir la operación, una vez tras otra, hasta dejar la luz de estos pequeños vasos repleta de largas filas de huevos (200-300 hasta 3000-4000 o más según la especie) desde 300 hasta 3000 en *S. haematobium* (Gállego Berenguer, 2006).

Del total de huevos puestos, algunos atraviesan la pared de las venas y los tejidos de la vejiga urinaria, donde más del 50% quedan atrapados y otros pasan a través de la pared del lumen hasta llegar al medio externo (Theron & Jourdane, 1979; Jourdane & Theron, 1980; Jourdane *et al.*, 1980; Jourdane, 1983).

Con la orina (en *S. haematobium*) o las deyecciones, los huevos alcanzan el agua y tiene lugar la salida del miracidio (larva móvil y ciliada) por la efracción de las paredes del huevo. El miracidio emerge nadando activamente gracias a su cubierta ciliada, sobreviviendo tan sólo unas pocas horas en el agua durante las cuales tratará de penetrar en los tejidos blandos de los moluscos que actúan como hospedadores intermediarios específicos, guiados por los estímulos quimiotácticos de los mismos (Gállego Berenguer, 2006). En el caso de *S. haematobium*, son los moluscos de agua dulce del género *Bulinus*, como es el caso de la especie *B. truncatus*.

Es a nivel de caracol hospedador donde el parásito sufre una multiplicación asexual. El miracidio metamorfosea dando lugar a un esporocisto de primer orden, denominado esporocisto madre con capacidad exclusivamente esporocistógena, el cual produce numerosos esporocistos de segundo orden, llamados esporocistos hijos, los cuales presentan capacidad tanto cercariógena como esporocistógena, es decir, capacidad para producir tanto un elevado número de cercarias como de replicarse produciendo una siguiente generación de esporocistos hijos, con idéntica capacidad bipotencial y así sucesivamente (Theron & Jourdane, 1979; Jourdane & Theron, 1980; Jourdane *et al.*, 1980; Jourdane, 1983).

Después de varias semanas, las cercarias (larvas no ciliadas de tipo furcocercaria) que ya se han formado emergen de los esporocistos hijos, abandonando el molusco hospedador aproximadamente a los 4 meses de la infestación, y nadando activamente (vida de 1-3 días) en busca del que será el hospedador definitivo, que en caso de *S. haematobium* es el ser humano.

Durante su penetración transcutánea, la furcocercaria pierde su cola y pasa a un estadio juvenil del parásito, denominado esquistosómulo, que gana acceso al sistema circulatorio y llega a la circulación mayor y de allí a los capilares pulmonares a partir de

las 48h de penetración de la frucocercaria. Arrastrados por la corriente sanguínea de las venas pulmonares, los esquistosómulos llegan al corazón y desde este son conducidos al hígado por la arteria hepática para pasar después a los vasos del sistema porta. En ellos tendrá lugar su maduración a adultos y el acoplamiento de los sexos, que cierran el ciclo al iniciarse la puesta de los huevos. El período de puesta puede durar varios años, ya que la vida de los parásitos adultos se puede prolongar hasta 30 años en el hospedador definitivo, aunque la esperanza de vida se encuentra entre 3 y 8 años (Sheehan *et al.*, 1984; Gállego Berenguer, 2006; IAMAT, 2015; Kincaid-Smith *et al.*, 2016).

Aunque *S. haematobium* puede desarrollarse en *Bulinus* spp. a temperaturas alrededor de los 20°C (Chu *et al.*, 1966), la temperatura óptima para la infección de los caracoles vectores (*Bulinus* spp.) con el miracidio de *S. haematobium*, es entre los 20°C y los 30°C (Chu *et al.*, 1966; Blankespoor *et al.*, 1989). La emisión cercariana también depende de la temperatura, con una mayor emisión a altas temperaturas (Rollinson *et al.*, 2001). Sin embargo, la emisión cercariana puede darse entre 10°C y 30°C (McClelland, 1965).

### **Especies vectoras**

Son los moluscos de agua dulce pertenecientes al género *Bulinus* los que actúan como hospedadores específicos de los estados larvarios de *S. haematobium*.

*Bulinus* (O.F. Müller, 1781) es un género de gasterópodo planórbido dulceacuícola con una treintena de especies descritas, caracterizado por poseer una concha levógira con una espira de forma muy variable, una abertura relativamente alta y vueltas uniformemente curvadas, pudiendo ser angulosas y raramente carenadas, a diferencia de otros planórbidos con forma discoidal (por ejemplo: *Planorbis*) (Brown, 1980).

Se trata de un género de gran interés sanitario, ya que la mayoría de sus especies son vectoras de parásitos trematodos que pueden causar graves enfermedades en humanos, como la schistosomiasis (Esquistosomiasis) o Bilharziasis. *Bulinus truncatus* es un taxón de amplia distribución geográfica que comprende varios países europeos: España, Francia continental y Córcega, Grecia continental y Creta, Italia (Cerdeña y Sicilia), Malta y Portugal. También está presente en gran parte de África, desde Egipto hasta el sur de Marruecos y el Sáhara por el norte y desde la República Democrática del Congo hasta Malawi y Etiopía, por el sur, así como en Oriente Medio (Irán, Irak y Arabia Saudita) y el Oriente Próximo (Jordania, Israel y Yemen) (Germain, 1931;

Larambergue, 1939; Brown, 1980; Schütt, 1987; Giusti *et al.*, 1995). En España *B. truncatus* ha sido citada previamente en Andalucía, islas Baleares, Cataluña y Galicia (Rolán *et al.*, 1987; Bech, 1990; Pérez-Quintero *et al.*, 2004; Beckman, 2007).

Durante 2014 se hallaron dos nuevas poblaciones de *Bulinus truncatus* en España. En una de ellas, la laguna de Villena (Alicante) que fue desecada a principios del siglo XIX, sólo se encontraron conchas, mientras que, en la otra, que se encuentra en El Ejido (Almería), se hallaron una cantidad considerable de ejemplares vivos.

Además del valor faunístico y biogeográfico de *B. truncatus*, debe señalarse su gran importancia sanitaria, ya que es bien conocido su papel como hospedador intermediario o vector de agentes causales de schistosomiasis, concretamente de *S. haematobium* parásito de humanos (Berry *et al.*, 2014; Holftreter *et al.*, 2014; Lewis & Tucker, 2014) y de *Schistosoma bovis* parásito del ganado (Moné *et al.* 1999; De La Torre-Escudero *et al.*, 2012).

La concha de *B. truncatus* (Fig. 5) es, como ya se ha dicho con anterioridad, levógira y posee una forma ovoide globosa bastante frágil, de color ámbar pálido, muy variable respecto a la altura de la espira. Una descripción más detallada nos permite conocer que su concha está compuesta por 3-4 vueltas convexas abombadas, con suturas profundas siendo la última un poco más alta que la mitad de la concha y provista de estrías longitudinales, aunque en general poco marcadas, finas, desiguales algo flexuosas. Posee un ápice romo, una abertura oblicua ovalada y un poco angulosa por la parte superior, con el peristoma delgado, subcontínuo, no reflejado, sin engrosamiento, con el margen columelar normalmente estrecho más o menos enrollado y con el obliquo estrecho. Las dimensiones máximas para esta especie alcanzan 12,0 mm de longitud y 8,0 mm de diámetro (Germain, 1931; Brown, 1980). La protoconcha, como en todo el género *Bulinus*, presenta una microescultura puntiforme cuyos puntos aparecen dispuestos en filas espirales (Germain, 1931).

### 2.1.1.2.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La schistosomiasis debida a *S. haematobium* es una enfermedad que fue conocida ya en la antigua Mesopotamia y en la parte sur del Mediterráneo, donde fue detectada en momias egipcias con vejigas calcificadas, una característica de la forma urogenital de la enfermedad. La distribución geográfica de *S. haematobium* cubre el África Subsahariana, el medio Este y la península Arábiga con un total de 54 países afectados (WHO, 2014).

### 2.1.1.3.- EPIDEMIOLOGÍA

La zona de prevalencia de la schistosomiasis se sitúa en las regiones tropicales y subtropicales (Fig. 6), más notablemente en aquellas comunidades que no tienen acceso al agua potable y a unas condiciones de saneamiento favorables. Se estima que el 90% de las personas que se encuentran bajo la necesidad de ser tratadas contra la schistosomiasis viven en África (OMS, 2017). De los más de 110 millones de casos en África sub-Sahariana, 70 millones están asociados a hematuria, 18 a patologías de la pared de la vejiga y 10 millones a la hidronefrosis que conlleva a una enfermedad severa de los riñones (Van der Werf *et al.*, 2003; King *et al.*, 2005), así como también se asocia al cáncer de vejiga (Shiff *et al.*, 2006).

Se estima que unos 16 millones de mujeres presentan schistosomiasis genital, la cual causa complicaciones relacionadas con la fertilidad y transmisión del VIH, así como otras infecciones transmitidas sexualmente (Kjetland *et al.*, 2014). La schistosomiasis afecta particularmente las poblaciones pobres de agricultores y pescadores, así como a las mujeres que realizan sus tareas domésticas con el agua infestada por no tener acceso a otro tipo de agua, dejándolas igualmente expuestas al riesgo. La falta de higiene y el contacto con el agua infestada mediante el juego hace que los niños sean particularmente vulnerables (OMS, 2017).

El éxodo rural y los desplazamientos de refugiados son factores que favorecen la introducción de la enfermedad en nuevas regiones. Así pues, teniendo en cuenta que el crecimiento demográfico va de la mano con el aumento de las necesidades de energía y agua, y que estos dos factores a menudo son el origen de programas de desarrollo que conllevan también a modificaciones en el ambiente, se deduce que todo ello junto con el desarrollo del ecoturismo y los viajes, refuerza la transmisión de la schistosomiasis.

Dicha enfermedad es endémica en 78 países tropicales y subtropicales del mundo (OMS, 2014). La Organización Mundial de la Salud en 2014 estimó que 258 millones de personas requirieron tratamiento preventivo contra el parásito (Fig.7). Más de 61,6 millones de personas fueron tratadas contra la schistosomiasis en 2014 (OMS, 2014).

Los datos aportados por GLOBOCAN de la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC, 2012) muestran que, en las mujeres, la mortalidad debida al cáncer de vejiga es más elevada en regiones endémicas de África para la schistosomiasis urogenital. Sin embargo, en los hombres, la diferencia es menos importante debido a

una menor exposición y a la presencia de factores de confusión tales como el tabaco (Berry *et al.*, 2016).

#### **2.1.1.4.- PATOLOGÍA Y CLÍNICA**

Exponiendo las manifestaciones clínicas de la schistosomiasis urinaria desde una perspectiva patogénica, y de acuerdo con el vigor de la respuesta inmune del hospedador, esta parasitosis puede deberse a desórdenes en la respuesta inmune mediada por células o por inmuno-complejos. Lo anterior, normalmente debido a una infección por *S. haematobium*, se atribuye a la formación de granulomas en la totalidad del tracto urinario, que es donde se da el mayor impacto al ser el sitio de mayor oviposición.

De forma común se dan infecciones bacterianas y virales secundarias, las cuales pueden estar implicadas en la formación secundaria de piedras en la vejiga. Ciertos complejos circulatorios compuestos por antígenos de *Schistosoma* y diferentes clases de inmunoglobulinas depositadas en los riñones dan lugar a varios patrones de patología glomerular. Ésta última ha sido categorizada bajo seis clases basadas en el perfil histológico y de inmunofluorescencia. Estas seis clases han sido asociadas a las respectivas manifestaciones clínicas y dependen del estado de evolución de la respuesta inmune del hospedador, del grado de asociación con la fibrosis hepática y de la coinfección con *Salmonella* o hepatitis C.

El amplio espectro clinicopatológico de la schistosomiasis urinaria refleja la evolución de la respuesta inmune del hospedador según la cronicidad de la infección y de las coinfecciones bacterianas o virales. Así pues, la patogenicidad es atribuida a la perturbación del sistema inmune del hospedador por parte de los antígenos del parásito. De modo que, la enfermedad urinaria puede ser, por tanto, categorizada en dos tipos según sea la respuesta inmune a la infección y el potencial oncogénico de esta última en, celular (Tipo IV reacción de hipersensibilidad) o humoral (principalmente Tipo III) (Barsoum, 2012).

A continuación, serán descritas con más detalle las diferentes manifestaciones patológicas y clínicas que la infección por *S. haematobium* provoca en las diferentes partes del tracto urinario.

#### **A) Manifestaciones de la respuesta inmune mediada por células**

El granuloma schistosomal es la unidad típica de la respuesta inmune celular en la infección por *Schistosoma*. Dicho granuloma está compuesto por diferentes células sanguíneas y tisulares que son reclutadas por quimio-trayentes específicos, que cubren funciones específicas. Aunque esta reacción es básicamente celular por naturaleza, el rol de los anticuerpos y del complemento ha sido documentado en modelos experimentales desde hace décadas. El impacto clinicopatológico del granuloma schistosomal difiere según la fase de evolución en la que se encuentre. La inflamación es dominante en la fase temprana cuando el granuloma es celular y secreta activamente quimiocinas, citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios, mientras que la transformación parenquimal-mesenquimal domina en las últimas fases cuando el granuloma es moderado, fibrótico o calcificado (De Brito *et al.*, 1984).

### **A.1) Lesiones inflamatorias**

La infección por *S. haematobium* afecta frecuentemente a la vejiga, uréteres inferiores, vesícula seminal y de forma menos frecuente, al vaso deferente, la próstata y el sistema genital femenino. Las lesiones iniciales son granulomas mucosos que se unen para formar tubérculos, nódulos o masas que normalmente se ulceran. La submucosa y capas de músculo también están implicadas en el proceso inflamatorio el cual puede conducir a una contrapresión transitoria si las uniones uréterovesicales están afectadas. La manifestación clínica característica es la hematuria terminal, normalmente asociada al incremento de la frecuencia de micción y disuria.

### **A.2) Lesiones fibróticas**

#### **Vejiga**

Las lesiones de la vejiga dejan una mucosa con manchas granulosas, descriptivamente conocidas como manchas de arena, las cuales son características de la schistosomiasis. Éstas a menudo se calcifican, proporcionando una opacidad típica en el plano de la examinación radiológica. La naturaleza parcheada de la lesión puede dañar relativamente la mucosa sana la cual se llega a enquistar dando lugar a una patología típica llamada cistitis quística, pudiendo ser estas lesiones totalmente asintomáticas. La bacteriuria secundaria es común, particularmente en pacientes con lesiones obstructivas (Laughlin *et al.*, 1978), debidas en parte al uso de instrumentos urológicos, causando una cistitis crónica.

En ciertas zonas de endemia, los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*, son causas notorias de la resistente cistitis bacteriana secundaria, debido a la conocida asociación simbiótica entre schistosomas y ciertas cepas de *Salmonella*

(Muniz-Junqueira *et al.*, 2009). Se han detectado sobre todo las bacterias por *Salmonella* en pacientes de Egipto (Laughlin, 1984).

### **Uretra**

La parte más externa de la vejiga es uno de los sitios favoritos de oviposición de los schistosomas, más concretamente el ápice del triángulo vesical. La acumulación de huevos en esta zona desarrolla una fibrosis intensa la cual induce, a su vez, la obstrucción del cuello de la vejiga, provocando incontinencia de forma ocasional. Esta incontinencia, sin embargo, es una complicación que normalmente se da cuando se intenta dilatar el cuello de la vejiga mediante procedimientos urológicos (Barsoum, 2012).

### **Uniones urovesicales**

Las uniones ureterovesicales marcan la base del triángulo de la vejiga, de ahí su vulnerabilidad a las lesiones schistosomales. Durante la fase inicial de la enfermedad, las lesiones que se producen pueden llegar a causar obstrucción funcional y/o reflujo, pudiendo esto conllevar cambios de presión en la parte de atrás del tracto urinario (Barsoum, 2012).

### **Uréteres**

Las lesiones por bilharziasis o schistosomiasis se limitan comúnmente a la mitad inferior de los uréteres, correspondiéndose con el borde inferior de la tercera vértebra lumbar, atribuyéndose a los canales anastomóticos de ese sitio, situados entre las venas mesentérica inferior y la periuréterica y la vesical. Se cree que estas comunicaciones son la principal ruta a través de la cual los individuos adultos de *S. haematobium* migran al sistema urinario. Las lesiones de los uréteres incluyen la formación de tubérculos tempranos y úlceras que pueden acabar en quistes. La uropatía obstructiva puede que no llegue a ser sintomática hasta que la enfermedad no esté avanzada y a menudo se detecta sólo por pielografía intravenosa o renografía con yoduro-131-iodohipurato sodio (Pugh *et al.*, 1979; Young *et al.*, 1979). Otras lesiones asociadas a la patología del riñón o de la vejiga, no provocan síntomas específicos, aunque algunos pacientes se quejan de dolor o molestia en la zona suprapúbica o pélvica (Barsoum, 2012).

### **Estructuras genitales**

Se pueden desarrollar lesiones inflamatorias y una subsecuente fibrosis en las vesículas seminales y próstata de hombres, así como también en el cérvix uterino, vagina, vulva y trompas de Falopio de mujeres (Brown *et al.*, 1982). Muchas de estas lesiones son asintomáticas, aunque la fibrosis subsecuente puede provocar la esterilidad en el hombre, siendo la calcificación de las vesículas seminales es uno de los signos radiológicos característicos en la schistosomiasis (Barsoum, 2012).

### **Nefropatía obstructiva**

Los efectos de la presión en la espalda pueden extenderse a los riñones o bien producir el fallo de la compensación urodinámica uretérica o el reflujo vesicoureterico. Debido a la fibrosis asociada al parénquima renal, el alivio de la obstrucción puede que no corrija la presión de la espalda que aparentemente se muestra en las radiografías. En estos casos es necesario medir la presión de la espalda para evitar intervenciones injustificadas. El procedimiento estándar en este caso es el llamado test Whitaker, el cual se correlaciona con el renograma de diuresis en el 75% de los casos (Barsoum, 2012).

### **Pielonefritis crónica**

Como resultado de la obstrucción, el reflujo, la infección y posiblemente la lesión tubular mediada inmunológicamente por la especificidad del parásito, daña los riñones a menudo acabando en una nefritis intersticial crónica con fibrosis y daño funcional. La pérdida de la habilidad de concentración, pérdida de sodio y la acidosis tubular constituyen la tríada inicial típica. Además, la excreción de calcio a través de la orina se ve incrementada debido a la reabsorción de los huesos y a su vez, la concentración de citrato se ve reducida debido a la acidosis tubular.

En la schistosomiasis, la incidencia de piedras infectivas se ve incrementada. El glomérulo puede mostrar cambios alternativos asociados a fibrosis periglomerular o daño inmunológico concomitante. La función glomerular de forma eventual acaba en fallo renal. Como en otro estado final de la enfermedad renal debida a enfermedad intersticial crónica, la anemia es severa, la acidosis es marcada al combinarse la retención ácida con la pérdida de bases y la enfermedad ósea es prominente debido a la temprana pérdida de calcio y el subsecuente hiperparatiroidismo (Barsoum, 2012).

## **B) Enfermedad mediada por el inmuno-complejo**

### **Glomerulonefritis**

Se han reportado unos cuantos casos del síndrome nefrítico transitorio durante las fases tempranas de la infección por *S. hematobium* en la parte baja del tracto urinario (Ezzat *et al.*, 1978). Esto es a menudo olvidado por la hematuria y disuria que dominan en la enfermedad de la vejiga. Los pacientes pueden desarrollar hipertensión moderada, edemas y su orina contiene significativas cantidades de albúmina, células rojas dismórficas y emisiones de sangre (Barsoum, 2012).

### **Malignidad**

La neoplasia de la vejiga se ha reportado en pacientes, con una incidencia mayor del 4.5 % (Chugh *et al.*, 1986). La típica lesión histológica reportada en muchos estudios a lo largo de los años es un carcinoma de células escamosas en alrededor del 60%. El carcinoma de células transicionales fue reportado en un 20%, el adenocarcinoma en un 10% y una mezcla de ambos en un 10%. Los huevos de *Schistosoma* fueron detectados en más del 85% de los cánceres de vejiga en una serie de 1026 casos de Egipto sujetos a cistectomía quirúrgica (Ghoneim *et al.*, 1997). El carcinoma de la vejiga, el cáncer más común en Egipto es la complicación más importante que se da, siendo la mayor parte de los casos descritos en adolescentes (Schwartz, 1981).

El tumor, particularmente cuando se trata de células escamosas, permanece por un período largo de tiempo antes de expandirse en las proximidades de los tejidos pélvicos, gracias a la oclusión linfática por el precedente proceso fibrótico (Gouda *et al.*, 2007). Las infecciones bacterianas y víricas asociadas, así como los productos parasitarios, son los principales factores de patogenicidad. La asociación con la infección del virus del papiloma humano ha dado recientemente una considerable atención a ese respecto, encontrándose en alrededor de 1 de cada 4 casos (El-Mawla *et al.*, 2001). Dicho tumor se puede detectar mediante examinación pélvica en la cual puede identificarse de forma local la expansión linfática extravesical y la metástasis en los pulmones, hígado o huesos puede ser detectada mediante análisis específico de imágenes (Barsoum *et al.*, 2012).

Puede darse dermatitis en el punto de entrada del parásito, pero a veces va más allá produciendo pápulas pruríticas, formándose más comúnmente en las piernas. El síndrome de la schistosomiasis aguda, conocido como la fiebre de Katayama, es esencialmente una enfermedad del complejo inmune, similar a la enfermedad del suero. Normalmente empieza durante la fase de migración del parásito y llega a ser más severa cuando el verme adulto empieza a depositar los huevos (Lehman *et al.*, 1973).

Las manifestaciones clínicas de dicha enfermedad incluyen fiebre, resfriado, diarrea, anorexia, urticaria, leucocitosis y eosinofilia. Los síntomas van remitiendo gradualmente entre los 3 y 4 meses después de la exposición, mientras que, por su parte, los síntomas de la schistosomiasis aguda han sido raramente reportados en *S. haematobium* que en otras especies del género *Schistosoma*. La enfermedad crónica causada por *S. haematobium*, afecta predominantemente al tracto urogenital. Esto se debe a que los huevos son depositados en los tejidos intersticiales, formándose granulomas a su alrededor con la consecuente fibrosis. La severidad de la enfermedad es directamente proporcional al número de huevos depositados (Lehman *et al.*, 1973).

Los análisis de orina realizados durante esa fase muestran una significativa correlación entre la intensidad de la infección y el grado de hematuria y proteinuria (Wilkins *et al.*, 1979; Mott *et al.*, 1983). Una respuesta inflamatoria exudativa de la mucosa y de la submucosa en el sistema genitourinario, se manifiesta con hiperemia, úlceras, nódulos y pólipos, pudiendo desarrollarse de forma irreversible y con lesiones fibrosas crónicas que son más evidentes a partir de los treinta años. Esta forma crónica de la enfermedad se desarrolla principalmente en los pacientes infectados de forma más severa (Barsoum *et al.*, 2012).

### **Respuesta el hospedador**

La respuesta del hospedador frente a la schistosomiasis es compleja y la defensa más efectiva se da durante los primeros días después de la penetración de la cercaria. Durante este período, la tasa de deserción de los schistosómulo en la invasión es alta (Warren, 1982). La respuesta del hospedador está mediada por la activación inespecífica del complemento, anticuerpos IgE y IgG, eosinófilos, macrófagos y mastocitos. Las citadas IgE y IgG actúan principalmente por citotoxicidad mediada y dirigida por anticuerpos, mientras que las células efectoras con los eosinófilos y los macrófagos.

El schistosómulo responde mediante un número de mecanismos como la incorporación de antígenos del hospedador, incluyendo antígenos ABO y HLA y otras glicoproteínas que se encuentran en la superficie corporal del hospedador. El parásito a su vez libera algunos antígenos de su propia superficie y secreta sustancias que interfieren en la respuesta del hospedador. Así pues, se crea un equilibrio que permite que el parásito pueda persistir en dicho hospedador (inmunidad concomitante) (Capron *et al.*, 1982).

En la schistosomiasis crónica, la respuesta inmune es inicialmente retrasada por hipersensibilidad, con la formación de granulomas alrededor de los huevos del

parásito. El hospedador modula su respuesta inmunológica a través de varios mecanismos supresores que incluyen principalmente a los linfocitos T supresores, los monocitos y el factor serológico (Ottesen, 1982).

Esta parasitosis comprende dos fases distintas: una fase aguda que se da más o menos rápidamente después de la infección y una fase crónica que puede aparecer unas semanas o meses más tarde y evolucionar durante años (Gryseels, 2012).

### **Fase aguda**

Esta fase se traduce en dos entidades clínicas distintas: la dermatitis de nadador y el síndrome de Katayama. La dermatitis de nadador se manifiesta mediante lesiones cutáneas que aparecen muy rápidamente en los puntos de penetración de las formas larvianas del parásito (las furcocercarias). Éstas ocasionan un prurito localizado asociado a un eritema de tipo urticaria y/o a las lesiones eritemato-papulosas. Las lesiones desaparecen generalmente en unas cuantas horas, pero en algunos casos pueden persistir uno o dos días.

El síndrome de Katayama es una reacción inmunopatológica desarrollada por los schistosómulos (estado larvario) que sobreviven de 2 a 10 semanas después de la infección. Los síntomas varían desde fiebre, tos seca, urticaria, mialgias y cefaleas hasta incluso afecciones del sistema nervioso central o cardíacas, aunque de manera menos frecuente. Las manifestaciones de la fase aguda son, generalmente discretas en el caso de la schistosomiasis debida a *S. haematobium*, en comparación con otras especies de *Schistosoma* (Berry *et al.*, 2016).

### **Fase crónica**

La fase crónica está directamente relacionada con la reacción granulomatosa que se produce como consecuencia de los huevos. En el caso de la schistosomiasis urogenital, los granulomas se localizan a nivel de todo el tracto urinario y genital (Whitty *et al.*, 2000). Sintomáticamente, la afección urinaria es la más frecuente, aunque la hematuria es muy clásica presentándose en aproximadamente el 40% de las schistosomiasis urogenitales. La hematuria puede estar asociada o no a los dolores o complicaciones hipogástricos. Además, se puede dar una uréterohidronefrosis cuando el granuloma se desarrolla en el lado endoluminal de los uréteres. Con respecto a la parte ginecológica, se pueden observar en la mujer las dispareunias y ulceraciones genitales, pudiendo favorecer la transmisión de infecciones de transmisión sexual tales como el SIDA, mientras que en el hombre se observa orquitis, epididimitis o una prostatitis, asociadas o no a una hemospermia. Las complicaciones ligadas a la fase

crónica solo se observan en las poblaciones que viven en zonas de endemia y que por tanto son más propensas a las infestaciones múltiples después de muchos años de evolución. Se producen problemas en la función de la vejiga tales como la disuria, producción de residuos al miccionar, pudiendo esto ligarse a un cáncer de vejiga. Las obstrucciones bilaterales, aunque son raras, pueden llegar a generar una insuficiencia renal y tanto en la mujer como en el hombre las afecciones genitales pueden tener como consecuencia la hipofertilidad (Berry *et al.*, 2016).

### **Schistosomiasis urinaria y cáncer**

La asociación entre la schistosomiasis urogenital y el cáncer de vejiga fue abordada por primera vez por C. Goebel en 1905, AR Ferguson, profesor de Patología y de Bacteriología en la Facultad de Medicina del Cairo. El profesor publicó un primer estudio bajo una serie de 40 autopsias describiendo la posible asociación entre cáncer de vejiga y la infección por *S. haematobium*. Dentro del cuadro de la schistosomiasis urogenital se abordaron dos procesos no exclusivos:

- una reacción inflamatoria crónica intra-vesical causada por los granulomas schistosomales centrados bajo los huevos y que acaban en una transformación neoplásica después de muchos años de evolución.
- un rol cocarcinogénico de la schistosomiasis, con una respuesta inmune de tipo Th2 intravesical pero también una alteración de la dinámica vesical que acaba favoreciendo las infecciones crónicas, bacterianas y virales, conocidas por ser cancerígenas. La hipótesis de una relación entre schistosomiasis y cáncer es antigua y la naturaleza de esta asociación es compleja y difiere según la especie de *Schistosoma* causante y los órganos afectados. (Berry *et al.*, 2016). La asociación entre un tumor maligno de la vejiga y la infección por *S. haematobium* fue confirmada en el siglo pasado por otros autores en Egipto (Makar & Fawzy, 1947) (Mohamed, 1954) (Halawani *et al.*, 1955) (Makhyoun *et al.*, 1971) y de igual modo en otros países de África como África del Sur (Keen & Fripp, 1980), Kenya (Anjarwalla, 1971), Uganda (Anthony, 1974), Sudán (Malik *et al.*, 1965), Tanzania (Kitinya *et al.*, 1986) y Zimbawe (Thomas *et al.*, 1990) así como también en Arabia Saudita (Hanash, 1984) y en Irak (Talib, 1970).

La infección por *S. haematobium* fue reconocida por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer en 1994 y confirmada en 2012 como cancerígena (IARC, 1994, 2012).

El cáncer de vejiga asociado al parasitismo por *S. haematobium* está directa o indirectamente ligado a la fisiopatología local de la infección por la que los huevos de

*Schistosoma* quedan atrapados dentro de la pared vesical. Estos huevos se quedan dentro de la submucosa, en las proximidades de la lámina propia, desarrollándose alrededor de ellos, una importante reacción granulomatosa responsable de lesiones intravesicales de tipo ulceroso y/o tumores poliploides. Esta respuesta inmunitaria de tipo Th2 favorece el fenómeno de tolerancia entre el parásito y su hospedador (Boyett & Hsieh, 2014).

Esta fase inflamatoria subaguda llegará a una fase cicatrizante de tipo fibroso y posterior calcificación. A largo plazo, la multiplicidad y la cronicidad de estas lesiones conllevan una disfunción de la vejiga. No parece que los huevos o los vermes adultos tengan una acción directa de mutagénesis como se muestra en trabajos *in vitro* bajo modelos celulares (Osada *et al.*, 2005). Por el contrario, los antígenos de los huevos favorecen la proliferación de las células uroteliales (El-awady *et al.*, 2001).

En un trabajo reciente, utilizando un modelo *S. haematobium/ souris*, el análisis de los transcritos ha demostrado una sobreexpresión de ciertos factores procancerígenos (Ray *et al.*, 2012). Esta observación aún no ha sido confirmada en el caso del ser humano, en el cual, no parecen existir anomalías genéticas específicas asociadas a los cánceres inducidos por *S. haematobium*, lo cual está a favor de un rol cancerígeno no específico de la infección parasitaria (Armengol *et al.*, 2007).

Así pues, es probable que la acción cancerígena de la infección por *S. haematobium* proceda de un mecanismo ligado a la inflamación crónica; situación que se conoce en el caso de cánceres inducidos por otras infecciones crónicas, bacterianas o virales y que se observa de igual manera en otras patologías inflamatorias crónicas (Grivennikov *et al.*, 2010). A nivel anatomopatológico, se observa la secuencia clásica de hiperplasia, metaplasia, displasia y carcinoma. A nivel molecular, diferentes estudios han mostrado que esas transformaciones anatómicas aparecen debido a anomalías cromosómicas como son la represión de genes supresores e inversamente la activación de genes procancerígenos, aunque los mecanismos de acción aún no se conocen bien (Rosin *et al.*, 1994; Badawi *et al.*, 1996; Greten & Karin, 2010). Independientemente de ese mecanismo inflamatorio, la schistosomiasis urogenital puede favorecer la acción de cofactores cancerígenos. La alteración de la dinámica vesical que se da después de muchos años de evolución de la infección es consecuencia de la fibrosis y de la calcificación de la pared de la vejiga (Laughlin *et al.*, 1978; Hill, 1979; Hicks *et al.*, 1982; El-Aaser *et al.*, 1982). La susceptibilidad infecciosa también se ve favorecida por el estado de tolerancia inmunitaria inducida por la schistosomiasis via la IL10 y del TGF $\beta$  (Salgame *et al.*, 2013; Brindley & Hotez, 2013). En el caso de los pacientes que padecen de vejiga neurógena, se sospecha que las

infecciones bacterianas crónicas sean las culpables de inducir cánceres mediante la producción de nitrosaminas y para el caso de la schistosomiasis urogenital, las constataciones son similares (Hicks *et al.*, 1977; Hicks *et al.*, 1978; Hill, 1979; Tricker *et al.*, 1991). En un trabajo, en el que se utilizaron ratones como modelo (Ray *et al.*, 2012), se observó una disminución en la transcripción de diferentes genes para proteínas de la unión intercelular, asegurando el estancamiento de la estructura epitelial de la vejiga. La alteración de esas estructuras en el curso de la schistosomiasis beneficia al parásito facilitando la extrusión de huevos a través de la luz del órgano, pero esto, a su vez, también favorece el contacto entre la submucosa y las toxinas urinarias, apoyando este hecho al cáncer de vejiga. Además, la vitamina A interviene en la diferenciación de los epitelios, por lo que, una carencia de la misma también se asocia a un riesgo elevado de cáncer de vejiga. Este déficit podría ser un cofactor en los pacientes infectados por *S. haematobium* en las zonas donde las carencias en vitamina A son frecuentes (Liang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2014).

Los cánceres de vejiga inducidos por *S. haematobium* se dan mayoritariamente entre los 45 y los 55 años, mientras que los que no son inducidos por este helminto se observan sobre todo entre los 60 y los 70 años. En las zonas de endemia, los primeros contactos con el parásito se dan en la infancia, por lo que se entiende que son necesarios de 30 a 40 años de evolución para que aparezcan las lesiones neoplásicas (Bedwani *et al.*, 1998).

El elemento más característico de los cánceres inducidos por la schistosomiasis urogenital es que son de tipo escamoso. Aunque estas formas histológicas ocasionan la mayor parte de las lesiones menos invasivas, con las metástasis, que son menos frecuentes, el pronóstico de este tipo de cánceres es idéntico al de las formas urogenitales no asociadas a la schistosomiasis. Bajo las formas localizadas, la cistectomía resulta ser el mejor tratamiento curativo en términos de supervivencia (Kamat *et al.*, 2016). Se ha de tener en cuenta que, aunque la schistosomiasis urogenital resulta ser endémica en numerosos países de África, la incidencia del cáncer en relación con esta parasitosis es moderada, ya que, en 2008 se estimaron 10.200 nuevos casos por año por toda África (De Martel *et al.*, 2012).

#### **2.1.1.5.- DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico para la schistosomiasis general se realiza con el objetivo de detectar la presencia de huevos en heces u orina. Los antígenos presentes en las muestras de

heces y orina son igualmente indicadores de la infección. Concretamente para la schistosomiasis urogenital, una técnica de filtración con filtros de nylon, papel o policarbonatos es la norma general. Los niños portadores de *S. haematobium*, presentan casi todos los días microhematuria detectable con bandas reactivas.

Para las personas que vienen de zonas no endémicas o en las que no se da transmisión de la enfermedad, las técnicas serológicas e inmunológicas pueden llegar a ser útiles para poner en evidencia la exposición a la infección y la necesidad de proceder al análisis de más brotes a tratar (OMS, 2014).

### **Biología no específica**

Como en gran parte de las helmintiasis, se observa de forma frecuente hipereosinofilia (eosinófilos polinucleados  $\geq 500$  elementos/ $\mu\text{L}$ ) y un aumento de las IgE totales (IgE totales  $\geq 150$  KUI/L para un adulto). Estos marcadores no específicos se ven frecuentemente incrementados en la fase de invasión de la enfermedad (Van gool *et al.*, 2002; Jaureguiberry *et al.*, 2010).

### **Biología específica**

Para el serodiagnóstico, la búsqueda de anticuerpos específicos es el examen de elección para el cribado y el diagnóstico de los schistosomas aunque el examen parasitológico de la orina y/o de heces asegure con certeza el diagnóstico por detección de huevos. Para una mayor sensibilidad, es recomendable realizar dos serodiagnósticos de cribado utilizando diferentes antígenos parasitarios de estados diferentes (huevo y parásito adulto) (Van gool *et al.*, 2002; Jaureguiberry *et al.*, 2010).

Para el diagnóstico de *S. haematobium*, la combinación de dos técnicas permite obtener una sensibilidad del orden del 80 al 90%, así como también una muy buena especificidad ( $\approx 100\%$ ). En caso de que los resultados sean discordantes, solo la técnica de Western Blot permitiría descartar. Como en muchas otras helmintiasis, existe para la schistosomiasis una fase pre-patente en la que el diagnóstico biológico es poco productivo. Para el serodiagnóstico, los test no resultan ser positivos hasta la sexta semana después de la infección con los extremos variando entre 1 y 3 meses. En el caso de que el primer serodiagnóstico sea negativo, es importante, repetir el examen si el tiempo transcurrido entre la exposición y la toma de muestras ha sido inferior a 6 o 10 semanas en el momento de la primera determinación (Smith *et al.*, 2012; Nickel *et al.*, 2015).

### **Diagnóstico microscópico: búsqueda de huevos**

El diagnóstico microscópico para la búsqueda de huevos en las muestras de orina no es muy sensible (entre un 15 y un 50%) (Whitty *et al.*, 2000; Bierman *et al.*, 2005; Meltzer *et al.*, 2006). Es tanto menos sensible conforme más débil es la carga parasitaria, que es lo más frecuente en los casos de schistosomas importados por los viajeros. En cambio, la microscopía permite realizar un diagnóstico de la especie teniendo en cuenta la morfología de los huevos y la naturaleza de la muestra examinada. De forma general, los huevos de los schistosomas procedentes del continente africano son los de tamaño más grande y ovalados (de 115 a 240  $\mu\text{m}$  de longitud y de 40 a 70  $\mu\text{m}$  de ancho), con un espolón terminal bien visible en el caso de *S. haematobium*.

Para una mayor sensibilidad, la búsqueda de schistosomas en muestras de orina debe hacerse a partir de orinas de 24 h, a partir de la primera micción de la mañana o a partir de una micción después de haber realizado actividad física. Las muestras de orina deben ser enviadas rápidamente al laboratorio a temperatura ambiente. El examen de heces teóricamente no es muy útil para el diagnóstico de schistosomiasis urogenital, ya que, no es frecuente encontrar huevos de *S. haematobium* en las heces (Basch *et al.*, 1991).

De forma general, se aconseja en caso de sospecha de schistosomiasis, la búsqueda de huevos tanto en heces como en orina, en el caso de que no se tengan argumentos a favor ni de una especie ni de otra. Este examen parasitológico debe repetirse al menos 3 veces para obtener una sensibilidad correcta. Considerando el tiempo necesario para que el parásito llegue a la madurez y el necesario para el tránsito de los huevos a través de la pared de la vejiga, solo es posible encontrar huevos en el examen parasitológico a partir de la 5ª a la 10ª semana después de la infección (Basch *et al.*, 1991).

#### **2.1.1.6.- TRATAMIENTO**

El tratamiento para la schistosomiasis se basa en la utilización del praziquantel comercializado en Francia bajo el nombre de Biltricide®. Este medicamento es eficaz y bien tolerado y puede ser prescrito en niños y mujeres después del primer trimestre de embarazo. La posología recomendada es una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal. La estrategia terapéutica en el momento de la fase de invasión es delicada. Por una parte, el tratamiento con praziquantel no es muy eficaz, ya que el hospedador

acoge principalmente en ese período de tiempo, a los schistosómulos (formas larvarias), sobre las cuales el medicamento no es muy eficaz (Cioli *et al.*, 2014).

Por otra parte, el tratamiento precoz con praziquantel puede inducir o incrementar la sintomatología clínica, provocando, a pesar de todo, una lisis parasitaria que amplificaría la reacción inmunopatológica. El consenso de medidas terapéuticas contra la bilharziosis o schistosomiasis en la fase aguda que ha surgido en los últimos años es a favor de la prescripción inicial de corticoterapia que puede estar asociada a un tratamiento específico con praziquantel (Jaureguiberry *et al.*, 2010). Este tratamiento con praziquantel deberá ser repetido 2 o 3 meses más tarde (momento en el que todos los parásitos serán adultos). En la fase crónica, el tratamiento con praziquantel basta para asegurar la recuperación en la mayoría de los casos (Berry *et al.*, 2016). Desde 1985 el experto comité en schistosomiasis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado la quimioterapia como la principal estrategia de control frente a la infección. La distribución a larga escala del praziquantel fue oficialmente adoptada por la OMS en 2001 y esta estrategia ha sido integrada en los programas de salud pública en muchos países afectados (IAMAT, 2015).

El praziquantel paraliza los vermes adultos, haciéndolos vulnerables a los mecanismos de defensa del cuerpo del hospedador. Más concretamente lo que ocurre es que se produce una vacuolización en el tegumento del parásito, seguido por la unión de fagocitos al parásito hasta provocar su muerte (Pearson & Guerrant, 1983). Sin embargo, este tratamiento puede mejorar, pero no solventar la situación ya que, las personas tratadas pueden re-infectarse fácilmente. Los objetivos para la interrupción de la transmisión del ciclo son la educación pública, la mejora del saneamiento y la deposición de los residuos humanos, eliminación de moluscos y el tratamiento de personas infectadas (IAMAT, 2015).

#### **2.1.1.7.- PROFILAXIS INDIVIDUAL Y CONTROL GENERAL**

Con un exitoso programa nacional de control de la schistosomiasis, la prevalencia de las infecciones causadas por *S. haematobium* y *S. mansoni* se encuentra en declive. En otras áreas desérticas como Arabia Saudí e Irak, el limitado volumen de agua hace que las perspectivas de erradicación de la enfermedad sean posibles. Es en este tipo de áreas donde la eliminación de los moluscos y el tratamiento de las personas infectadas es suficiente para bloquear la transmisión. En muchos países,

particularmente en el sur de África subsahariana, el problema aún está a la espera de ser resuelto. Los ríos y lagos son una parte integral de la vida doméstica en las comunidades rurales donde el agua se utiliza para consumo, lavar la ropa, higiene personal y con fines recreativos. Solo una combinación de educación para la salud con la introducción de un saneamiento efectivo como el agua de pozos y una eficiente deposición de los desechos humanos en letrinas pueden prevenir la transmisión de la schistosomiasis de una forma más adecuada (IAMAT, 2015).

### **Prevención personal**

Las reglas de oro para la prevención de la schistosomiasis son:

- en países donde la schistosomiasis es endémica, evitar el contacto con cuerpos de agua dulce.
- si se planea un viaje a la jungla o desierto, asegurarse de que será por poco tiempo y que será posible resistir el calor y que no se estará tentado de refrescarse en un estanque o cuerpo de agua similar y a su vez asegurarse de que no te quedas sin agua purificada.
- si se ha de atravesar estanques o pantanos, asegurarse de llevar botas de agua u otro complemento que cubran hasta las rodillas.
- mantenerse alejado de arroyos y ríos; los moluscos abundan en aguas poco profundas donde se alimentan de residuos orgánicos y de la vegetación acuática.
- evitar el contacto con el agua dulce durante las horas de más luz del día que es cuando las cercarias emergen de los moluscos y son más activas.
- si accidentalmente se entra en contacto con el agua dulce, se recomienda frotar la piel inmediatamente con alcohol secando posteriormente con una toalla para reducir la posibilidad de infección.
- si se viaja por tierra con coche, tratar de coger un par de guantes de goma para protegerse en caso de necesitar ponerle agua al radiador procedente de algún estanque o cuerpo de agua similar.
- el agua de río o lago que se utilice para aseo personal o para lavar los platos debe ser hervida o clorada.
- el agua para aseo personal y para el lavado de enseres domésticos es relativamente seguro si se almacena durante 2-3 días, (que es el período de tiempo generalmente aceptado como esperanza de vida de las cercarias) en un contenedor libre de moluscos.
- el agua de bebida debería ser hervida o tratada con tabletas de cloro, ya que las cercarias podrían entrar y excavar a través de la mucosa de la boca.

- cocinar bien los vegetales y evitar las ensaladas que hayan sido lavadas con agua que pudiera estar infectada (IAMAT, 2015).

## **2.1.2.- LA EPIDEMIA RECIENTE DE SCHISTOSOMIASIS UROGENITAL EN CÓRCEGA**

Recientemente, ha sido detectado un brote de schistosomiasis en Europa, con pacientes afectados en Francia, Alemania e Italia (Berry *et al.*, 2014; Holtfreter *et al.*, 2014). La introducción de la schistosomiasis se asocia con la llegada de gente infectada desde regiones endémicas para el parásito africano, *S. haematobium* y la diseminación de los huevos del parásito se da a través de la orina de dicha gente en los sitios en donde se cría el molusco a lo largo del río Cavu (Córcega). La subsecuente infección de los moluscos planórbidos de agua dulce de la especie *B. truncatus*, presentes a lo largo de toda Córcega (Doby *et al.*, 1966), muestra la compatibilidad del parásito importado con el caracol local.

### **Origen de la epidemia**

El análisis molecular de las especies de *Schistosoma* detectadas en Córcega, muestra una relación genética muy estrecha con los schistosomas previamente aislados del noreste de Senegal, sugiriendo que el origen de los schistosomas de Córcega es el oeste africano. *S. haematobium* es endémica en 53 países (Chitsulo *et al.*, 2000), y la schistosomiasis urogenital es altamente endémica en Senegal; con una prevalencia estimada de alrededor del 25% del total de la población, pero un rango comprendido entre 0% y el 100% según la región (Schur *et al.*, 2011). Senegal fue una colonia francesa hasta 1958, pero entre Francia y Senegal sigue habiendo lazos. Los nacionales viajan libremente entre ambos países. De modo que, los turistas franceses pueden llegar a infectarse en Senegal y las infecciones suelen ser reportadas en los viajeros europeos (Blach *et al.*, 2012; Steiner *et al.*, 2013). Los individuos pueden que no sean conscientes de que están infectados y de que en consecuencia pueden llegar a introducir el parásito en lugares como Córcega.

### **2.1.2.1.- ESPECIES INTRODUCIDAS**

Durante el siglo XX, la schistosomiasis urogenital ha llegado a ser endémica en el sureste de la provincia portuguesa de Algarve (De Azevedo *et al.*, 1948).

Los primeros casos se dieron en 1921 y se estimó que la transmisión cesó aproximadamente en 1970. El origen de este brote es desconocido, pero se postuló que los schistosomas fueron introducidos por gente que viajaba o bien desde Marruecos o bien desde alguna colonia portuguesa en África como Angola, Mozambique o Guinea Bissau. Una importante diferencia entre la transmisión en Córcega y en Portugal es el molusco que actúa como hospedador intermediario.

Mientras que *B. truncatus* se asume como el molusco hospedador intermediario en Córcega; en Portugal, los moluscos de la especie *Planorbarius metidjensis* (que no están presentes en Córcega) se encuentran infectados de forma natural por schistosoma en el mismo momento del brote, por lo que fue propuesto como otro hospedador intermediario responsable de la transmisión de la schistosomiasis (Bettencourt & Borges, 1922). Este hecho fue inesperado porque *P. metidjensis* no es el hospedador típico de *S. haematobium* y los schistosomas que se conocen son muy específicos en términos de hospedador intermediario. Una explicación para la implicación de *P. metidjensis* en el brote de schistosomiasis urogenital en Portugal pudo haber sido la transmisión de híbridos de *S. haematobium*-*S. bovis* aparte de la cepa pura de *S. haematobium* (Boissier *et al.*, 2016).

Estudios moleculares de la cepa de *Schistosoma* de Córcega han mostrado que, además de la cepa pura de *S. haematobium*, muchos de los huevos obtenidos de pacientes son híbridos de *S. haematobium* y de la especie de ganado *S. bovis*. Este hallazgo inesperado sugiere que se han dado varias introducciones de humanos infectados con diferentes cepas de *S. haematobium* o que la hibridación se ha dado en Córcega (Boissier *et al.*, 2015).

### **2.1.2.2.- DURACIÓN Y LUGAR DE LA EPIDEMIA**

El brote epidémico se originó en Córcega, más concretamente en el Río Cavu, al norte de Porto-Vecchio, el cual es un destino turístico bastante popular (Boissier *et al.*, 2015). La transmisión parece ser que empezó en 2011. El descubrimiento tardío de esta situación en mayo de 2014 estuvo relacionado con el diagnóstico erróneo de hematuria en pacientes infectados en los años previos, los cuales nunca habían estado en África, habiéndose registrado la ausencia de viajes a África en sus historiales. Este brote fue inesperado ya que el último caso de transmisión de schistosomiasis registrado en Europa fue en el sureste de Portugal, donde el último paciente fue curado

en 1967. La schistosomiasis urogenital fue entonces declarada como eliminada en Europa y no se había visto como una infección que presentara riesgo de ser introducida en el continente hasta el momento (Boissier *et al.*, 2015). En el verano de 2015 se reportó un caso agudo de schistosomiasis adquirido en Córcega, lo cual sugiere que la transmisión aún persiste (Berry *et al.*, 2015) y supone un riesgo potencial.

### **2.1.2.3.- MOLUSCO VECTOR EN CÓRCEGA**

La especie de planórbido *B. truncatus* que actúa como vector de la schistosomiasis, es endémico en Córcega (Brumpt, 1929), distribuyéndose a través del perímetro de la isla (Doby *et al.*, 1966). Estos moluscos son endémicos del sureste de Europa, incluyendo países como España, Italia, Francia y Grecia. Se espera que la temperatura del agua aumente con el paso del tiempo en el sur de Europa (Van vliet *et al.*, 2013), lo cual favorecerá la supervivencia y las aptitudes tanto del parásito como de las poblaciones del molusco vector ya que, los moluscos del género *Bulinus spp.* son muy tolerantes a los cambios de temperatura, pudiendo sobrevivir a temperaturas de entre 2°C y 40°C (Watson, 1958; Chu *et al.*, 1966). Resulta también interesante que, en Córcega, se transmita la forma zoonótica de la enfermedad por *S. bovis*, la cual puede causar a los humanos una irritación en la piel (dermatitis cercariana) debido a la inútil penetración de la cercaria en su piel (Dolfrus, 1922; Gretillat, 1963; Doby *et al.*, 1966).

### **2.1.2.4.- POBLACIÓN HUMANA AFECTADA**

A comienzos del 2014 un grupo de casos de schistosomiasis urogenital fue diagnosticado en pacientes de Francia (marzo, 2014) y Alemania (enero, 2014) (Berry *et al.*, 2014; Holtfreter *et al.*, 2014; Boissier *et al.*, 2015). Dichos pacientes nunca habían visitado países endémicos de schistosomiasis, pero había un factor común en todos ellos y era que habían pasado sus vacaciones en el sureste de Córcega en agosto de 2013, la isla francesa del Mediterráneo bastante popular entre los turistas debido a su belleza natural y a su clima mediterráneo (Boissier *et al.*, 2016).

Después de que se reportaran los primeros casos, el instituto francés de sanidad (Institute Nationale de Veille Sanitaire) y el centro europeo de prevención y control de enfermedades, publicaron una evaluación de riesgos que fue seguida por una larga

campaña entre abril de 2014 y abril de 2015, para así incrementar la concienciación del riesgo de infección de schistosomiasis urogenital en Córcega y el posible diagnóstico erróneo de hematuria. Como consecuencia de ello, se reportaron 124 casos más de schistosomiasis adquirida en franceses nacionales quienes visitaron Córcega y nadaron en el Río Cavu en 2013 (Boissier *et al.*, 2016).

Y aunque la schistosomiasis es una de las enfermedades infecciosas más comunes extendidas por el mundo, es raramente reportada en viajeros que vuelven de los trópicos. Esto es así debido a que es necesario el contacto prolongado y repetido con el agua para que se dé la infección clínica y para su posterior desarrollo.

No obstante, se describen a continuación con más detalle cuatro casos de schistosomiasis urinaria, procedentes de una familia de canadienses que habían sido criados en el noreste de Nigeria en la cual los cuatro niños presentaban la enfermedad y fueron curados con una dosis simple de praziquantel (Sheehan *et al.*, 1984).

### **Caso del paciente 1**

Se trataba de un niño de 9 años previamente sano y que presentaba enuresis nocturna. Tres meses antes él y su familia habían vuelto a Canadá desde el noreste de Nigeria, donde ellos habían vivido hasta los nueve años. Él presentaba un año de historia de hematuria y disuria y dolor periumbilical de forma ocasional. El examen físico mostró resultados normales. El análisis de orina mostró de 35 a 40 eritrocitos, de 15 a 20 células epiteliales y de forma ocasional una cantidad de células de pus por campo alta. Otras investigaciones en el laboratorio dieron los siguientes resultados: concentración de hemoglobina de 136 g/l y un significativo volumen corpuscular de eritrocitos de 78 Fl, concentración de hemoglobina de 26 mmol/L, un recuento total de leucocitos de  $10 \times 10^9/L$ ; recuento leucocitario diferencial de 43% de neutrófilos, 14% de eosinófilos, 36% de linfocitos, 6% de monocitos y 1% de linfocitos atípicos, con una tasa de sedimentación de 39 mm/h y un recuento absoluto de eosinófilos de  $1.82 \times 10^9/L$ . El suero de la urea, la creatinina y las concentraciones de electrolitos fueron normales. El recuento absoluto de leucocitos en orina fue de  $0.64 \times 10^9/L$ .

Una muestra de orina media no mostró crecimiento cuando se cultivó y tres muestras más de orina no mostraron evidencia de organismos micobacteriales cuando se cultivaba. La orina mostró huevos con las características morfológicas de *S. haematobium*. En la muestra de heces no se encontraron huevos, quistes ni parásitos. Un test de ELISA para anticuerpos de *Schistosoma* dió un resultado positivo. Se realizó el diagnóstico para schistosomiasis urinaria y el niño recibió una dosis simple (40 mg/kg) de praziquantel de forma oral. En posteriores visitas de seguimiento, sus

síntomas fueron completamente eliminados, su orina no mostró evidencia ni de huevos ni de quistes ni parásitos y el pielograma resultó ser normal (Sheehan *et al.*, 1984).

### **Caso del paciente 2**

El hermano gemelo del primer paciente no tuvo síntomas excepto nocturia. Su examen físico resultó normal y el análisis de orina mostró de 25 a 30 eritrocitos, de 1 a 2 células epiteliales y de 2 a 4 células de pus por campo. El recuento leucocitario total fue de  $9.4 \times 10^9/L$ , la concentración de hemoglobina fue de 146 g/L y el índice de eritrocitos fue normal. El recuento leucocitario diferencial mostró un 23% de neutrófilos segmentados, 35% de eosinófilos, 2% de basófilos, 37% de linfocitos y 3% de monocitos. La tasa de sedimentación de los eritrocitos fue de 20 mm/h y el suero de la urea, la creatinina y las concentraciones de electrolitos fue normal. El recuento leucocitario absoluto en una muestra de orina fue de  $0.126 \times 10^9/L$ . Una muestra de orina media no mostró crecimiento alguno de micobacterias cuando se cultivó y tres muestras más de orina tampoco mostraron crecimiento de organismos micobacteriales. En la orina se encontraron huevos con las características morfológicas de *S. haematobium* y una muestra de heces mostró quistes de *Entamoeba coli*. El test de ELISA para anticuerpos de *Schistosoma* mostró resultado positivo. Se llevó a cabo el diagnóstico y el niño fue tratado con una dosis simple 1.4 g de praziquantel de forma oral. Del mismo modo que su hermano, en las posteriores visitas de seguimiento, se observó que el niño era asintomático, su orina no mostró evidencia de huevos, quistes o parásitos y el pielograma intravenoso resultó ser normal (Sheehan *et al.*, 1984).

### **Caso del paciente 3**

La hermana de 12 años de los pacientes 1 y 2 era asintomática y el examen físico resultó ser normal. Sin embargo, una muestra de heces mostró quistes de *E. coli*, y una muestra de orina mostró huevos de *S. haematobium*. Fue tratada con una dosis simple de 2 g de praziquantel administrados oralmente. En las posteriores visitas de seguimiento, las muestras de orina no mostraron evidencia de huevos, quistes ni tampoco parásitos (Sheehan *et al.*, 1984).

### **Caso del paciente 4**

La hermana de 8 años de los otros tres pacientes anteriormente nombrados era asintomática y el examen físico dió resultados normales. Sin embargo, una muestra de heces mostró huevos de *Trichuris trichura* y quistes de *Entamoeba coli* y *Endolimax nana*. La muestra de orina mostró también huevos de *S. haematobium*. Se le

diagnosticó para trichuriasis y schistosomiasis urinaria y fue tratada con mebendazol, 100 mg 3 veces al día de forma oral durante tres días, y una dosis simple de 1.2 g de praziquantel administrados también de forma oral. En las posteriores visitas de seguimiento no se observó evidencia alguna de huevos, quistes o parásitos.

Los cuatro niños habían asistido a las escuelas locales del noreste de Nigeria y durante la estación de lluvias habían estado en contacto frecuente con el agua, especialmente los dos niños. Su madre también fue evaluada. Ella no mostró evidencia de schistosomiasis, pero era asintomática para quistes de *Entamoeba histolytica* y fue tratada con iodoquinol, 650 mg administrados oralmente tres veces al día durante 20 días (Sheehan *et al.*, 1984)

Además, en enero de 2014, un niño alemán de 12 años desarrolló schistosomiasis urinaria (Holtfreter *et al.*, 2014), siendo este el primer reporte en la literatura científica de schistosomiasis humana autóctona adquirida en Europa desde su eliminación en el año 1960 (Davis, 2009). Se había bañado en ríos del sureste de Córcega cinco meses antes. Antes de este caso, la schistosomiasis humana no había sido reportada en la isla, aunque su vector, el planórbido de agua dulce *B. truncatus*, localmente transmite la enfermedad zoonótica causada por *S. bovis*. El padre de dicho niño excretaba huevos de *S. haematobium* pero que no eran viables, mientras que las tres pruebas que se le hicieron al niño fueron serológicamente positivas contra *Schistosoma*. El niño no sentía dolor cuando orinaba a pesar de excretar sangre en la misma. Tampoco se detectó ningún agente bacteriano infeccioso, pero sí una cistitis severa. El examen histológico de la biopsia realizada con tejido de la pared de la vejiga mostró inflamación granulomatosa por lo que se sospechó de schistosomiasis. A su vez, el estudio microscópico de una muestra de orina de las 24 horas desde el primer día en que el niño se presentó hasta el siguiente mostró la presencia de huevos viables de *S. haematobium*. Fue tratado con una dosis estándar de praziquantel (40 mg/Kg de peso corporal) y retratado tres semanas después con la misma dosis, para tener la seguridad de que se curaba por completo de la infección. Durante 24 días después de la terapia, tuvo varios ataques de hematuria, presentando a veces coágulos dentro de la vejiga. Las coinfecciones bacterianas incluyendo la tuberculosis fueron descartadas por cultivos de orina, PCR y el ensayo de liberación de interferón gamma. Las investigaciones de 5 miembros de la familia del niño revelaron huevos de *S. haematobium* no viables. Se repitieron los exámenes y resultaron negativos para todos los miembros de la familia. Además, la serología frente a antígenos de las cercarias y de los vermes adultos, mediante el ensayo de ELISA, y el test de inmunofluorescencia

resultó ser altamente positivo. La historia detallada, de nuevo confirmó que el niño y su familia no habían viajado nunca fuera de Europa. El viaje más hacia el sur que hicieron fue a España, donde no se bañaron en agua dulce, y al sureste de Francia incluyendo el sureste de Córcega, donde el niño había disfrutado de sus vacaciones en familia en agosto de 2013 y donde frecuentemente se había bañado en varios ríos. La madre fue la única de toda la familia que dió resultados negativos en todos los test, y esto coincidía con el hecho de que había sido la única que no se había bañado en el Río Cavu (Holtfreter *et al.*, 2014).

#### **2.1.2.5.- ESTRATEGIA DE GESTIÓN DE RIESGO DE SCHISTOSOMIASIS**

Teniendo en cuenta la cantidad de desplazamientos tanto de bienes como de personas, en Córcega, como en otras regiones, emergen patologías consideradas como tropicales. La eliminación definitiva no concebible de los moluscos vectores de la schistosomiasis o bilharziosis sumada a la circulación de personas contaminadas y provenientes de zonas de endemia, obliga de alguna manera a las autoridades sanitarias a gestionar un riesgo constante dentro de un contexto de incerteza. Después del reconocimiento en 2014 de casos agrupados de bilharziosis relacionados con el baño recreativo en el río Cavu en Córcega en el verano de 2013, la estrategia de gestión de riesgo por parte de las autoridades ha evolucionado.

Durante un tiempo, el acceso a la zona de baño del río Cavu se prohibió durante toda la estación de verano en 2014, pero esta medida no regularizó el problema de forma definitiva. El diagnóstico permitió registrar más de 37.000 test serológicos en 2014, contra los 5000 a 7000 de años anteriores. La Agencia Nacional de Seguridad Sanitaria en 2014, 2015 y 2016 dió aviso realizando numerosos controles.

La búsqueda del molusco vector del género *Bulinus* ha permitido considerar que el parásito no persiste en el río Cavu de un año para otro en ausencia de recontaminación, ya que los *Bulinus* infectados no sobreviven a temperaturas invernales. Las investigaciones de la fauna de la zona (roedores, bovinos y ovinos) ha permitido descartar la hipótesis de una posible contaminación animal. Otros cuerpos de agua en Córcega albergan de igual manera *Bulinus* pero en una cantidad notablemente menor, lo que significa que una contaminación es igualmente posible pero de forma más aleatoria. La búsqueda del parásito mediante el examen microscópico de los *Bulinus* no ha permitido nunca detectar la presencia del parásito, aunque más de 5.500 *Bulinus* han sido examinados entre 2014 y 2015. Por tanto, el diagnóstico de dos

personas contaminadas en 2015 significa que el parásito está de nuevo presente en el río Cavu. La hipótesis de contaminación del río más certera es que la contaminación es de origen humano, de manera que la llegada de una persona contaminada y procedente de una zona endémica para la enfermedad se ha dado varias veces de forma regular en 2013 y que no ha sido diagnosticada.

Expertos de la Universidad de Perpignan han definido una estrategia de gestión para el año 2016, la cual se basa en 4 ideas:

- la detección precoz de la presencia del parásito en el ambiente;
- la sensibilización de los profesionales de la sanidad para el diagnóstico de personas asintomáticas;
- informar al público de los riesgos de transmisión ligados al baño en el río Cavu y
- la realización de modificaciones del sitio para reducir el riesgo de contaminación (Vincent *et al.*, 2016).

### **2.1.3.- EL PROBLEMA DE UNA INTRODUCCIÓN INESPERADA**

En vista de lo ocurrido en Córcega y que la zona del levante mediterráneo está bastante influenciada por los cambios en el clima, se podría llegar a plantear la idea de si lo mismo podría ocurrir en España. La introducción de la schistosomiasis en España sería posible ya que, en todo el levante mediterráneo la temperatura es favorable tanto para la supervivencia y dispersión del molusco vector *B. truncatus*, como para el desarrollo y supervivencia de las fases larvianas de vida libre del parásito en cuestión. Además, el hallazgo en 2014, de dos nuevas localizaciones para la especie de molusco planórbido *B. truncatus* en España, concretamente en la laguna de Villena (Alicante) y en El Ejido (Almería), es un hecho a tener en cuenta para la posible introducción de la schistosomiasis en España.

De modo que, si a la temperatura favorable, se añade el hecho de que *B. truncatus* es una especie endémica de diversas regiones de España cercanas o bañadas por el mar Mediterráneo junto con la presencia del molusco específico para el parásito y el fenómeno de la inmigración de personas infestadas procedentes de zonas endémicas a zonas no endémicas de la enfermedad; se dan las condiciones ideales para que la schistosomiasis urogenital pueda llegar a España y establecerse una transmisión autóctona, como ya ha ocurrido en otros países.

El río Cavu, es un hábitat ideal para *B. truncatus* y particularmente atractivo por sus baños recreativos o para nadar, favoreciendo la dispersión de la schistosomiasis

urogenital debido a la orina que los bañistas turistas depositan en estas piscinas naturales. Córcega es visitada por 3 millones de turistas cada año, incluyendo 2,7 millones en la estación alta que es entre mayo y octubre (Agence du Tourisme de la Corse, 2013). Durante el período en el que se da más turismo (desde mediados de julio a mediados de agosto) de 3000 a 5000 personas visitan el río Cavu cada año. Así pues, este elevado número de visitantes, combinado con la elevada abundancia de moluscos hospedadores intermediarios disponibles y la cantidad de gente viajando entre Córcega y áreas endémicas para la schistosomiasis urogenital, hace de dicho río, un área de alto riesgo de introducción y transmisión de la schistosomiasis urogenital (Boissier *et al.*, 2016).

Esta trematodiasis puede ser reintroducida en otras áreas endémicas o antiguas áreas endémicas para los moluscos del género *Bulinus* spp. incluyendo el sureste de Portugal, Cerdeña, Sicilia, Xipre y Grecia (Blocca, 1980; Gracio, 1983; Schütt, 1987; Rollinson *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2006).

### **2.1.3.1.- LA ANAMNESIS EN EL DIAGNÓSTICO**

La información recopilada por el médico especialista en el momento en el que el paciente acude a la consulta es crucial para el correcto diagnóstico y posterior tratamiento de las distintas enfermedades en general. Existen síntomas y signos clínicos concretos que ayudan a determinar el diagnóstico de una determinada enfermedad, pero el problema surge cuando no se dispone de información suficiente como para poder concretar y elaborar un diagnóstico definitivo, o bien porque el paciente no quiere contarlo por motivos personales o relacionados con su cultura o bien porque éste decide no contarlo ya que le parece algo normal y no le da importancia.

Esta falta de información dificulta el desarrollo favorable del diagnóstico, y si a esto se le suma el hecho de que algunos signos clínicos pueden darse por infecciones causadas por otros trematodos distintos a *S. haematobium* y *F. hepatica* y a las tradiciones a veces compartidas por diferentes países, esto puede llevar a confusión y retraso en el diagnóstico definitivo, retrasando así también la posibilidad de aplicar un tratamiento adecuado y a tiempo, poniendo en peligro la vida de los pacientes. Es por tanto importante, disponer de una anamnesis completa para poder actuar con la mayor rapidez, precisión y eficacia posible. Los datos aportados por los pacientes dan información acerca de la fase de la enfermedad en la que se encuentran según sean

los síntomas y el tiempo que presentan dichos síntomas, así como también, de algún modo, dan a conocer el patrón de transmisión de la enfermedad teniendo en cuenta si el paciente ha viajado o no y en caso de haberlo hecho, saber por cuanto tiempo viajó, o según hayan sido sus hábitos durante el viaje.

### **2.1.3.2.- EL CARÁCTER ZONÓTICO DE LA EPIDEMIA AL TRATARSE DE UN HÍBRIDO**

El agente patógeno responsable de la schistosomiasis o bilharziosis urinaria es, como ya se ha ido nombrando en puntos anteriores, habitualmente *S. haematobium*, pero en el caso de Córcega los análisis moleculares han mostrado que el parásito implicado es una forma híbrida entre *S. haematobium* y *S. bovis* (Boissier *et al.*, 2015, 2016).

Estas dos especies del parásito son filogenéticamente próximas, pero presentan características epidemiológicas totalmente diferentes. De hecho, *S. bovis* es un parásito mesentérico y no es un parásito del hombre sino del ganado (vacas, cabras y ovejas). Su espectro de hospedadores intermediarios es más amplio que el de *S. haematobium*, de modo que infecta a moluscos del género *Bulinus* y del género *Planorbarius*. Por lo que a los vertebrados se refiere, a pesar del tropismo tan diferente que existe entre las dos especies, el reencuentro se puede dar de igual manera entre los machos y las hembras a nivel de la vena porta hepática, que es el verdadero sistema de encuentro en los schistosomas (Beltran *et al.*, 2008). De forma similar a *S. haematobium*, *S. bovis* también es transmitida por especies de moluscos pertenecientes al género *Bulinus* y ambas especies de schistosoma habitan en áreas geográficamente simpátricas. Esta asociación filogenética tan próxima, combinada con el solapamiento de las distribuciones geográficas, habilita la hibridación entre *S. haematobium* y *S. bovis*, (Huyse *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2013).

La hibridación puede alterar la epidemiología de la enfermedad y favorecer características fenotípicas que afecten la transmisión y la compatibilidad del hospedador (Tchuem Tchuente *et al.*, 2003). Esta hibridación es especialmente importante en relación con la compatibilidad molusco-parásito, por lo que la hibridación puede favorecer el uso de un rango más amplio de hospedadores intermediarios por parte de la forma híbrida parásito en cuestión (Huyse *et al.*, 2009), favoreciendo así la expansión potencial de la enfermedad.

El análisis de huevos de *Schistosoma* excretados por doce pacientes infectados en Córcega ha permitido descifrar de forma más detallada aspectos de esta epidemia (Boissier *et al.*, 2016). De esos doce pacientes, 5 excretaron los huevos de la cepa pura de *S. haematobium*, 4 pacientes excretaron los huevos de la forma híbrida y 3 de ellos excretaron los huevos de las cepas pura e híbrida. De modo que, del total de huevos excretados el 41% fueron de la forma híbrida, el 58% de la forma pura de *S. haematobium* y por primera vez se identificó un huevo de la forma pura de *S. bovis* excretado por un hospedador humano. El estudio genético permitió saber el país de origen del parásito, que resultó ser Senegal (Boissier *et al.*, 2016). El carácter híbrido del parásito ha producido cierto temor a una transmisión zoonótica y a la presencia de un reservorio animal. Un primer análisis de una treintena de animales que vivían en las proximidades inmediatas del río Cavu (Córcega), mostró que ninguno de los animales era positivo en el test Elisa (Boissier *et al.*, 2016).

La particularidad híbrida del parásito genera, por tanto, una situación epidemiológica más compleja y plantea numerosas preguntas que van desde cuál es el rol del carácter híbrido del parásito dentro de la emergencia en Córcega, cuál es la virulencia de ese híbrido comparado con las formas parentales puras o cuál es el espectro de hospedadores intermediarios y definitivos de este híbrido hasta si las formas híbridas afectan al diagnóstico.

En general las formas híbridas tanto animales como vegetales pueden presentar las características intensificadas en comparación con las especies parentales puras (Tchuem Tchuente *et al.*, 1997). La fuerza del híbrido ha sido mostrada en otros cruzamientos entre especies de *Schistosoma* que han infectado al hombre (Tchuem Tchuente *et al.*, 2003). Por ejemplo, en Camerún, dentro de la provincia de Loum, el híbrido *S. haematobium* x *S. intercalatum* ha hecho desaparecer totalmente el pariente de *S. intercalatum* en menos de 30 años (Huyse *et al.*, 2009). Por tanto, si el origen de la emergencia de la enfermedad en Córcega es exclusivamente consecuencia del híbrido, esto limitará los riesgos de introducción de la bilharziasis en Europa. El híbrido *S. haematobium* x *S. bovis* parece estar restringido al oeste de África, aunque la cartografía africana de este híbrido no está claramente completa (Kincaid-Smith *et al.*, 2016).

El gran valor selectivo de las formas híbridas se puede traducir en una capacidad más fuerte para infectar a sus hospedadores (Tchuem Tchuente *et al.*, 2003). Las cercarias híbridas son dos veces más virulentas que las larvas parentales puras en un hospedador experimental hámster (Tchuem Tchuente *et al.*, 2003). El estudio de la virulencia de los híbridos entre *S. haematobium* y *S. bovis* está en curso en la

Universidad de Perpignan. Para llevarlo a cabo, se han recuperado las cepas puras de *S. haematobium* y *S. bovis* en África y la hibridación ha sido reproducida en el laboratorio (Kincaid-Smith *et al.*, 2016).

Otra capacidad de estos híbridos puede ser la ampliación del espectro de hospedadores infectando de igual modo a los hospedadores predilectos por cada una de las dos especies parentales del parásito (Tchuem Tchuente *et al.*, 1997). Este aspecto es particularmente importante en el caso del cruzamiento entre *S. haematobium* y *S. bovis*. Aún no se sabe si el híbrido es capaz de infectar al hospedador intermediario *Planorbarius metidjensis* (hospedador intermediario de *S. bovis*) el cual se encuentra ampliamente distribuido en la Península ibérica y en Magreb (Welter-Schultes, 2012). Una compatibilidad entre el híbrido de *S. haematobium* x *S. bovis* y *P. metidjensis* aumentaría el riesgo de introducción de la bilharziosis urogenital en Europa. Más preocupante sería aún si el híbrido tuviese la capacidad de infectar los hospedadores definitivos rumiantes infiriendo así una dimensión zoonótica a la bilharziosis urinaria.

El hecho de que los huevos de la schistosomiasis urinaria sean excretados en la orina a diferencia de los huevos de la schistosomiasis mesentérica, debida a *S. bovis*, que son excretados en las heces y de que además en Senegal, los pacientes excretaron los huevos del parásito híbrido tanto en orina como en heces, evidencia la forma en la que la presencia de la forma híbrida puede afectar en el diagnóstico microscópico. El diagnóstico serológico puede igualmente verse afectado. De hecho, los test serológicos clásicos (Elisa, Western Blot, IHA) son desarrollados a partir de antígenos de *S. mansoni*, y una de las razones es porque *S. mansoni* es más fácil de mantener que *S. haematobium* en el laboratorio (Kincaid-Smith *et al.*, 2016).

### **2.1.3.3.- EL IMPACTO DEL CAMBIO GLOBAL**

Los movimientos de refugiados y la migración hacia las ciudades están introduciendo la enfermedad en nuevas zonas. El aumento de la población y las correspondientes necesidades de energía y agua generan también a menudo planes de desarrollo y modificaciones ambientales que también contribuyen a aumentar la transmisión. Además, el aumento del ecoturismo y los viajes "fuera de las rutas más trilladas" están haciendo que aumente el número de turistas infectados con schistosomiasis (OMS, 2017).

En el caso concreto del brote epidémico acontecido en Córcega descrito anteriormente, es importante tener en cuenta que la emigración desde Senegal a Europa es frecuente, con Francia como destino más común (Gerdes, 2007). Los viajes de los nacionales senegaleses a Córcega en verano por trabajo son comunes, creándose así una oportunidad para una importación accidental de los schistosomas de África (Boissier *et al.*, 2016).

Es de esperar que el incremento de los viajes de los humanos, la migración animal y los cambios en el medio ambiente promueva la emergencia de enfermedades tropicales infecciosas en ambientes de elevada latitud (Bouzid *et al.*, 2014).

La demanda mundial de agua requiere nuevos proyectos de irrigación, y la construcción de presas ha resultado en una dispersión de la enfermedad donde previamente no existía. Un caso puntual es la construcción de la presa de Akosombo en Ghana, creando el Lago Volta en 1965. El proyecto desplazó 80.000 personas, principalmente granjeros y pescaderos de 700 pueblos que habían sido asentados en 52 comunidades. En un período corto de tiempo después de la construcción de la presa, la proporción de población afectada por schistosomiasis aumentó a un 40% del 5% que había previamente. En Egipto, la construcción de la presa de Aswan también alteró el balance entre los dos tipos de infección presentes en el país. Los cambios ecológicos favorecieron la dispersión de los moluscos del género *Biomphalaria*, de modo que aumentaron los casos de infección por *S. mansoni* y a su vez la infección por *S. haematobium* disminuyó (IAMAT, 2015).

#### **2.1.3.4.- EL IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO**

Parece estar claro que tanto el cambio climático como el calentamiento global generarán cambios en los ambientes acuáticos. La expansión de hábitats adecuados para los hospedadores invertebrados de parásitos como *Schistosoma* podría resultar en un riesgo de infección por el agua en humanos y animales y en un incremento de la distribución de la enfermedad. Existen diferentes factores ambientales que causan impacto en la distribución de la schistosomiasis. La temperatura, el tipo de cuerpo de agua, las lluvias, la velocidad del agua y la altitud, pueden todos ellos tener un efecto significativo en el ciclo biológico de *Schistosoma* y en la supervivencia del molusco que actúa como hospedador intermediario (Fenwick *et al.*, 2006). Los cambios en el clima probablemente afectan a la conocida distribución geográfica de los moluscos de agua dulce (Morgan *et al.*, 2001).

La schistosomiasis es una enfermedad capaz de incrementar tanto la infección local como la expansión geográfica con el cambio climático y principalmente con el calentamiento global (Githeko *et al.*, 2000; Bergquist *et al.*, 2001 a, b). La hipótesis más frecuente es que un incremento anual del grado por día, puede alterar la extensión y el nivel de transmisión de la schistosomiasis (Yang *et al.*, 2006). Dicho de otro modo, el número de generaciones del parásito se incrementaría debido a un desarrollo acelerado en estaciones de crecimiento más largas, expandiéndose así el área normal donde las formas larvarias del parásito y el molusco hospedador intermediario pueden proliferar (Brooker *et al.*, 2000). El *Annual Growing Degree Day* (AGDD) es una unidad que expresa la cantidad de energía térmica que un organismo acumula en un año entero y se correlaciona con la distribución espacial de la vida de los organismos. Las unidades de calor que un organismo requiere para su desarrollo son bastante constantes, vienen dadas por una temperatura por encima de un umbral crítico sumado al período de tiempo en el que este umbral de temperatura es excedido. De modo que, organismos con requerimientos altos de temperatura, son más propensos a desarrollarse en sus fases maduras en áreas donde el Annual Growing Degree Day es más alto (Zhou *et al.*, 2008).

De forma general, la temperatura produce un impacto en la ecología, ciclo biológico, comportamiento y supervivencia de los moluscos vectores de la enfermedad. Por un lado, el incremento de la temperatura puede provocar la expansión de hábitats adecuados para los moluscos que actúan como hospedadores intermediarios de los parásitos. Esto, a su vez, conlleva un mayor riesgo de infección en humanos a través del agua y una mayor distribución de la enfermedad. Las altas temperaturas también incrementan la tasa de metabolismo de los moluscos y en consecuencia se produce un aumento en la producción de huevos y un aumento en la producción de cercarias en caso de que estén infectados.

#### **2.1.3.5.- EL RIESGO DE EXPANSIÓN A OTROS PAÍSES EUROPEOS**

Aunque la schistosomiasis urinaria está geográficamente restringida a África y Medio Oriente, la reciente epidemia de Córcega demuestra que inmigrantes procedentes de regiones donde esta parasitosis es endémica, pueden llegar a introducir la enfermedad en Europa, y también en España, en caso de que estos individuos africanos infectados eliminasen los huevos del parásito con la orina en colecciones de agua dulce donde se

encontrasen los moluscos vectores apropiados, llegando así a establecerse una transmisión autóctona al completarse su ciclo biológico (Martínez-Ortí *et al.*, 2015).

Las especies de moluscos vectores de la schistosomiasis, *P.metidjensis* y *B. truncatus* se encuentran de forma habitual en Portugal y Francia e Italia respectivamente, razón por la cual, aumenta el riesgo de expansión a otros países europeos y sobretodo aquellos bañados por el mar Mediterráneo.

La implicación de la forma híbrida de *Schistosoma* en la infección de los distintos pacientes afectados, presenta muchas repercusiones. La existencia de la forma híbrida aumenta la variedad de vectores potenciales, desde el extendido molusco *P. metidjensis* que transmite *S. bovis*; incrementando así el riesgo de diseminación a Portugal, España e Italia. Además, el rol potencial de otras especies de ganado debe ser valoradas en Córcega, donde la ganadería es una de las actividades incontroladas (Boissier *et al.*, 2015). Se conocen focos de infección de *S. bovis* en Córcega (Brumpt, 1930), Cerdeña (Sadun & Biocca,1962), Portugal (Ramajo Martín, 1972) y España (Ramajo Martín, 1972). La adaptación de un híbrido africano infectivo de schistosoma al ganado local europeo representa un serio problema. El hecho de que los huevos híbridos de *S. haematobium-S. bovis*, se hayan encontrado en la orina de pacientes infectados en Córcega, y que además los moluscos vectores se infecten de forma exitosa por los estados larvarios obtenidos a partir de esos huevos (Boissier *et al.*, 2016), sugiere que estos híbridos pueden perpetuar el ciclo de vida del parásito (Boissier *et al.*, 2015).

## **2.2.- FASCIOLIASIS HUMANA Y ANIMAL: PRINCIPALES ESPECIES CAUSANTES, Y SUS CARACTERÍSTICAS**

La fascioliasis es causada principalmente por dos especies, *F. hepatica* (Linnaeus,1758) y *F. gigantica* (Cobbold, 1855), pertenecientes a la familia *Fasciolidae*, las cuales causan importantes enfermedades zoonóticas como es la citada fascioliasis, debido a su amplia distribución geográfica y a su alta patogenicidad (Stiles & Hassall, 1898; Mas-Coma *et al.*, 2005). La familia *Fasciolidae* incluye digénidos que morfológicamente se caracterizan por poseer el ciego y los testículos ramificados. Ambas especies son transmitidas por moluscos de la familia *Lymnaeidae*, y sus estados adultos infectan el hígado y más raramente el duodeno y los pulmones de sus hospedadores mamíferos (Mas-Coma *et al.*, 2009a). Los límites de temperatura mínima para su desarrollo son de 10°C para *F. hepatica* y de 16°C para *F. gigantica*

(Malone *et al.*, 1998; Yilma & Malone, 1998), lo cual explica la distribución de *F. hepatica* en zonas templadas y de *F. gigantica* en los climas calientes.

Las dos especies de *Fasciola* presentan un cuerpo en forma de hoja con su extremo posterior ampliamente punteado. Las dos ventosas son relativamente pequeñas y localizadas cerca una de la otra en un cono en la extensión anterior del cuerpo siendo la faringe bien visible. El ciego intestinal es largo, alcanzando el extremo posterior del cuerpo y presentando un largo número de ramas laterales (Mas-Coma *et al.*, 2009a). Así como en *Schistosoma* los ejemplares adultos presentan sexos separados, en el caso de *Fasciola*, los adultos son hermafroditas.

Los dos testículos ramificados se localizan en un tándem longitudinal, en el segundo o tercer cuarto del cuerpo. La bolsa del cirro, conteniendo un cirro protusible y espinado, es prominente y preacetabular, abriéndose en un poro genital postbifurcal. El ovario ramificado es pretesticular y dextral y la vitelaria se extiende bilateralmente hasta la parte posterior del cuerpo. El corto útero se localiza entre el ovario y la bifurcación del ciego. Los huevos son operculados, ovoides, amarillos y no embrionados en el momento de la puesta (con un tamaño de 130-150/63-90  $\mu\text{m}$  para *F. hepatica* (Valero *et al.*, 1996).

En áreas endémicas donde las dos especies se solapan, los especímenes híbridos pueden presentar formas intermedias (Mas-Coma *et al.*, 2009a). La presencia de tales adultos y huevos de forma fenotípicamente intermedia, han sido confirmadas en Egipto e Irán (Ashrafi *et al.*, 2006). Además, las comparaciones entre adultos y huevos de poblaciones de trematodos del hígado de diferentes especies de hospedador y adultos y huevos obtenidos de forma experimental en el laboratorio a partir de ratas infectadas con aislados de diferentes hospedadores naturales, revelan que la especie de hospedador definitivo influye de forma decisiva en el tamaño de los adultos y los huevos y que esta influencia no persiste en un hospedador heterogéneo (Valero *et al.*, 2001).

Los fasciolidos adultos son parásitos de los grandes conductos biliares de la vesícula biliar de rumiantes, principalmente ovejas, cabras y vacas. Una gran variedad de otros animales domésticos y salvajes también pueden verse afectados. Los hospedadores alternativos que juegan el rol más significativo en la epidemiología de la enfermedad son los caballos, burros, mulas y algunos camélidos. Mamíferos herbívoros salvajes como el búfalo, ciervo, oveja salvaje, cerdo salvaje, algunos marsupiales, conejo, liebre y núa también son hospedadores susceptibles a la enfermedad, así como varias especies salvajes en África que incluyen los monos. Los

cerdos domésticos también pueden verse afectados, pero este hospedador presenta una elevada resistencia natural contra el parásito (Mas-Coma & Bargues, 1997).

*F. gigantica*, es un parásito común de los conductos biliares y vesícula biliar de animales herbívoros tanto domésticos como salvajes, especialmente rumiantes, en África y Asia. Los hospedadores definitivos que se han reportado son oveja, cabra, ganado y búfalo, camello, cerdo, caballo, burro, antílope, ciervo, jirafa y cebra (Boray, 1982). Muchas especies de roedores se han encontrado infectados de forma natural por *F. hepatica*, y otros son normalmente utilizados con fines experimentales (Mas-Coma *et al.*, 1988). Los humanos son hospedadores susceptibles para ambas especies de *Fasciola* (Mas-Coma *et al.*, 2009a).

El patrón general del ciclo de vida diheteroxeno de *F. hepatica* fue el primero de los trematodos en ser elucidado (Taylor, 1964; Dawes & Hughes, 1964, 1970; Pantelouris, 1965; Kendall, 1965, 1970). El ciclo biológico de *F. gigantica* incluye moluscos lymnaeidos, especialmente las especies asociadas a cuerpos de agua tranquilas o de poca corriente con abundante vegetación, en los cuales se desarrollan esporocistos y redias (Alicata, 1938; Tapar & Tandon, 1952; Dinnik & Dinnik, 1956; Kendall, 1965). El miracidio de *F. gigantica* muestra un comportamiento distinto al de *F. hepatica*. El miracidio de *F. hepatica* es positivamente fototrópico y negativamente geotrópico, como adaptación de los moluscos anfibios o de la superficie del agua. En *F. gigantica*, éste se mueve por aguas profundas, el objetivo del cual es la especie *L. natalensis* en África y variedades de la especie *L. auricularia* en Asia (Alicata, 1938). La emisión cercariana a partir del molusco muestra una periodicidad nocturna, la emergencia de las cercarias se da en la fase oscura (Prasad, 1992).

## **2.2.1.- LA FASCIOLIASIS POR *FASCIOLA HEPATICA***

### **2.2.1.1.- AGENTE CAUSAL, CICLO BIOLÓGICO Y ESPECIES VECTORAS**

#### **Agente causal**

Morfológicamente, las dos especies difieren en tamaño alcanzando *F. gigantica* más del doble de longitud que *F. hepatica* (20-50/6-13 mm de tamaño), así como también difieren en la forma, siendo *F. gigantica* mucho más alargada y estrecha (midiendo 24-76/5-13 mm) (Sahba *et al.*, 1972). Otras características que diferencian a la especie *F. gigantica* son que en dicha especie los hombros están menos desarrollados, el cono cefálico es más corto y el ciego es más ramificado que en *F. hepatica*, especialmente

hacia la línea media del cuerpo. Las ramificaciones del ovario son más largas y más abundantes en *F. gigantea* y son más pequeñas y en forma de maza en *F. hepática*, siendo la distancia media entre el borde posterior del cuerpo y los testículos posteriores es más larga en *F. gigantea* (14.9 mm; rango: 6-19 mm) que en *F. hepática* (7.78 mm; rango: 3-13 mm) (Varma, 1953). Los huevos son morfológicamente similares a los de *F. hepática* pero más largos, midiendo 150-196/90-100  $\mu\text{m}$  (Sarwar, 1957; Kendall & Parfitt, 1959).

### **Ciclo biológico**

Tanto el ciclo de vida de *F. hepática* como el de *F. gigantea* siguen un patrón similar (Fig. 8). Su duración es de alrededor de 14-23 semanas y comprende 4 fases (Mas-Coma & Bargues, 1997, 2003).

El lugar de acogida del hospedador definitivo para el trematodo en su fase adulta son los grandes conductos biliares y la vesícula biliar de numerosos hervíboros y omnívoros (buey, cordero, cabra, cerdo y conejo entre ellos). Los huevos eliminados con la bilis llegan al intestino delgado y son arrastrados a exterior con las materias fecales (Gállego-Berenguer, 2006). El hospedador definitivo se infecta por ingestión de la metacercaria, la cual se desenquista en el intestino delgado una hora después de haber sido ingerida, penetrando en la pared intestinal del hospedador y apareciendo en la cavidad abdominal en alrededor de 2 horas después de la ingestión. Muchos alcanzan el hígado en 6 días después del desenquistamiento y una vez en el hígado, migran durante 5-6 semanas, alimentándose directa y preferentemente del tejido del hígado. De forma eventual penetran en los conductos biliares cuando alcanzan la madurez sexual y el período prepatente (desde la ingestión de la metacercaria hasta la aparición de los primeros huevos en las heces) es de alrededor de 2 meses (6-13 semanas) en ovejas y vacas. Este período varía en función del hospedador, así como también puede depender del número de trematodos adultos que haya en el hígado (Valero *et al.*, 2006). El mayor tiempo de maduración y el inicio de la liberación de los huevos es de: 35-42 días en ratones, 55 días en cerdos de Guinea, 63 días en ovejas infectadas con 200 metacercarias, 13-15 semanas en ovejas infectadas con 2000 metacercarias, 56-61 días en ganado dependiendo de la edad del hospedador (Boray, 1969; De Leon *et al.*, 1981).

En humanos, es necesario un período de 3-4 meses para que los trematodos alcancen la madurez sexual (Facey & Marsden, 1960; Wasowa *et al.*, 1979). Diversos estudios muestran que la esperanza de vida del parásito puede ser mayor de 11 años en ovejas y de 9-12 meses en vacas. En lo que concierne al ser humano, Dan *et al.*,

(1981) sugiere que *F. hepatica* puede sobrevivir durante 9 años basándose en casos importados de Afganistán, y más de 13,5 años de acuerdo con otro caso (Chatterjee, 1975). Se estima que la esperanza de vida de la forma adulta del parásito en el humano se encuentra entre 9 y 13 años. La transición entre el mamífero hospedador definitivo y el molusco hospedador intermediario incluye la larga fase de resistencia del huevo y la corta fase activa del miracidio (mide alrededor de 130/28  $\mu\text{m}$  en *F. hepatica* (Lapage, 1968).

Los huevos liberados con las heces del mamífero solo pueden continuar su desarrollo si alcanzan el agua de características fisicoquímicas apropiadas. Si las condiciones climáticas son adecuadas (15°C-25°C), el miracidio desarrollado eclosionará del huevo en alrededor de 9-21 días; si las condiciones son desfavorables, éstos pueden no madurar, pero sí permanecer viables durante varios meses. El miracidio eclosiona bajo la estimulación de la luz y nada rápidamente hasta tomar contacto con el molusco hospedador apropiado, ya sea acuático o anfibio. Dicho miracidio es positivamente fototrópico y negativamente geotrópico. Los miracidios que fallan en el intento de penetrar en el caracol apropiado mueren en 24 horas (Lapage, 1968).

Una vez que el miracidio ha penetrado en el caracol, éste cambia de forma convirtiéndose en un saco elíptico llamado esporocisto de entre 150-500 $\mu\text{m}$  de longitud. Este esporocisto produce redias madre las cuales a su vez producen redias hijas cercariogéneas. Las redias maduras, presentan un sistema digestivo rudimentario compuesto por faringe y un corto ciego, son cilíndricas y miden alrededor de 250-750  $\mu\text{m}$  de longitud (Olsen, 1974).

Se han encontrado más de cuatro generaciones de redias aunque normalmente se producen tres generaciones después de la infección monomiracial (Rondelaud & Barthe, 1986). Las generaciones de redias siguen el mismo patrón de desarrollo en las diferentes especies de lymnaeidos y el complejo desarrollo de las generaciones de redias ha sido descrito recientemente (Rondelaud *et al.*, 2009). Las cercarías, con un cuerpo largo, redondeado y espinoso 28-320/250  $\mu\text{m}$  y una larga cola móvil de alrededor de 700  $\mu\text{m}$  de longitud, se desarrollan en 6-7 semanas entre 20°C-25°C. A temperaturas más bajas el desarrollo es más lento y teniendo en cuenta que el período prepatente depende de la temperatura, éste se reduce conforme mayor es la temperatura (15°C, 56-86 días; 25°C, 38 días). El proceso de liberación de las cercarías se da entre los 9 y los 26°C, independientemente de la presencia/ausencia de luz y parece seguir un patrón de liberación de 7 días en la producción diaria durante

todo el proceso de emergencia y un ritmo cercariano con una máxima producción entre medianoche y la 1 de la madrugada (Andousset *et al.*, 1989).

La transición entre el molusco hospedador intermediario y el mamífero hospedador definitivo incluye la corta fase en la que la cercaria nada y la larga fase de resistencia de la metacercaria hasta que es ingerida por el hospedador definitivo. La cercaria nada durante un corto período de tiempo (1 hora) hasta contactar con un sustrato sólido, principalmente hojas y plantas acuáticas por encima o por debajo de la superficie del agua. Es entonces cuando pierden su cola enquistándose rápidamente y convirtiéndose en metacercarias, las cuales, con un diámetro de alrededor de 200  $\mu\text{m}$ , llegan a ser infectivas dentro de las 24 horas posteriores al enquistamiento. Las metacercarias enquistadas son resistentes y permanecen viables durante un período largo de tiempo, pero mueren en condiciones de calor excesivo y sequedad (Vareille-Morel *et al.*, 1993).

### **Especies vectoras**

Estudios recientes con especies de lymnaeidos identificadas mediante marcadores de DNA, indican que *F. hepatica* es principalmente transmitida por especies de lymnaeidos de pequeño tamaño pertenecientes al grupo llamado *Galba/Fossaria* (Bargues *et al.*, 2007, 2011a), en el cual *Galba truncatula* es la principal especie transmisora y la única en Europa pero está presente en África, Asia, y Sudamérica; *Lymnaea humilis*, *Lymnaea bulimoides*, *Lymnaea humilis* y *Lymnaea cubensis* en Norte América; *L. cubensis* en el Caribe; *Lymnaea neotropica*, *Lymnaea cousini*, y *Lymnaea viator* en Sudamérica; y *Lymnaea tomentosa* en Australia. En el caso de *F. gigantica*, esta especie es transmitida por especies del género *Radix*, principalmente *R. natalensis* en África y variedades de *R. auricularia* y *R. viridis* en Asia (Bargues *et al.*, 2001a). Finalmente, unas pocas especies de lymnaeidos del grupo de estagnícolas han mostrado su capacidad para transmitir *F. hepatica* bajo condiciones naturales excepcionales en algunas áreas, como *Lymnaea (Stagnicola) palustris* y *Lymnaea (Stagnicola) fuscus* y especies relativamente cercanas como *Omphiscola glabra* (Bargues *et al.*, 2003).

#### **2.2.1.2.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

La Fascioliasis es un problema veterinario bien conocido de distribución muy amplia (Mas-Coma & Bargues, 2003; Mas-Coma *et al.*, 2005). El incremento de casos

humanos reportados en muchos países de los cinco continentes y los resultados de los estudios de patogenicidad e inmunidad, principalmente en la fase crónica de la enfermedad, son las razones por las que se decidió considerar la fascioliasis, no como la segunda enfermedad zoonótica, pero si considerarla como una enfermedad parasitaria de gran importancia (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

Un análisis global de la distribución geográfica de casos humanos muestra que la esperada correlación entre la fascioliasis animal y humana solo se da a nivel básico. Las altas prevalencias en humanos no están necesariamente relacionadas con áreas donde la fascioliasis es un verdadero problema veterinario. Los principales problemas de salud se conocen en países Andinos (Bolivia, Perú, Chile, y Ecuador), el área del Caribe (principalmente Cuba), el noeste de África (Egipto), el cercano este (Irán y países vecinos), Sureste de Asia (principalmente Vietnam), y Europa occidental (Francia, Portugal, y España) (Esteban *et al.*, 1998; Mas-Coma *et al.*, 2005, 2009). La infección humana también ha sido descrita en áreas de mayor altitud que Ecuador (Trueba *et al.*, 2000), Colombia (Bargues *et al.*, 2011b) y Venezuela (Bargues *et al.*, 2011c) y recientemente en Argentina (Carnevale *et al.*, 2013).

El parásito se distribuye principalmente en zonas templadas y subtropicales (Fig. 9), siendo la enfermedad prevalente en Europa, Norte, Central y Sudamérica, el noreste de Asia, Oceanía y el noreste de África y Sudáfrica. La enfermedad también se da en grandes islas que incluyen Nueva Zelanda, Tasmania, UK, Islandia, Chipre, Córcega, Cerdeña, Sicilia, Japón, Papúa Nueva Guinea, Filipinas y diversas islas de Caribe.

En Europa, la enfermedad es prevalente en casi todos los países y en islas adyacentes, la prevalencia en animales varía marcadamente dependiendo de las regiones (Pantelouris, 1965).

En Estados Unidos, el parásito es ampliamente distribuido, pero de una forma irregular. *F. hepatica* se da de forma más frecuente conllevando considerables pérdidas en el ganado (Malone, 1986) en Florida, Louisiana, Texas, California, Oregon, Washington, Nevada, Idaho, Utah, Montana; así como también en Arizona, Nuevo México, Colorado, Arkansas, Wyoming, Michigan, Wisconsin, Alabama y Missouri. El parásito es muy común en Puerto Rico y Hawai. Es también endémico en el este de las provincias de Canadá y British Columbia. Además de en Puerto Rico, también es prevalente en otras islas del Caribe como Cuba, Hispaniola, Guadalupe, Martinica Santa Lucía y otras. En América central y Sudamérica, el parásito es también conocido en México, Costa Rica, Venezuela, Perú, Bolivia, Brasil, Uruguay, Argentina y Chile (Boray, 1986) así como también en Colombia (Rey, 1991).

En África, el parásito aparece en países del noreste mediterráneo como Marruecos y Algeria, donde el parásito utiliza el mismo caracol hospedador intermediario que en Europa, *Lymnaea truncatula* (Malek, 1985). Sin embargo, en Egipto la fascioliasis parece ser debida a *F. gigantica* (Chen & Mott, 1990; Khallaayoune *et al.*, 1991, siendo *F. hepatica* la especie presente a elevada altitud en Kenia y Etiopía.

En Oceanía, además de Nueva Zelanda y Tasmania, es común y ampliamente distribuída en zonas templadas, húmedas y de agricultura en la parte sureste del país (Haiba & Selim, 1960; Chen & Mott, 1990).

En Asia, también se conoce la enfermedad en Turquía, Israel, Arabia Saudita, Yemen, Irán, Pakistán, India, Nepal, Burma, China, Taiwan, Tailandia, Vietnam, Corea, Japón las Filipinas (Bergeon & Laurent, 1970).

### 2.2.1.3.- EPIDEMIOLOGÍA

Los casos de fascioliasis humana han ido aumentando en las últimas décadas. Las estimaciones van desde 2.4 millones hasta 17 millones de personas afectadas o incluso más, dependiendo de las situaciones hasta ahora desconocidas principalmente en Asia y África (Mas-Coma, 2004). Después de muchos años de estudio en diferentes áreas donde la infección humana por fasciólidos trematodos del hígado está presente a lo largo del mundo, se ha propuesto una clasificación de las distintas situaciones epidemiológicas (Mas-Coma *et al.*, 1999b, 2009) que aún parece ser plenamente válida y útil. Esta clasificación incluye las siguientes situaciones:

- *Casos autóctonos aislados*: los humanos adquieren la infección en un área donde viven y donde la fascioliasis animal también está presente; estos casos humanos aparecen esporádicamente, sin ninguna constancia.
- *Casos importados*: son casos humanos que fueron diagnosticados en una zona donde no se encuentra el parásito, incluso en animales, y son infectados en un área donde se da la transmisión.
- *Endemia*: son tres los tipos de situaciones endémicas que pueden distinguirse de acuerdo con las prevalencias humanas en la población total, obtenidas por diagnóstico coprológico.
  - *Hipoendemia*: prevalencia menor del 1%, intensidad media aritmética menor de 50 huevos por gramo de heces, elevado número de huevos por gramo en casos

esporádicos, participación humana en la transmisión mediante la emisión de huevos, características higiénico-sanitarias que incluyen letrinas o instalaciones de eliminación de residuos o aguas residuales, y no se practica la defecación al aire libre.

- *Mesoendemia*: prevalencia entre el 1% y el 10%; pudiendo presentar prevalencias más altas los niños de entre 5-15 años; la intensidad media aritmética en comunidades humanas normalmente es de entre 50 y 300 huevos por gramo de heces. Se puede encontrar un número de huevos por gramo más alto, aunque intensidades mayores de 1000 huevos por gramo son raras. Los sujetos humanos pueden participar en la transmisión a través de la emisión de huevos, las características higiénico-sanitarias pueden o no incluir letrinas e instalaciones de eliminación de residuos y alcantarillado; y se puede practicar la defecación al aire libre.

- *Hiperendemia*: prevalencia mayor del 10%, la intensidad media aritmética en comunidades humanas normalmente de más de 300 huevos por gramo, las intensidades mayores de 1000 huevos por gramo son relativamente frecuentes; los sujetos humanos participan significativamente en la transmisión a través de la emisión de huevos; las características higiénico-sanitarias no incluyen el uso de letrinas; no hay instalaciones apropiadas para la eliminación de residuos y alcantarillado y la defecación indiscriminada es comúnmente practicada.

- Epidemia: hay tres tipos de epidemias según la situación endémica o no endémica de la zona.
  - *Epidemias en áreas endémicas para animales, pero no para humanos*: los brotes aparecen en zonas donde previamente los casos reportados en humanos han sido aislados o esporádicos; normalmente los brotes afectan a unos pocos sujetos que han sido infectados a partir de una misma fuente de contaminación (familia o pequeños grupos, cultivos domésticos o crecimiento comercial de berros u otros vegetales que puedan poseer metacercarias).
  - *Epidemias en áreas endémicas*: los brotes aparecen en zonas de endemia humana; el número de sujetos infectados puede ser mayor que en las zonas de endemia animal; normalmente se asocia a condiciones climáticas que previamente han favorecido tanto el ciclo del parásito como el del molusco.

En áreas de hipo hiperendemia, esta enfermedad presenta un espectro muy amplio de transmisión y patrones epidemiológicos relacionados con la gran diversidad de

ambientes, incluyendo diferentes situaciones de endemia/epidemia humana; demografías humanas distintas, razas, dietas, hábitos, tradiciones y religiones; diferentes especies de mamíferos salvajes y domésticos que actúan como reservorio; diferentes especies de lymnaeidos; zonas tanto de los hemisferios noreste y sureste; altitudes desde 27 a más de 4200 m, climas cálidos y fríos; estacionalidad y temperaturas anuales constantes; escasez por las pronunciadas lluvias; bajos y altos valores medios anuales de evapotranspiración; y desde falta de período seco hasta falta de período húmedo mediante diferentes tasas de sequedad/humedad (Mas-Coma & Bargues, 2003).

Se ha propuesto una clasificación para los distintos modelos de transmisión (Mas-Coma, 2005) que es actualizada progresivamente para ofrecer una línea base para futuras investigaciones (Mas-Coma *et al.*, 2009a). Los diferentes patrones pueden distinguirse en:

1. Un patrón de altitud muy elevada relacionado únicamente con la transmisión de *F. hepatica* importada por *G. truncatula* en países Andinos siguiendo la transmisión a lo largo del año. Dentro de esta categoría pueden distinguirse dos subpatrones que pueden diferenciarse de acuerdo con las características fisiográficas y estacionales:
  - a) El patrón altiplánico, con transmisión a lo largo de todo el año.
  - b) El patrón del valle, con estacionalidad y prevalencias e intensidades relacionadas con la altitud (Valero *et al.*, 2012b).
2. El patrón insular del Caribe con pocos, pero repetidos brotes en áreas humanas hipoendémicas. En la transmisión se ven involucradas las especies de lymnaeidos además de las principales especies vectoras.
3. Un patrón relacionado con las tierras bajas Afro-Mediterráneas, incluyendo el solapamiento de *F. hepatica* con *F. gigantica* y diversos *Galba/Fossaria* y *Radix* lymnaeidos junto con el transmisor secundario *Pseudosuccinea* y donde la estacionalidad es típica.
4. Un patrón relacionado con las áreas que rodean el mar Caspio, incluyendo áreas humanas de hipoendemia en las cuales se dan grandes epidemias, involucrando ocasionalmente a más de 10.000 personas. Existe cierto solapamiento entre *F. hepatica* y *F. gigantica* y varios lymnaeidos del grupo *Galba/Fossaria*, *Radix* y estagnícola.
5. Patrón relacionado con las áreas de Vietnam, el cual puede ser extrapolado a otros países vecinos del sureste asiático; este patrón es capaz de aumentar las

grandes epidemias humanas y está relacionado solo y principalmente con *F. gigantica* y en consecuencia a los lymnaeidos del grupo *Radix*.

La fascioliasis humana muestra una marcada heterogenicidad en las diferentes situaciones epidemiológicas y patrones de transmisión a lo largo del mundo. Sin embargo, las bien conocidas situaciones y patrones de fascioliasis puede que no siempre expliquen las características de la enfermedad en un área dada.

Las especies vectoras de lymnaeidos muestran una relación con los patrones de transmisión. Los lymnaeidos presentan diferentes características ecológicas y etológicas, dependiendo de las especies. Factores como el tipo de colección de agua, la dinámica de la población, límites de temperatura, estacionalidad o susceptibilidad a la infección por estos trematodos, son cruciales en la fascioliasis. Como en otras enfermedades parasitarias de origen vectorial, los lymnaeidos constituyen excelentes marcadores de las características de la enfermedad útiles para la diferenciación entre las diferentes situaciones y patrones de la enfermedad; es por ello que es necesario su evaluación antes de aplicar o diseñar las apropiadas estrategias de control (Mas-Coma *et al.*, 2014).

A la vista del hecho de que la infección humana se da por ingestión de la metacercaria, la infectividad de esta depende del tiempo de almacenamiento, siendo menor la infectividad cuando la metacercaria es más vieja. La máxima longevidad es de 31 a 48 semanas. Además la viabilidad e infectividad de la metacercaria no muestra diferencias entre aislados de diferentes especies reservorios, demostrando así que, los trematodos de reservorios secundarios como son por ejemplo los cerdos y burros poseen el mismo riesgo potencial que las especies animales que actúan como reservorios principales como la oveja o la vaca (Valero & Mas-Coma, 2000). La ingestión de la metacercaria en humanos puede ocurrir de distintas maneras. A continuación se distinguen algunas fuentes (Mas-Coma, 2004):

-Ingestión de plantas silvestres de agua dulce: importante en animales de áreas endémicas;

- Ingestión de plantas cultivadas de agua dulce, principalmente berros;
- Ingestión de plantas terrestres silvestres: recolectadas en hábitats secos pero que fueron sumergidos en agua unas pocas semanas o meses antes;
- Ingestión de plantas terrestres cultivadas que requieren una irrigación frecuente.
- Bebiendo agua contaminada;
- Ingestión de platos o sopas hechas con agua contaminada;
- Lavando los utensilios de cocina u otros objetos con agua contaminada y

- Por la ingestión de hígado crudo infectado con metacercarias migratorias que pueden conservar la capacidad para reiniciar la migración.

Las tradiciones culturales demuestran ser importantes en algunas áreas de endemia y algunos estudios experimentales muestran el papel que juegan los alimentos vegetales en la infección humana en Gilan, Irán (Ashrafi *et al.*, 2006). La relación entre el riesgo de padecer fascioliasis y el consumo de vegetales crudos, a parte de los berros, debe ser destacada, ya que sugiere contaminación cuando se lavan los vegetales terrestres con agua no tratada y/o en cultivos de plantas usando agua natural de irrigación (Zumaquero-Ríos *et al.*, 2013).

El origen y la dispersión geográfica tanto de *F. hepatica* como *F. gigantica* tanto en rumiantes en el paleoperiodo antes de la domesticación como en ganado desde el momento de la domesticación hace 12.000-1.000 años, han sido analizados y los resultados de los análisis sugieren que existe un antecesor común de *Fasciola* tanto para *F. hepatica* como para *F. gigantica*. Se trataba de una especie infectiva del hígado de uno o más artiodáctilos geográficamente distribuidos desde África hasta el cercano este y transmitidos por lymnaeidos viejos (probablemente del género *Radix*) durante el final del Oligoceno y principios del Mioceno (Mas-Coma *et al.*, 2009a). Las dos especies corrientes de *Fasciola* se originaron, por tanto, de forma separada una de la otra. Los datos sugieren que *F. gigantica* se originó primero por adaptación a *R. natalensis* y rumiantes (*Giraffidae*, *Reduncinae*, *Alcelaphinae* o gñus) en África Sub-Sahariana, probablemente en tierras bajas cálidas del sureste de África. Por el contrario, *F. hepatica* fue originada después por adaptación a *G. truncatula* y probablemente a rumiantes de la familia *Caprinae* (principalmente especies de oveja del género *Ovis*) probablemente en tierras altas y frías en el cercano este. La hipótesis del origen de ambas especies de *Fasciola* encaja perfectamente con la datación de la mayor radiación de eventos de rumiantes durante el período del Terciario (Mas-Coma *et al.*, 2009a). Esto encaja a nivel de evolución con la divergencia entre *F. hepatica* y *F. gigantica* que se estima que ocurrió hace 19 millones de años (Irving *et al.*, 2003).

El anterior estudio mencionado sugiere que las dos especies de fasciólido estaban más o menos geográficamente restringidas a áreas originales durante millones de años de evolución y empezaron su mayor dispersión desde la llegada de los humanos y de la de la domesticación de los herbívoros salvajes (Mas-Coma *et al.*, 2009a).

#### **2.2.1.4.- PATOLOGÍA Y CLÍNICA**

## Patología

La patogénesis depende del número de trematodos que contenga el hospedador, esto es, de la carga o intensidad de la infección. La penetración de las metacercarias en la pared del duodeno o del yeyuno puede causar hemorragias focales e inflamación, aunque las lesiones pueden no ser evidentes clínicamente. En animales la tasa de mortalidad es inversamente proporcional al número de parásitos presentes en el hígado. Los principales efectos patológicos se deben a la migración del parásito a través del parénquima del hígado durante 4-6 semanas o más, los parásitos digieren el tejido hepático causando una extensa destrucción del parénquima con intensas lesiones hemorrágicas y reacciones inmunológicas e inflamatorias. Algunos de los parásitos mueren a veces, durante la migración dejando cavidades llenas de restos necróticos y en consecuencia algunas áreas del hígado pueden ser reemplazadas por tejido cicatrizado (Smithers, 1982; Mas-Coma *et al.*, 1999a; Mas-Coma & Bargues, 2000). Una pequeña proporción de trematodos puede alcanzar los conductos biliares donde pueden llegar a vivir varios años. En dichos conductos los efectos patológicos son menores, aunque la inflamación comúnmente acaba en fibrosis y expansión (Chen & Mott, 1990).

En una imagen de la ultraestructura del conducto biliar se pueden apreciar hiperplasia, fibrosis de los tractos portales, ensanchamiento de los espacios interhepáticos por la presencia de muchos microvilis y espacios dilatados con fibras de colágeno. La hiperplasia de los conductos biliares puede ser el factor inicial de la fibrogénesis, la cual subsecuentemente, intensifica el desarrollo de microvili en la superficie de los hepatocitos. Tanto en las infecciones animales como humanas, la anemia es uno de los síntomas más característicos, especialmente en infecciones más fuertes. La pérdida de sangre en la bilis parece ser un factor importante que contribuye a la anemia severa (Valero *et al.*, 2008).

El proceso patológico puede resumirse de la siguiente manera: (a) el trematodo se alimenta de sangre pero también puede alimentarse de tejido; (b) las hemorragias pueden producirse por la erosión del epitelio biliar debido a la infección; (c) el número de reticulocitos en la sangre periférica aumenta; (d) ausencia de hemólisis generalizada; (e) no hay evidencia de hierro en plasma o deficiencias de vitamina B12, aunque recientemente se ha detectado, una reducción significativa del hierro en suero, en pacientes con fascioliasis crónica (Mas-Coma *et al.*, 2014a).

Inmunológicamente, la respuesta mediada por células varía de hospedador a hospedador y en el mismo hospedador, de acuerdo con la fase de la infección (Oldham, 1985). La enfermedad es autolimitante en el ganado, así como también en

ratas, cerdos de guinea y conejos, la resistencia se adquiere durante las infecciones primarias, pero las lesiones hepáticas y la elevada mortalidad puede darse, particularmente en animales jóvenes o débiles. En ovejas, sí como en cabras, hamsters y ratones, se ha visto una baja o inexistente resistencia y la infección es altamente patogénica tanto en la fase aguda como en la crónica; la muerte es normal en infecciones fuertes (Boray, 1969; Smithers, 1982). Las secuelas más importantes son las lesiones hepáticas y la fibrosis, así como también la inflamación crónica de los conductos biliares, dado que la enfermedad está confinada al hígado (Mas-Coma & Bargues, 1997).

El hígado aparece normalmente agrandado con una superficie lisa y desigual. Las lesiones macroscópicas más comunes son los múltiples nódulos amarillentos o grisáceos de entre 2-30 mm de diámetro, que se corresponden con abscesos eosinofílicos. También se observan nódulos en el peritoneo parietal próximo al hígado y alrededor del ligamento del hígado. Las hemorragias puntiformes aparecen en los márgenes de los nódulos. Cerca de estos nódulos se producen formas acanaladas o vermiformes de un color y consistencia similares a los nódulos observados bajo laparoscopia. Los vasos linfáticos subcapsulares se dilatan y a su vez, los nódulos linfáticos cercanos a la vena porta hepática pueden ampliarse marcadamente. La mayoría de las lesiones están a menos de 20 mm por debajo de las cápsulas (Acosta-Ferreira *et al.*, 1980). Los conductos biliares se dilatan y alargan y su pared se engrosa. La pared de la vesícula biliar aparece engrosada debido a la hipertrofia muscular y a la fibrosis perimuscular. Se da hiperplasia epitelial glandular y todas las capas de la pared contienen infiltraciones irregulares de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Acosta-Ferreira *et al.*, 1980). La litiasis, a menudo múltiple, es muy común en los conductos biliares y la vesícula biliar (Arjona *et al.*, 1995). Generalmente, las vías de migración son encontradas en el hígado y otros órganos. Las paredes de las vías del hígado a menudo contienen cristales de Charcot-Leyden y eosinófilos. Las cavidades de las vías están llenas de restos celulares necróticos, incluyendo hepatocitos, fibrina y glóbulos rojos. Las largas vías de migración pueden cruzar varios lóbulos hepáticos y en lesiones viejas, se observan macrófagos, linfocitos, eosinófilos y tejido fibroso (Acosta-Ferreira *et al.*, 1980).

Las formas inmaduras del parásito pueden desviarse durante la migración, entrando en otros órganos causando fascioliasis ectópica. En humanos, las lesiones ectópicas más frecuentes son las del tracto gastrointestinal (Acosta-Ferreira *et al.*, 1980); Parck *et al.*, 1984). Otras lesiones ectópicas se dan en la pared abdominal (Totev & Georgiev, 1979), páncreas (Chitchang *et al.*, 1982), bazo (Wei, 1984), tejido subcutáneo (Aguirre

Errasti *et al.*, 1981; Parck *et al.*, 1984; García Rodríguez *et al.*, 1985), corazón (Cho *et al.*, 1994), vasos sanguíneos, el pulmón y la cavidad pleural (Parck *et al.*, 1984; García-Rodríguez *et al.*, 1985), cerebro (Ruggieri *et al.*, 1967; Mas-Coma *et al.*, 2014b), cuenca del ojo (García-Rodríguez *et al.*, 1985; Cho *et al.*, 1994; Mas-Coma *et al.*, 2014b) músculo esquelético, apéndice (Parck *et al.*, 1984) y epidídimo (Aguirre Errasti *et al.*, 1981). Los efectos patológicos normales de las lesiones ectópicas son debidas a las vías de migración causadas por el daño tisular con inflamación y fibrosis (Mas-Coma & Bargues, 1997). Los parásitos pueden calcificarse o llegar a ser incorporados en un granuloma (Arjona *et al.*, 1995; Mas-Coma & Bargues, 1997).

Un análisis amplio ha demostrado que la neurofascioliasis o infección intracraneal por *Fasciola* y la oftalmofascioliasis o afección directa del ojo por migración de trematodos es rara, aunque no esporádica como se creía. Sin embargo, las manifestaciones incluyen un amplio rango de síntomas neurológicos, señales y síndromes, junto con manifestaciones meníngeas, psiquiátricas o neurofísicas, y desórdenes oculares causados a distancia por trematodos que, infectando el hígado, pueden ser frecuentes pero subestimados debido a un diagnóstico erróneo, principalmente en regiones donde la cantidad de ingresos por la enfermedad es baja (Mas-Coma *et al.*, 2014b).

## **Clínica**

La clínica incluye desde hemiplegia y paraplegia a alteraciones o dificultad en la capacidad para caminar, alteraciones del habla, convulsiones, epilepsia y coma, amnesia, alucinaciones y ceguera permanente (Mas-Coma *et al.*, 2014b).

Desde un punto de vista clínico, se pueden distinguir los siguientes períodos (Facey & Marsden, 1960; Mangos & Menzies, 1973): el período de incubación (desde la ingestión de la metacercaria hasta la aparición de los primeros síntomas), la fase invasiva o aguda (correspondiente a la migración del parásito hacia los conductos biliares), la fase latente (empezando con la maduración del parásito y el comienzo de la oviposición), y finalmente la fase obstructiva o crónica. De estos cuatro períodos, la fase invasiva o aguda y la fase crónica o biliar son las más importantes y en las que la mayoría de los pacientes son diagnosticados. El período de incubación varía según el número de metacercarias ingeridas y de la respuesta del hospedador. El período de incubación en humanos no está bien determinado, aunque se encuentra entre sólo unos pocos días (Ragab & Farag, 1978), 6 semanas (Rimbault, 1981), o entre 2-3 meses (Hardman *et al.*, 1970).

Las duelas hepáticas promueven su propia supervivencia mediante diversas estrategias para regular la respuesta inmune del hospedador durante la fase temprana de la infección (Brady *et al.*, 1999). Otro estudio muestra que la modulación de la respuesta inmune se da también en la fascioliasis crónica avanzada. Los resultados indican que durante la infección crónica temprana, predominaba la respuesta Th2, la cual disminuye en la infección crónica avanzada, caracterizada por una supresión inmune persistente (Gironès *et al.*, 2007). La Fascioliasis es un inductor potente de las respuestas Th2 que debilitan la habilidad de generar cualquier respuesta Th1 efectiva contra bacterias y otros patógenos (Brady *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2000; Jaffar *et al.*, 2004).

En la fase aguda, la sintomatología se debe principalmente a la destrucción mecánica del tejido del hígado y del peritoneo abdominal debido a la migración larvaria que causa reacciones alérgicas localizadas o generalmente tóxicas durante 2-4 meses. Sin embargo, en áreas endémicas, la infección por *F. hepatica* normalmente es repetitiva y las lesiones agudas son suprimidas por la enfermedad crónica. De este modo la fase aguda puede prolongarse o solaparse con la fase latente o a crónica.

Los principales síntomas de la fase aguda son:

- Fiebre: la fiebre es normalmente el primer síntoma, siendo baja o moderada, aunque a veces puede alcanzar los 40°C, y en infecciones muy fuertes puede llegar a ser mayor de 42°C; puede remitir, ser intermitente o irregular con elevadas temperaturas conforme se acerca la noche. En algunos casos una fiebre recurrente y baja puede durar más tiempo (de 4 a 18 meses).
- Dolor abdominal: de leve a insoportable, a veces impreciso, puede ser generalizado al principio, aunque normalmente se localiza en el hipocondrio derecho o debajo del xifoides.
- Alteraciones gastrointestinales: pérdida de apetito, flatulencias náuseas y diarreas son comunes, mientras que los vómitos y el estreñimiento no son frecuentes.
- Urticaria: es junto con la dermatografía, una característica distintiva en las primeras fases de la invasión del trematodo y puede ir acompañada por ataques de asma bronquial.
- Síntomas respiratorios: tos, disnea, hemoptisis y dolor de pecho, se dan de forma común, pero en algunos casos son las primeras manifestaciones de la infección

En la fase aguda pueden aparecer los siguientes signos mediante examen físico (Chen & Mott, 1990):

- Hepatomegalia y esplenomegalia: el hígado normalmente se hace más grande y sensible, llegando a veces hasta la fosa ilíaca derecha, el grado de hepatomegalia parece aumentar durante el curso de la enfermedad, y se detectan abscesos hepáticos; la esplenomegalia no es común, pero ha sido reportada muchas veces.
- Ascitis: este signo ha sido reportado varias veces; se da un elevado recuento de leucocitos, aunque predominan los eosinófilos; la patogénesis se considera como una respuesta inflamatoria contra un elevado número de trematodos juveniles penetrando en las paredes del intestino, la irrigación del peritoneo y la penetración a través de la cápsula del hígado durante su migración, en vez de insuficiencia hepática.
- Anemia: de leve a moderada; la palidez de la piel y de la mucosa se asocia comúnmente con la lasitud, mareo, palpitaciones y debilidad.
- Signos en el pecho: mediante auscultación los humores secos o húmedos detectados pueden ser obtenidos al toser en la base del pulmón derecho probablemente debido a la migración de las formas juveniles del parásito; se ha reportado rozamiento pleural con neumotórax.
- Ictericia: es frecuente y cuando aparece es más leve de lo que se ha observado en la fase crónica.

En zonas de endemia humana, normalmente hay una disminución de la prevalencia desde niños y jóvenes hasta adultos. A pesar de esto, los resultados demuestran que los individuos adultos, o bien mantienen los parásitos adquiridos cuando son jóvenes o bien pueden ser nuevamente infectados como consecuencia de estar habitando una zona de alto riesgo de infección (Esteban *et al.*, 1999). Es importante tener en cuenta que la esperanza de vida de las formas adultas del parásito en humanos es de entre 9 y 13.5 años (Mas-Coma & Bargues, 1997).

La fase crónica o biliar puede desarrollarse meses o años después de la infección. Las formas adultas del parásito causan inflamación en los conductos biliares e hiperplasia del epitelio. Posteriormente se da el espesamiento y dilatación de los conductos de la vesícula biliar. La colangitis y la colecistitis resultantes, combinadas con el grande tamaño de los parásitos es suficiente para causar una obstrucción mecánica del conducto biliar, el diámetro del cual es, en comparación más pequeño. Las manifestaciones clínicas en esta fase como son el cólico biliar, dolor epigástrico, intolerancia a las comidas con grasa, náuseas, ictericia, prurito, sensibilidad abdominal en el cuadrante superior derecho, etc; son indistinguibles de la colangitis, coleocistitis o

la colelitiasis que originan otras infecciones por *Fasciola*. El agrandamiento hepático puede estar asociado al agrandamiento del bazo y la ascitis (Acosta-Ferreira *et al.*, 1980). Los conductos biliares se ven normalmente distendidos y engrosados, siendo sus diámetros de 1.5-3.0 veces el tamaño normal. El lugar de obstrucción más común es el conducto biliar. En caso de obstrucción, la vesícula biliar normalmente se hace más grande y edematosa con un engrosamiento de la pared. La vesícula biliar puede medir 12x7x7 cm y el borde inferior llega al ombligo. Es común que las fibras de la vesícula biliar se adhieran a los órganos adyacentes. La litiasis del conducto biliar o de la vesícula biliar es frecuente y normalmente las piedras que se forman son pequeñas y abundantes (Chen & Mott, 1990) (Arjona *et al.*, 1995). Ambos pueden contener sangre mezclada con bilis (haemobilia), coágulos de sangre y tapones fibrinosos.

Se ha verificado experimentalmente que la duración y la intensidad de la infección por *Fasciola* y el daño del hígado se asocian con la bacterobilia por *Escherichia coli* (45% de los casos), *Enterococcus faecalis* (45%) y *Klebsiella pneumoniae* (10%). Esto apoya la idea de que la obstrucción causada por la fascioliasis crónica avanzada puede estar relacionada con la sepsis biliar. Estos resultados llevan a reconsiderar las características del tratamiento de la enfermedad en humanos (Valero *et al.*, 2006b).

Los factores comunes en todas las fases de la infección por *F. hepatica* son, la eosinofilia (siempre más del 5%, la mayor detectada ha llegado a ser del 83%) acompañada de leucocitosis, especialmente en la fase aguda. La anemia es común, pero normalmente no muy severa. La tasa de sedimentación eritrocítica puede ser mayor en la fase aguda (posiblemente alcanzando 165 mm en una hora) La función anormal del hígado puede observarse tanto en la fase aguda como en la obstructiva o crónica, pero los altos niveles de bilirrubina se asocian con la fase crónica (Chen & Mott, 1990). Los estudios de la inmunoglobulina sérica (Sampaio Silva *et al.*, 1985; Salem *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1997) han mostrado que los niveles de IgG, IgM e IgE son normalmente elevados. Los anticuerpos IgE específicos son detectados en el 48% de los pacientes. Los niveles de IgA son normales. En humanos, las complicaciones que se pueden dar son la cirrosis de la vejiga y de la vesícula biliar, las cuales pueden ser las principales causas de muerte. La muerte es rara así como la infección es normalmente esporádica y la prevalencia es baja (Chen & Mott, 1990).

#### **2.2.1.5.- DIAGNÓSTICO**

Principalmente en áreas de endemia humana donde los médicos son conscientes de la infección por trematodos del hígado, la verificación de la

infección necesita del uso de técnicas parasitológicas directas, test inmunológicos indirectos y otras técnicas de diagnóstico disponibles no invasivas (Xiao *et al.*, 2015).

La eosinofilia en sangre y la ingestión de berros y otros vegetales de agua dulce, son extremadamente útiles en la anamnesis para orientarse hacia un diagnóstico de fascioliasis en un país desarrollado. Por tanto, la fascioliasis fue incluida en la lista de enfermedades que causan eosinofilia en viajeros y migrantes que vuelven de los trópicos (Checkley *et al.*, 2010). Desafortunadamente, la eosinofilia y la anamnesis normalmente no son útiles en áreas de endemia humana de países desarrollados, donde la eosinofilia puede también ser causada por infecciones de otros helmintos y donde las tradiciones gastronómicas locales incluyendo la ingestión de muchas plantas no cocinadas, pueden enmascarar la infección por trematodos del hígado (Mas-Coma *et al.*, 2014).

La detección e identificación de huevos de fasciólidos en muestras de heces, contenido duodenal o bilis, sigue siendo la estrategia de diagnóstico etiológico o directo más apropiada tanto para detectar tanto la infección como para estimar la intensidad de la misma. Se ha llegado a esta conclusión a pesar de la reconocida baja sensibilidad de la detección de huevos en muestras fecales y de su inutilidad para el diagnóstico de pacientes que se encuentran en la fase aguda, así como la falta de una relación precisa entre el número de huevos por gramo contados en heces y la carga de trematodos (Valero *et al.*, 2006, 2009). La concentración de huevos se ha conseguido mediante técnicas de flotación y sedimentación. Las técnicas de sedimentación parecen ser más precisas y sensibles que las de flotación (Esteban *et al.*, 1998). El tamaño de los huevos de los trematodos ha sido siempre utilizado para el diagnóstico en humanos. En base a los estudios realizados en ganado, los límites que permiten la diferenciación entre las dos especies de fasciólidos son tradicionalmente considerados como 150  $\mu\text{m}$  de longitud y 90  $\mu\text{m}$  de ancho, presentando *F. hepatica* valores más bajos y *F. gigantica* valores más altos. Sin embargo, se observaron primero variaciones elevadas de tamaño en los huevos de *F. hepatica* en ganado de diferentes localizaciones geográficas (Tinar, 1984).

En un estudio sobre aspectos morfométricos de los huevos, se ha demostrado experimentalmente que la especie de hospedador definitivo (oveja, vacas, cerdos y burros) influye decisivamente en el tamaño de los huevos de *F. hepatica* aún dentro de la misma área endémica (Valero *et al.*, 2001). En humanos, los huevos de *F. hepatica* son más grandes y los huevos de *F. gigantica* son más pequeños que los reportados en ganado y cuando comparamos sus medidas éstas se solapan (Valero *et al.*, 2009). Además, la existencia de formas intermedias entre ambas especies de fasciólidos y la

presencia de híbridos genéticos de ambos en áreas de solapamiento incrementa el problema. La existencia de estas formas intermedias plantea la cuestión de si las características de los huevos son adecuadas para el diagnóstico diferencial de la fascioliasis causada por estas especies (Valero *et al.*, 2006). Un ejemplo concreto de este problema ya fue enfatizado en el diagnóstico de la fascioliasis en humanos (Inoue *et al.*, 2007).

Los análisis coprológicos cuantitativos son importantes en las encuestas epidemiológicas, así como también lo es el seguimiento después del tratamiento. La carga de huevos es también crucial en el momento de decidir la dosis apropiada de tratamiento. Se ha propuesto un límite de 400 huevos por gramo para identificar infecciones de elevada intensidad. Para evitar el riesgo de cólico, se recomienda una dosis media, espaciada en el tiempo y de forma repetida en pacientes que liberan más de 400 huevos (OMS, 2007; Valero *et al.*, 2012). La segunda mitad del régimen es administrado 24 h después, cuando se verifica la ausencia de efectos secundarios. La técnica de Kato-Katz parece ser apropiada por su simplicidad, bajo coste y reproducibilidad (Mas-Coma *et al.*, 1999a). Su baja sensibilidad puede compensarse aplicando la técnica repetidas veces. Además de huevos, en los análisis coprológicos, también se pueden encontrar adultos en otras partes mediante técnicas invasivas; a partir de la obtención de fluido duodenal, aspiraciones duodenales y biliares, cirugía (laparotomía, colecistectomía, esfínterotomía), y exámenes histológicos del hígado y/o la biopsia de otros órganos (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

Numerosos test serológicos, intradérmicos y de detección de antígenos coprológicos han sido desarrollados. Las técnicas inmunológicas tienen la ventaja de poder ser aplicados durante todos los períodos de la enfermedad, pero fundamentalmente durante la fase aguda, así como también en aquellas situaciones en las que las técnicas coprológicas presentan problemas. Sin embargo, las técnicas inmunológicas ofrecen otros tipos de problemas relacionados principalmente con la sensibilidad y especificidad. Se han usado diversos test serológicos para el diagnóstico en humanos. Casi todas estas técnicas implican la detección de anticuerpos, y solo unos pocos son diseñados para detectar antígenos circulantes e inmuno complejos. Actualmente los esfuerzos se concentran en la obtención de antígenos de excreción/ secreción purificados y/o proteínas recombinantes para mejorar los test serológicos, superando los problemas del diagnóstico durante la fase aguda (examen coprológico positivo solo 3-4 meses después de la infección), la dinámica irregular de la emisión de huevos, muy baja o ausente emisión de huevos en casos de un solo o pocos trematodos adultos, y viejas infecciones, infecciones crónicas, infecciones ectópicas o trematodos incapaces

de alcanzar la madurez sexual en los sujetos humanos en áreas no endémicas para humanos (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

La cisteín-proteinasa es secretada por las formas adulta y juvenil del parásito y es altamente antigénica tanto en animales como en humanos. Varias cisteín-proteinases son marcadores altamente sensibles y específicos para el serodiagnóstico en humanos para *F. hepatica*, (Sampaio-Silva *et al.*, 1996; Cordova *et al.*, 1997, 1999; O'Neill *et al.*, 1998), 1999; Strauss *et al.*, 1999; Rokni *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2007; Mezo *et al.*, 2003, 2004), así como para la infección causada por *F. gigantica* (Ikeda *et al.*, 1998; Maleewong *et al.*, 1999) (Intapan *et al.*, 1998, 2004; Tantrawatpan *et al.*, 2005). Se han usado cistein-proteasas recombinantes de *F. hepatica* producidas en levadura (O'Neill *et al.*, 1999) o en *Escherichia coli* (Carnevale *et al.*, 2001) en los métodos ELISA para el diagnóstico de la infección en humanos. Un estudio reciente en dos áreas de hiperendemia humana de Bolivia y Perú han mostrado que el test de detección de coproantígeno MM3-COPRO tiene elevada sensibilidad y especificidad, una rápida y gran capacidad de detección, capacidad de detección en la fase crónica, detección temprana del fallo del tratamiento o reinfección en individuos tratados a posteriori, y utilidad para los programas de vigilancia. Sin embargo, esta técnica se queda corta cuando se evalúa la carga de termatodos en sí misma (Valero *et al.*, 2012). El uso de un nuevo diluyente CoproGuard, desarrollado para preservar los coproantígenos de *Fasciola*, demostró que podía mejorar la extracción del coproantígeno sin afectar el límite de detección del ensayo, y la antigenicidad de los coproantígenos de *Fasciola* en las muestras de heces almacenadas a 37°C, se guardaban a lo largo del período entero de observación. MM3-COPRO ELISA combinado con el uso de CoproGuard puede ser una herramienta muy útil para el diagnóstico de la fascioliasis humana (Ubeira *et al.*, 2009).

El reciente desarrollo de un nuevo test de flujo (SeroFluke) para el serodiagnóstico en humanos parece ser un paso hacia delante. Este test ha sido construido con catepsina L1 de *F. hepatica* y utiliza proteína A y mAb MM3 como reagentes detectores en términos de prueba y control, respectivamente. En comparación con el test ELISA (MM3-SERO), el SeroFluke test muestra la máxima especificidad y sensibilidad y la ventaja de ser aplicable tanto a suero como a muestras de sangre. Su simplicidad permite que pueda ser usado en la mayoría de hospitales así como en regiones de endemia/hiperendemia donde se requiere un punto de atención en la prueba (Martínez-Sernández *et al.*, 2011). Las técnicas no invasivas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico en humanos son la radiología, el escaneo con radioisótopos, los ultrasonidos, la tomografía computerizada y la resonancia magnética (Mas-Coma *et al.*,

1999a; Hillyer, 1999). La infección humana por *F. hepatica* y *F. gigantica* no se puede diferenciar mediante métodos clínicos, patológicos, coprológicos o inmunológicos. Este problema se da en las áreas de solapamiento donde el diagnóstico diferencial es muy importante debido a la diferente patología, transmisión y características epidemiológicas de los dos fasciólidos, así como también debido al solapamiento de las medidas de los huevos en las formas intermedias del parásito. Para distinguir entre *F. hepatica* y *F. gigantica*, un basta con un simple y rápido ensayo PCR-RFLP, utilizando enzimas de restricción comunes como Avall y Drall. Está basado en 618 pares de bases de la secuencia larga 28S del RNA del gen recientemente obtenido a partir de poblaciones de Sudamérica, Europa y África. Esta secuencia no muestra variaciones intraespecíficas en cada especie y pocas diferencias en los nucleótidos entre ambos fasciólidos. Este ensayo proporciona resultados fiables y puede ser útil tanto para el diagnóstico individual como para cuestiones epidemiológicas en humanos y animales en regiones endémicas de simpatria en África y Asia (Marcilla *et al.*, 2002). Desafortunadamente, este tipo de ensayo PCR-RFLP solo son útiles para diferenciar entre especies puras, pero no para las formas híbridas (Mas-Coma *et al.*, 2009). Las principales conclusiones se refieren a: (i) las dificultades en el diagnóstico de la fascioliasis en humanos dado las diferentes fases de la infección y capacidad migratoria del parásito, heterogenicidad clínica, complejidad inmunológica, diferentes situaciones epidemiológicas y varios patrones de transmisión, (ii) la falta de una técnica diagnóstica que cubra todas las necesidades y situaciones, (iii) el hecho de que, a pesar de las limitaciones potenciales, un buen test puede ser útil si se selecciona para una situación apropiada y (iv) la evidente conveniencia del uso combinado de diferentes técnicas, al menos incluyendo una técnica para heces y otra para sangre, para mejorar la confianza en el diagnóstico de la fascioliasis humana. Es recomendable incluir una técnica cuantitativa cuando el paciente es un niño procedente de un área de endemia humana (se recomienda la hospitalización si existe riesgo de cólico debido a la elevada carga de huevos, mayor de 400 huevos por gramo). Una combinación apropiada de técnicas de diagnóstico permite una correcta interpretación de la situación de infección del paciente y subsecuentemente, un diseño adecuado del tratamiento, postratamiento a seguir y medidas preventivas para evitar la re-infección. El problema de la marcada y diferente sensibilidad en las diferentes especies de hospedador debe ser considerada, evitando la extrapolación de las capacidades de un test diagnóstico de unas especies de hospedador (animales) a otras (humanos, otros animales). Cuando se trata de encuestas, deben considerarse los siguientes aspectos: (i) las técnicas deben ser seleccionadas de acuerdo con las características de áreas de

estudio; (ii) es necesario incluir una técnica cuantitativa para diseñar el tratamiento (hospitalización para niños con más de 400 huevos por gramo de heces); (iii) cuando sea posible incluir una técnica rápida, permitiendo la selección de un gran número de muestras; y (iv) añadir una técnica que permita la detección de coinfecciones por *Fasciola* y otros protozoos y helmintos (Mas-Coma *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.6.-TRATAMIENTO**

Se han utilizado muchos medicamentos para el tratamiento de la fascioliasis humana. La emetina y derivados como la dehidroemetina, han sido utilizados ampliamente y continúan siéndolo a día de hoy, administrados intramuscular o subcutáneamente a dosis de 1-10 mg/Kg al día durante 10 días. Sin embargo, el uso de la emetina se abandonó progresivamente debido a sus efectos tóxicos que implicaban al corazón, hígado y tracto digestivo (Mas-Coma *et al.*, 2014). Lo mismo ocurrió con la dehidroemetina a pesar de ser mejor tolerada. Este medicamento, a dosis normal de 1 mg/kg diario durante un período de 10-14 días, fue aun así considerado el medicamento de elección hace unas pocas décadas (Esteban. *et al.*, 1998). La Cloroquina también fue utilizada como tratamiento para la infección por *F. hepatica*. Aunque no se han visto efectos sobre los trematodos, el tratamiento con este derivado de la aminoquinolina mejora los síntomas dramáticamente cuando se aplica en la fase aguda. El bitinol, un derivado fenol halogenado, se propuso como medicamento de elección para tratar la infección producida por *F. hepatica* durante las últimas décadas el siglo pasado. Normalmente se aplica a una dosis de 30-50 mg/kg diariamente, dividida en tres dosis orales en días alternos durante 20-30 días. En casos de resistencia al de la fascioliasis con emetina y praziquantel, el nitinol llega a curar a una dosis de 50 mg/kg diariamente durante 10 días alternos o a dosis de 40 mg/kg diariamente durante 14-15 días alternos. En ocasiones, los pacientes requieren un segundo proceso de tratamiento para alcanzar la cura por completo. Los efectos secundarios incluyendo diarrea, anorexia, náuseas, vómitos, prurito, urticaria y dolor abdominal, normalmente son leves (Chen & Mott, 1990; Esteban *et al.*, 1998). El praziquantel es un derivado de la pirazina-isoquinolina la cual fue ampliamente aplicada para el tratamiento de la fascioliasis humana durante los años 1980 y 1990, basándose en el hecho de que es el medicamento de elección para las infecciones humanas por trematodos. Sin embargo, se encontraron resultados conflictivos al inicio de su aplicación en pacientes con fascioliasis, incluyendo muchos fallos del tratamiento aún a dosis elevadas. A día de hoy, generalmente se acepta la idea de que *Fasciola* puede ser el único género de trematodo que prácticamente no presenta respuesta

frente al praziquantel. El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro, el cual ha demostrado ser efectivo en vacas a una dosis simple oral de 15 mg/kg de peso corporal (Min *et al.*, 1983) y en ovejas a una dosis simple comprendida entre 3.8 y 7.5 mg/kg de peso corporal, pero la eficacia del fármaco contra las formas inmaduras del parásito es menor (Johns & Dickenson, 1979). El mebendazol, a una dosis diaria de 4g durante 3 semanas es eficaz contra la infección producida por *F. hepatica* diagnosticada clínicamente y serológicamente en la fase invasiva (Dugernier *et al.*, 1986).

Metronidazol y albendazol son, esporádicamente como el mebendazol, derivados del imidazol que también han sido aplicados para el tratamiento de la fascioliasis humana con más o menos éxito. Pero otro derivado del imidazol como el triclabendazol, comercialmente conocido como Egaten® ha llegado a ser el medicamento de elección para la fascioliasis humana causada por *F. hepatica* y *F. gigantica* en el presente (Savioli *et al.*, 1999). Este medicamento se absorbe mejor si es administrado después de las comidas (Lecaillon *et al.*, 1998). La dosis recomendada son dos regímenes de 10 mg/kg. Se encontraron tasas de cura de 79,2% en la primera ronda y del 100% después de la segunda ronda de tratamiento, en Chile (Apt *et al.*, 1995) y del 79,4% y 93,9%, respectivamente en Egipto (Morshedy *et al.*, 1999). El triclabendazol parece conservar su eficacia a regímenes estándar en zonas de endemia humana después de años (Talaie *et al.*, 2004), aunque se ha observado la necesidad de una tercera dosis en Cuba (Millán *et al.*, 2000).

Desafortunadamente, el riesgo de aparición de la resistencia al triclabendazol, no puede dejarse de lado teniendo en cuenta el uso veterinario del triclabendazol para el tratamiento del ganado en áreas endémicas desde hace tiempo, la tradición de los autotratamientos humanos con Fasinex® (nombre comercial del triclabendazol), debido a la elevada disponibilidad de este medicamento, y la aparición de la resistencia al triclabendazol en animales en diferentes países. La resistencia al triclabendazol fue descrita por primera vez en Australia, después en países europeos como Irlanda, Escocia, Países bajos y España (Mas-Coma *et al.*, 2007). Muy recientemente también se ha encontrado en el sur de Brasil (Oliveira *et al.*, 2008) y Argentina (Olaechea *et al.*, 2011), y también en el nuevo mundo. Hasta ese momento, la resistencia al triclabendazol solo ha afectado al ganado en áreas de endemia animal, pero ha sido también descrita (Ortiz *et al.*, 2013) en áreas de alta endemia humana como el valle Andino de Cajamarca, Perú (González *et al.*, 2011). El triclabendazol es usado de forma efectiva en medicina veterinaria tanto contra las formas adultas como contra las inmaduras de *F. hepatica*. En estudios experimentales con ovejas, se observó que

dosis de 2.5-5.0 mg/kg de peso corporal elimina casi todos los parásitos (98.1-100%) 12 semanas después de la infección (Boray *et al.*, 1983; Turner *et al.*, 1984). Una elevada dosis de 10 mg/kg de peso corporal alcanza reducciones del 93-98% de los parásitos, una semana después de la infección (Boray *et al.*, 1983). Este fármaco aún no está registrado para su uso en humanos (Chen & Mott, 1990). La resistencia a los fármacos por parte de *F. hepatica* ya ha sido reportada, afectando la eficacia de los fármacos contra los estados inmaduros del parásito. La combinación de fármacos ha sido testada recientemente y se ha demostrado que su acción sinérgica incrementa la eficacia contra las formas inmaduras, eliminando formas resistentes y que a su vez podrían también reducir el desarrollo de esa resistencia (Boray,1997).

### **2.2.1.7.- PROFILAXIS INDIVIDUAL Y CONTROL GENERAL**

La prevención de la fascioliasis humana puede lograrse simplemente con el control estricto del consumo de berros y otras plantas acuáticas de consumo humano, a las que puedan adherirse las metacercarias, especialmente en zonas endémicas. Desafortunadamente, se ha demostrado que, el permanganato de potasio, el cual había sido sugerido como la herramienta preventiva más efectiva para matar las metacercarias adheridas a hojas y vegetales utilizados en ensaladas, no es efectivo contra la viabilidad de la metacercaria, aún a dosis elevadas (Ashrafi *et al.*, 2006). Como medidas de control, son necesarios estudios previos de epidemiología que provean de recomendaciones generales sobre el tiempo adecuado de tratamiento con fármacos efectivos para así lograr el control económico y mejorar la información a la comunidad de ganaderos. Los pronósticos de los brotes pueden estar basados en los datos climatológicos y en modelos epidemiológicos. La eficiencia en el control de la fascioliasis depende de la correcta aplicación e integración de:

- A) Reducción de la carga parasitaria de los hospedadores animales y contaminación del pasto mediante estrategias regulares del uso de fármacos (tratamiento preventivo en períodos del año apropiados de acuerdo con las diferentes regiones).
- B) Reducción del número de caracoles física, química o biológicamente.
- C) Reducción del riesgo de infección mediante prácticas administrativas correctas en las granjas (sistema rotacional de potreros infectados y no infectados, combinado con un tratamiento efectivo) (Boray *et al.*, 1983; Mas-Coma & Bargues,1997).

Debe tenerse en cuenta la posibilidad de infección humana en áreas urbanas. Gracias al transporte de vegetales (tanto acuáticos como terrestres) desde zonas rurales endémicas hasta las ciudades, las plantas que poseen metacercarias adheridas pueden ser vendidas de forma incontrolada en los mercados de la ciudad, aumentando así la infección urbana (Mas-Coma, 2004). La educación siempre debe ser incluida dentro de las medidas generales de control para ser aplicadas en áreas de endemia humana, principalmente para dar a conocer a los habitantes las fuentes de infección. La comunidad debe ser apropiadamente informada sobre la enfermedad, su patogenicidad, su transmisión y dónde acudir en caso de que aparezcan síntomas (Mas-Coma *et al.*, 2014a). Debido a la similitud entre los ciclos biológicos, las medidas de prevención y control siguen los mismos patrones tanto para *F. hepatica* como para *F. gigantica*. Sin embargo, las peculiaridades de *F. gigantica* deben ser consideradas. Así pues, en áreas enzoóticas de *F. gigantica*, la contracción de la infección por animales y la contaminación del área con huevos emitidos por estos animales con las heces tienen lugar cuando los animales van a beber, en vez de cuando los animales se encuentran en tierras de pasto como en el caso de *F. hepatica*. De acuerdo con esto, evitando que los animales beban de las orillas pantanosas de los ríos y de los cuerpos de agua ricos en vegetación, podría reducirse considerablemente la oportunidad de infección (Mas-Coma & Bargues, 1997). El control de los moluscos hospedadores intermediarios, desafortunadamente no recibe la atención requerida por parte de los funcionarios de salud pública, pero el control de los moluscos vectores es necesario para eliminar definitivamente la transmisión (Chen & Mott, 1990). Se deben aplicar métodos agrícolas intensivos para reducir los hábitats adecuados para los caracoles. Además de los métodos físicos, hay estrategias de control disponibles que consisten en el uso de molusquicidas químicos, molusquicidas naturales de origen vegetal, control biológico (incluyendo depredadores, competidores, el efecto señuelo y otros fenómenos asociados como la castración parasítica y el antagonismo interespecífico entre trematodos y patógenos), manipulación genética y control mediante ingeniería (Malek, 1985; Combes & Cheng, 1986).

#### **2.2.1.8.- CASOS REPORTADOS**

Los casos de fascioliasis reportados en viajeros incluyen (i) pacientes viajando de una parte del país a otra parte del mismo país, como en Perú, Bolivia y Argentina, (ii) pacientes viajando a un país vecino, como en Europa y Norte América; y (iii) pacientes

viajando desde un continente a otro. Es importante resaltar que en varios casos el origen de los viajeros son países en los cuales las áreas de endemia humana no han sido nunca descritas ni tampoco se han reportado tasas elevadas de infección en humanos, a veces incluso países en los que no hay datos sobre la infección humana en la literatura. Son diferentes los tipos de viajeros que se pueden ver involucrados en los casos de infección humana reportados, desde viajeros de negocios, turistas, inmigrantes, emigrantes, trabajadores expatriados y personal militar hasta misioneros religiosos y refugiados. Oceanía es el único continente donde hasta la fecha no se ha publicado ningún informe de este tipo (Ashrafi *et al.*, 2014).

Europa es el continente donde se han reportado más casos importados. En Francia, la fascioliasis importada ya fue reportada en la primera mitad del siglo pasado, cuando un soldado francés regresó de Thessaloniki, Grecia y fue diagnosticado por detección de huevos en muestras de heces (Senevet, 1920). Del mismo modo, un oficial militar fue diagnosticado de forma similar después de estar 4 años en Argelia (Delanoe, 1929). También, un hombre somalí se presentó después de 20 días de síntomas y se comprobó que estaba infectado por *Fasciola* y *S. mansoni* después de encontrar huevos de los dos trematodos en sus heces (Heckenroth, 1932) y después de estar 15 años en Marruecos, una mujer francesa fue diagnosticada y tratada en Francia (Bürgi, 1936).

Un cuadro clínico bastante impactante fue descrito en un hombre belga diagnosticado en Francia. Presentaba manifestaciones neurológicas y oculares incluidos fuertes dolores en las extremidades inferiores, anosmia, ageusia y amaurosis que apareció en la fase crónica después de muchos años, este cuadro fue acompañado de fiebre, eosinofilia y manifestaciones cutáneas y pulmonares. La enfermedad se mantuvo durante dos años y medio a pesar de repetir el tratamiento con entobex, emetina y cloroquina (Becquert & Delassus, 1961). Este caso ilustra como la fascioliasis puede dejar atrás a los pacientes discapacitados, incluyendo fuertes secuelas como dolor en las extremidades inferiores, disgeusia parcial y anosmia, así como también ceguera unilateral (Mas-Coma *et al.*, 2014b). Un cuadro clínico aún más complicado incluyó manifestaciones psiquiátricas y neurológicas, presentadas por una mujer de Camerún. Los primeros síntomas eran ataque de ansiedad y nerviosismo con fiebre y delirios. Tres semanas después de ser trasladada a París, esta paciente mostró amplios síntomas de confusión, ataques de delirio, anemia, hepatomegalia y esplenomegalia. Se le diagnosticó una coinfección con otras cuatro especies de helmintos. La infección por *F. gigantica* subyacente a la neurológica y persistente intensos desórdenes neuropsíquicos podrían establecerse solo después

de 4 meses y medio. Su recuperación fue total después de tres tratamientos con dehidroemetina junto con entobex, nivaquina y prednisone (Paraf *et al.*, 1968).

En África, se reportaron muchos casos en países de Magreb, donde se distinguieron tres situaciones: (i) epidemias en grupos de gente de Europa, (ii) casos aislados en europeos, y (iii) casos aislados de habitantes autóctonos (Hazoug-Boehm *et al.*, 1979). Un caso interesante fue el de un soldado británico que se infectó en Egipto. La infección avanzó muy rápido, solo estuvo 4 meses en Egipto, fue admitido en el hospital y 6 semanas después murió. En la autopsia se encontraron muchos especímenes de *Fasciola* (Chester, 1928).

### **2.2.2.- EL PROBLEMA DE LA EXPANSIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL DE *FASCIOLA HEPATICA***

A pesar de las restricciones debidas a los cambios en el clima o a la actividad humana que existen en las fases del ciclo biológico, *F. hepatica* se ha expandido con éxito desde la zona geográfica original del oriente próximo, hasta llegar a colonizar los cinco continentes (Mas-Coma *et al.*, 2009a). En la actualidad, la fascioliasis por *F. hepatica* es la enfermedad de origen vectorial que presenta la más amplia distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal conocida (Mas-Coma & Bargues, 2003).

Con los animales domésticos se transportaron muchos parasitismos, zoonosis entre las que se incluyen la fascioliasis y un largo etc. El caso de *Fasciola hepatica* y su molusco vector *Galba truncatula* es bien significativo (Fernández, 2007). Cuando el grupo de parasitólogos españoles del equipo del Profesor Mas-Coma, estudiaron el foco de fascioliasis del Altiplano Boliviano, encontraron que las fasciolas que infectan al hombre y a los animales en los márgenes del Lago Titicaca y su molusco vector eran molecularmente iguales a las que se encontraban en España (Mas-Coma *et al.*, 2001). El transporte de las fasciolas, en los hígados de las ovejas llevadas a América, es bastante comprensible, sin embargo, el de un molusco anfibio, europeo, débil como es *Galba truncatula* resulta más difícil de comprender. Posiblemente fueron transportados con el barro que quedó en las patas de los animales, entrando en estivación durante el transporte en barco. *Fasciola* encontró en América, como en Australia más tarde, otros moluscos sustitutos de su *Galba truncatula* eurasiática, convirtiéndose por tanto, en un invasor en toda regla (Fernández, 2007).

### **2.2.2.1.- EXPANSIÓN PASIVA DE ESPECIES VECTORAS**

La expansión pasiva de especies vectoras de moluscos puede darse, por ejemplo, a través de las aves migratorias con el barro que puede quedar entre las patas de éstas y el cual puede contener clusters de huevos de los moluscos vectores de fascioliasis. De modo que, una vez en el lugar de destino, estas aves depositan esos huevos en un lugar distinto del que provenían; dándole la posibilidad al molusco vector de reproducirse y en consecuencia colonizar una nueva zona. También puede ser que con la importación/exportación del ganado los clusters de huevos de los moluscos vectores o ejemplares de estos mismos queden adheridos en las pezuñas o patas del ganado, como ya se ha dicho en el punto anterior, y una vez en su nuevo destino, estos animales expandan pasivamente los moluscos en los ríos donde vayan a beber o en las zonas de pasto donde se alimenten. Aunque también se tendría que tener en cuenta la posibilidad del transporte pasivo de algunas especies vectoras de molusco con las plantas de acuario procedentes de ambientes tropicales que se venden en distintas tiendas, ya que en éstas pueden quedar también adheridos clusters de huevos de las especies de molusco más comúnmente distribuidas en los puntos de venta de artículos para acuarios.

### **2.2.2.2.- EXPANSIÓN DEL PARÁSITO CON ESPECIES RESERVORIAS DE GANADO**

Es conocida la reciente propagación de la fascioliasis desde su origen en el cercano este eurasiático, hasta el resto del mundo, la cual está indudablemente relacionada con la actividad humana. Esto incluye la exportación/importación que implica (i) inicialmente, ovejas y cabras de tamaño mediano, (ii) secundariamente, varias especies de herbívoros de tamaño grande, siendo todos ellos buenos hospedadores definitivos de los trematodos del hígado, incluyendo vacas, bueyes, yaks, caballos, burros y mulas, los cuales fueron utilizados para el transporte de mercancías por tierra en distancias cortas y largas (aún entre diferentes países), (iii) más tarde, las colonizaciones de otros continentes por antiguos europeos, junto con la introducción de ganado europeo y équidos, y también la adaptación a nuevas especies de hospedador que también fueron utilizados para el transporte, como los camélidos Andinos (principalmente llamas), y (iv) más recientemente, para el progresivo comercio

ganadero, así como también (v) las diferentes introducciones del vector lymnaeido (Mas-Coma *et al.*, 2003).

La domesticación de los herbívoros salvajes empezó hace alrededor de 10.000 años en los albores del Neolítico en la región conocida como Creciente Fértil, antes fértil, ahora parcialmente desierto, área del cercano y medio este que era una región agrícola que se extendía desde el Levante (tierras bordeando las costas del este de los mares Mediterráneo y Egeo) hacia el este incluyendo Israel, Jordania, Líbano y el oeste de Siria, el sureste de Turquía y a lo largo de los ríos Tigris y Eufrates, en Irak y los flancos occidentales de Irán (MacHugh & Bradley, 2001). El período del Neolítico fue la época donde se dieron los principales cambios en la vida del hombre. Las cabras fueron los primeros herbívoros en ser domesticados. La domesticación de ovejas y cabras jugó un papel importante en el fenómeno de neolitización que se dió en la prehistoria en un clima óptimo, dando lugar a un estilo de vida sedentario (Pedrosa *et al.*, 2005). La cultura del Neolítico se expandió fuera del cercano este en los Balcanes, Grecia y en el noreste de Europa Central. Adaptándose a los animales recién domesticados en el Creciente Fértil, *F. hepatica* dió un paso crucial que le permitiría expandirse por esa región, para colonizar casi todo el mundo. Tal propagación tuvo lugar hacia el oeste en Europa, hacia el este en Asia y hacia el sur en África, con características específicas en cada uno de esos continentes. *Galba truncatula* debía haber estado presente en el Creciente Fértil y de hecho el haplotipo ITS-2 se encuentra en Irán (Ashrafi *et al.*, 2007) (Bargues *et al.*, 2002), y a su vez se encuentra ampliamente distribuída en Europa (Portugal, España, Francia y Holanda) (Bargues *et al.*, 2001). La presencia de *G. truncatula* a través de Europa (Glöer & Meier-Brook, 1998) constituye el principal factor para entender la exitosa colonización de este continente por parte del parásito. Las evidencias sugieren que las ovejas, cabras y vacas juegan todos ellos un papel importante en la expansión. Estudios moleculares recientes en las especies de ganado indican que se siguieron dos rutas principales desde el cercano este, una ampliamente dispersada a través de Europa central, alcanzando los territorios situados más al norte y otra ruta al sur, que más probablemente utilizaba las rutas marinas a través del mar Mediterráneo. Los hallazgos de huevos de *Fasciola* en coprolitos humanos colectados en lugares arqueológicos en Francia, Holanda, Dinamarca, Alemania, Austria, Polonia y Suiza (Mas-Coma, 2005) datan de la Edad de piedra, el final del período Mesolítico (hace 5.000-5100 años), Neolítico, Edad de bronce, período Galo-Romano y edades medias (Bouchet *et al.*, 2003) apoyando la colonización europea por *F. hepatica* en tiempos prehistóricos. La explicación más plausible es el extensivo uso de una ruta Mediterránea por el mar o a lo

largo de las regiones costeras del Mediterráneo en los siglos XI y XII, sin olvidar el intercambio entre Iberia y Magreb durante el período musulmán (Pereira *et al.*, 2006). Generalmente se acepta la idea de que el primer paso hacia la domesticación del ganado ocurrió en el suroeste de Asia y que ese ganado ya domesticado, entró en Europa con pastores que migraban desde esta región (Caramelli, 2006).

La presente distribución de *F. hepatica* y *G. truncatula* en África se puede dividir en tres regiones distintas:

- La región noroeste que incluye países como Marruecos, Algeria y Túnez, caracterizada por unas temperaturas estacionalmente suaves que permiten el desarrollo de *G. truncatula* (Brown, 1994) (Groumghar *et al.*, 2004) (Khallaayoune *et al.*, 1991).
- Las grandes regiones del oeste sub-Sahariano y África central, caracterizadas por la presencia de una única especie de lymnaeido, *R. natalensis* (Brown, 1994), un molusco distribuido a través de África excepto en la región costera del este africano y Namibia (Van Damme, 1984). Este molusco es resistente a la infección por *F. hepatica* (Cruiz-Reyes & Malek, 1987), lo que podría no permitir la exitosa introducción y colonización de esta especie de trematodo del hígado.
- África oriental desde su extrema costa mediterránea norteña hasta el sureste de África, incluye un área de distribución en Egipto, otra grande pero aislada área en Etiopía, otra al sur incluyendo Kenia y Tanzania y finalmente una gran área en Sudáfrica (Brown, 1994).

Esta distribución dispersa sugiere, en primer lugar, que tanto *F. hepatica* como *G. truncatula* fueron introducidas desde el sureste de Asia, muy probablemente juntas, con ovejas y cabras. La ausencia de *F. hepatica* en Egipto más tarde, como se ha deducido de estudios de final del siglo XVIII, puede ser explicada por su desaparición debido al incremento de temperaturas y sequía (Van Damme, 1984). La reaparición tanto del fasciólido como del lymnaeido hoy en día en Egipto, puede ser explicada por una reciente introducción (El-Azazy & Veen, 1983; Soliman, 1998) que tuvo éxito gracias a las nuevas condiciones ambientales adecuadas derivadas de los sistemas de riego artificial después de la construcción de la presa de Aswan. La expansión de *F. hepatica* a Oceanía y América estuvo marcada por las colonizaciones humanas. El éxito de esas colonizaciones fue debido por un lado a la adaptación de *F. hepatica* a las diferentes especies de lymnaeidos autóctonos de esos continentes, como *L. tomentosa* en Australia y Nueva Zelanda (Boray, 1969, 1982) o miembros del grupo *Galba/Fossaria* en Latino América (Bargues *et al.*, 2007); así como también, debido por otro lado, a la introducción de especies vectoras de lymnaeidos exóticos y

susceptibles, incluyendo *P. collumella* en Australia (Boray, 1978) o ambos *P. columella* y *G. truncatula* en Nueva Zelanda (Boray, 1978) y sudamérica (Malek, 1985; Mas-Coma *et al.*, 2001, 2005, 2007; Mas-Coma & Bargues, 2003). Ovejas y vacas eran las especies de ganado más transportadas por los humanos colonizadores, aunque las cabras también fueron incluidas en los barcos (Hiendleder *et al.*, 1998).

### **2.2.3.3.- EL IMPACTO DEL CAMBIO GLOBAL**

Desafortunadamente, el cambio climático se solapa con otras modificaciones antropogénicas y del ambiente las cuales son incluidas dentro del término “cambio global”. Cambio global se refiere a muchos cambios ambientales llevados a cabo por el ser humano como son los cambios hidrológicos que incluyen la construcción de presas, canales de irrigación, reservorios de agua, los cuales establecen nuevos ambientes adecuados para la supervivencia de los moluscos vectores que transmiten el parásito. (Mas-Coma *et al.*, 2009).

Todos estos cambios debidos a la actividad humana suponen a su vez, cambios en la epidemiología de la enfermedad que resultan preocupantes y dificultan el desarrollo de medidas de control eficaces, obligando de alguna manera a realizar análisis y estudios continuos para una mejor prevención de la enfermedad y puesta en marcha de medidas de control que se adecuen a los cambios que se van dando.

### **2.2.3.4.- EL IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO Y DEL CALENTAMIENTO GLOBAL**

Los factores climáticos son decisivos en la transmisión de la fascioliasis. La incidencia de infección de los hospedadores definitivos ha sido relacionada con la temperatura del aire, las precipitaciones y/o la evapotranspiración. Estos factores afectan a la dinámica poblacional del molusco que actúa como hospedador intermediario y a la población del parásito a nivel tanto de las fases larvarias de vida libre de huevos y metacercarias como a los estados larvarios del parásito que se desarrollan en el interior del molusco, como son el esporocisto, la redia y la cercaria (Mas-Coma *et al.*, 1999c). El cambio climático influye más concretamente sobre la emisión cercariana, ya que la producción de cercarias puede verse favorecida a elevadas temperaturas, como una consecuencia simple del incremento de la actividad

metabólica del hospedador y de la energía disponible para el parásito. La tasa de los procesos fisiológicos aumenta significativamente con el incremento de la temperatura en el caso de animales ectotermos (Schmidt-Nielsen, 1997) como los moluscos lymnaeidos que actúan como hospedadores intermediarios de la fascioliasis. La emisión cercariana de los moluscos es la llave del éxito de la transmisión en el caso de los trematodos (Erasmus 1972; Galaktionov & Dobrovolskij, 2013). En trematodos sin un límite determinado en el número de cercarias emitidas, la incrementada tasa de emisión cercariana puede prolongarse bastante tiempo siempre y cuando el molusco proporcione recursos suficientes para el parásito. En *Fasciola*, más o menos larga, la producción finita de cercarias está relacionada con el número de generaciones de redias cercariógenas e independientemente de las diferentes especies vectoras de lymnaeidos implicadas (Dinnik & Dinnik, 1956, 1964; Rondelaud & Barthe, 1987; Rondelaud, 1994; Rondelaud *et al.*, 2004). Generalmente, la supervivencia de las cercarias disminuye con el aumento de la temperatura (Evans, 1985; McCarthy, 1999) (Mouritsen, 2002) como resultado directo de la mayor actividad de la cercaria a elevadas temperaturas, acelerando así, la depleción de sus reservas energéticas (Pechenik & Fried, 1995; McCarthy, 1999). A su vez, la infectividad de las cercarias generalmente aumenta con la temperatura antes de que éstas mueran a elevadas temperaturas (Evans, 1985; McCarthy, 1999). Sin embargo, la eficiencia de las cercarias en la transmisión, no se ve afectada negativamente por el incremento de la temperatura, cuando supervivencia e infectividad cercariana se combinan (Evans, 1985; McCarthy, 1999). La eficiencia en la transmisión se mantiene aproximadamente dentro del rango comprendido entre 15-30°C (Evans, 1985; McCarthy, 1999). Bajo estas condiciones un aumento mediado por la temperatura de la emisión cercariana, conduciría a mayores niveles de infección en los siguientes hospedadores de los trematodos, aún cuando la supervivencia de las cercarias es menor a elevadas temperaturas (Poulin, 2006).

La variación estacional principalmente de las precipitaciones y la temperatura aumenta la diferente estacionalidad de la fascioliasis dependiendo de las áreas. En Europa, la transmisión de la enfermedad es típicamente biestacional debido a los períodos de actividad de los lymnaeidos vectores en primavera y otoño. En el Altiplano Boliviano, sin embargo, la transmisión se da a lo largo del año ya que, las poblaciones del lymaeido vector se encuentran siempre presentes debido a los permanentes cuerpos de agua donde habitan los moluscos, en vez de ser temporales, debido a las elevadas tasa de evapotranspiración a muy elevada altitud (Mas-Coma *et al.*, 1999c).

En otras áreas, la transmisión parece ser monoestacional, debido a la existencia de un solo período anual con agua disponible y otro período de sequedad que cubre el resto del año. Las modificaciones del ambiente también pueden modificar la estacionalidad de la enfermedad en un área endémica dada. En la provincia del Punjab, en Pakistán, se ha descrito recientemente un complejo modelo de transmisión, incluyendo biestacionalidad con un pico relacionado con las precipitaciones y otro pico relacionado con la irrigación llevada a cabo por el humano. La provincia del Punjab, es la primera zona endémica donde la emergencia de la infección humana ha sido correlacionada con el incremento del riesgo de transmisión de la fascioliasis debido al impacto del cambio climático a lo largo de un período de 20 años mediante un análisis de índices de previsión y datos de teledetección (Afshan *et al.*, 2014).

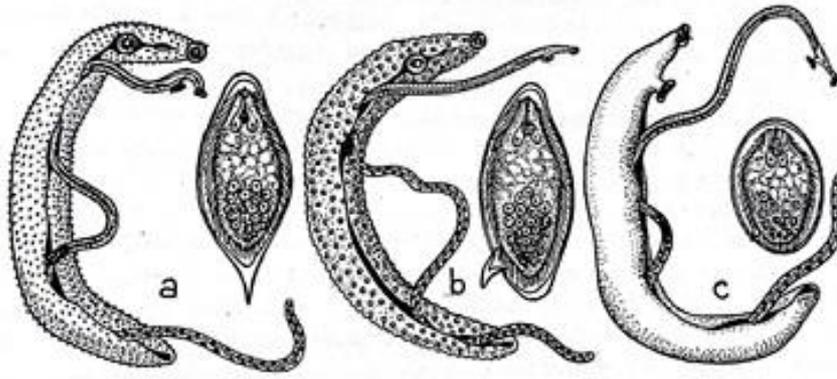
La fuerte dependencia de la fascioliasis frente a los factores climáticos indica que el cambio climático podría tener una marcada influencia en la futura evolución de esta enfermedad. En áreas de elevada altitud de hiperendemia humana y animal, se espera que el calentamiento global y el fenómeno de El Niño tengan consecuencias epidemiológicas (Rosenzweig *et al.*, 2007).

La tendencia al calentamiento también mejorará directamente la transmisión del trematodo (Fuentes *et al.*, 1999). De forma sorprendente, se da una elevada transmisión de la fascioliasis incluso cuando la temperatura media ambiental está por debajo del límite mínimo de temperatura de 10°C, en el cual se da el desarrollo de las fases larvianas del parásito a lo largo del año (Mas-Coma & Bargues, 1997).

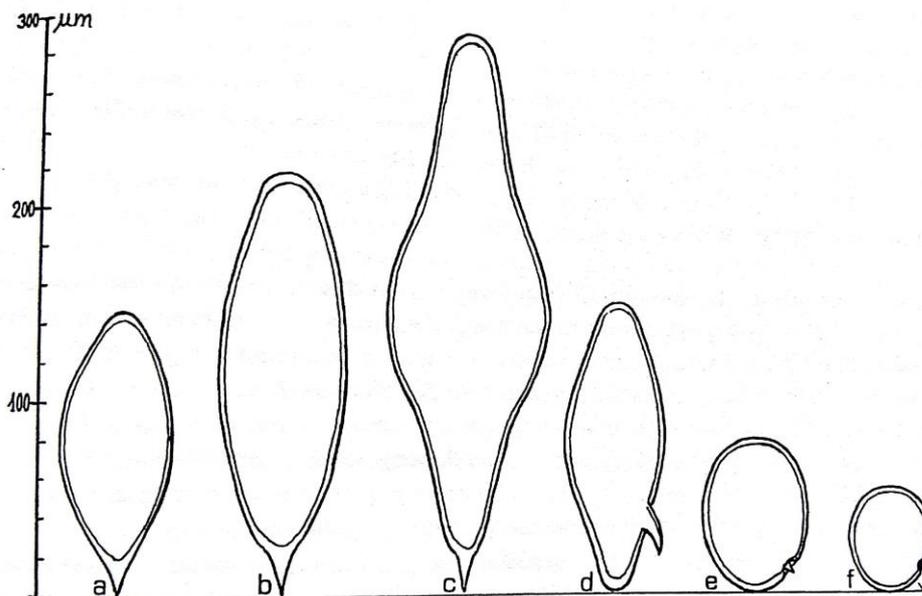
Un futuro pequeño incremento de la temperatura puede conducir a elevadas tasas de transmisión e infección, y adicionalmente modificar las áreas de bajo, moderado y alto riesgo actuales que se distinguen dentro del área de hiperendemia (Fuentes *et al.*, 1999; 2001). Un incremento de las lluvias puede también ampliar la ventana del riesgo de contaminación vinculada al período húmedo comprendido entre noviembre y abril (Fuentes *et al.*, 1999). Las crecientes sequías e inundaciones asociadas al fenómeno de El Niño (Githeko *et al.*, 2000; Magrin *et al.*, 2007) pueden influir en la epidemiología de la fascioliasis. La sequía puede modificar la fragmentación espacial y típica de los focos de dicha enfermedad, mientras que las inundaciones pueden facilitar la supervivencia de los lymnaeidos y expandir geográficamente sus poblaciones. Como consecuencia, la fascioliasis se añade en la lista de enfermedades en áreas específicas mostrando una fuerte evidencia epidemiológica del aumento del riesgo asociado a las anomalías del clima relacionadas con el ciclo del fenómeno de El Niño (Kovats *et al.*, 2003; Magrin *et al.*, 2007).

La situación epidemiológica actual debida al solapamiento de ambos agentes causales *F. hepatica* y *F. gigantica* (Periago *et al.*, 2008), puede verse alterada de forma pronunciada por el cambio climático, debido tanto a las diferentes características de desarrollo de sus respectivos estados larvarios (límite mínimo de temperatura de 10°C para *F. hepatica* y 16°C para *F. gigantica* (Malone *et al.*, 1998; Yilma & Malone, 1998), como a los distintos requerimientos ecológicos de sus respectivos moluscos lymnaeidos vectores, específicos pequeños *Galba/Fossaria* y grandes *Radix* (Bargues *et al.*, 2001a).

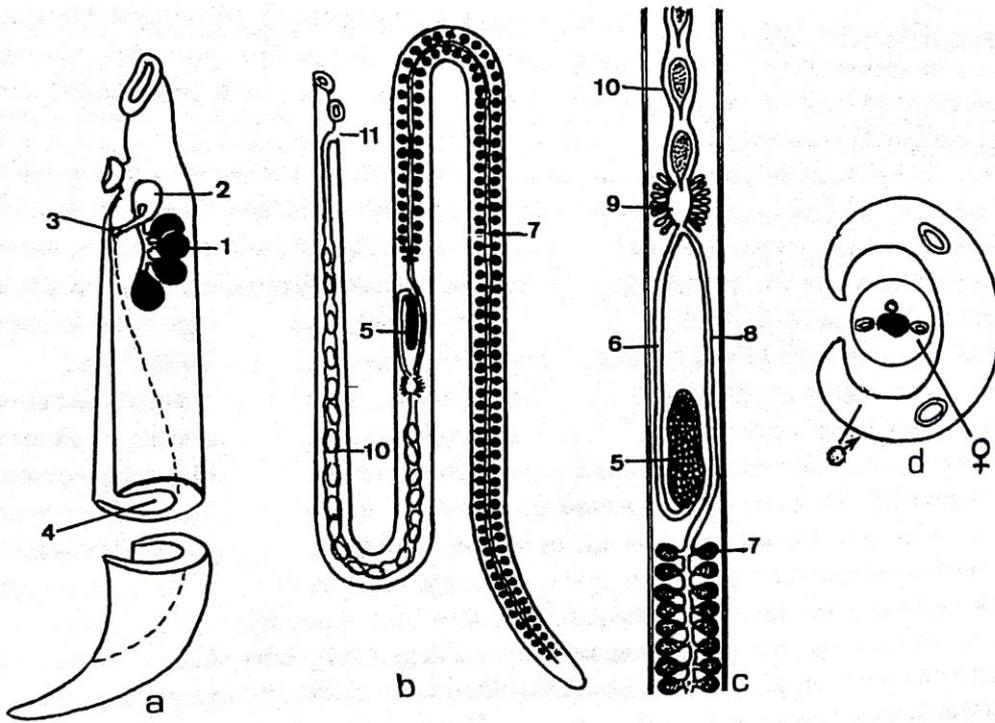
Los moluscos lymnaeidos que transmiten *F. hepatica* son especies que muestran una tendencia marcada a ser anfibios, más adaptados a condiciones frías, los cuales suelen habitar cuerpos de agua pequeños o muy pequeños, dependiendo estas colecciones de agua de la irrigación de los campos de cultivo o de la estación de lluvias. Los lymnaeidos responsables de la transmisión de *F. gigantica* son especies más adaptadas a condiciones cálidas y prefieren cuerpos de agua más grandes y profundos ricos en vegetación acuática, como son amplios canales de irrigación y suministro de agua. Así, los focos de transmisión de ambos fasciólidos normalmente son diferentes y aparecen de forma separada incluso en la misma localidad endémica, estando la fascioliasis por *F. hepatica* más relacionada con la estacionalidad que la fascioliasis causada por *F. gigantica* (Mas-Coma, 2004).



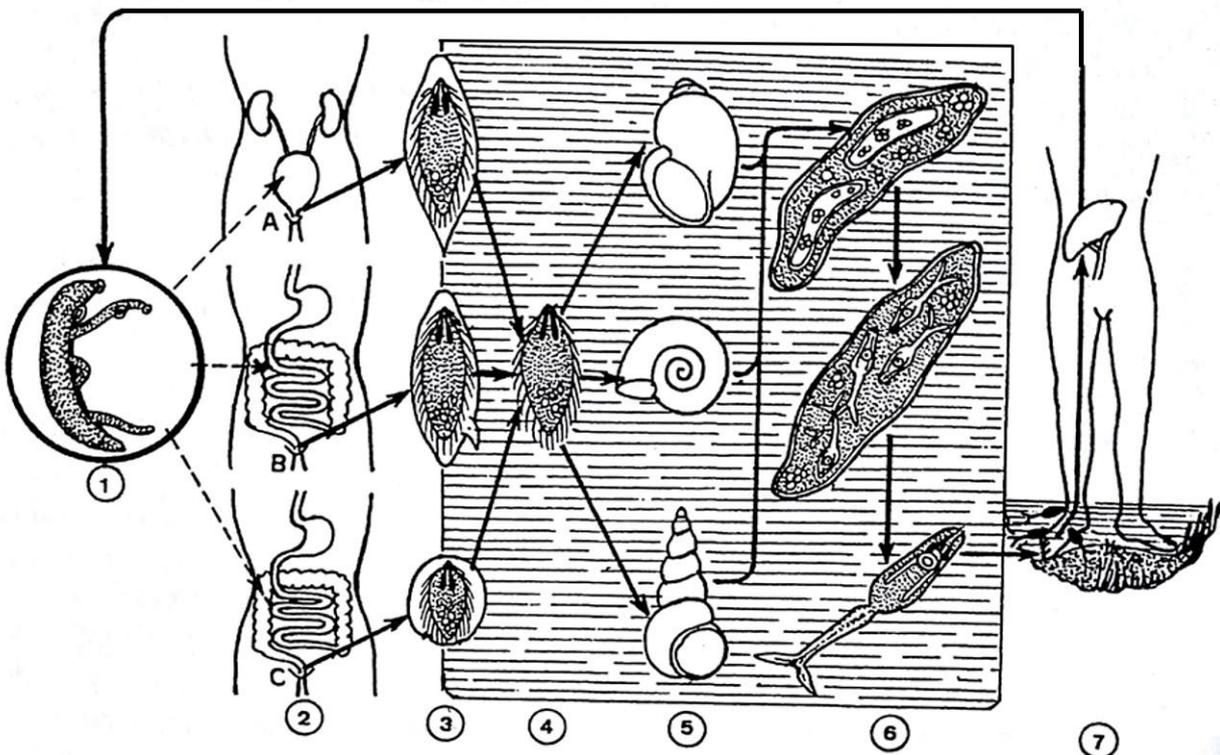
**Fig. 1.- Morfología de las tres especies principales del género *Schistosoma* que parasitan al ser humano y de sus huevos: (a) *S. haematobium*, con cutícula espinosa en la región dorsal del macho y huevo con espolón polar; (b) *S. mansoni*, con la cutícula del macho sembrada de tubérculos espinosos y huevos con un espolón lateral cerca de su polo posterior y (c) *S. japonicum*, con la cutícula del macho lisa y el acetábulo pedunculado en ambos sexos y huevos ovoides con un espolón rudimentario. Fuente: Jaime Gállego Berenguer, 2006 en: *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*.**



**Fig. 2.- Huevos de las especies de *Schistosoma* que parasitan al ser humano, representados sólo por sus cubiertas y a la misma escala: (a) *S. haematobium*; (b) *S. intercalatum*; (c) *S. bovis*; (d) *S. mansoni*; (e) *S. japonicum* y (f) *S. mekongi*. Fuente: Jaime Gállego Berenguer, 2006 en: *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*.**

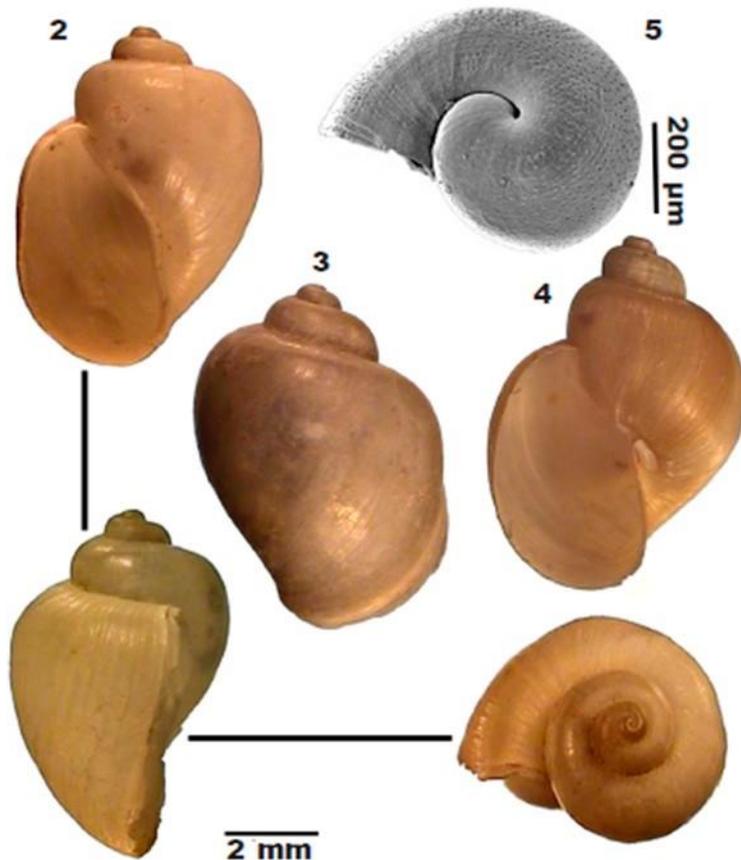


**Fig. 3.- Morfología general de los digénidos del género *Schistosoma*:** (a) Sección transversal del macho que permite apreciar el canal ginecóforo (4) y los testículos, (1) vesícula seminal (2) y la situación del gonoporo en el comienzo del canal ginecóforo (3); (b) y (c) Hembra: ovario, (5) oviducto, (6) glándula vitelógena, (7) viteloducto, (8) ootipo (9) y útero (10); (d) Sección transversal del macho y la hembra en cópula. Fuente: Jaime Gállego Berenguer, 2006 en: *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*.

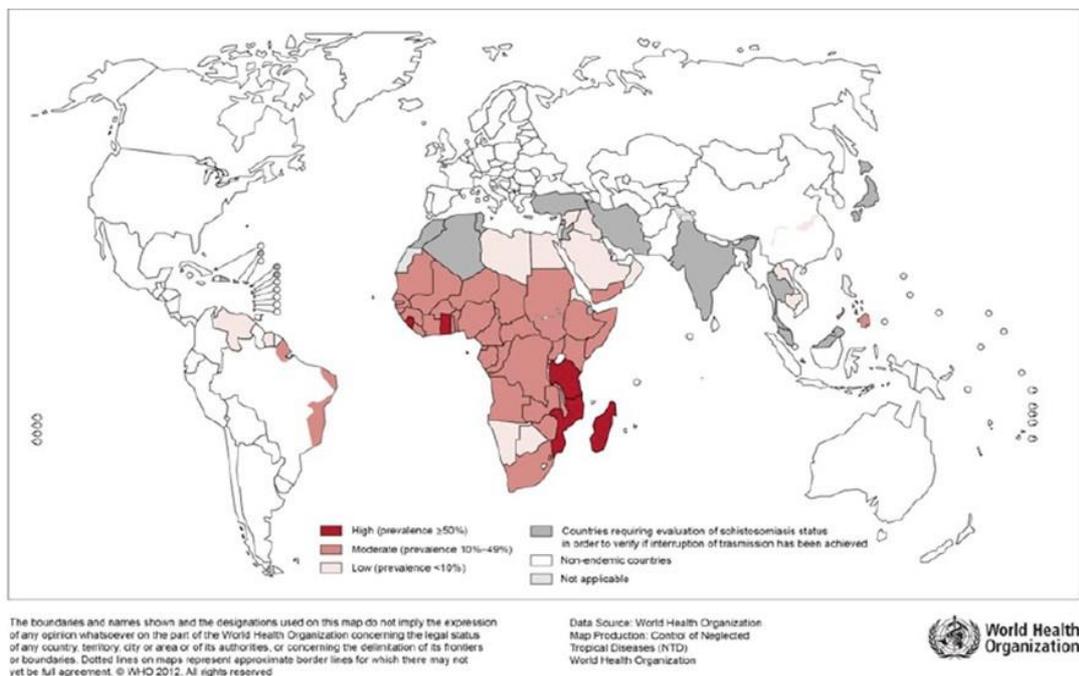


**Fig. 4.- Ciclo biológico general de las especies del género *Schistosoma* parásitas del ser humano:** (A) *S. haematobium*; (B) *S. mansoni* y (C) *S. japonicum*; (1) Cópula entre macho y hembra; (2) Emuntorios urinario o fecal por los que se eliminan los huevos; (3) y (4) Miracidio libre en el agua; (5)

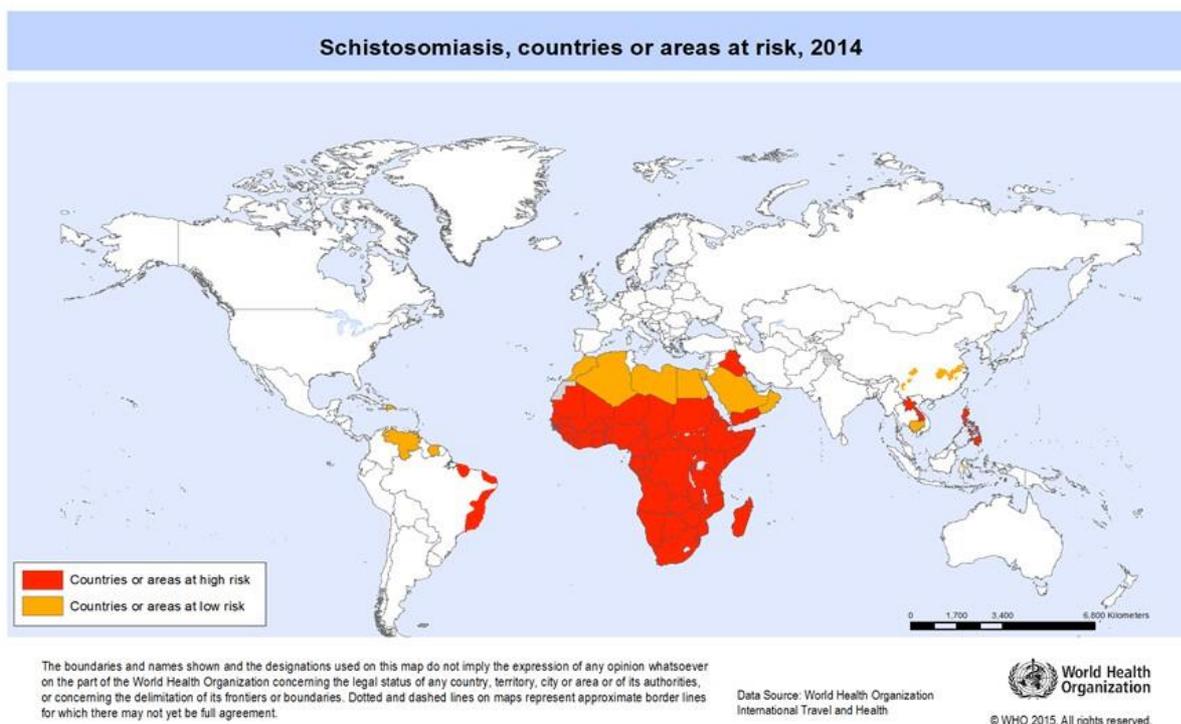
Moluscos hospedadores intermediarios de las diferentes especies de *Schistosoma* (superior *Bulinus*, central *Biomphalaria* e inferior *Oncomelania*); **(6)** Evolución en el molusco (esporocisto con esporocistos hijos, esporocisto hijo con furcocercarias y furcocercaria) y **(7)** Penetración de las furcocercarias por vía cutánea y paso de los esquistosómlos a los vasos del sistema porta, donde maduran a machos y hembras adultos. Fuente: Jaime Gállego Berenguer, 2006 en: *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*.



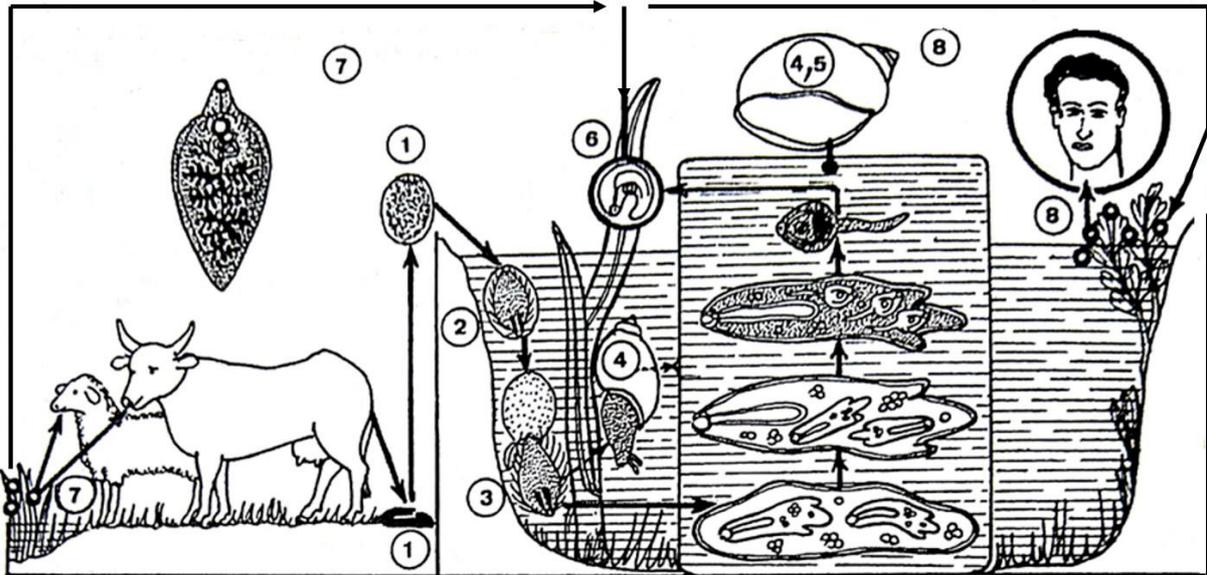
**Fig. 5.- Conchas de *B. truncatus* procedentes de las dos nuevas localizaciones para esta especie de planórbido en España: (2) y (3) Laguna de Villena (Alicante); (4) y (5) El Ejido (Almería), con detalle de la microescultura de la protoconcha. Fuente: Martínez-Ortí *et al*, 2015.**



**Fig. 6.- Mapa mundial de la prevalencia de la schistosomiasis.** En tonalidad rojo intenso, prevalencia elevada mayor o igual del 50%; en tonalidad de rojo intermedia, prevalencia moderada entre 10%-49% y en tonalidad roja muy tenue, baja prevalencia, menor del 10%; en gris, aquellos países que requieren ser evaluados frente al estado de la schistosomiasis y en blanco los países no endémicos. Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2012.



**Fig. 7.- Mapa de riesgo de la schistosomiasis.** En color rojo se representan los países o áreas con riesgo elevado de schistosomiasis y en color naranja aquellos países o áreas con bajo riesgo. Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2014.



**Fig. 8.- Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.** Los huevos inmaduros, eliminados junto con las heces de los reservorios ovino y bovino (1), llegan al medio acuático donde maduran (2) y liberan el miracidio (3) que penetra en un molusco pulmonado del género *Lymnaea* (4). Allí (4) y (5) se transforma en esporocisto productor de redias que pueden dar directamente cercarias o una fase intermedia de redias hijas. Las cercarias abandonan el caracol y se enquistan en la vegetación acuática (6), y llegan a sus hospedadores definitivos al ser ingeridas con el pasto (7) o en el caso del hombre al ingerir vegetales silvestres en ensaladas (8) o al beber agua contaminada. Fuente: Jaime Gállego Berenguer, 2006 en: *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*.



**Fig. 9.- Distribución global de la infección por *Fasciola* en humanos.** Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2013.



## **CAPITULO III**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- MOLUSCOS VECTORES

Con el fin de obtener resultados lo más significativos posible en relación con los objetivos planteados y anteriormente enumerados en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, fueron tres las especies de moluscos vectores seleccionadas y cuatro las diferentes áreas en las que se detectó la presencia de ejemplares moluscos que conformaron la base de nuestros estudios.

##### 3.1.1.- LUGARES DE PROSPECCIÓN DE PLANÓRBIDOS

###### ***Bulinus truncatus***

La especie de planórbido *B. truncatus* fue localizada en Andalucía, más concretamente cerca de El Ejido (Almería) (UTM = 30SWF1867; 30 m), una nueva población aislada en una gran excavación artificial en el curso de una rambla procedente de la Sierra de Gádor, a su paso por esa población (Fig. 10). En cuanto a los parámetros del agua donde se encontraban los moluscos, en diciembre de 2014 se obtuvieron los siguientes datos: temperatura: 18°C; pH: 7,1; y conductividad: 1,25 µS.

La razón por la cual escogimos este punto de recolección fue la inesperada infección por schistosomiasis de una familia senegalesa y ciudadana de El Ejido. La infección se detectó en el hospital general de El Ejido. Este hecho despertó nuestro interés junto con la presencia de esta especie en este nuevo enclave, ya que estaríamos frente a una nueva localización para *B. truncatus* urinaria en España. Además, teniendo en cuenta que esta especie de molusco actúa como vector de la schistosomiasis urinaria, estaríamos, por tanto, frente a un posible foco de infección de la enfermedad en cuestión.

Todo el material malacológico de este taxón (códigos: MVHN-071214TP04, El Ejido), así como el resto de malacofauna acompañante encontrada en dicha localidad, se encuentra depositado en el Museu Valencià d'Història Natural (MVHN) de Alginet (Valencia). En la población almeriense, los diez ejemplares medidos presentaban unas dimensiones máximas que oscilaban entre 7,8 y 9,6 mm de longitud y entre 5,1 y 5,9 de anchura, presentando los de mayor talla las siguientes dimensiones: 9,6 x 5,6 mm, 9 x 5,8 mm y 8 x 5,9 mm y los más pequeños: 7,8 x 5,3 mm y 9,1 x 5,1 mm.

### ***Planorbarius metidjensis***

La recolección de ejemplares de *P. metidjensis* se realizó en El vallejo de Polán, Talayuelas, Cuenca (Fig. 11) (UTM=30SXK4707; 923 m). La vegetación presente en el biotopo situada junto al arroyo era típica de ribera, sobre un suelo silíceo (cuarcitas), y envolviéndolo aparecía de forma abundante el pino rodeno (*Pinus pinaster*), que conforma un paisaje de pinada característico en la comarca.

La presencia de los ejemplares moluscos estuvo relacionada con el régimen de lluvias, así como también con la presencia de agua que se mantenía almacenada tras las lluvias en una charca que quedaba en el cauce del arroyo. En 2016 esta charca permaneció seca desde mediados de abril hasta mediados de noviembre, hasta desaparecer la población, pero a finales de este último mes, debido a las lluvias, se volvieron a encontrar ejemplares bastante pequeños recientemente eclosionados.

### **3.1.2.- LUGARES DE PROSPECCIÓN DE LYMNAEIDOS**

En el caso de los Lymnaeidos se tomó la decisión de explorar biotopos distintos, pertenecientes a la Comunidad Valenciana, pero situados en distintas provincias (Fig. 12). Uno de estos biotopos se correspondía con un tramo de la cuenca del río Palancia cerca de la población de Albalat dels Tarongers, perteneciente a la provincia de Valencia, mientras que el otro biotopo se basaba en un conjunto de campos de cultivo de arroz adyacentes a una carretera comarcal situada a nivel del mar, en los alrededores de la población conocida como Chilches, ya en la provincia de Castellón.

La elección del primer enclave nombrado con anterioridad como posible lugar de prospección, se debió a la emergencia de un brote infeccioso de fascioliasis en ganado ovino en el año 2014. Este hecho despertó el interés de nuestro equipo del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por realizar el estudio de dicha zona para tratar de determinar la presencia o ausencia de ejemplares de moluscos lymnaeidos, vectores potenciales de la fascioliasis.

El segundo enclave se exploró, suponiendo una alta probabilidad de la presencia de moluscos lymnaeidos, teniendo en cuenta por un lado que los campos de cultivo de arroz pasan gran parte del tiempo inundados o bastante húmedos y embarrados y por otro lado que a la mayoría de especies de la familia *Lymnaeidae* son anfíbias y que les gusta vivir en el barro húmedo o en cuerpos de agua de poca profundidad y sin corriente. Sabiendo de la presencia de otras especies de moluscos gasterópodos de

agua dulce en este tipo de biotopo, era normal pensar en la posibilidad de que nuestra especie objeto de estudio pudiera estar conviviendo con las mismas. Algunos de los moluscos encontrados en las zonas de recolección pertenecían a las familias *Rumina* y *Helicidae* (moluscos terrestres) y a los géneros *Physa*, *Gyraulus*, *Theba*, también vimos algunos ejemplares de moluscos operculados tipo *Melanoidea* y ejemplares de otras especies de la familia Lymnaeidae, en lo que concierne a moluscos acuáticos. Nos llamó la atención que, en ambos enclaves el género de molusco acuático que más abundaba era *Physa*.

A continuación, se describen más detalladamente los cambios observados a nivel geográfico y ecológico, a lo largo del seguimiento realizado durante un año (desde noviembre de 2014 a noviembre de 2015) de ambos biotopos. Mensualmente, para dicho seguimiento se tuvieron en cuenta algunos aspectos como: presencia/ausencia de agua, precipitaciones, tipo de vegetación presente en la zona, temperatura ambiental y del agua y otros factores abióticos del agua como el pH, conductividad y saturación de oxígeno.

A) Cuenca del río Palancia, Albalat dels Tarongers (Província: Valencia; Comarca: Camp de Morvedre):

Excepto en los meses de noviembre y diciembre de 2014 y julio de 2015, durante el resto de meses del año, la presencia de agua se hizo evidente en mayor o menor grado, siendo la estación primaveral (marzo, abril y mayo) la que mayor cantidad de agua albergó seguida de la otoñal (septiembre y octubre). Se trata de un biotopo que depende únicamente de las oscilaciones de algunos parámetros ambientales o agentes atmosféricos, sobre todo en cuanto a luz, temperatura y precipitaciones se refiere, por lo que el agua presente en los distintos meses procedía del deshielo de la montaña por nevadas anteriores o de las lluvias.

En lo que concierne a la vegetación presente en este ambiente biológico en la época primaveral, la comunidad era evidentemente un herbazal nitrófilo sobre suelos moderadamente frescos. Las especies más abundantes eran: *Poa annua* L., *Lolium perenne* L., *Geranium dissectum* L., *Rumex crispus* L., *Avena sterilis* L., *Erodium malacoides* (L.) L'Hér. Las abundantes, pero en menor proporción: *Bromus diandrus* Roth, *Bromus catharticus* Vahl.; las que se presentaban ocasionalmente: *Stachys ocymastrum* (L.) Briq., *Asphodelus tenuifolius* Cav., *Galactites tomentosa* Moench y ya dentro del agua: *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek.

Excepto en el mes de julio de 2015, en el cual la mayor parte de la vegetación se encontraba seca, durante el resto de meses del año, las especies vegetales nombradas

con anterioridad estuvieron presentes de forma permanente, aunque variando su abundancia y altura.

En nuestra evaluación de la presencia de ejemplares moluscos de la especie *Lymnaea* sp., pudimos esclarecer la presencia de otros moluscos con los que convivía dicha especie pertenecientes a los géneros *Radix*, *Physa*, otros caracoles acuáticos operculados de concha dextrógira y globosa y moluscos del género *Pseudosuccinea*.

La distribución de la especie de molusco de interés no fue uniforme a lo largo del año, ya que, no todos los meses había ejemplares y los meses en que sí los hubo se les encontró en distintas localizaciones dentro de la misma área de muestreo según iba cambiando el nivel del agua. Los moluscos de interés se encontraban en los tallos de la vegetación, justo en la interfaz entre el agua y el aire o bien en las partes medias de los tallos donde aún llegaba la luz del día.

Lo más común era encontrarlos en el limo húmedo o habiendo 2 cm de agua. Teniendo en cuenta esto y el hecho de que en el proceso de adaptación en el laboratorio pasaban más tiempo fuera que dentro del agua y que además solo toleraban de 1 a 2 cm de agua, pudimos suponer que se trataba de una especie más anfibia que acuática.

Se encontraron moluscos vivos en las épocas de verano y otoño, pero fue en el primer mes de verano (junio) y en el último de otoño (noviembre) cuando se observó una mayor densidad poblacional. En junio se concentraban todos los ejemplares en un punto donde no había prácticamente agua y abundaba el barro, mientras que en noviembre la cantidad de agua era considerable en ciertos puntos y los ejemplares se encontraron entre los tallos de la vegetación mayoritariamente.

#### B) Campos de cultivo de arroz, Chilches (Provincia: Castellón; Comarca: Plana Baixa).

Al tratarse de un biotopo antropizado, los cambios observados son debidos en su gran mayoría a la actividad del ser humano, aunque las precipitaciones también puedan influir a veces (Fig. 13). Nos fue de gran ayuda la información aportada por agricultores, ganaderos y vecinos de las poblaciones, acerca de la localización de otros cuerpos de agua donde podría haber más moluscos, las rutas y horarios del pastoreo de ovinos por la zona, las fases del cultivo del arroz, el tipo de productos químicos utilizados para tratar los campos de arroz (herbicidas, plaguicidas y molusquicidas), procedencia del agua de riego, etc. Toda esta información sumada a la adquirida en cada expedición nos fue de gran utilidad para hacernos una idea de algunos aspectos relacionados con la transmisión y epidemiología de la fascioliasis.

De mayo a septiembre los campos de cultivo de arroz permanecieron inundados de forma continua aunque con ciertas fluctuaciones en el nivel del agua, coincidiendo con las diferentes fases de la siembra del arroz. El proceso para el cultivo de este cereal se divide de la siguiente manera:

- Marzo: se ara la tierra para facilitar la circulación del agua y así conseguir un riego más eficaz, eliminar las malas hierbas y a su vez descompactar la tierra para facilitar la siembra.
- Abril: se remueve la tierra para abonar los campos con abono natural a partir de excrementos de animal y con abono de tipo industrial en forma de pequeñas esferas blancas.
- Mayo: se siembra el arroz y se inunda el campo de forma uniforme, aunque no con demasiada agua.
- Junio y julio: la plantación de arroz se encuentra en su máximo nivel de crecimiento.
- Agosto: las semillas de arroz de la plantación están ya secas y preparadas para ser recogidas.
- Septiembre: se siegan las plantas de arroz para la recogida de este cereal.

En octubre y noviembre se observó que los campos quedaban de nuevo inundados, ya que las grandes tuberías dispuestas en cada uno de los campos liberaban agua procedente de un canal de irrigación de forma continua. La poca cantidad de agua que se encontró en los campos los meses restantes provenía de las lluvias y a su vez, la cantidad de algas y lentejas de agua que había en los campos de cultivo dificultaba a veces la visibilidad y acceso a los moluscos de interés. Éstos se encontraban conviviendo con otros moluscos acuáticos pertenecientes a los géneros *Physa*, *Gyraulus* y *Lymnaea* aunque el género más abundante era *Physa* seguido de *Gyraulus*. En los márgenes de los campos encontramos moluscos terrestres de los géneros *Rumina* y *Helicidae* y también algunos operculados de tipo *Melanoides*.

La distribución de los moluscos de interés dentro del biotopo a lo largo del año de seguimiento fue bastante uniforme durante los meses en los que hubo agua, que fueron unos 9 o 10 meses de los 12 durante los cuales se realizó el seguimiento de la zona. La presencia/ausencia de moluscos dependía en gran medida de los cambios en el microambiente efectuados por los agricultores, ya que éstos araban la tierra, sembraban y cortaban las plantas de arroz, abonaban y echaban plaguicidas, herbicidas y alguicidas, lo cual podría explicar la variación en la densidad poblacional de los moluscos.

Los puntos del índice denominados como “Recolección en la naturaleza y transporte in vivo”, “Verificación de la ausencia de infección”, “Lanzamiento de los cultivos experimentales: Adaptación y cultivo en el laboratorio” y “Seguimiento cronológico de características malacológicas a estudiar”, son comunes para ambos grupos de caracoles vectores estudiados en la presente tesis doctoral y pasarán a ser explicados de forma detallada a continuación. Tanto para planórbidos como para lymnaeidos, los pasos seguidos desde su recolección en la naturaleza hasta el seguimiento de las características malacológicas a estudiar han sido exactamente los mismos.

### **3.1.3.- RECOLECCIÓN EN LA NATURALEZA Y TRANSPORTE “IN VIVO”**

En cada uno de los biotopos estudiados, la recolección de los moluscos se realizó mediante la búsqueda visual sobre el sustrato fijo o flotante (agua) y sobre la vegetación; desplazándose libremente por el área de muestreo (Figs. 14 y 15). Los especímenes fueron recolectados con la ayuda de unas pinzas blandas de acero que por un lado evitaban el daño o deterioro de los moluscos al manipularlos y por otro reducían el impacto sobre el biotopo. Los ejemplares recolectados se iban colocando en tubos falcon con una pequeña cantidad de agua y vegetación de la zona, correctamente rotulados con el nombre de la especie, fecha y procedencia. Estos tubos se mantenían abiertos para así asegurar la disponibilidad de oxígeno por parte de los moluscos durante el tiempo que durara la recogida de los mismos. La localización y el área de los puntos de muestreo siempre eran las mismas para cada biotopo, excepto cuando los cambios climatológicos o antropogénicos de los biotopos, nos obligaban a buscar los moluscos en puntos de muestreo alternativos dentro de la misma zona sin variar el área (1 m<sup>2</sup>).

El estudio mensual del microclima de las áreas de muestreo de cada biotopo, incluía la medida de parámetros como temperatura (°C), pH, saturación de oxígeno y conductividad del agua en la que se encontraban los moluscos. Para ello se utilizó un medidor multiparámetro MultiLine modelo P4 SET, que incluía, un electrodo de pH combinado con un sensor de temperatura integrado SenTix41, una sonda de oxígeno disuelto CellOx325 y una célula de conductividad estándar TetraCon® 325, con las correspondientes cubetas de calibración.

La medida de dichos parámetros, nos permitió determinar parte de las condiciones del agua en las que vivían los moluscos de interés. Cuando el nivel del agua era insuficiente para poder sumergir la sonda de pH, se recurría a las tiras indicadoras del

pH PEHANON de rango comprendido entre 6,0-8,1 y 8,0-9,7 y tanto la saturación de oxígeno como la conductividad no se medían en ese caso. La toma de fotografías de los enclaves estudiados, se realizó con el fin de disponer de una información lo más completa posible para futuros análisis sobre la transmisión y epidemiología de las dos helmintiasis tratadas en la presente tesis doctoral.

Una vez recolectados, los moluscos fueron transportados "in vivo" hasta el laboratorio de la unidad de Parasitología de la Universitat de València. Durante el transporte desde la naturaleza hasta el laboratorio se procuró mantener los moluscos a una temperatura no muy elevada y en condiciones de máxima oxigenación dentro de las posibilidades para de este modo asegurar su supervivencia y llegada al laboratorio en condiciones óptimas. Los moluscos eran trasladados a recipientes rectangulares de plástico de un tamaño aproximado de 20 x 15 cm y cierre hermético, siendo separados en grupos de no más de 30 individuos por recipiente según la localidad de procedencia. El motivo de separarlos en grupos de 30, cuando el número de ejemplares recolectados resultó ser considerable, fue facilitar las interrelaciones molusco-molusco y molusco-ambiente en un espacio reducido. La finalidad era conseguir posteriores cultivos puros de las distintas especies de moluscos vectores recolectadas con los que poder realizar el resto de experiencias.

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

Tras la recolección y el transporte de moluscos desde la naturaleza al laboratorio, el primer paso fue el análisis individualizado de cada uno de los ejemplares recolectados, con el fin de verificar la ausencia de infección por algún tipo de helminto.

Inicialmente, el total de los ejemplares recolectados fueron aislados en placas de Petri individuales y se comprobó en éstos si se daba la emisión cercariana durante 60 días consecutivos. En el caso de que ninguno resultara positivo para la parasitación, se consideraba la población negativa y eran devueltos a las cajas de cultivo. Pero si por el contrario algún ejemplar resultaba positivo, todos los ejemplares recolectados eran verificados de la misma manera una segunda vez hasta estar seguros de que no existía infección.

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 hubiese pasado desapercibido al encontrarse aún en el período prepatente, es decir, antes de llegar a la fase de emisión cercariana.

### 3.1.5.- LANZAMIENTO DE LOS CULTIVOS EXPERIMENTALES: ACLIMATACIÓN Y CULTIVO EN EL LABORATORIO

Una vez verificada la ausencia de infección, los moluscos debían ser aclimatados y su ciclo vital mantenido en el laboratorio en unas condiciones que fuesen lo más similares posible a las de su hábitat natural, de tal forma, que fueran capaces de superar su periodo de aclimatación, que suele estar comprendido entre 24 y 48h (Rondelaud & Barthe, 1987; Audousset *et al.*, 1989)

Después de superar el proceso de aclimatación, los moluscos recolectados fueron separados y colocados, según la especie y biotopo de procedencia en recipientes de plástico herméticos y transparentes provistos de un aireador que facilitaba la oxigenación del agua mediante burbujeo. En el fondo de cada uno de los recipientes se colocó un sedimento de tipo calcáreo-margoso (Rondelaud & Barthe, 1978; Bouix-Busson *et al.*, 1985a, b; Audousset *et al.*, 1989), previamente autoclavado, dispuesto en una capa fina en el fondo seguida de una capa de agua mineral, proporcionándose como alimento porciones de lechuga fresca (Fig. 16).

El lanzamiento y mantenimiento de los cultivos experimentales de moluscos se llevó a cabo en cámaras climáticas Heraeus-Vötsch® VB-0714 (Fig. 17) a unas condiciones constantes de temperatura, humedad relativa y fotoperíodo de 20°C, 50% y 12 horas luz/12 horas oscuridad, respectivamente, con oxigenación artificial constante e intensidad de luz máxima de 3.500 lux. Cada una de las cajas de cultivo fue debidamente etiquetada, indicando el número de ejemplares existentes, el biotopo, lugar de procedencia y la fecha de recolección.

Cada 5-7 días se proporcionaban hojas de lechuga como alimento y se procedía a la renovación del agua de las cajas de cultivo (Bouix-Busson *et al.*, 1985a, b). En el caso de ejemplares de tamaño pequeño la lechuga fue complementada 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 una mayor frecuencia, pero la brevedad del procedimiento, la eliminación de prácticamente todos los residuos durante el proceso de limpieza y el mayor acceso a los nutrientes de los moluscos recién nacidos o de tamaño pequeño, demostraban la utilidad de estas algas. El sedimento por su parte se cambiaba cada 1 o 2 meses, a medida que se iba deteriorando por la erosión y según fuera la cantidad de detritus acumulado que no se conseguía eliminar con el lavado habitual. Parte de ese sedimento desechado se

reciclaba para su uso posterior mediante el empleo de una autoclave para esterilizar el material.

### **3.1.6.- SEGUIMIENTO CRONOLÓGICO DE CARACTERÍSTICAS MALACOLÓGICAS A ESTUDIAR**

De las tres especies de moluscos vectores seleccionadas para nuestros estudios, decidimos analizar la dinámica de crecimiento y la capacidad de autofecundación de cada una de ellas, para poder realizar así un estudio comparado de la biología de las mismas. De modo que, a partir de la eclosión de clusters de huevos procedentes de los ejemplares recolectados en la naturaleza, se obtuvo una primera generación de moluscos, a partir de la cual se obtuvieron dos más. Así pues, para cada especie se obtuvieron tres generaciones y para cada una de ellas se seleccionó un número mínimo de 30 individuos/generación por motivos de significancia estadística.

Para el seguimiento cronológico de la capacidad de autofecundación y las tasas de reproducción y crecimiento, los moluscos fueron aislados de forma individual en placas de Petri de 15 cm de diámetro con agua mineral y una alícuota de algas. La alimentación basada en algas cianofitas de la especie *Oscillatoria formosa* solo fue necesaria durante el primer mes de vida de los ejemplares moluscos hasta que éstos alcanzaran un tamaño que les permitiera, con la rádula ya más desarrollada, alimentarse de porciones de lechuga. Diariamente se renovó tanto el agua como el alimento de todas y cada una de las placas de Petri registrando el número de clústers de huevos emitidos por cada ejemplar, así como también el número de huevos por clúster. Cada uno de éstos fue aislado en una nueva placa de Petri para posteriormente realizar el seguimiento de las fases de maduración de los mismos y así determinar el tiempo que tardaban en eclosionar. Paralelamente al seguimiento de la autofecundación, el estudio de la dinámica de crecimiento se realizaba cada quince días con la obtención de imágenes digitales de cada uno de los individuos, tanto en posición ventral como apical para posteriores estudios morfométricos. El manejo de los moluscos trataba siempre de llevarse a cabo con la ayuda de pinceles finos para disminuir el riesgo de rotura de la concha de los mismos y a su vez, sin tardar demasiado para así disminuir también el tiempo de exposición de los moluscos a la luz intensa de la lupa binocular. De esta manera se evitaba el posible daño inducido por el calor desprendido por la luz de la lupa.

Cada una de las placas era debidamente etiquetada con etiqueta el nombre de la especie de molusco, el número (del 1 al 30) asignado para cada ejemplar, la fecha de nacimiento y el número de generación correspondiente. Todos los ejemplares fueron mantenidos en cámaras climáticas bajo condiciones estándar de laboratorio de 20°C, 50% de humedad relativa y un fotoperiodo 12 h luz/12 h oscuridad.

### **3.1.7.- ESTUDIO DE LA ANATOMÍA INTERNA DE *BULINUS TRUNCATUS***

#### **A) Estudio de caracteres morfológicos de *B.truncatus*, El Ejido (Almería) España.**

Mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica, se realizó el estudio de la concha, protoconcha, rádula y de la pseudobranquia, ya que son tres características de gran utilidad para poder distinguir entre géneros que aparentemente parecen iguales a simple vista, como son por ejemplo el género *Physa* y *Bulinus*. Debido a la confusión que se da entre estos dos géneros, consideramos importante recurrir al estudio microscópico de algunas de esas características, para poder distinguirlos de forma correcta.

#### **A.1) Concha**

Para el estudio de las características ornamentales de la concha de 20 ejemplares de *B. truncatus*, se utilizó un Scanning Electron Microscope S-4100 haciendo uso de una Working Distance que variaba de 15 a 18 mm, una intensidad de luz fija de 10 KV (high voltage), con aumentos de x40 a x450, estableciendo una escala comprendida entre 50  $\mu\text{m}$  y 600  $\mu\text{m}$  según fuera el tamaño del ejemplar.

A partir del análisis de la concha o teleoconcha percibimos que estaba provista de estrías longitudinales, aunque en general poco marcadas, finas, desiguales y algo flexuosas (Martínez-Ortí *et al.*, 2015). El examen de la protoconcha o concha embrionaria mediante microscopía electrónica de barrido resulta interesante ya que nos permite distinguir a nivel de familia y de género. Como es característico en todo el género *Bulinus*, la protoconcha presentaba una microescultura puntiforme (Fig. 18), cuyos puntos aparecían dispuestos en filas espirales (Germain, 1931) lo que difiere claramente de los dos ejemplares examinados de *Physa acuta*, en los que se observó que era lisa.

#### **A.2) Rádula**

Se consideró también importante el estudio de la rádula ya que la ordenación espacial de la misma y el patrón que presenta cada una de ellas nos permite diagnosticar diferentes especies. Se examinaron un total de 3 rádulas de ejemplares de *B. truncatus* para poder determinar su fórmula radular. Esta especie se caracteriza por poseer una rádula formada por una hilera longitudinal y central de pequeños dientes quitinosos con la misma morfología y tamaño, a partir de la cual se añaden columnas laterales, los dientes de las cuales van cambiando en tamaño y morfología a medida que nos alejamos de la hilera central hasta llegar a los dientes marginales (Fig. 19). Los dientes más jóvenes se encuentran en la parte más interna mientras que en la parte más externa encontramos los dientes más desgastados. Los dientes se van renovando de forma continua en la parte posterior de la cinta radular y a una velocidad considerable. Cada hilera de dientes consiste en un diente central, un número determinado de dientes laterales a cada lado del diente central y los dientes marginales.

### **A.3) Pseudobranquia**

Para el estudio de la pseudobranquia se utilizó la microscopía óptica ya que, al tratarse de tejido blando, las características a nivel morfológico se apreciaban más con esta técnica. El estudio de la misma nos permite distinguir entre géneros de moluscos. Se examinaron pseudobranquias de 3 ejemplares jóvenes y de un adulto. En el caso de *B. truncatus* se caracterizan por ser estructuras alargadas y relativamente aplanadas compuestas por diversas láminas lobuladas de color grisáceo y superpuestas entre ellas (Fig. 20).

Volviendo a la confusión que se da en ocasiones para distinguir entre los géneros *Physa* y *Bulinus* es importante saber que *Physa* no posee pseudobranquia mientras que *Bulinus* y otros planorbidos estudiados en la presente tesis como *Planorbarius* sí que la poseen, aunque con distinta morfología. Por tanto, la presencia/ausencia de pseudobranquia o las diferencias morfológicas de la misma, puede ser de gran utilidad para distinguir entre géneros.

### **B) Determinación de la eufalía o afalía en *B. truncatus* de Cerdeña (Italia)**

Tras el hallazgo de un ejemplar eufálico después de haber examinado gran cantidad de ellos afálicos, se decidió estudiar si el carácter eufálico/afálico seguía un patrón a lo largo de las distintas generaciones, partiendo de 30 ejemplares adultos recolectados

en la naturaleza y adaptados al laboratorio. De modo que, después de haber obtenido dos generaciones enteras, se procedió a la disección de un total de 159 ejemplares de unos 6 meses de edad, concretamente 30 parentales, 68 de la primera generación y 61 de la segunda generación. La disección se llevó a cabo en el Museu Valencià d'Història Natural d'Alginet.

Para ello se utilizó un kit de disección con pinzas de punta muy fina, bisturí y tijeras de punta fina también. Primeramente, se separó el cuerpo del animal de su propia concha con la ayuda de unas pinzas blandas de acero sobre una placa de Petri de cristal donde se había depositado el molusco junto con el contenido de alcohol 70% con el que había sido conservado previamente. Una vez separado el cuerpo de la concha, y con la ayuda de agujas entomológicas, se colocó y se fijó el cuerpo del molusco orientado por su parte izquierda, ya que es el lado por donde se encuentra el orificio genital masculino (Fig. 21).

Para facilitar la visibilidad bajo la lupa, el cuerpo del molusco se dispuso sumergido en alcohol 70% sobre una base de parafina teñida de color negro que a su vez encajaba dentro de una placa de Petri de cristal. Cuando el orificio genital masculino localizado justo en la base del tentáculo era visualizado bajo la lupa, se realizaba una escisión abriendo desde la base del tentáculo para que en caso de que el molusco tuviera pene fuera más fácil encontrarlo. Finalmente se volvían a conservar los ejemplares diseccionados en alcohol 70% para que hubiera material disponible para posteriores extracciones de DNA.

### **3.2.- MÉTODOS MORFOMÉTRICOS DE FENOTIPAJE DE VECTORES**

En estos últimos años se han desarrollado muchos estudios relacionados con el fenotipaje, que demuestran la posibilidad de realizar análisis de la variabilidad morfométrica a lo largo de la vida de un organismo (Valero *et al.*, 1996, 2001). En nuestro caso, la atención se centró en las diferencias morfométricas durante el período de crecimiento de las distintas generaciones de las especies de moluscos vectores estudiadas y obtenidas en el laboratorio. La aplicación de parámetros que previamente habían sido definidos en otros estudios (Valero *et al.*, 1998, 1999) permitió realizar una caracterización fenotípica muy útil de los moluscos vectores en cuestión. La metodología utilizada tiene la ventaja de no requerir de aparatos muy costosos para llegar a obtener el resultado deseado, contando únicamente con una lupa binocular

debidamente calibrada y conectada a un software especializado, se puede llevar a cabo el seguimiento del estudio morfométrico sin problemas.

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

Para realizar las medidas pertinentes tanto de conchas como de clusters y huevos de las especies de moluscos seleccionadas para nuestro estudio, se hizo uso del sistema de análisis de imágenes llamado Computer Image Analysis System (CIAS), el cual se compone de una lupa binocular NIKON SMC calibrada y de alta resolución, conectada y debidamente adaptada a un ordenador que comprende un software especializado para el análisis de imágenes llamado Image Pro Plus 5.1.

En otro ordenador, asociado a su vez a una cámara microscópica de vídeo en color, (DX 20, Kappa) colocada en la lupa binocular, se realizaron las digitalizaciones de las conchas previas a su medida con la ayuda del software Kappa Image Base.

La descripción y aplicación de esta metodología en el ámbito de la Fascioliasis fue llevada a cabo, ya en 2005 por Valero *et al.* De forma reciente se ha demostrado la utilidad de dicha metodología para moluscos lymnaeidos en otro estudio realizado también en el departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València (Bargues *et al.*, 2011, 2012). Basándonos en las mismas directrices hemos desarrollado los estudios sobre la variabilidad de la concha de los géneros *Bulinus*, *Planorbarius* y *Lymnaea*.

#### **3.2.1.1.- MEDICIÓN DE CONCHAS DE ADULTOS MEDIANTE CIAS**

A partir de las imágenes de las conchas generadas cada 15 días utilizando el software Image KAPPA Base, se procedió a la medida de las mismas utilizando el programa Image Pro Plus, versión 5.1 para Windows. Se realizó el seguimiento del crecimiento para el estudio de la variabilidad de la concha de tres especies distintas de moluscos vectores; dos de ellas pertenecientes a la familia Planorbidae (*B. truncatus* y *P. metidjensis*) y una de la familia Lymnaeidae (*Lymnaea* sp.).

A su vez, para cada una de esas tres especies, se obtuvieron tres generaciones sucesivas en el laboratorio para de este modo trabajar con poblaciones puras de las especies sometidas a estudio, componiéndose cada una de esas generaciones de 30 individuos.

La medición de las conchas de los moluscos se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio estereoscópico NIKON, modelo SMC 1500, lupa binocular con gama de aumento zoom de 0.75x a 11.25x dotado de una videocámara a color ExaveHAD (SONY) y asociado a un ordenador con el software anteriormente ya nombrado conocido como Image Pro Plus 5.1. Para llevar a cabo las medidas de los géneros *Lymnaea*, *Bulinus* y *Planorbarius*, se tomaron como base de referencia los trabajos de Hubbendik (1951) y de Glöer & Meier-Brook (1994), adaptando los esquemas de las medidas según nuestros objetivos.

La longitud de la concha (LC) se mide desde el ápice siguiendo una línea recta que recorre la columela terminando en la proyección del margen anterior de la concha. Las mediciones restantes; anchura de la concha (AC), longitud de la abertura (LA), anchura de la abertura (AA) y la longitud de la última vuelta de espira (LUE) se tomaron en base a líneas perpendiculares o paralelas a la línea que representa el eje principal del molusco. Para la medida del ángulo de la espira se procuró trazar con la ayuda del software Image Pro Plus, dos líneas que tuvieran tres puntos de contacto con la concha del molusco. Una en la última vuelta de la espira y la otra en el peristoma justo al nivel de máxima anchura de la concha del molusco, pero tocando también en un punto el otro lado de la última vuelta de espira permitiendo una medida estandarizada del ángulo (Fig. 22).

El ratio entre la longitud de la concha/anchura de la concha (LC/AC), longitud de la concha/longitud de la abertura (LC/LA) y longitud de la concha/longitud de la última vuelta de espira (LC/LUE) también fueron calculados, pero esta vez con el software Microsoft Excel para Windows. Las mediciones efectuadas al estar ya estandarizadas permitieron la consecución de estudios comparados significativos con otras poblaciones de la misma o diferentes especies.

### **3.2.1.2.- MEDICIÓN DE CLUSTERS Y HUEVOS OBTENIDOS A PARTIR DE CULTIVOS PUROS**

Los clusters de huevos emitidos por los ejemplares de cada una de las tres generaciones estudiadas para cada especie de molusco, fueron aislados de forma individual en placas de Petri para su posterior digitalización y medición. La captura previa de imágenes digitales de cada uno de los clusters se realizó colocándolos sobre un portaobjetos provisto de una franja milimetrada en su borde superior que permitió calibrar las imágenes facilitando las mediciones posteriores (Fig. 23).

Las medidas llevadas a cabo fueron las siguientes:

A) Medidas de los clusters: 1) área; 2) redondez; 3) longitud; 4) anchura; 5) ratio longitud/anchura.

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.

### **3.2.2.- CONSERVACIÓN DE LAS CONCHAS**

Las conchas de los ejemplares moluscos que morían de forma natural o bien en el transcurso de las experiencias o bien al final de las mismas, fueron conservadas en viales de cristal debidamente etiquetados con el nombre y procedencia de la especie de molusco y la fecha en la que eran colocados en los viales. Además, aquellas conchas vacías obtenidas en los puntos de recolección seleccionados para cada una de las especies en estudio también fueron conservadas del mismo modo; así como también lo fueron aquellas procedentes de los cultivos lanzados en el laboratorio. Para una mejor conservación de las conchas, éstas se limpiaron con agua mineral y la ayuda de un pincel y se secaron antes de conservarse en viales de cristal. Su conservación permite por un lado evitar el daño de las mismas y por otro emplearlas para posibles estudios posteriores.

### **3.2.3.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Los datos morfométricos obtenidos con el software Image-Pro Plus versión 5.1 a partir del estudio de un total de 90 ejemplares para cada una de las tres especies objeto de estudio, fueron procesados y analizados estadísticamente. La metodología se basó, en la realización de la prueba o estadístico Chi cuadrado para comprobar si la diferencia en los datos que observamos estaba dentro de lo normal y probable, es decir, si las diferencias que observamos en los datos eran debidas al azar o a algo más, considerándose como significativas o no. El cálculo del estadístico Chi cuadrado nos permitió esclarecer si dichas diferencias observadas entre las generaciones dentro de una misma especie para los valores de las variables morfométricas estudiadas tanto para la concha como para los clusters eran significativas o no. La hipótesis nula ( $H_0$ ) que se estableció fue que no había diferencias entre las generaciones de una misma especie, o lo que es lo mismo, que había igualdad entre ellas.

$$\chi^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

### 3.3.- TREMATODOS PARÁSITOS

A continuación pasamos a detallar los materiales y métodos relacionados con las infecciones experimentales de los caracoles para la verificación de su capacidad de transmisión. Su exposición se lleva a cabo por ser éste el último paso en el que hemos participado, si bien sus resultados y análisis no se corresponden a esta Tesis Doctoral sino a otra que se desarrollará por otro doctorando con posterioridad. Su importancia para nuestra Tesis Doctoral radica en el hecho de haberse podido verificar que las tres especies de caracoles aquí estudiadas ostentan la capacidad de transmisión de los respectivos trematodos y son por tanto especies de moluscos de interés epidemiológico para las enfermedades parasitarias en cuestión.

#### 3.3.1.- ESPECIES DE *SCHISTOSOMA* DE PACIENTES INFECTADOS EN CÓRCEGA

Los huevos de la especie *S. haematobium*, son eliminados mediante la orina de individuos infectados y estos huevos eclosionan al entrar en contacto con un cuerpo de agua dulce, liberando el miracidio, que es la fase infectiva que nada libremente hasta encontrar e infectar al caracol hospedador intermediario adecuado del género *Bulinus*, dentro del cual se desarrolla y replica (Rollinson & Simpson, 1987). *Schistosoma bovis* es una especie hermana estrechamente relacionada con *S. haematobium* que causa schistosomiasis intestinal en rumiantes y es el mayor problema veterinario a través de África, pero puede ser encontrada también en países mediterráneos (Brumpt, 1929; Grétilat, 1963; De Bont & Vercruyse, 1997). De forma similar a *S. haematobium*, *S. bovis* también es transmitida por especies de moluscos del género *Bulinus* y ambas especies de schistosoma habitan en áreas geográficamente simpátricas (Huyse *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2013).

A principios del 2014, se diagnosticaron un grupo de casos de schistosomiasis urogenital en pacientes de Francia (marzo, 2014) y Alemania (enero, 2014) (Berry *et al.*, 2014; Holtfreter *et al.*, 2014; Boissier *et al.*, 2015). Los pacientes no habían visitado

nunca países endémicos para schistosomiasis, pero todos ellos habían pasado sus vacaciones en el sureste de Córcega en agosto de 2013. Los análisis moleculares preliminares de los huevos de *Schistosoma* obtenidos de un paciente procedente de Alemania el cual fue el primer caso reportado de schistosomiasis urogenital adquirido en Córcega, mostró que las especies de *Schistosoma* involucradas en la infección eran *S. haematobium* y el híbrido entre *S. bovis* y *S. haematobium* (Moné *et al.*, 2015).

### **3.3.1.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DE CEPAS**

A los pacientes de Córcega y del continente europeo que fueron diagnosticados serológicamente de schistosomiasis urogenital, se les pidió una muestra de orina para confirmar el diagnóstico mediante análisis parasitológico. Las muestras fueron examinadas microscópicamente por la presencia de la característica espina terminal de los huevos de *Schistosoma*. Las muestras positivas fueron enviadas al laboratorio de Perpignan (Francia), donde fueron registradas como provenientes tanto de ciudadanos locales de Córcega como de turistas.

Los huevos fueron microscópicamente retirados individualmente con una pipeta Pasteur larga de cada una de las muestras de orina y cuando fue posible se intentaron eclosionar los huevos colocándolos en agua dulce. Tanto los huevos no eclosionados como los miracidios, fueron individualmente capturados utilizando una pipeta y preparados para la extracción de DNA. Se extrajo el DNA de huevos y miracidios (Beltran *et al.*, 2008) obtenidos a partir de las muestras de orina de pacientes de Córcega.

### **3.3.1.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PLANÓRBIDOS**

Se seleccionaron de forma aleatoria un número de caracoles de la especie *B. truncatus* y de *P. metidjensis* (3-5 mm de tamaño) y fueron expuestos individualmente a 1, 2 o 3 miracidios de huevos eclosionados satisfactoriamente a partir de la muestra de orina de un paciente local de Córcega infectado. La infección fue confirmada mediante la emisión cercariana natural al mes y medio después de la exposición miracidial.

### **3.3.1.3.- SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN**

El número de caracoles expuestos que llegó a infectarse fue registrado y varios hamsters de laboratorio fueron expuestos cada uno a un pool de cercarias. Los animales fueron sacrificados 12 semanas después de la exposición al parásito según el procedimiento estándar (Boissier *et al.*, 2003). Se caracterizaron molecularmente los schistosomatidos que se recuperaron de los hamsters infectados. Todos los experimentos con animales fueron realizados en el laboratorio del centro colaborador de la OMS en Perpignan, Francia.

### **3.3.2.- CEPA DE *FASCIOLA* OBTENIDA EN BOVINO**

Personal veterinario del matadero de Valencia *MercaValencia* nos proporcionó el material parasitológico necesario para poder obtener huevos de *F. hepatica*, es decir, ejemplares adultos y grávidos de *Fasciola*. Los adultos se transportaron y conservaron en botes de plástico con agua mineral hasta llegar al laboratorio. La procedencia de los adultos de *Fasciola* fue de bovino de Francia que había sido engordado en Montesa, Valencia, España.

#### **3.3.2.1.- OBTENCIÓN DE HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA***

La extracción y subsiguiente obtención de los huevos se llevó a cabo mediante dilaceración uterina de los fasciólidos adultos y grávidos. Con la ayuda de unas pinzas blandas y un bisturí se hizo una pequeña incisión justo en el segundo tercio del útero, donde se encuentran los huevos maduros y fértiles. Concretamente se hizo un pequeño corte en la parte del útero más cercana a la ventosa ventral, la cual se encuentra prácticamente pegada a la bolsa del cirro.

Para extraer los huevos fue necesario apretar con suavidad el útero justo alrededor del pequeño corte realizado con anterioridad. Este corte sólo es necesario en el caso que el cirro esté taponado por restos celulares, sangre o detritus, en caso contrario, solo presionando suavemente sobre las aglomeraciones de huevos ya suele ser suficiente para poder obtener una cantidad considerable de los mismos.

Los huevos que quedaron en la placa de Petri se concentraron en el centro de la misma realizando pequeños movimientos en círculo y con suavidad para facilitar su

recogida con una pipeta de plástico. Los huevos se colocaron en un vial de cristal con agua mineral natural y con la tapa agujereada para permitir la entrada de oxígeno y evitar así la muerte de los mismos. Posteriormente se realizaron sucesivos lavados de los huevos con agua mineral para asegurar una mayor limpieza y eliminación de impurezas que pudieran dañar o contaminar el material parasitológico. Los viales fueron envueltos en papel de aluminio para evitar que el paso de la luz pudiera acelerar el proceso de crecimiento de bacterias y hongos en caso de haberlos.

### **3.3.2.2.- EMBRIONACIÓN DE LOS HUEVOS**

Una vez extraídos los huevos del adulto de *Fasciola* mediante dilaceración uterina, se seleccionaron aquellos que estaban en buen estado, es decir, que no estaban rotos, deformados ni degenerados. De todo el conjunto de huevos seleccionados se cogió un pool de unos 200 huevos aproximadamente, los cuales se conservaron en un vial de cristal con agua mineral y la tapa agujereada para asegurar la aireación y viabilidad de los mismos. El vial fue colocado en una cámara climática (Heraeus Vötsch® modelo VB714) a 20°C y como ya se ha dicho con anterioridad, envuelto en papel de aluminio para dificultar el crecimiento de bacterias u hongos, en el caso de que los hubiera.

Para llevar a cabo las lecturas de las diferentes fases de desarrollo de los huevos de *Fasciola* durante el proceso de embrionación, el procedimiento llevado a cabo se basó en la obtención y posterior observación directa bajo el microscopio óptico a 10x de una alícuota del contenido del vial de entre 30 y 50 huevos, tratando de no exponer al aire y a la luz por mucho tiempo la muestra durante el proceso para así evitar posibles contaminaciones y/o daño del material parasitológico. Las sucesivas lecturas se realizaron a los 7 días después de haber dejado los huevos a embrionar en la cámara climática a 20°C, a los 13 y a los 16 hasta llegar a los 19 días post-embrionación que es cuando se hizo la última lectura.

Llegados a este punto se tomó la decisión de interrumpir las lecturas, ya que el 75% de los huevos se encontraba en estado de miracidio desarrollado, lo cual indicaba que, en las horas posteriores, la probabilidad de eclosión de los huevos de *Fasciola* era altamente probable. Después de cada lectura se hizo el recuento del número de huevos de cada fase de embrionación (mórula incipiente, mórula avanzada, miracidio perfilado o miracidio desarrollado hasta que el huevo esté embrionado por completo).

A partir de dicho recuento se calculó el porcentaje de huevos de cada fase de embrionación presente en la muestra. De modo que, cuando el porcentaje de huevos

en estado de miracidio desarrollado era del 60% o superior, deducíamos que, en cuestión de aproximadamente un máximo de dos días, los miracidios ya estarían lo suficientemente maduros como para salir del huevo y por ende, podríamos programar de una manera más controlada la excitación mediante luz de los miracidios que se encontraban aún dentro del huevo para la posterior infestación experimental de los moluscos lymnaeidos.

### **3.3.2.3.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LYMNAEIDOS**

En el laboratorio del Centro OMS y FAO de Valencia, se llevó a cabo la infestación monomiracidial de ejemplares de moluscos *Lymnaea* sp. divididos en tres grupos de edad y tamaño como sigue, grupo 1 (entre 5-6 meses de edad y longitud de 5'5-6'5 mm), grupo 2 (1 año y 26 días y longitud de 6-8 mm) y por último grupo 3 (entre 3-4 meses de edad y de 4-6 mm de longitud). Los ejemplares moluscos de los tres grupos nacieron en el laboratorio a partir de ejemplares recolectados en la naturaleza.

La localidad de procedencia tanto del grupo 1 (24 ejemplares) como el grupo 2 (4 ejemplares) fue Albalat dels Tarongers (Valencia), concretamente en un tramo del río Palancia, mientras que los 28 ejemplares del grupo 3 procedían de la localidad de Chilches (Castelló), de unos arrozales cercanos a la playa. Una vez obtenidos los miracidios mediante excitación con luz intensa durante una hora y media aproximadamente, se individualizaron los ejemplares moluscos en placas de Petri de 3'5 mm de diámetro con agua mineral. El motivo del uso de placas de Petri de un diámetro menor es para optimizar el encuentro miracidio-molusco, así como también para poder controlar de forma más exhaustiva los intentos del molusco por salir de la placa.

El método utilizado para la infestación consistió en aspirar uno a uno los miracidios que iban saliendo de los huevos con una pipeta Pasteur de cristal proveída de un bulbo de látex en su borde superior, ya que se necesitaba de mucha precisión. Cada uno de los miracidios se puso en contacto con cada uno de los 56 ejemplares a infestar, controlando durante 4 horas (tiempo de vida aproximado para el miracidio), mediante observación directa, que el molusco estuviese siempre sumergido en el agua de la placa de Petri para facilitar el encuentro miracidio-molusco y asegurar de este modo la penetración del tegumento del molusco por parte del miracidio.

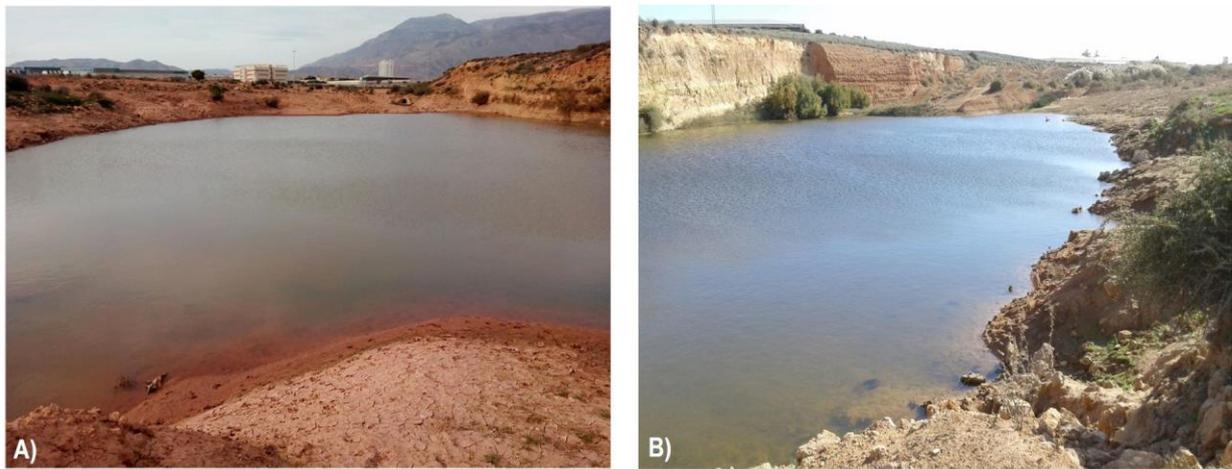
Posteriormente los moluscos infectados fueron trasladados de las placas de Petri a una caja de cultivo con una capa fina de sustrato calcáreo. Además, se les proporcionó

lechuga en porciones pequeñas como fuente de alimento, así como también una alícuota de algas (*Oscillatoria formosa*) para una alimentación más completa. Se mantuvo a los 56 ejemplares en la caja de cultivo durante 30 días después de la infestación y transcurrido ese período de tiempo se colocaron de nuevo los ejemplares de lymnaeidos en placas de Petri, pero esta vez de 5 mm de diámetro con agua mineral y una pequeña porción de lechuga.

#### **3.3.2.4.- CRONOBIOLOGÍA CERCARIANA Y CONSERVACIÓN DE METACERCARIAS**

Transcurridos 30 días, tras haber sido infectados, los moluscos lymnaeidos fueron trasladados a placas de Petri de forma individual desde la caja de cultivo en la cual habían sido mantenidos hasta el momento en la cámara climática bajo condiciones estándar (20°C, 12 h luz/12 h oscuridad y oxigenación constante). Para poder realizar el seguimiento exhaustivo de la emisión cercariana de cada uno de los ejemplares infestados, diariamente se revisaron todas las placas una por una en busca de metacercarias, renovando tanto el agua como la porción de lechuga de cada una de ellas. Las metacercarias (forma enquistada de la cercaria) obtenidas, fueron conservadas en viales de cristal a 4°C con agua mineral y con la tapa agujereada para asegurar la entrada de aire y por tanto la supervivencia de las mismas.

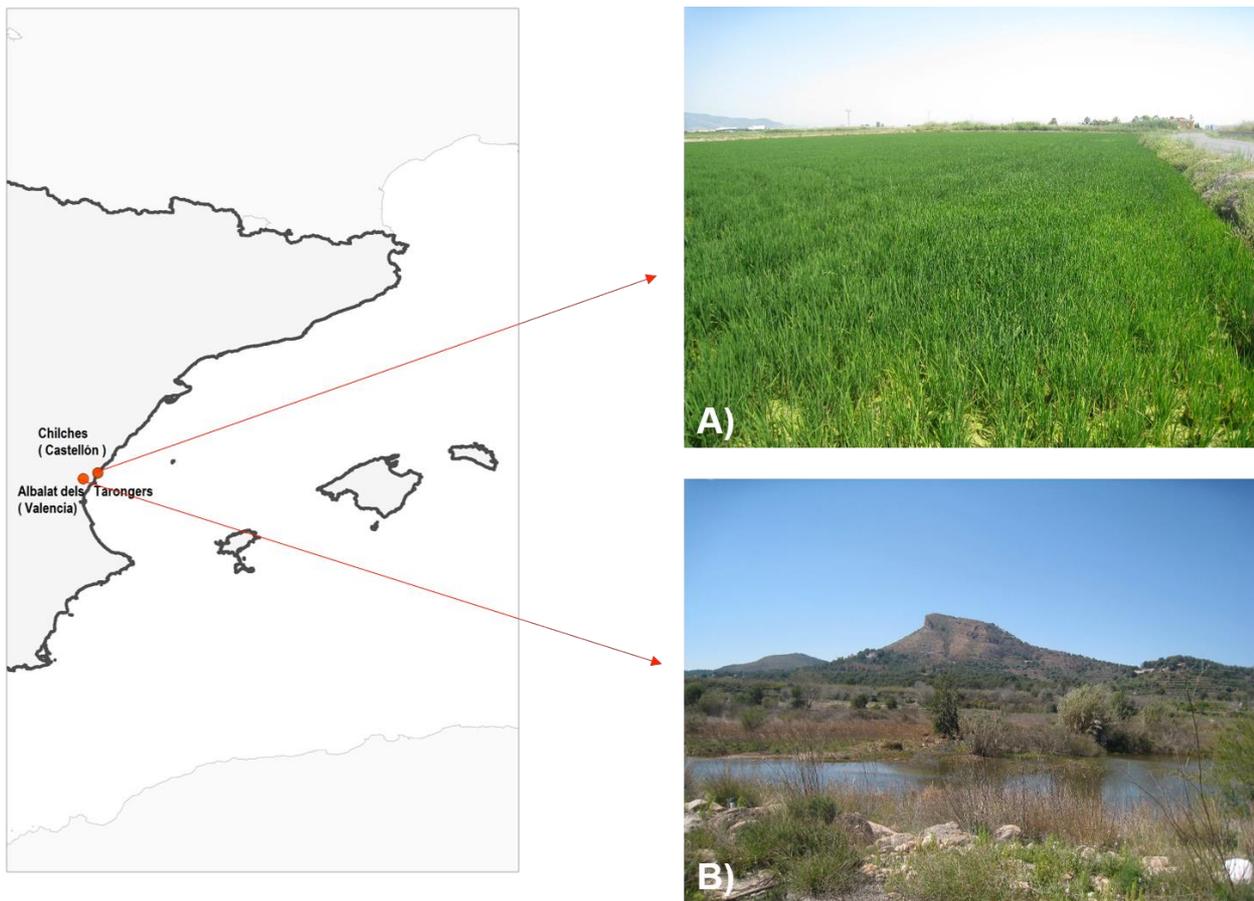




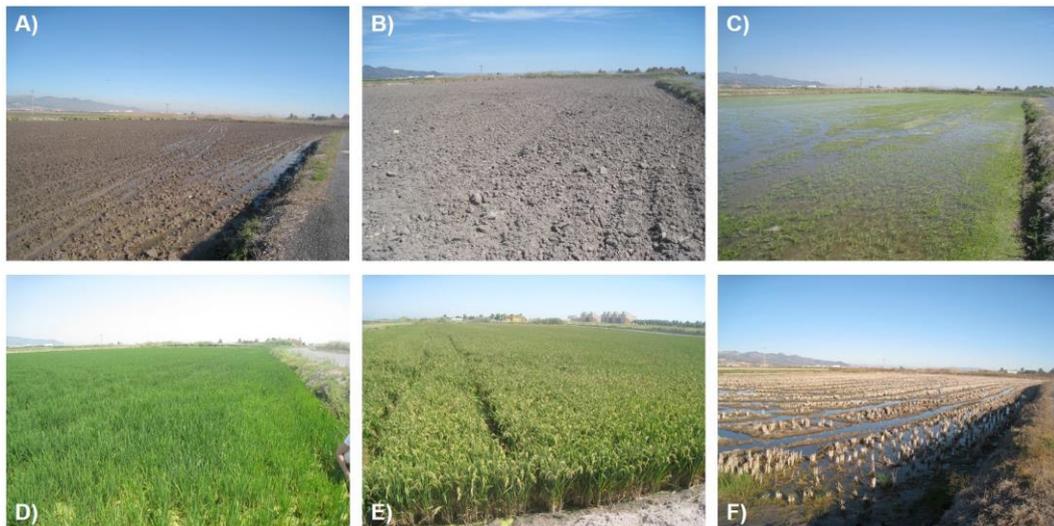
**Fig. 10.- Lugar de prospección de *Bulinus truncatus* en El Ejido (Almería): (A) lado izquierdo de la rambla de la Sierra de Gádor, detrás del Hospital de Poniente de El Ejido (Almería) y (B) lado derecho de la rambla. Fuente: Alberto Martínez-Ortí.**



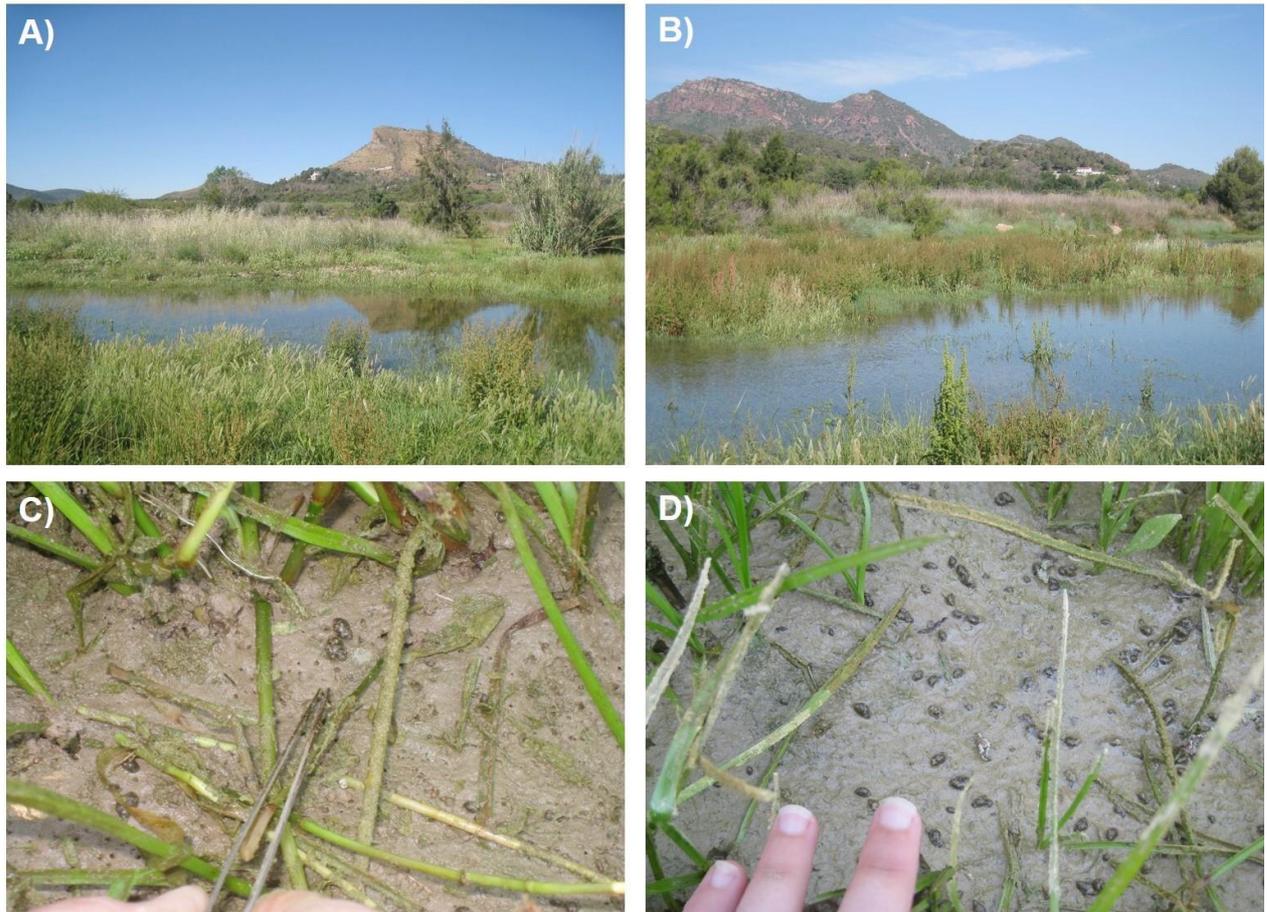
**Fig. 11.- Lugar de prospección de *Planorbarius metidjensis*. Tramo del cauce del arroyo en el Valle de Polán, Talayuelas (Cuenca): (A) charca con agua procedente de las lluvias de finales de noviembre de 2016; (B) detalle de la zona central de la charca donde se encontró la población de *Planorbarius metidjensis* e (C) imagen de la charca totalmente seca tomada en junio de 2016. Fuente: Alberto Martínez-Ortí.**



**Fig. 12.- Lugares de prospección de moluscos lymnaeidos de la especie *Lymnaea* sp.: (A) campo de arroz y (B) cauce de río.**



**Fig. 13.- Sucesión ecológica cíclica creada por la actividad humana en los arrozales la localidad de Chilches (Castellón), relacionada directamente con la presencia/ausencia de moluscos lymnaeidos: (A) arado de la tierra para facilitar la circulación del agua de lluvias anteriores (marzo de 2015); (B) se descompacta la tierra y se abona (abril de 2015); (C) siembra del arroz e inundación uniforme del campo (mayo de 2015); (D) máximo nivel de crecimiento de la plantación de arroz (junio-julio de 2015); (E) recogida de las semillas de arroz (agosto 2015), y (F) segado de las plantas de arroz y nuevo inicio del mismo ciclo (septiembre 2015).**



**Fig. 14.- Recolección de lymnaeidos en el cauce del río: (A) y (B) zonas central y lateral derecha del río donde se encontró la población de moluscos; (C) y (D) moluscos lymnaeidos encontrados sobre barro húmedo y la base de los tallos de la vegetación presente en la zona.**



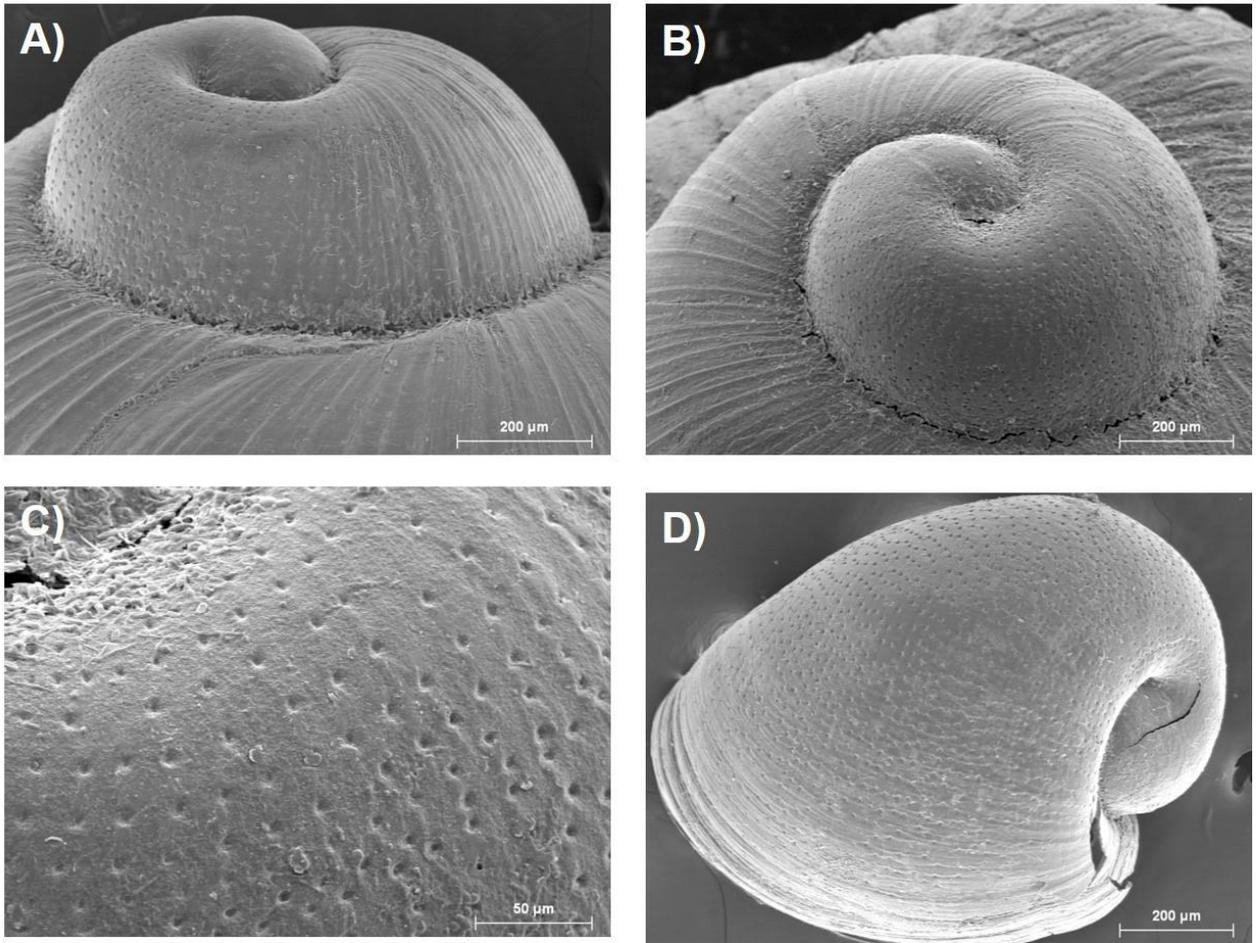
**Fig. 15.- Recolección de lymnaeidos en campos de arroz: (A) los moluscos se encontraron sumergidos en el agua, (B) sobre el barro húmedo en presencia de algas y (C) sujetos sobre las bases de los tallos de las plantas de arroz.**



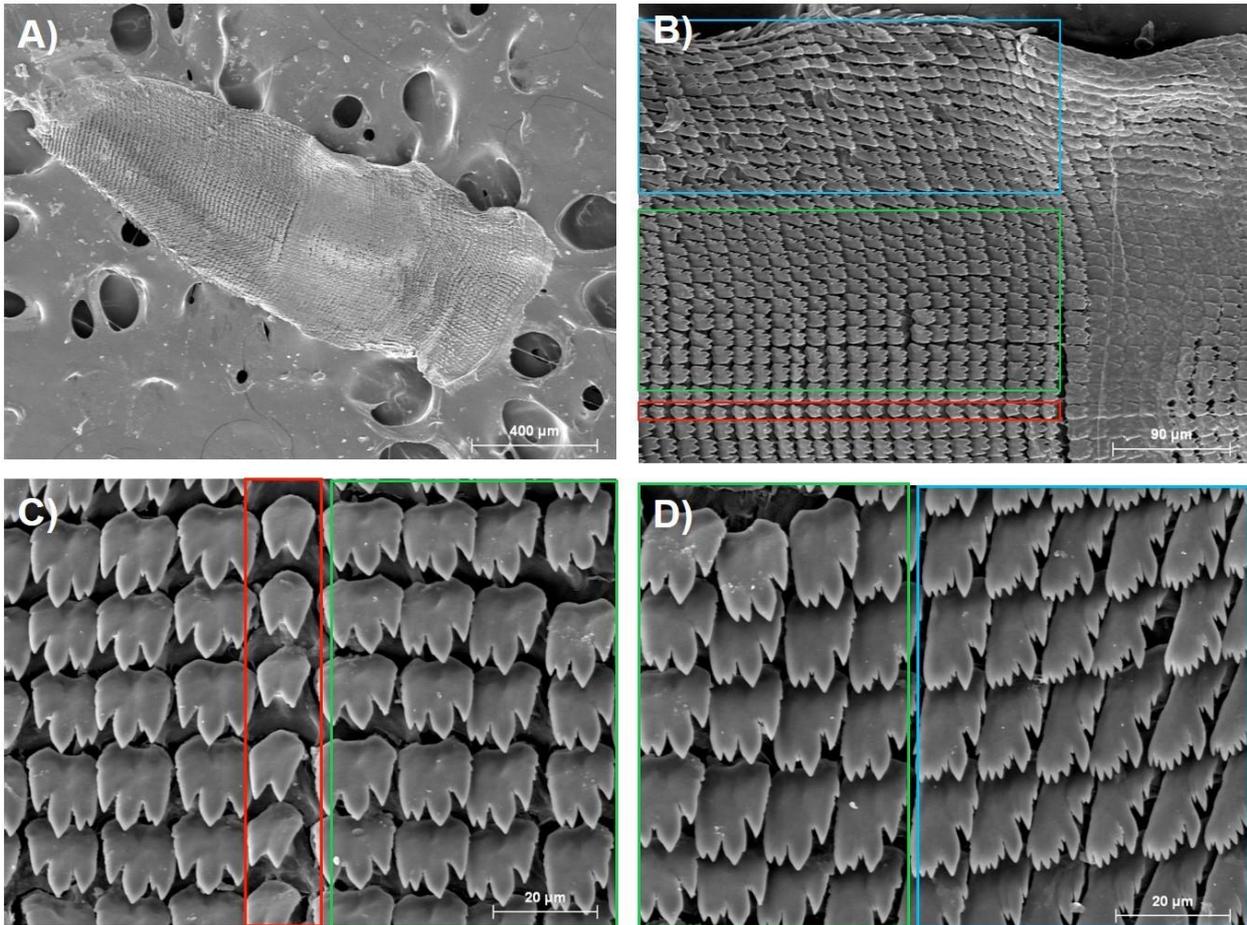
**Fig. 16.- Cajas para los cultivos experimentales de moluscos.** Los recipientes eran totalmente transparentes para permitir el paso de luz y se les alimentaba con lechuga fresca. En el caso de los lymnaeidos, por su naturaleza anfibia se decidió colocar un soporte a modo de rejilla (de color blanco en la imagen) sobre la fina capa de sustrato calcáreo del fondo para que los moluscos pudieran estar en contacto con el agua sin necesidad de estar sumergidos en ella.



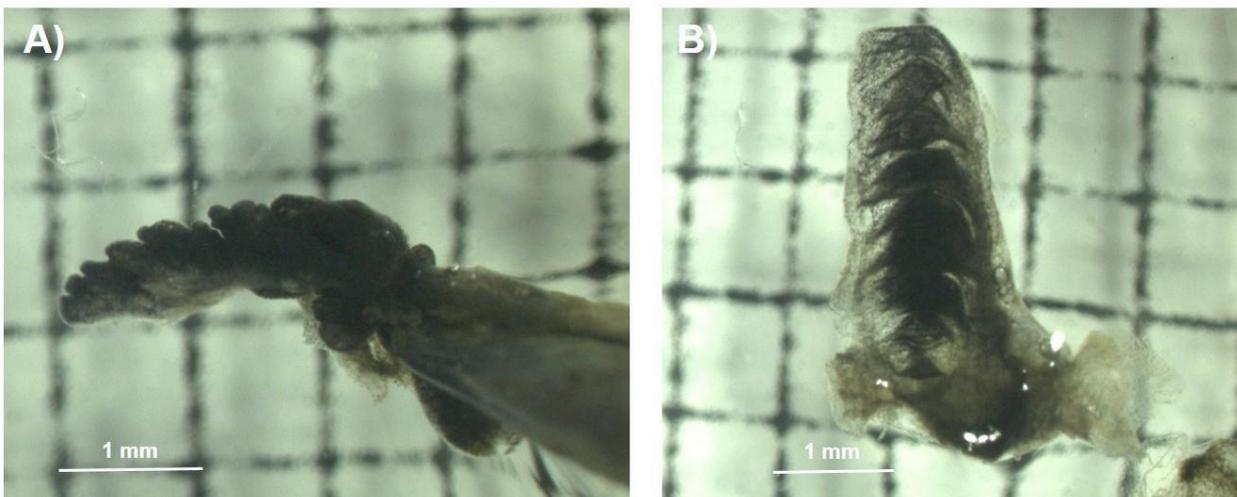
**Fig. 17.- Mantenimiento de los cultivos experimentales en el laboratorio:** (A) cámaras climáticas donde se aclimatan y mantienen los moluscos; (B) cajas de cultivo con aireación continua del agua mediante el uso de tubos flexibles de PVC conectados a diferentes llaves de paso de aire para controlar la intensidad del mismo y (C) matraces para el cultivo de las algas que sirve como complemento alimenticio para los moluscos, con aireación continua.



**Fig. 18.-** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la protoconcha de *Bulinus truncatus*: **(A)** vista frontal protoconcha de *B. truncatus*; **(B)** vista apical protoconcha de *B. truncatus*; **(C)** detalle de la microescultura puntiforme de la protoconcha y **(D)** protoconcha de un ejemplar de *B. truncatus* recién nacido.



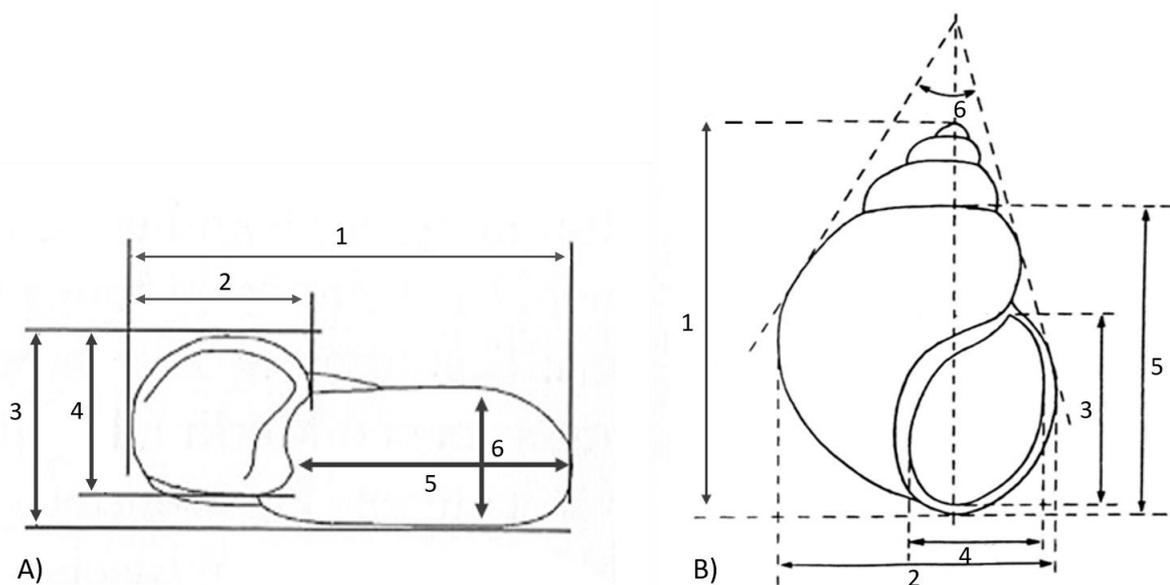
**Fig. 19.-** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la rádula de *B. truncatus*: (A) rádula entera; (B) de abajo a arriba, en rojo se marca la fila de dientes central, en verde filas de dientes laterales y en azul, filas de dientes marginales; (C) detalle a más aumentos de los dientes centrales (en rojo) y los laterales (en verde); (D) a la izquierda en verde, dientes laterales y a la derecha en azul, dientes marginales.



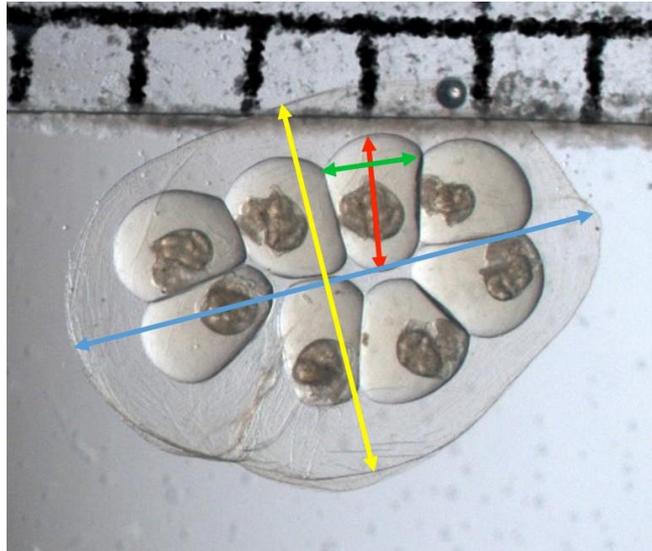
**Fig. 20.-** Pseudobranchia *B. truncatus*: (A) Vista lateral; (B) Vista frontal.



**Fig. 21.- Orificio genital masculino de *B. truncatus*.** La flecha de color blanco indica la situación exacta del orificio genital masculino, en la base del tentáculo izquierdo justo en el lado opuesto donde se localiza el ojo.



**Fig. 22.- Esquema de las medidas morfométricas para planórbidos y lymnaeidos:** (A) esquema de medidas llevadas a cabo en *P. metidjensis*, donde se mide (1) la longitud de la concha, (2) la longitud de la abertura, (3) el diámetro o anchura de la concha, (4) el diámetro de la abertura, (5) la longitud de la última vuelta de espira y (6) la anchura de la última vuelta de espira; (B) esquema de medidas morfométricas utilizado para *Lymnaea* y *Bulinus* (teniendo en cuenta que la concha es levogira), (1) longitud de la concha, (2) anchura de la concha, (3) longitud de la abertura, (4) anchura de la abertura, (5) longitud de la última vuelta de espira y (6) ángulo del ápice de la concha. Fuentes: Glöer & Meier-Brook, 1994; J.A. Oviedo *et al*, 1995.



**Fig. 23.- Principales medidas morfométricas de los clústers de huevos emitidos por los moluscos.** Cluster de *B. truncatus*: a flecha azul representa la longitud del clúster, la amarilla el diámetro del mismo; la roja marca la longitud del huevo y la verde el diámetro del mismo.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**



## **4.- RESULTADOS**

### **4.1.- ESPECÍMENES DE *BULINUS***

Fueron 90 ejemplares de la especie *Bulinus truncatus*, los que se utilizaron para el estudio de crecimiento y autofecundación. Los resultados obtenidos de dichos estudios se explican a continuación, en distintos apartados según el tipo de estudio llevado a cabo. Además, se exponen también los resultados del estudio sobre la determinación de eufalía/afalía de ejemplares de esta especie de planórbido, procedentes de Cerdeña (Italia).

#### **4.1.1.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA**

A partir de ejemplares adultos de *B. truncatus* recolectados en El Ejido (Almería), se utilizó como primera generación un grupo de 30 ejemplares, a partir de los cuales se obtuvieron dos generaciones más del mismo tamaño muestral.

Para el seguimiento del crecimiento, los resultados obtenidos de las medidas morfométricas realizadas sobre las tres generaciones de *B. truncatus*, se incluyeron en una gran Tabla Excel, donde se recogen ocho medidas y tres proporciones entre la longitud de la concha y otras tres medidas morfométricas estudiadas. Del mismo modo, se muestra la dinámica seguida por cada una de las tres generaciones para todas las medidas realizadas (Figuras 24-31).

#### **4.1.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN**

Para el estudio completo de todas las características de la autofecundación del planórbido *B. truncatus*, se dispuso de un total de 90 ejemplares, divididos en tres generaciones compuestas cada una de ellas por 30 ejemplares. A los 65 días de vida, el 100% de los ejemplares de la primera generación, se había autofecundado, mientras que los de la segunda y la tercera generación, lo hicieron a los 60 y 55 días de vida respectivamente. Los resultados del estudio detallado de la autofecundación de las tres generaciones se efectuó oportunamente mediante tablas Excel.

#### **4.1.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS**

Para el seguimiento periódico de la emisión de puestas, se analizaron un total de 90 ejemplares de *B. truncatus*. Los resultados obtenidos sobre la emisión de clusters y huevos de cada una de las tres generaciones, fueron debidamente estudiados y analizados.

Para una mejor comprensión, en las Figuras 32, 33, 34 y 35 se muestra la dinámica seguida por las tres generaciones estudiadas respecto a la emisión de clusters y huevos a lo largo de su período de puesta, representándose el comportamiento de las tres generaciones respecto a la emisión de clusters y huevos en los dos primeros y el promedio de emisión en los dos últimos gráficos.

#### **4.1.4.-ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS**

En este estudio, se contabilizaron los clusters y los huevos emitidos a lo largo de la vida de los 90 ejemplares de *B. truncatus* que llegaron a autofecundarse. Los resultados obtenidos para cada una de las tres generaciones fueron distribuidos en grandes tablas Excel con el fin de permitir su análisis comparativo y su estudio estadístico con el fin ulterior de comparar generaciones y especies.

#### **4.1.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS**

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos contenidos en éstos, fue analizada para tres generaciones de *B. truncatus*. En todas ellas, se observó una morfología de los clusters entre redonda y ovalada, con la parte central ensanchada y los extremos romos.

A su vez, eran planos por la parte inferior, es decir, por la parte por la que quedan adheridos a la superficie donde son depositados. Los huevos contenidos en los clusters, estaban dispuestos espacialmente en el mismo plano, unos pegados a otros, presentando un contorno bien definido y morfología muy similar a los granos de una granada; pudiéndose observar el movimiento del embrión en su interior.

En la primera generación se tomaron las medidas morfométricas de un total de 101 clusters y 691 huevos, emitidos por los 30 ejemplares de *B. truncatus* que se autofecundaron. En la segunda generación se midieron un total de 118 clusters y 710

huevos, emitidos por los 30 ejemplares que se autofecundaron. Por último, en la tercera generación se tomaron las medidas morfométricas de un total de 94 clusters y 459 huevos, emitidos por los ejemplares que se autofecundaron. Los resultados obtenidos del conjunto de las tres generaciones para dichas medidas fueron motivo del adecuado análisis comparado.

#### **4.1.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS**

A partir de los clusters emitidos por los ejemplares sometidos a la experiencia de autofecundación, se procedió a estudiar la cantidad de huevos que eclosionaban y los que no respecto al total de emitidos, así como también el tiempo que tardaban en madurar para finalmente eclosionar. Los resultados obtenidos para cada generación estudiada se exponen a continuación.

En la primera generación, el porcentaje de huevos eclosionados fue de un 98,81%, ya que, de un total de 10.546 huevos emitidos por los 30 ejemplares que se autofecundaron, 10.399 eclosionaron y se desarrollaron exitosamente, mientras que 141 no llegaron a eclosionar.

En el caso de la segunda generación, de un total de 8.519 huevos emitidos por los 30 ejemplares que se autofecundaron, 8.333 llegaron a eclosionar y se desarrollaron favorablemente, mientras que 194 no llegaron a eclosionar. De modo que, el porcentaje de huevos eclosionados fue del 97,81%.

Por último, para la tercera generación, el porcentaje de huevos eclosionados fue del 96,26%, ya que, de un total de 6.150 huevos emitidos por esta población, 5.920 eclosionaron y se desarrollaron favorablemente, mientras que 230 no llegaron a eclosionar. Los resultados del estudio de viabilidad de las tres generaciones de *B. truncatus* fueron objeto de los correspondientes y oportunos análisis.

#### **4.1.7.- ESTUDIO EUFALÍA/AFALÍA DE *BULINUS* DE CERDEÑA (ITALIA)**

Para la determinación de la eufalía/afalía de cada uno de los ejemplares de *B. truncatus* procedentes de Cerdeña (Italia) que se analizaron; los resultados obtenidos para las tres generaciones de cada una de las dos réplicas que se hicieron de esta experiencia fueron debidamente estudiados para sus ulteriores análisis compartados.

Se partió de un total de 30 ejemplares ya adultos, que fueron considerados como parentales, divididos en dos grupos de 15, a partir de los cuales se obtuvieron dos generaciones más compuestas de 20 y 21 ejemplares en total. No se observó un patrón definido para la eufalía/afalía de las tres generaciones estudiadas.

#### **4.2.- ESPECÍMENES DE *PLANORBARIUS***

Los estudios de crecimiento y autofecundación para *P. metidjensis*, se llevaron a cabo sobre un total de 90 ejemplares repartidos en tres generaciones formadas por 30 ejemplares cada una. Los resultados de cada uno de los estudios llevados a cabo se muestran a continuación en distintos apartados.

##### **4.2.1.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA**

Para la especie *P. metidjensis* se estudió, de igual modo que para *B. truncatus*, la variabilidad de las medidas morfométricas de la concha, a lo largo de la vida de las tres generaciones sobre las que se realizó la experiencia. Se hizo el seguimiento del crecimiento de un total de 90 individuos de *P. metidjensis*. Los resultados obtenidos de las distintas medidas morfométricas para las tres generaciones de esta especie de planórbido, se analizaron mediante tablas Excel y se recogen en las Figuras 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42.

##### **4.2.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN**

El estudio de autofecundación se realizó sobre un total de 55 ejemplares de *P. metidjensis*, ya que, en el caso de esta especie de planórbido, no se autofecundaron el total de 90 ejemplares (30 por generación) con los que se inició la experiencia.

El porcentaje de autofecundación de la primera generación fue de 73,3%, ya que, solo 22 del total de 30 ejemplares se autofecundaron. Esta generación tardó de 3 a 4 meses en empezar a emitir clusters. En la segunda generación de *P. metidjensis* solo se autofecundaron 15 ejemplares de un total de 30, lo que supuso un porcentaje de autofecundación del 50 %, tardando más de 3 meses en emitir la primera puesta.

Por último, la tercera generación de *P. metidjensis* se autofecundó en un 60% y tardó entre 3 y 4 meses en madurar sexualmente y empezar a emitir sus primeros clusters. Los resultados del estudio detallado de la autofecundación de las tres generaciones se efectuó oportunamente mediante tablas Excel.

#### **4.2.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS**

Los resultados para el seguimiento periódico de la emisión de clusters y huevos por parte de los 55 ejemplares de *P. metidjensis* que se autofecundaron en total para el conjunto de las tres generaciones, se presentan en las Figuras 43, 44, 45 y 46. En los dos primeros gráficos se muestra el comportamiento de las tres generaciones mientras que en los dos últimos se muestra el promedio de emisión de clusters y huevos respectivamente.

#### **4.2.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS**

Para llevar a cabo este estudio, se contabilizaron los clusters y los huevos emitidos a lo largo de la vida de los 55 ejemplares de *P. metidjensis* que se habían autofecundado. Los 22 ejemplares de *P. metidjensis* que se tuvieron en cuenta para el análisis de la primera generación, emitieron un total 116 clusters y 273 huevos.

En el caso de la segunda generación, los 15 ejemplares que se autofecundaron llegaron a emitir 140 clusters y 559 huevos. Mientras que, los 18 ejemplares de la tercera generación, emitieron 149 clusters y 422 huevos. Los resultados obtenidos para cada una de las tres generaciones fueron distribuidos en grandes tablas Excel con el fin de permitir su análisis comparativo y su estudio estadístico con el fin ulterior de compara generaciones y especies.

#### **4.2.5.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LAS PUESTAS**

Se analizó la variabilidad morfométrica de los clusters y huevos contenidos en éstos, para tres generaciones de *P. metidjensis*.

Por un lado, se observó que los clusters presentaban una morfología circular, aunque no perfecta, siendo más largos que anchos aquellos que eran de gran tamaño,

con la parte central ensanchada y los extremos romos. Los clusters de tamaño medio y pequeño eran prácticamente redondos. A su vez, eran planos por la parte por la que quedan adheridos a la superficie donde son depositados.

Por otro lado, los huevos contenidos en los clusters, estaban dispuestos espacialmente en el mismo plano y de forma contigua a modo de collar de perlas, presentando un contorno bien definido y morfología muy similar a los granos de una granada; pudiéndose observar el movimiento del embrión en su interior. Los resultados obtenidos para clusters y huevos de las tres generaciones fueron oportunamente estadísticamente analizados.

En el estudio de variabilidad de las puestas de la primera generación se estudiaron las características morfométricas de un total de 66 clusters y 170 huevos. De la segunda generación, se analizaron morfométricamente un total de 33 clusters y 167 huevos y para la tercera generación, se estudió la variabilidad de distintas características morfométricas de 35 clusters y 146 huevos.

#### **4.2.6.- ESTUDIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS**

En el estudio de la viabilidad de los huevos emitidos por los ejemplares de cada generación, se tuvo en cuenta la cantidad de huevos que habían eclosionado respecto al número total de huevos emitidos, así como también el tiempo que tardaban en eclosionar los mismos. Los resultados obtenidos para cada generación estudiada se muestran a continuación.

En la primera generación de un total de 273 huevos solo eclosionaron 190, por lo que el porcentaje de huevos viables para esta generación fue de 69,59 %, tardando la gran mayoría 12 días en eclosionar. La segunda generación de *P. metidjensis* emitió un total de 559 huevos de los cuales solo eclosionaron 395, suponiendo esto, por tanto, un porcentaje de 70,66%. La mayoría de los huevos emitidos por los ejemplares de esta generación también tardaron 12 días en eclosionar.

Los ejemplares que se autofecundaron de la tercera generación emitieron un total de 422 huevos, de los cuales solo eclosionaron 336 al cabo de 12 días en su mayoría. El porcentaje de viabilidad de los huevos emitidos fue de 79,62%. Los resultados del estudio de viabilidad de las tres generaciones de *B. truncatus* fueron objeto de los correspondientes y oportunos análisis.

### **4.3.- ESPECÍMENES DE *LYMNAEA***

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en los estudios de seguimiento del crecimiento y de la fecundación de un total de 90 ejemplares de *Lymnaea* sp., separando los apartados según el tipo de estudio realizado para dicha especie de molusco vector.

#### **4.3.1.- ESTUDIO SOBRE LA VARIABILIDAD DE LA CONCHA**

Para el seguimiento del crecimiento, se partió de 30 ejemplares nacidos y criados en el laboratorio, procedentes de generaciones anteriores de individuos de *Lymnaea*. que habían sido previamente recolectados en Albalat dels Tarongers (Valencia), en la primavera del año 2013. A partir de esta primera generación, en el laboratorio se obtuvieron dos generaciones más, de 30 ejemplares cada una.

Los resultados obtenidos para las distintas medidas morfométricas estudiadas se recogieron en oportunas hojas Excel que permitieron analizar adecuadamente los resultados y que se muestran a continuación con las Figuras 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 y 54; que representan la dinámica de crecimiento seguida para cada una de las variables estudiadas.

#### **4.3.2.- ESTUDIO DE AUTOFECUNDACIÓN**

El experimento de autofecundación también se llevó a cabo en tres generaciones de *Lymnaea*. En la primera de ellas, solo se tuvieron en cuenta 23 de los 30 ejemplares de *Lymnaea*, ya que fue este número de individuos el que se autofecundó. El porcentaje de autofecundación, por tanto, fue del 76.6%.

Así como en la primera generación solo se autofecundaron 23 ejemplares, en la segunda lo hicieron todos, es decir, los 30 que componían la población, lo que se tradujo en un 100% de autofecundación. En la tercera generación de *Lymnaea*. solo se autofecundaron 24 ejemplares, es decir, el 80% de la población. Los resultados del estudio detallado de la autofecundación de las tres generaciones se efectuó oportunamente mediante tablas Excel.

#### **4.3.3.- ESTUDIO CRONOLÓGICO DE PUESTAS**

Aunque el seguimiento cronológico de la emisión de las puestas se realizó sobre un total de 90 ejemplares de *Lymnaea*, solo se tuvieron en cuenta un total de 77 para la obtención de datos, ya que fue esa cantidad, el total de ejemplares de las tres generaciones que se autofecundó. Los resultados de la cronología de la emisión de puestas, se presenta a continuación, en las Figuras 55, 56, 57 y 58.

#### **4.3.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE PUESTAS**

En este estudio, se contabilizaron tanto clusters como huevos emitidos a lo largo de la vida de los 77 ejemplares de *Lymnaea* que se autofecundaron durante la experiencia. Los resultados obtenidos para cada una de las tres generaciones fueron distribuidos en grandes tablas Excel con el fin de permitir su análisis comparativo y su estudio estadístico con el fin ulterior de compara generaciones y especies.

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

La variabilidad morfométrica de los clusters y de los huevos contenidos en éstos, fue estudiada para tres generaciones de *Lymnaea*. En todas ellas, los clusters mostraron una morfología ovalada, alargada e incurvada en la mayoría de los casos, con su parte central ensanchada y los extremos atenuados. El número de huevos por cluster era mayor o menor, según el área del mismo.

Se observó que los huevos contenidos en los clusters, estaban dispuestos espacialmente en distinto plano, separados unas pocas micras unos de otros presentando un contorno bien definido, pudiéndose observar el movimiento del embrión en su interior. Según el plano en el que estaban dispuestos los huevos, su morfología tenía una apariencia más redonda o más ovalada, pero la diferencia era mínima.

En la primera generación se tomaron las medidas morfométricas de un total de 81 clusters y 360 huevos, emitidos por los 23 ejemplares de *Lymnaea*. que se autofecundaron, mientras que en la segunda fue un total de 81 clusters y 389 huevos, sobre los que se estudió la variabilidad de las características morfométricas analizadas. En el caso de la tercera generación, en la cual solo se autofecundaron 24 ejemplares

del total de 30, se estudiaron un total de 154 clusters y 850 huevos. Los resultados obtenidos del conjunto de las tres generaciones para dichas medidas fueron motivo del adecuado análisis comparado.

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

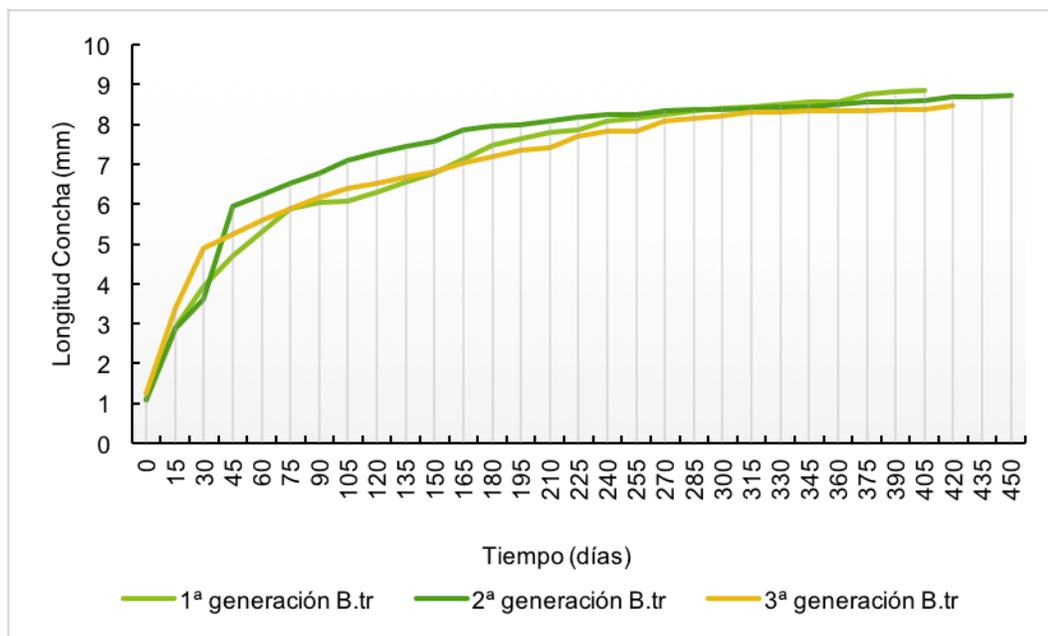
A partir de los clusters emitidos por los ejemplares sometidos al experimento de autofecundación, se procedió a estudiar la cantidad de huevos que eclosionaban y los que no respecto al total de emitidos, así como también el tiempo que tardaban en eclosionar los huevos, para poder deducir la capacidad que tenían los embriones de sobrevivir y desarrollarse dentro de los huevos y una vez eclosionados éstos.

En la primera generación, de un total de 539 huevos emitidos, 397 eclosionaron y se desarrollaron exitosamente, mientras que 142 no llegaron a eclosionar. Por tanto, el porcentaje de huevos eclosionados fue de un 73,65%.

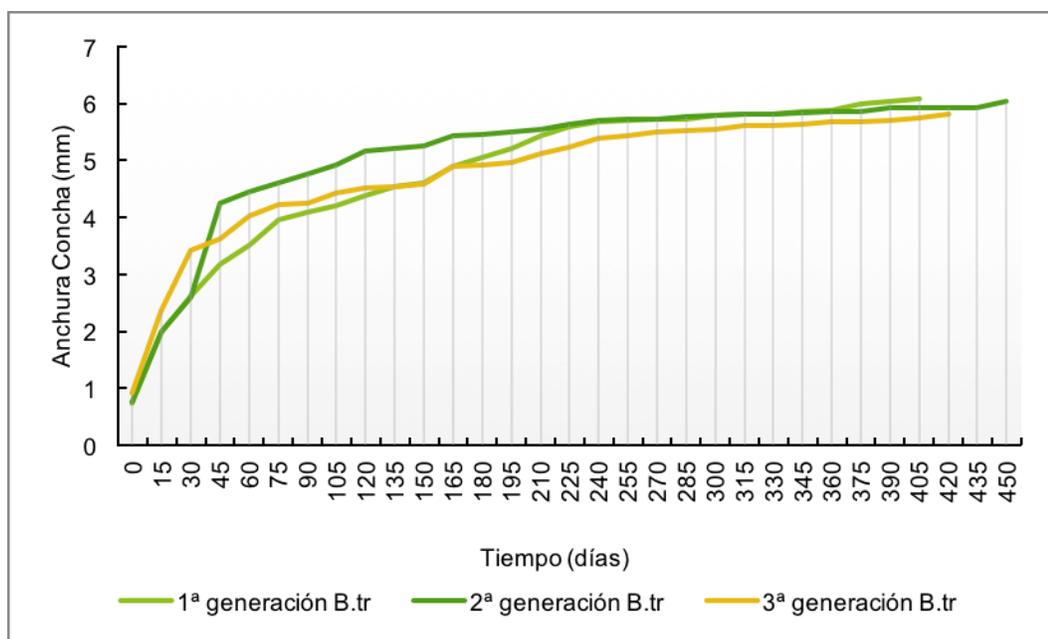
Sin embargo, en la segunda generación, de un total de 1402 huevos emitidos por todos los ejemplares que se autofecundaron, 1223 eclosionaron dando lugar a moluscos recién nacidos que se desarrollaron a lo largo del tiempo, sin embargo, fueron 182 los huevos que no llegaron a eclosionar. El porcentaje de eclosión de huevos para esta generación fue del 87,23%.

No obstante, en la tercera generación, de un total de 1244 huevos emitidos, 1126 eclosionaron y se desarrollaron favorablemente, mientras que 118 no llegaron a hacerlo. El porcentaje de eclosión para esta generación fue del 90,50%. Los resultados obtenidos para el estudio de viabilidad de los huevos fueron objeto de los correspondientes y oportunos análisis.

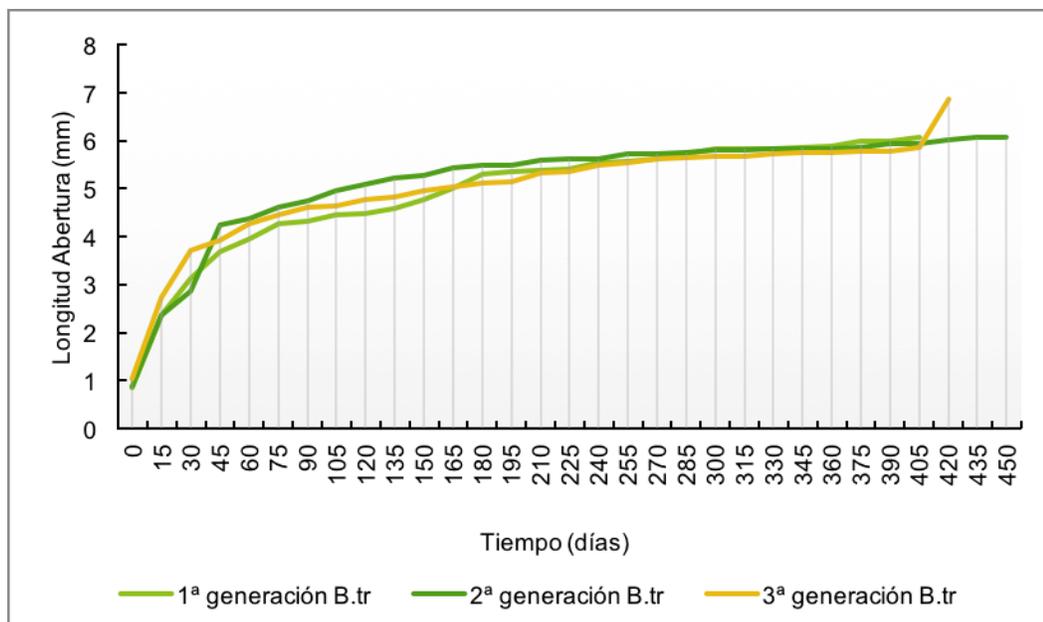




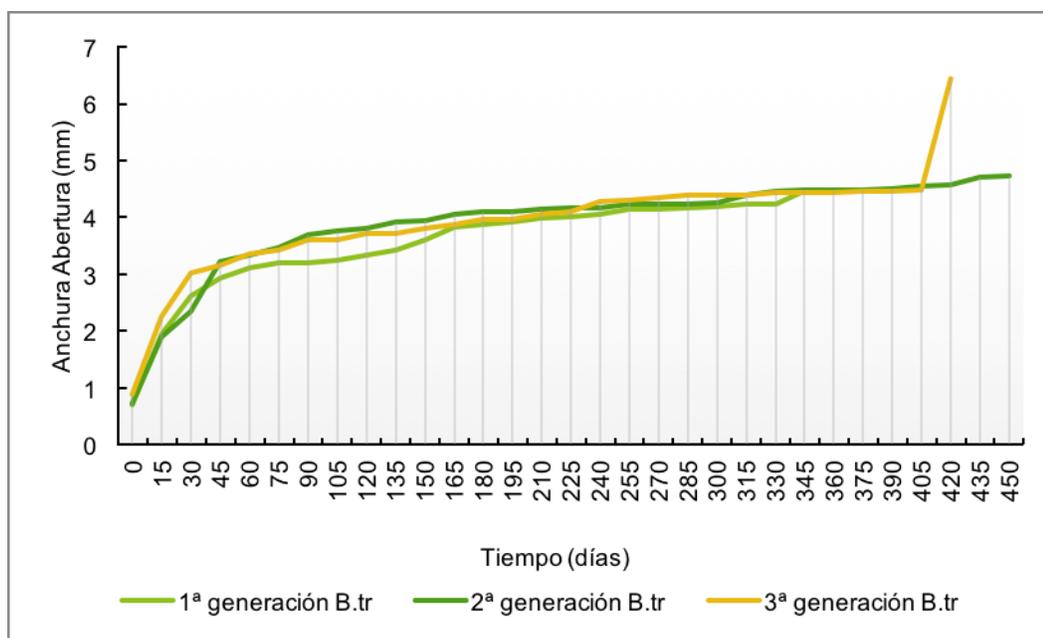
**Fig. 24.-** Variabilidad de la longitud de la concha de ejemplares de *B. truncatus* pertenecientes a tres generaciones distintas a lo largo del tiempo.



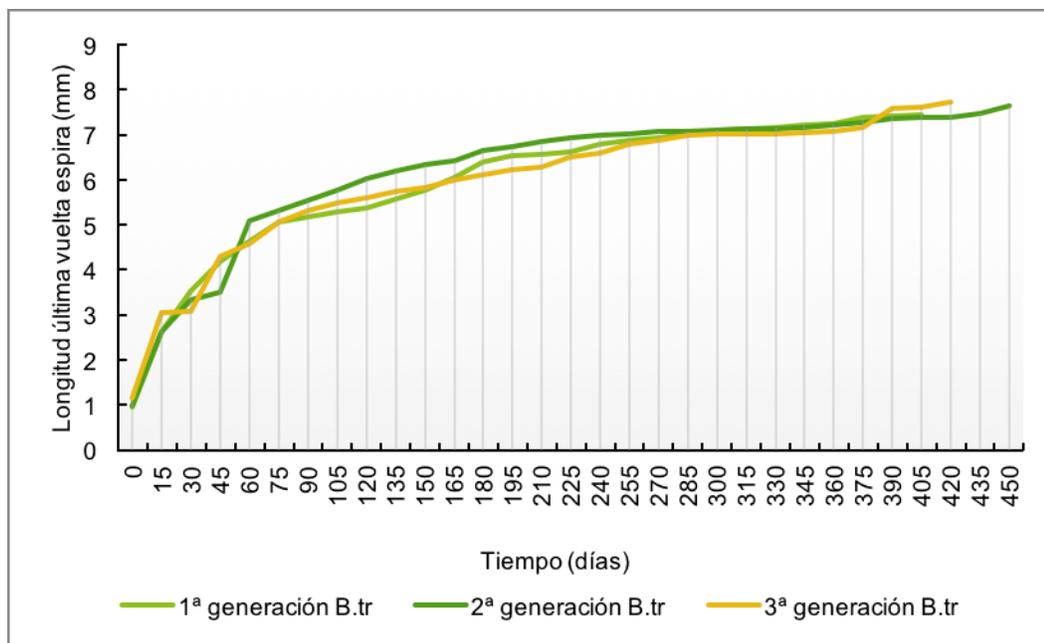
**Fig. 25.-** Variabilidad de la anchura de la concha de los ejemplares de *B. truncatus* con el tiempo teniendo en cuenta las tres generaciones.



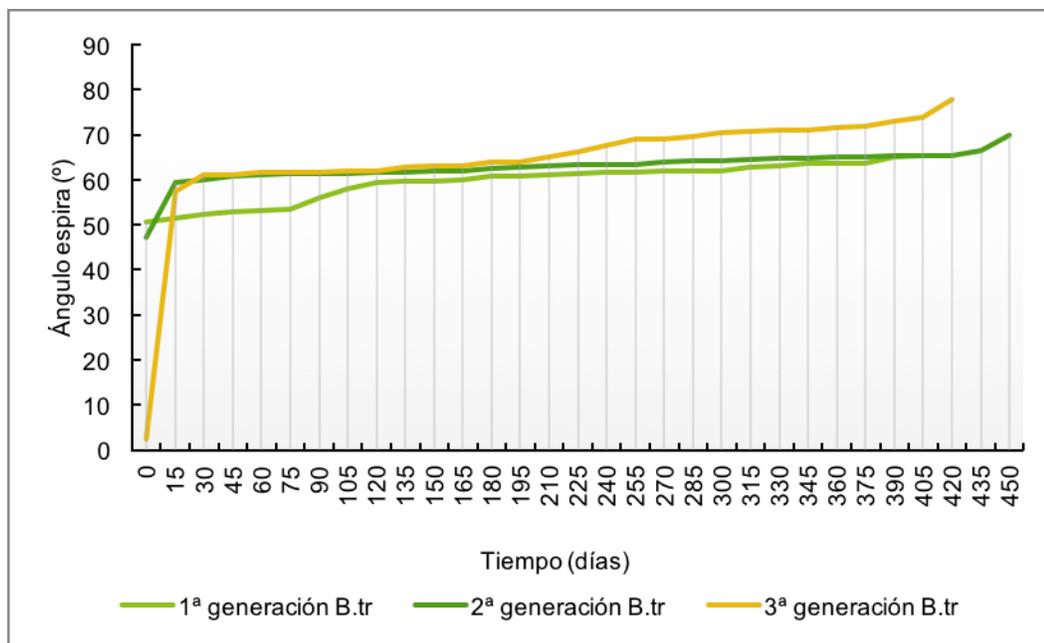
**Fig. 26.-** Variabilidad de la longitud de la abertura de los ejemplares de las tres generaciones de *B. truncatus* estudiadas.



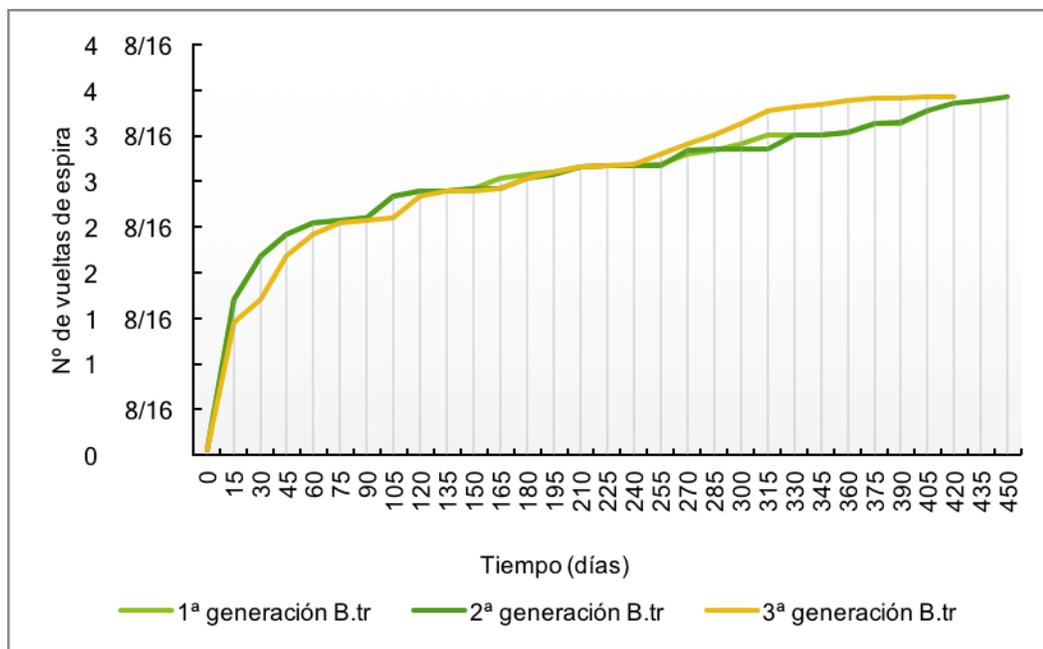
**Fig. 27.-** Variabilidad de la anchura de la abertura a lo largo del tiempo, para los ejemplares de las tres generaciones de *B. truncatus*.



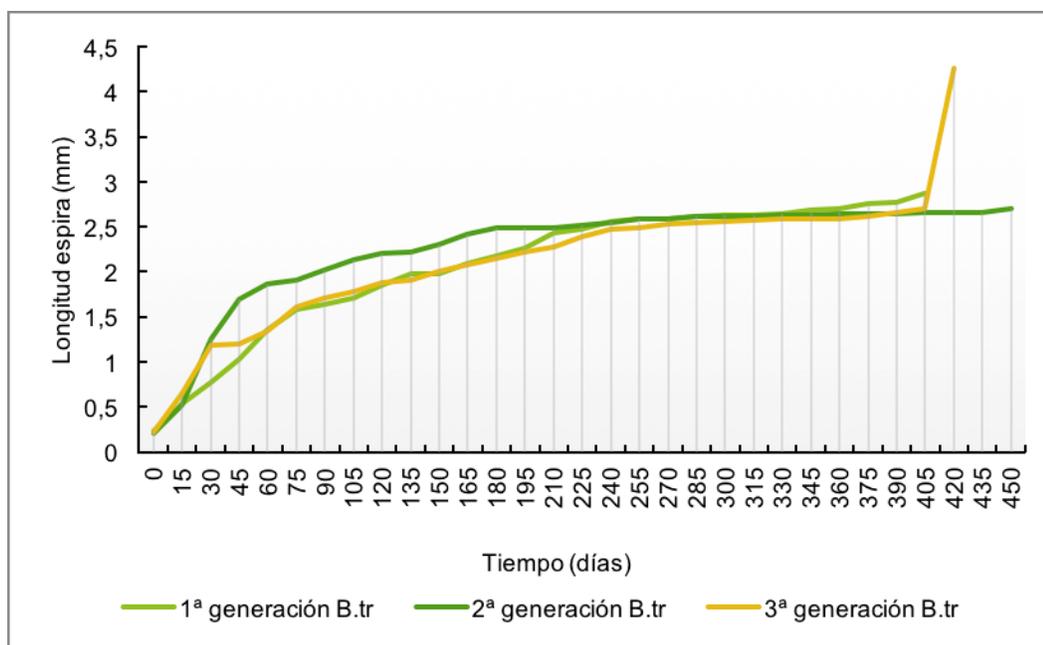
**Fig. 28.-** Variabilidad de la longitud de la última vuelta de espira a lo largo del tiempo, para los ejemplares de *B. truncatus* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



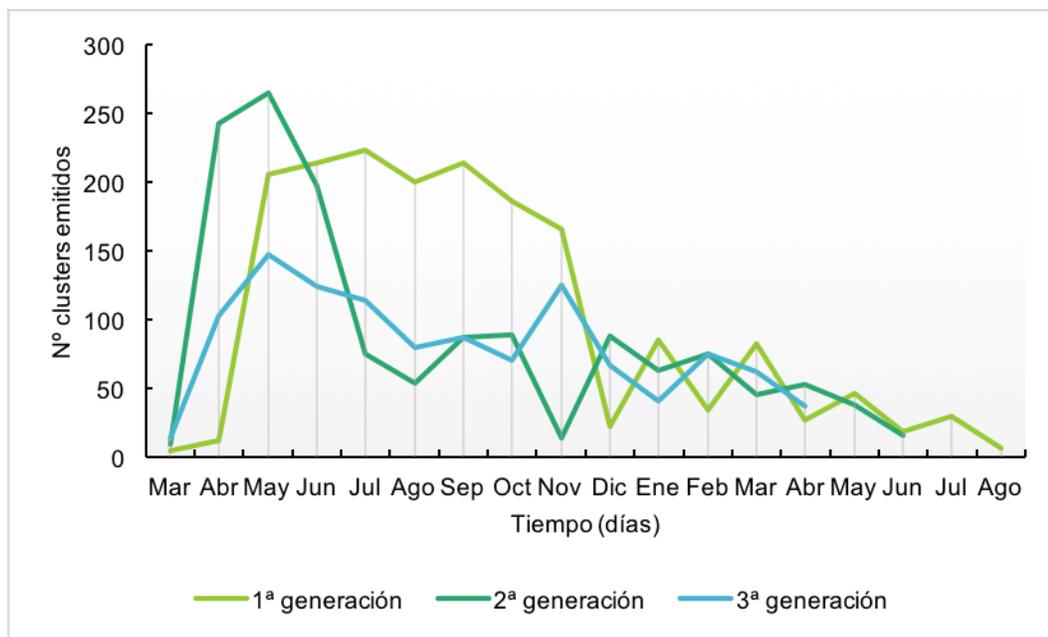
**Fig. 29.-** Variabilidad del ángulo de la espira a lo largo del tiempo para los ejemplares de *B. truncatus* de las tres generaciones analizadas.



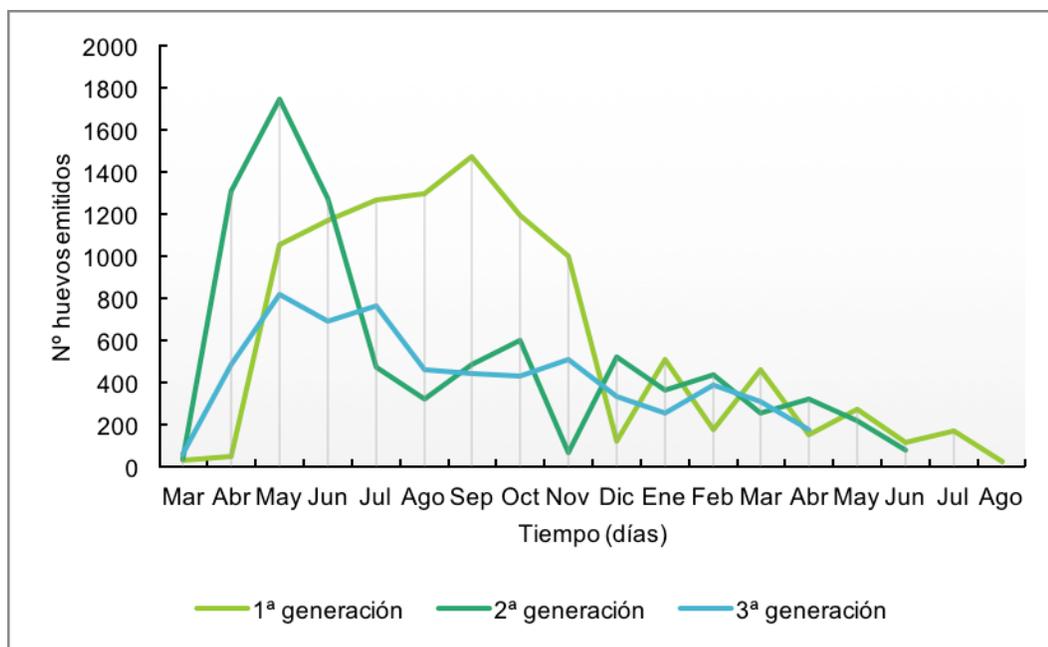
**Fig.30.-** Variabilidad, a lo largo del tiempo, del número de vueltas de espira de las 3 generaciones de *B. truncatus* estudiadas.



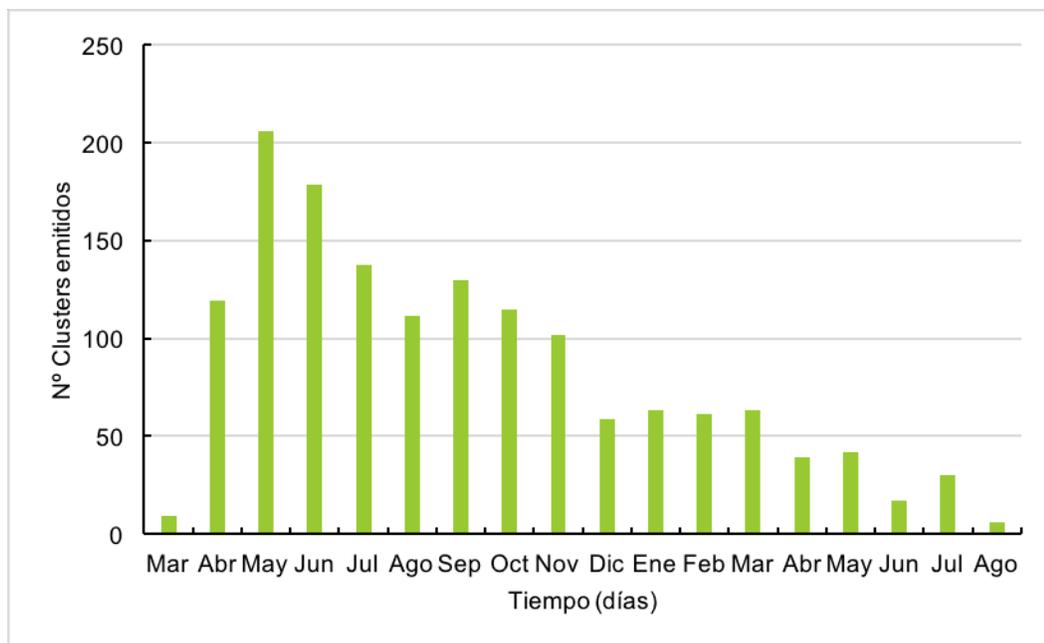
**Fig.31.-** Variabilidad de la longitud de la espira de los ejemplares de *B. truncatus* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



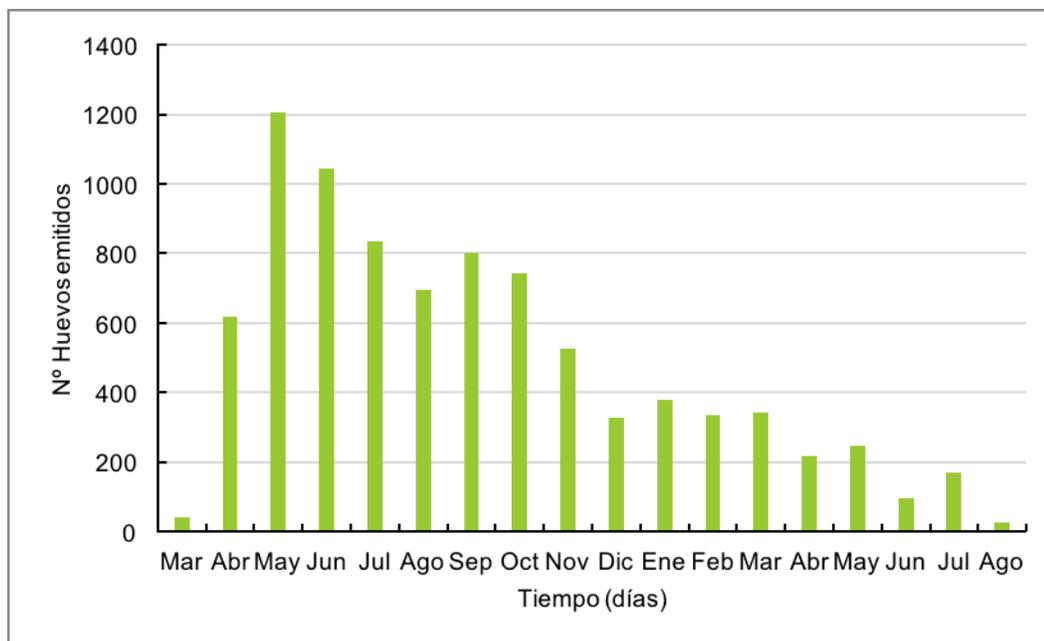
**Fig. 32.-** Dinámica de emisión de clusters seguida por los ejemplares de las tres generaciones estudiadas de *B. truncatus* durante su período de puesta.



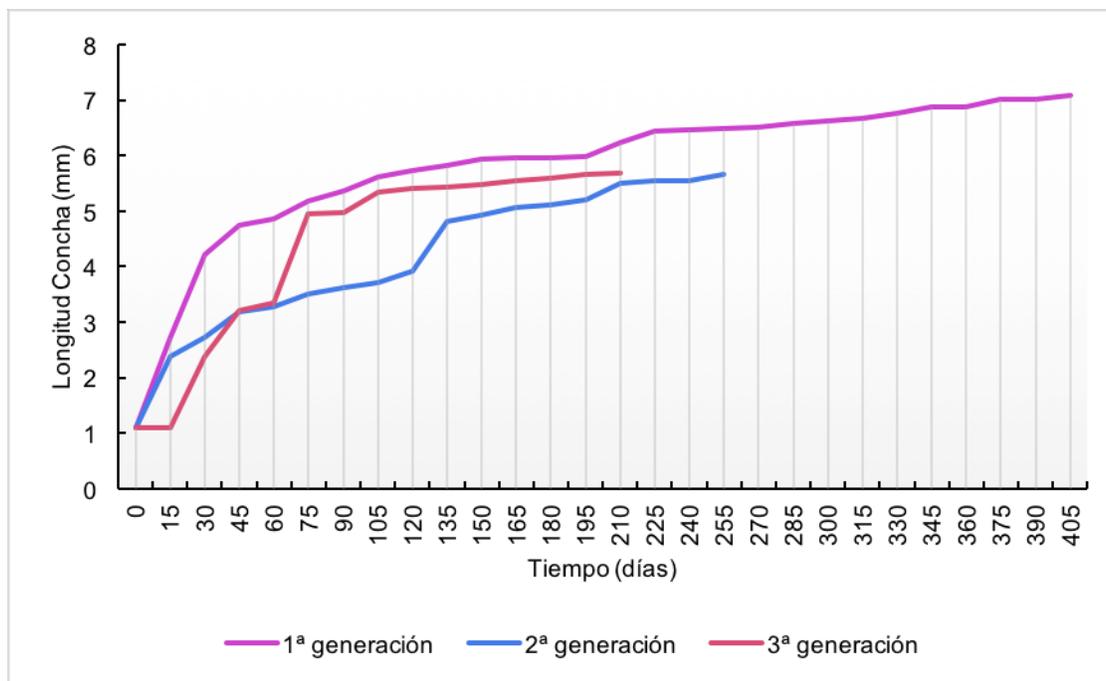
**Fig. 33.-** Dinámica de emisión de huevos seguida por los 90 ejemplares de las tres generaciones estudiadas de *B. truncatus*.



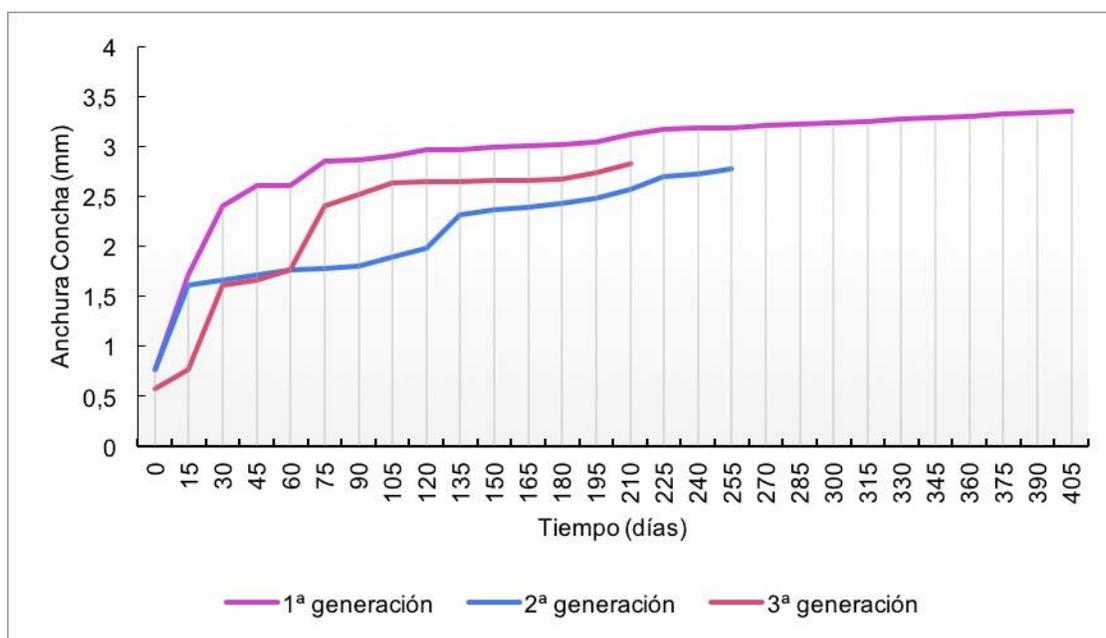
**Fig. 34.-** Promedio de clusters emitidos por las tres generaciones de *B. truncatus* cada mes durante su período de puesta.



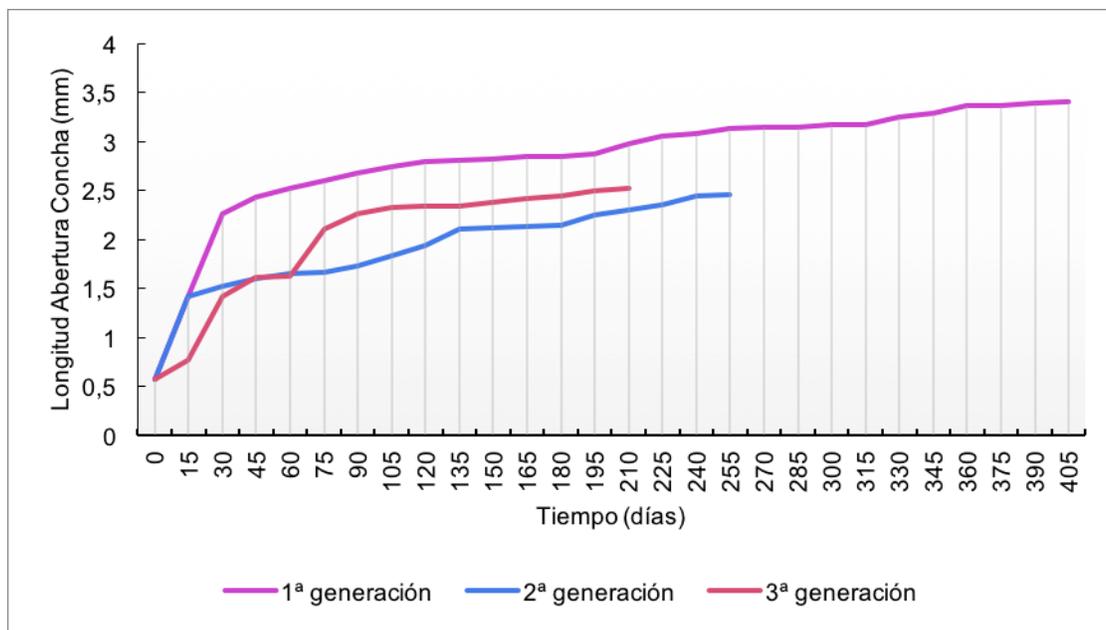
**Fig. 35.-** Promedio de huevos emitidos por los 90 ejemplares de las tres generaciones de *B. truncatus* que se analizaron.



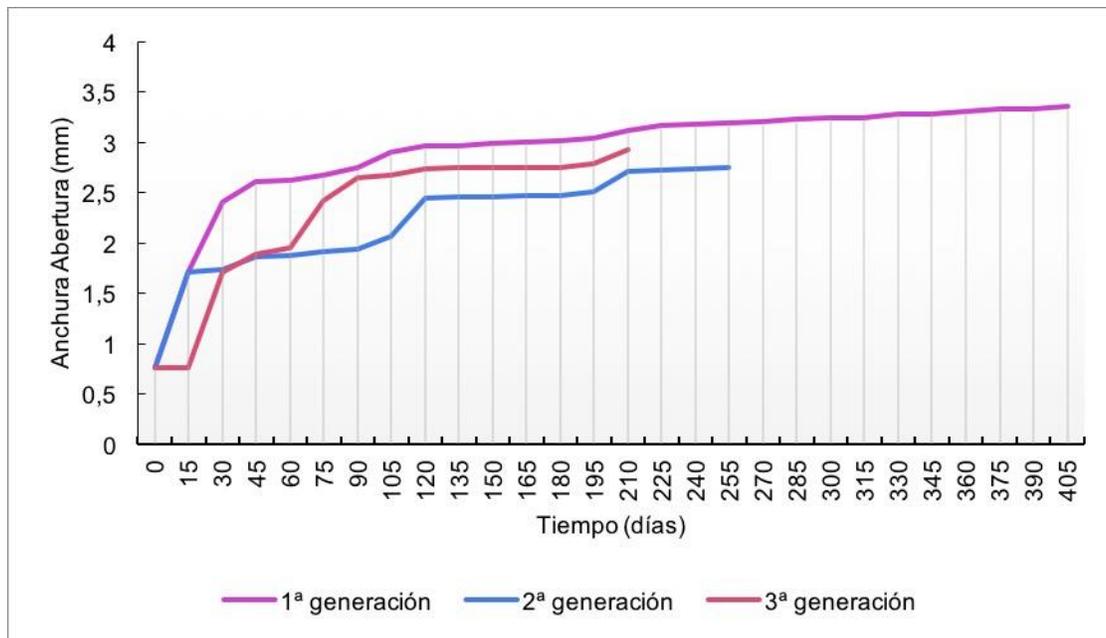
**Fig. 36.-** Variabilidad de la longitud de la concha a lo largo del tiempo, de los ejemplares de las tres generaciones estudiadas de *P. metidjensis*.



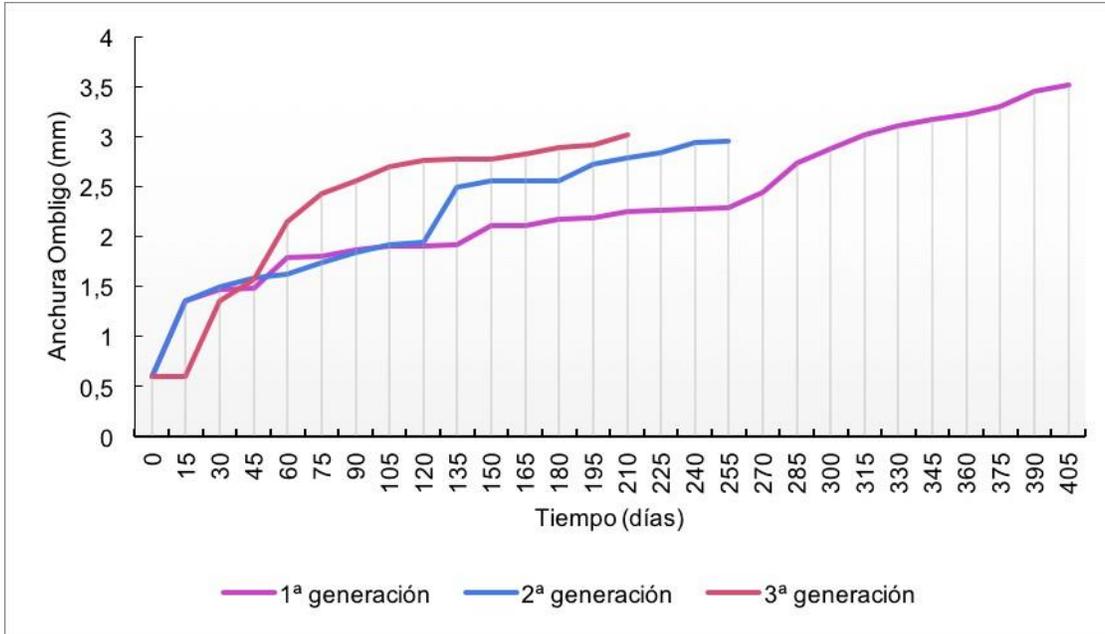
**Fig. 37.-** Variabilidad de la anchura de la concha con el tiempo, de los ejemplares de *P. metidjensis*, pertenecientes a tres generaciones.



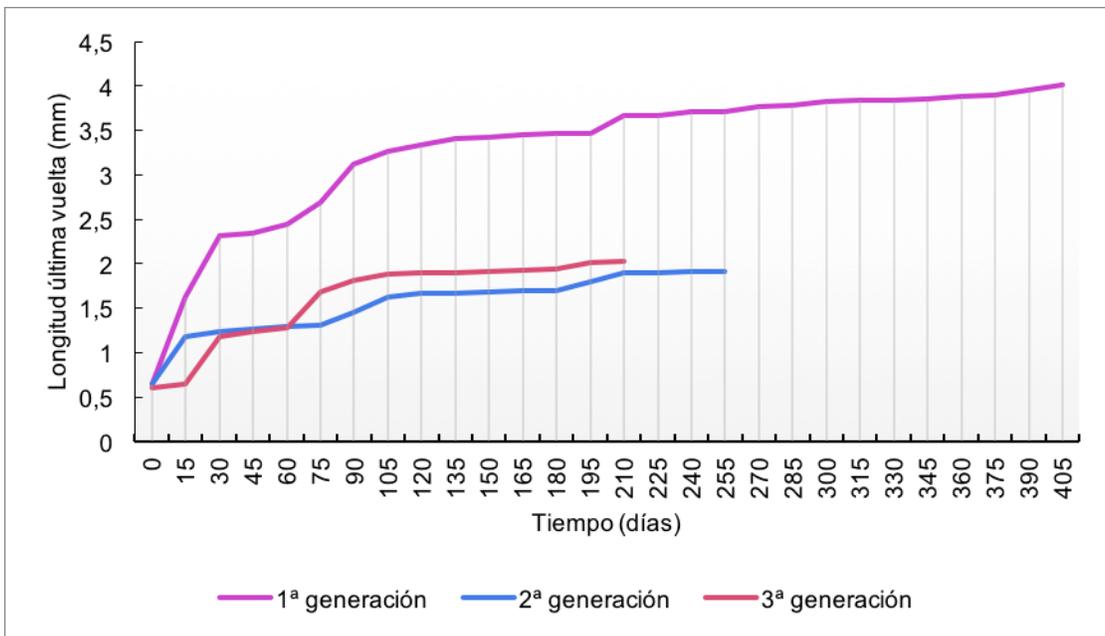
**Fig. 38.-** Variabilidad de la longitud de la abertura de la concha del total de ejemplares de *P. metidjensis* que se estudiaron en las tres generaciones.



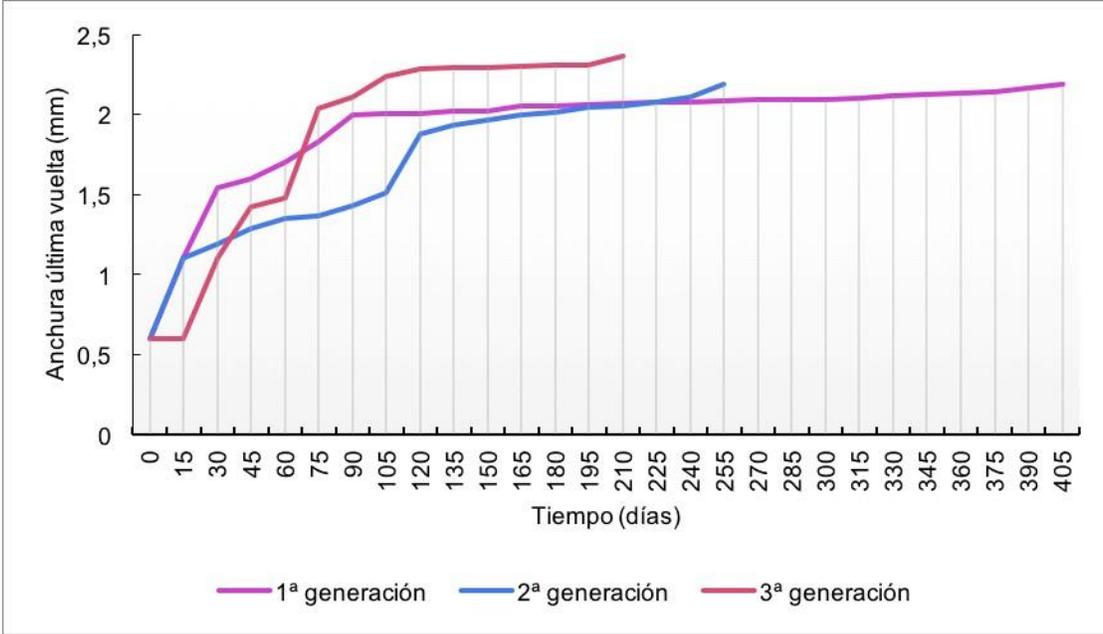
**Fig. 39.-** Variabilidad de la anchura de la abertura de la concha en el conjunto de ejemplares de *P. metidjensis* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



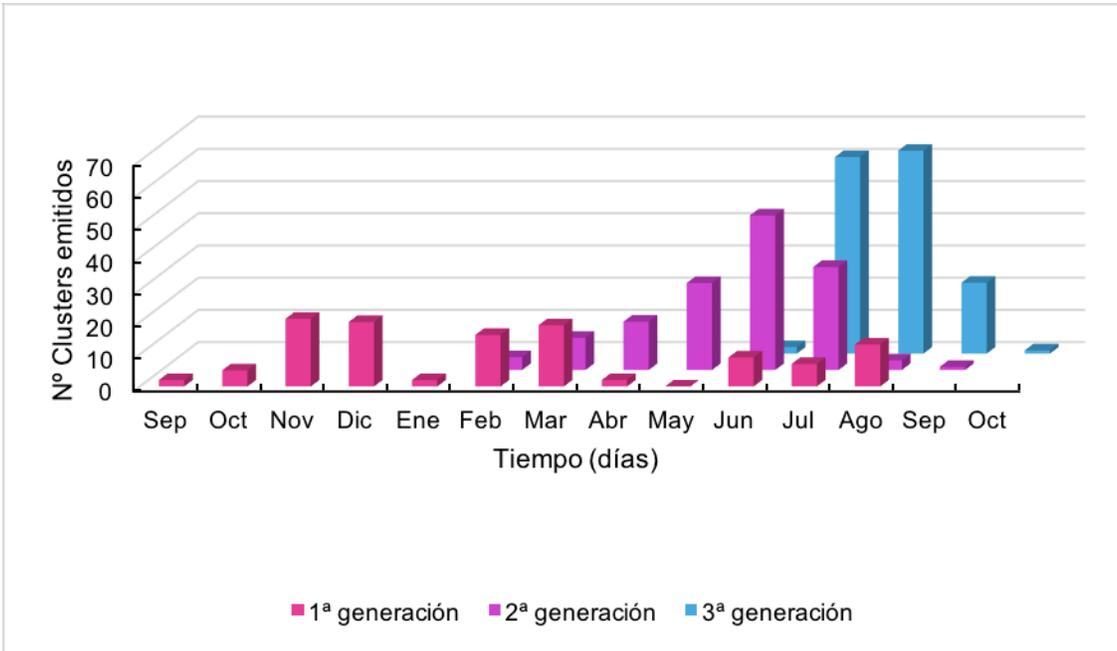
**Fig. 40.-** Variabilidad de la anchura del ombligo de la concha del conjunto de ejemplares de *P. metidjensis* analizados y pertenecientes a tres generaciones distintas.



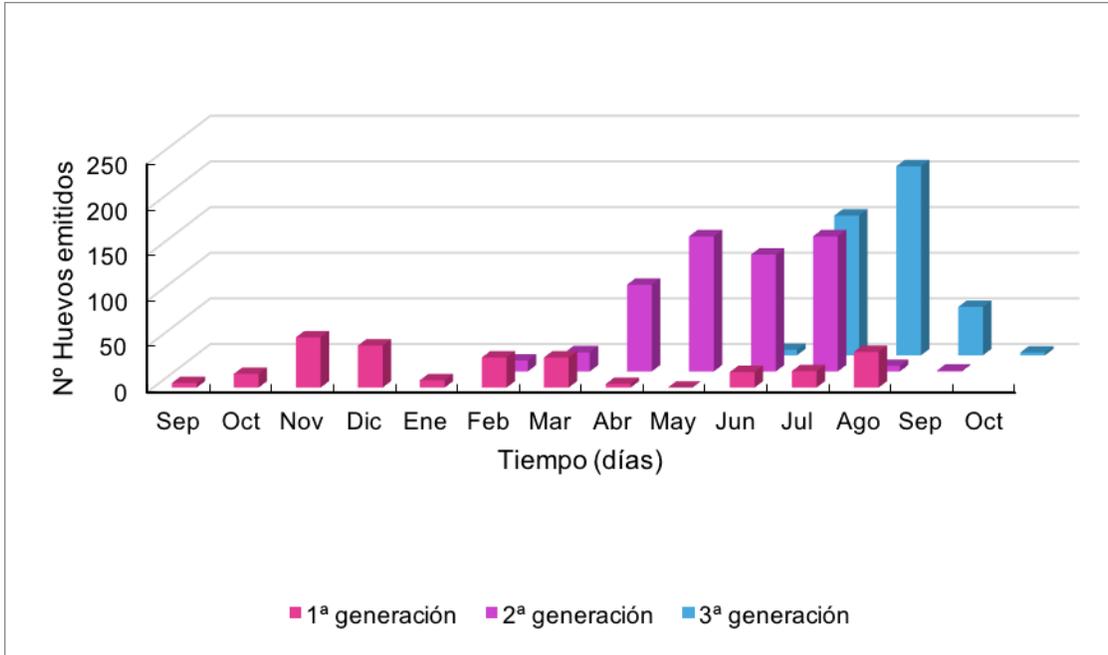
**Fig. 41.-** Variabilidad de la longitud de la última vuelta de espira a lo largo del tiempo, para los ejemplares de las tres generaciones de *P. metidjensis* analizadas.



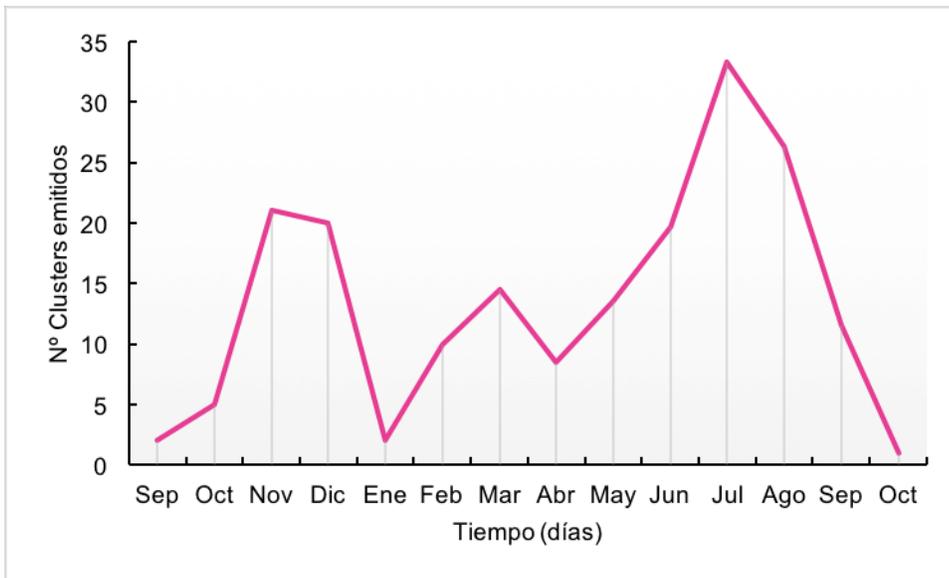
**Fig. 42.-** Variabilidad en el tiempo de la anchura de la última vuelta de espira en los ejemplares de *P. metidjensis* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



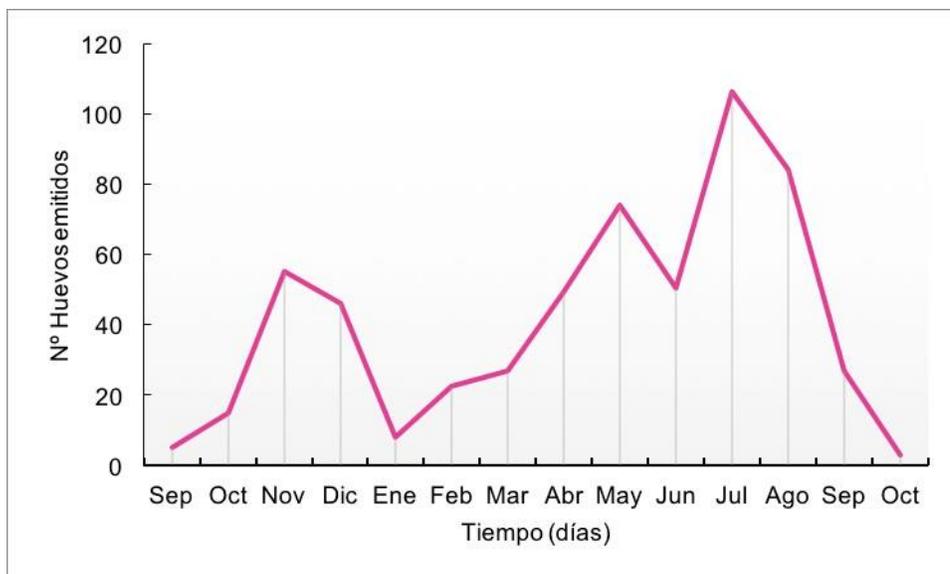
**Fig. 43.-** Cronología de la emisión de clusters por los ejemplares autofecundados de cada una de las tres generaciones estudiadas de *P. metidjensis*.



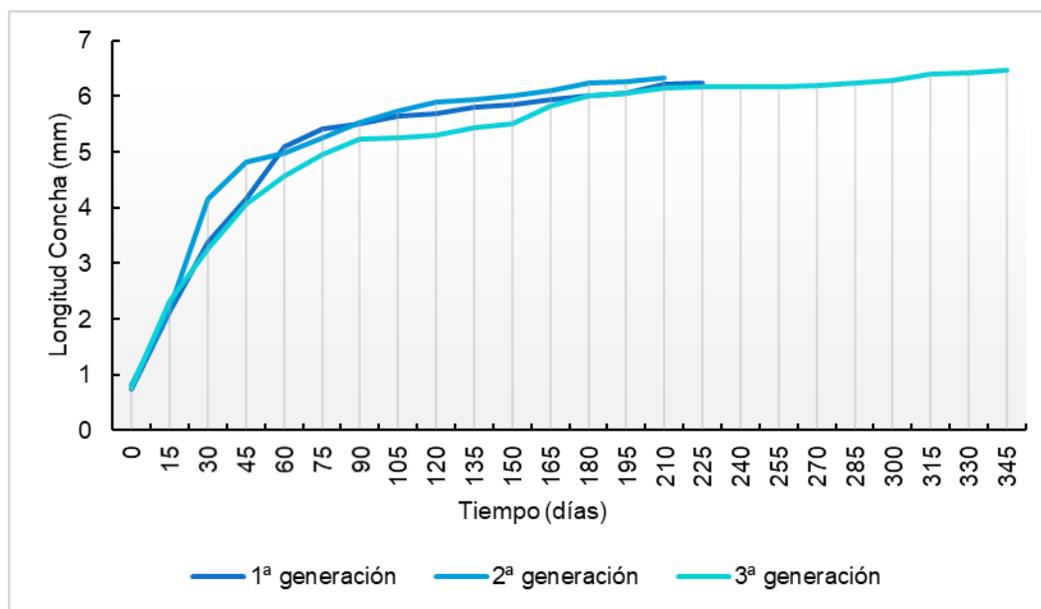
**Fig. 44.-** Cronología de emisión de huevos de los ejemplares autofecundados de las tres generaciones estudiadas de *P. metidjensis*.



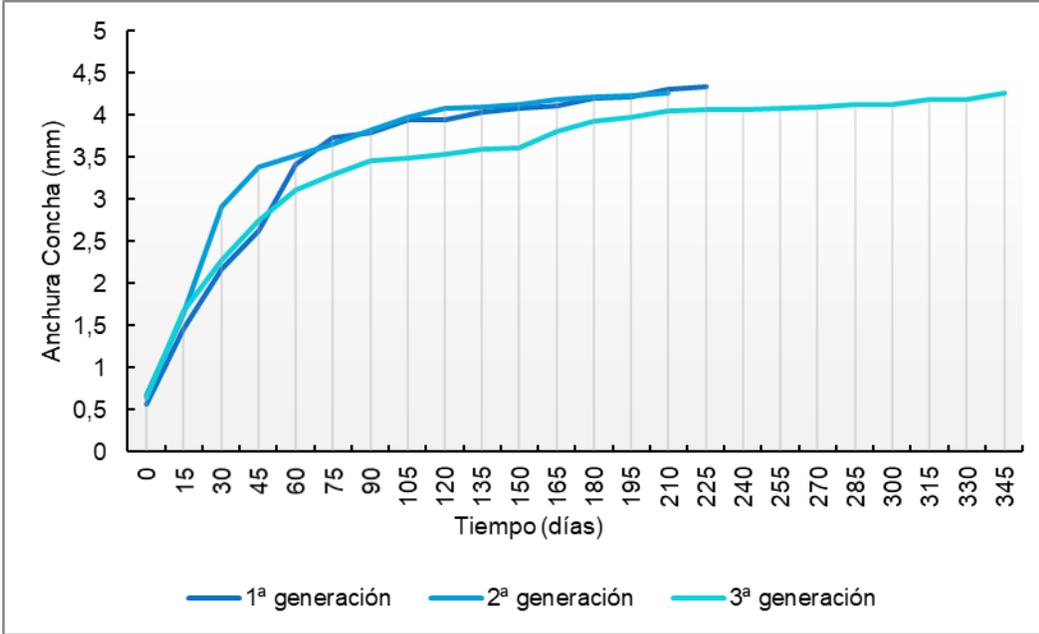
**Fig. 45.-** Promedio de la emisión de clusters a lo largo del tiempo, de los ejemplares de *P. metidjensis* de las tres generaciones estudiadas.



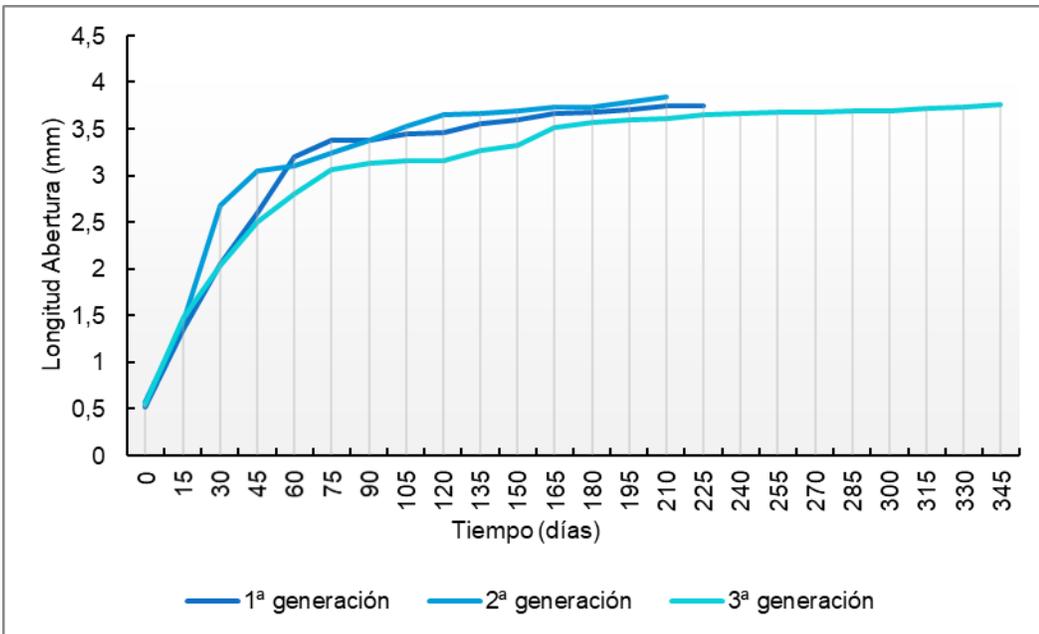
**Fig. 46.-** Promedio de la emisión de huevos a lo largo del tiempo, por parte de los ejemplares de *P. metidjensis* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas que se autofecundaron.



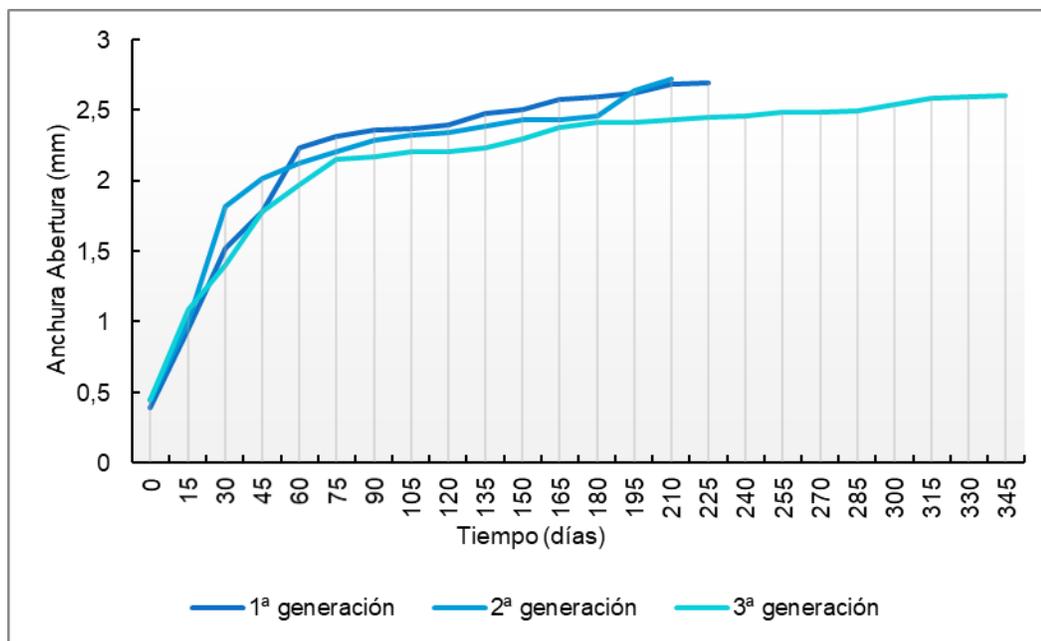
**Fig. 47.-** Variabilidad de la longitud de la concha de los 90 ejemplares de *Lymnaea* que se analizaron, pertenecientes a tres generaciones distintas.



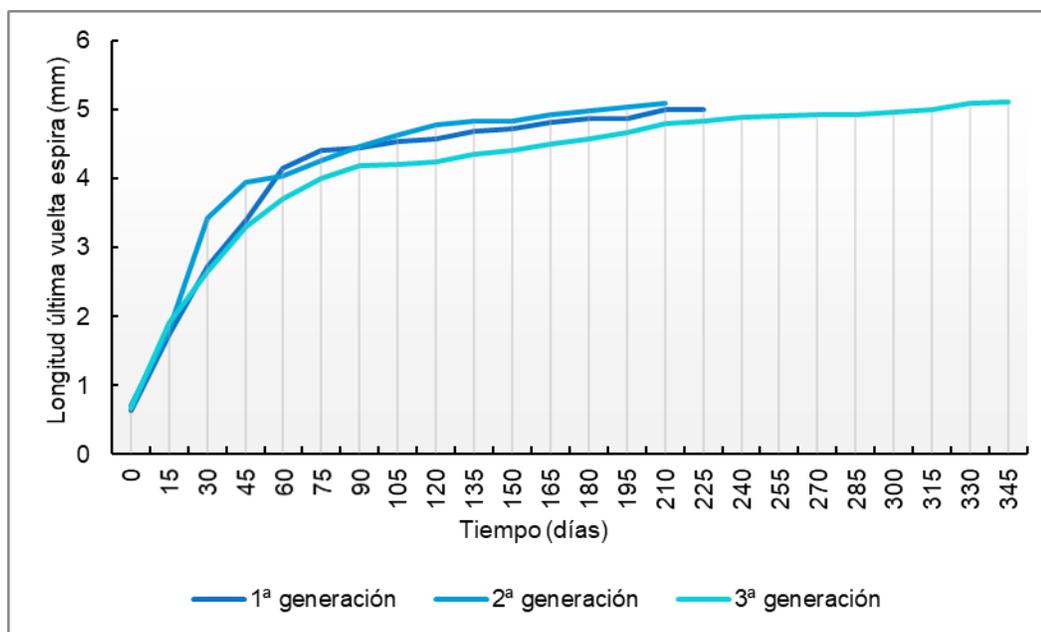
**Fig. 48.-** Variabilidad de la anchura de la concha de los ejemplares de *Lymnaea* estudiados en tres generaciones.



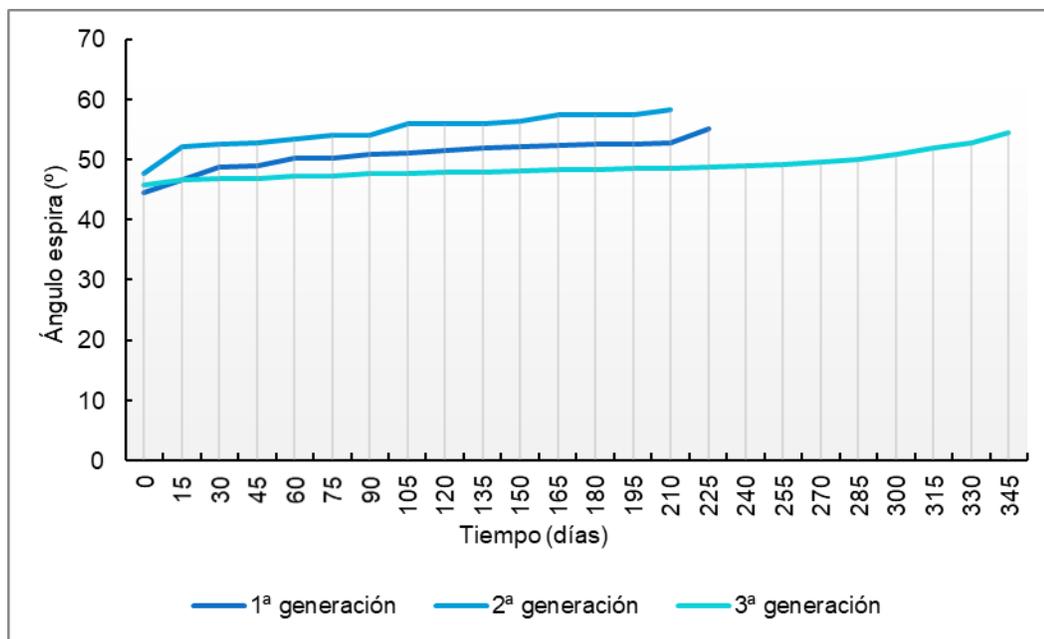
**Fig. 49.-** Variabilidad de la longitud de la abertura a lo largo del tiempo en los 90 ejemplares de *Lymnaea* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



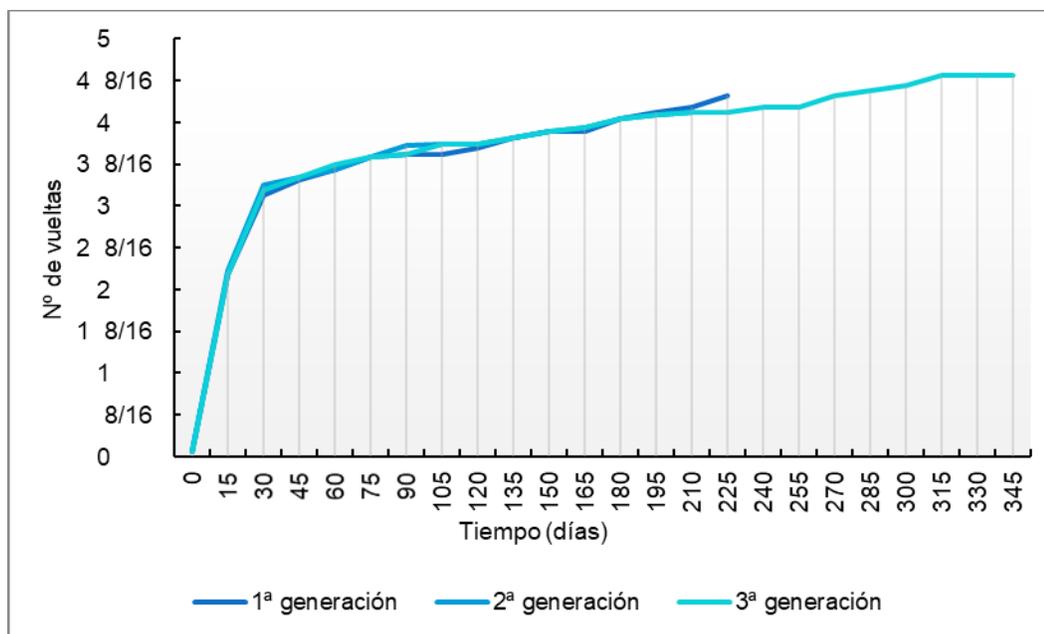
**Fig. 50.-** Variabilidad de la anchura de la abertura de la concha de los ejemplares de *Lymnaea* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



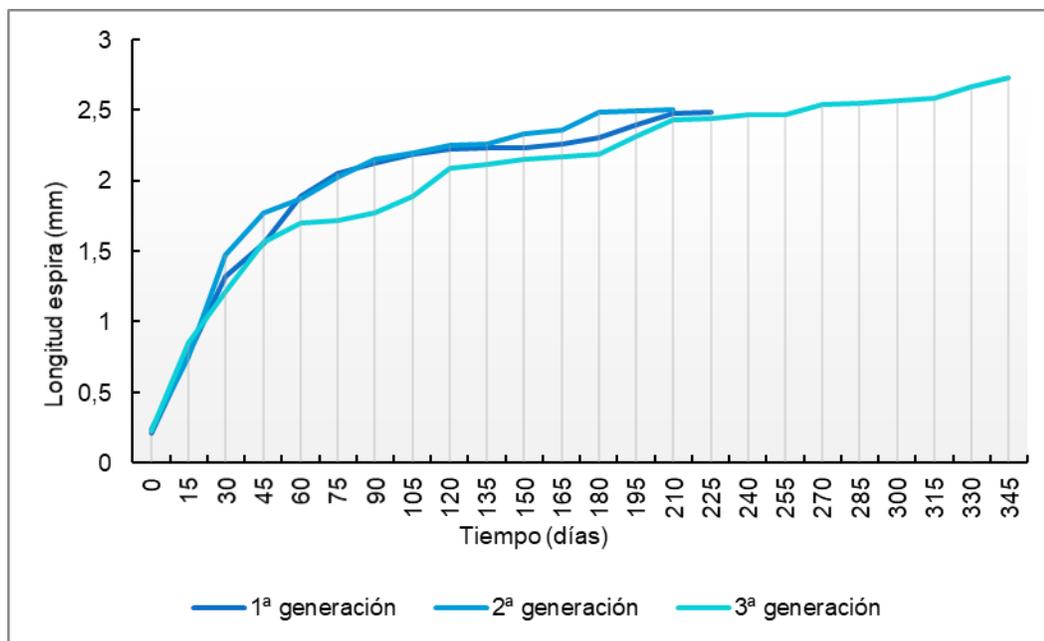
**Fig. 51.-** Variabilidad de la longitud de la última vuelta de espira a lo largo del tiempo de vida de los ejemplares de *Lymnaea* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



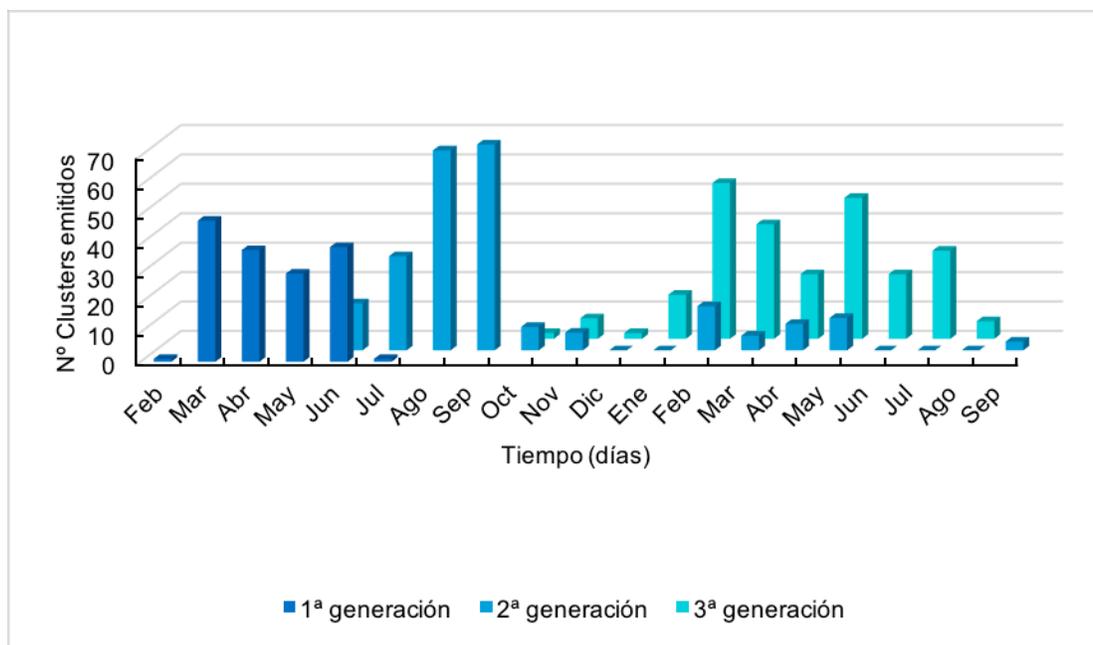
**Fig. 52.-** Variabilidad del ángulo de la espira con el tiempo, para los ejemplares de *Lymnaea* de las tres generaciones estudiadas.



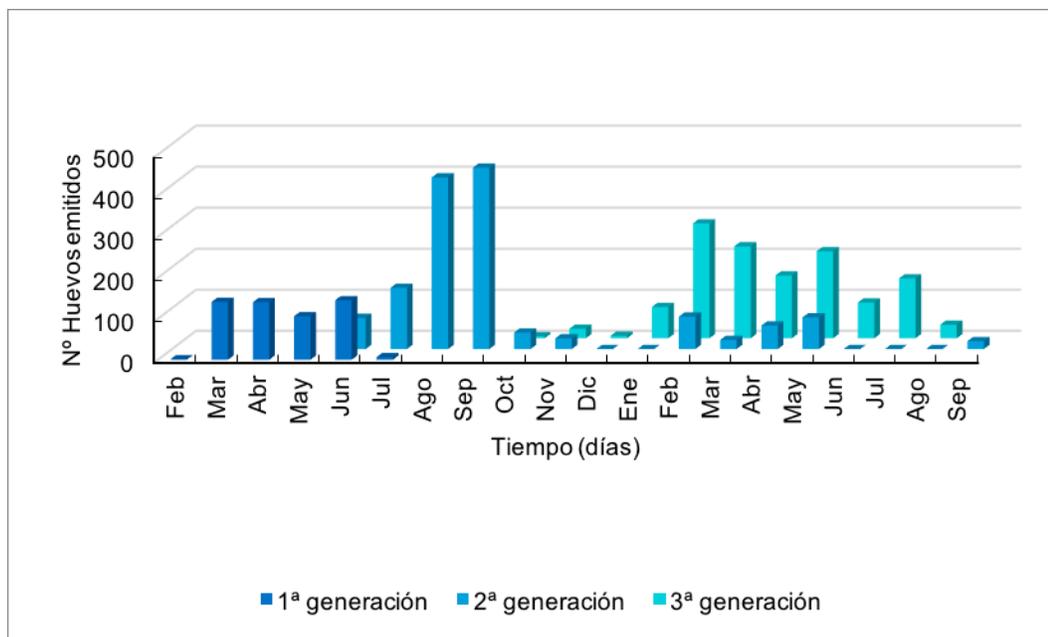
**Fig. 53.-** Variabilidad del número de vueltas de espira a lo largo del tiempo, para los ejemplares de *Lymnaea* pertenecientes a las tres generaciones estudiadas.



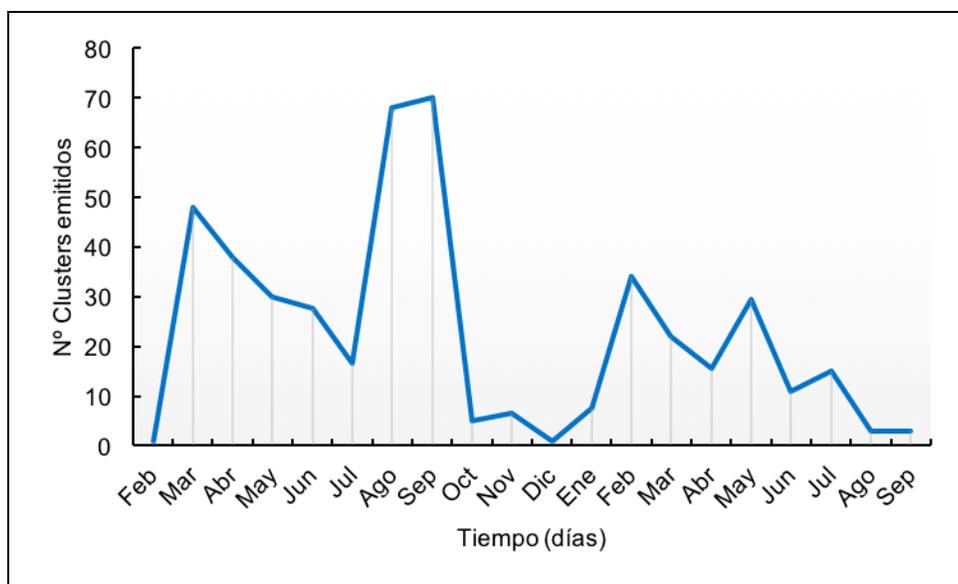
**Fig. 54.-** Variabilidad de la longitud de la espira con el tiempo, de los ejemplares de *Lymnaea* estudiados en tres generaciones distintas.



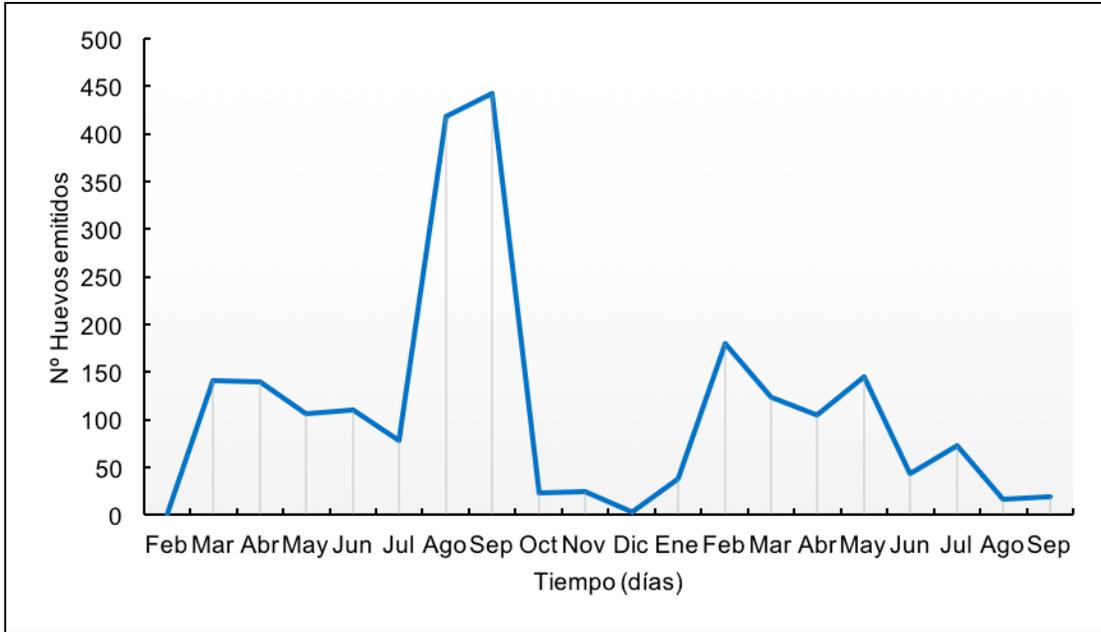
**Fig. 55.-** Emisión de clusters a lo largo del tiempo de los ejemplares del conjunto de las tres generaciones analizadas de *Lymnaea*.



**Fig. 56.-** Emisión de huevos a lo largo del período de puesta de los ejemplares de las tres generaciones analizadas de *Lymnaea*.



**Fig. 57.-** Emisión de clusters promedio de las tres generaciones de ejemplares analizadas de *Lymnaea*.



**Fig. 58.-** Emisión Promedio de huevos a lo largo del período de puesta de los ejemplares de las tres generaciones analizadas de *Lymnaea*.

## **CAPITULO V**

### **DISCUSIÓN**



## 5.- DISCUSIÓN

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

#### 5.1.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CONCHAS

Partiendo del hecho de que las generaciones de cada una de las tres especies estudiadas en la presente Tesis han sido mantenidas bajo condiciones estandarizadas de alimentación, tipo de agua, horas de luz, temperatura y tipo de sustrato, se planteó como hipótesis nula que no existían diferencias significativas para las medidas morfométricas de la concha, entre las generaciones de una misma especie, ya que, precisamente por esto último, su comportamiento no debería ser muy diferente.

Para poder demostrarlo con mayor precisión se ha llevado a cabo la prueba estadística de chi-cuadrado tomando como grados de libertad el número de generaciones comparadas menos 1 y como variables las distintas medidas morfométricas de la concha.

Nuestros resultados demuestran que estadísticamente no existen diferencias significativas entre las generaciones estudiadas de *B. truncatus*, *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. ( $p$ -valor  $> 0,05$ ) por lo que se refiere a los valores promedio de la longitud y anchura de la concha, longitud y anchura de la abertura, la longitud de la última vuelta de espira, el ángulo, la longitud de la espira y el número de vueltas.

Mientras que en las especies *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. no existen diferencias estadísticamente significativas para los valores mínimos y máximos de las medidas morfométricas llevadas a cabo, en la especie *B. truncatus* sí que se encuentran diferencias significativas entre la primera y la tercera generación y entre la segunda y la tercera, para los valores mínimos del ángulo de la espira, así como también las hay para los valores máximos del ángulo de la espira entre la primera y la segunda generación estudiadas de dicha especie.

A pesar de pertenecer a la familia *Planorbidae*, las especies *B. truncatus* y *P. metidjensis* presentan diferencias notables entre ellas en lo que respecta a las diferentes medidas de la concha. Teniendo en cuenta las medidas morfométricas realizadas de forma común para ambas especies (longitud y anchura de la concha, longitud y anchura de la abertura y longitud de la última vuelta de espira), nuestros resultados muestran que es *B. truncatus* la especie que alcanza valores más altos para cada una de ellas, siendo, por tanto, la que presenta un mayor crecimiento.

En su momento, Gaud (1958) realizó estudios sobre el crecimiento de *B. truncatus* en los que el desarrollo más rápido se observó para los *Bulinus* nacidos en mayo: 7 mm en menos de 2 meses, 10 mm en 3 meses y 12 mm en 5 meses. Mientras que el desarrollo resultó ser más lento para los nacidos en agosto: 7 mm en más de 6 meses, 10 mm en 8 meses, destacando que nunca se llegó a observar la talla de 12 mm.

Pero a diferencia del anterior estudio citado nuestros ejemplares no alcanzaron tallas más grandes de 9,89 mm pese a ser también criados en el laboratorio.

Y a pesar de que, en su trabajo dicho autor no especifica las condiciones bajo las que mantiene a los *Bulinus*, parte de nuestros resultados coinciden con los de Gaud (1958) ya que dos de las generaciones de *B. truncatus* analizadas en nuestro estudio, concretamente la 2ª y la 3ª, nacidas también una en mayo y la otra en agosto respectivamente, resultaron mostrar el mismo patrón de desarrollo, siendo la generación nacida en mayo la que mostró un crecimiento más rápido y la de agosto un crecimiento más lento, del mismo modo que ocurrió para sus ejemplares.

Por lo que se refiere a las diferentes características morfométricas de la concha estudiadas, en el caso de *B. truncatus* los valores obtenidos de la cría en cautividad bajo las condiciones estándar descritas en el capítulo de material y métodos de la presente Tesis, son muy similares a los obtenidos por otros autores (Hakim Saad *et al.*, 2016).

A pesar de que dicho autor y su equipo obtuvieron los valores de las medidas morfométricas a partir de moluscos colectados en la naturaleza (en dos localidades de Egipto), los valores promedio obtenidos en ese estudio solo distan un máximo de 0,76 mm respecto a los valores promedio de las medidas de la concha obtenidos en nuestro laboratorio bajo condiciones estandarizadas. Esto sugiere que el desarrollo de los ejemplares de la especie *B. truncatus* se da de forma similar tanto en la naturaleza como en el laboratorio y que por tanto nuestros resultados se acercan bastante a la realidad.

En términos de longitud de la concha, mientras que *B. truncatus* alcanza los 9,89 mm de longitud, *P. metidjensis* llega a medir 7,73 mm y *Lymnaea* sp. alcanza los 8,66 mm. La anchura de la concha alcanza valores dos veces mayor en *B. truncatus* (8,07 mm) respecto a *P. metidjensis* (3,80 mm) mientras que *Lymnaea* sp. alcanza un valor de 5,77 mm.

Por tanto, de entre los dos planórbidos, sería *B. truncatus* la especie que alcanza valores más altos de longitud y anchura. Y comparando las tres especies ésta seguiría en el primer puesto mientras que *Lymnaea* sp. adoptaría el segundo puesto, siendo *P.*

*metidjensis* la especie de molusco que alcanza valores de longitud y anchura más bajos.

Los valores de longitud y anchura de la concha de *Lymnaea* sp. obtenidos en nuestros estudios (8,66 mm de longitud y 5,77 mm de anchura) contrastan con los de otros Lymnaeidos del mismo grupo morfológico (Vergani, 1955). En ese estudio se detectó valores notablemente más elevados que los nuestros, del orden de 16 mm y 8 mm de longitud y anchura máximas respectivamente. Sin embargo, en su descripción de las condiciones de cría éste no especifica la temperatura a la que son mantenidos, pero teniendo en cuenta que Venezuela que es en donde se llevó a cabo los experimentos, presenta un clima tropical con temperaturas medias anuales de 25°C, podemos suponer que, sumando el hecho de que en esa época no disponían de cámaras climáticas, lo hiciera a la temperatura anteriormente dicha o quizá a una superior y de ahí la obtención de valores más altos.

Teniendo en cuenta que la temperatura es un factor abiótico importante que influye, entre otras cosas, en el ciclo biológico y desarrollo del molusco, resulta lógico llegar a pensar que a una mayor temperatura los moluscos puedan alcanzar valores mayores en el estudio de su morfometría.

Los estudios de crecimiento de Galba/Fossaria bajo condiciones de laboratorio (24°C y pH=6.8) llevados a cabo por Gretillat en 1967, muestran que dentro de las primeras cuatro semanas de vida el crecimiento es regular y que los ejemplares solo se alimentan de materia orgánica del agua en suspensión y que es a partir de la cuarta semana cuando el crecimiento de dichos ejemplares se acelera.

Nuestros resultados confirman esta dinámica de crecimiento seguida por *Lymnaea* sp., aunque la temperatura y pH en nuestro caso fue de 20°C y 7.4 respectivamente. Por lo que en un primer momento se podría pensar que estos dos factores abióticos no afectan en sí a la dinámica de crecimiento seguida por los ejemplares de este molusco, es decir, su comportamiento es el mismo ya sea a 24°C o a 20°C, porque a ambas temperaturas los ejemplares muestran un crecimiento regular durante las primeras cuatro semanas de vida y es a partir de ese momento cuando el crecimiento se acelera de forma notable.

En nuestro estudio, a 20°C y pH de 7,4 se dió un crecimiento regular durante los primeros 30 días de vida de los moluscos y a partir de ese momento se aceleró dando progresivamente valores cada vez mayores hasta llegar a un punto de estancamiento en el que el crecimiento simplemente se mantiene sin ir a más y en caso de darse alguna variación del mismo esto ocurre de una forma casi inapreciable.

Los valores máximos alcanzados por cada especie para todas las medidas realizadas fueron debidamente comparados. Además, en las Figuras 59, 60 y 61, también se muestra la dinámica de crecimiento seguida por las tres especies para cada una de las medidas morfométricas efectuadas.

El análisis morfológico de las conchas de las tres especies estudiadas mostró que *B. truncatus* y *P. metidjensis* presentan una concha levógira de color pardo oscuro con estrías, el ombligo bien marcado y sin opérculo.

Sin embargo, estas dos especies se diferencian porque, aunque ambas presenten una concha espiral, *B. truncatus* por su lado posee una concha globosa con la espira y la última vuelta achatadas, el ápice truncado, con suturas bien marcadas y los labios de la abertura relativamente anchos, mientras que *P. metidjensis* tiene la concha aplanada, con pocas espiras y los labios de la abertura poco pronunciados.

*Lymnaea* sp. se diferencia de las dos especies de planórbidos nombradas con anterioridad en que su concha es dextrógira, con la espira alargada, un mayor número de vueltas que *B. truncatus* y el ápice puntiagudo, suturas no muy marcadas y con el labio interior de la abertura mucho más marcado que el exterior. En las Figuras 74, 75 y 76 se muestran las conchas de las especies estudiadas en las cuales se observan si no todas, algunas de las características anteriormente descritas, ya que para la correcta observación de algunas de estas características es necesario el uso de la lupa binocular.

Según la publicación de Gretillat (1967) los moluscos Lymnaeidae presentan una concha dextrógira que mide entre 6 y 7 mm de longitud y entre 2'6 y 3 mm de anchura aproximadamente con 5 vueltas de espira. No obstante, nuestros resultados muestran valores más elevados para dichas medidas, alcanzándose una longitud y anchura de 8'6 y 5'7 mm respectivamente con casi 5 vueltas de espira.

La descripción morfológica coincide con la observada en nuestros estudios siendo la concha de los moluscos de un color gris más o menos claro con un punteado amarillo que se corresponde con el patrón de color del manto en la primera convexidad a partir de la abertura. Presentan una fina estriación que solamente es visible a la lupa y el pie presenta una forma sustancialmente triangular.

### **5.1.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CLUSTERS**

La única medida para la que en algunos casos podemos afirmar con una probabilidad alta que existen diferencias entre las generaciones, es para el área de los

clusters. De hecho, en la especie *B. truncatus* existen diferencias significativas ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre el área de la primera y la segunda generación y entre el área de la primera y la tercera, pero solo a nivel de valores máximos, del mismo modo que ocurre en *P. metidjensis* (Tablas 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 y 44).

Sin embargo, en la especie *Lymnaea* sp., no existen diferencias significativas entre las generaciones para la longitud, anchura, área y redondez de los clusters analizados ni a nivel de promedios, ni tampoco a nivel de máximos y mínimos.

En lo que atañe a la morfología de los clusters, entre *B. truncatus* y *P. metidjensis* las diferencias observadas no resultan ser lo suficientemente evidentes como para poder distinguir a simple vista entre ambas especies de planórbido. Pero los clusters de dichos moluscos se distinguen perfectamente de los de *Lymnaea* sp.

No obstante, así como en *B. truncatus* los huevos están cubiertos por una única capa de albúmina transparente de consistencia relativamente resistente, en *P. metidjensis* existe una segunda capa que es interna y que envuelve los huevos a modo de estuche. Los clusters de las dos especies de planórbido son más largos que anchos, pero mientras que en *P. metidjensis* la diferencia entre longitud y anchura es solo del orden de 1 mm, en *B. truncatus* la diferencia roza los 3 mm, por lo que los clusters de esta última especie son más alargados que los de *P. metidjensis*.

Aunque si que existen diferencias entre las medidas, al ser éstas tan sutiles a simple vista, resulta un poco más difícil poder distinguir ambas especies de forma rápida y clara, para ello es necesario hacer una caracterización minuciosa de los clusters.

En el caso de *Lymnaea* sp. la morfología de los clusters es claramente alargada y cóncava por la parte superior, y al igual que en *B. truncatus* también es una sola capa de albúmina la que recubre los huevos, pero a diferencia de las dos especies de planórbido (*P. metidjensis* y *B. truncatus*), en el caso de *Lymnaea* sp. la masa de albúmina es más blanda y mucho más frágil, lo cual se hacía evidente en el momento de manejarlos.

Respecto a los clusters de huevos, los estudios llevados a cabo muestran que de entre las dos especies de planórbidos, *B. truncatus* es la que emite clusters de mayor área (32,56 mm<sup>2</sup>) siguiéndole *P. metidjensis* (22,93 mm<sup>2</sup>) mientras que el área alcanzada por los clusters de *Lymnaea* sp. (8,49 mm<sup>2</sup>) es notablemente menor respecto a la de las otras dos especies.

Por lo que respecta a la redondez de los clusters de huevos, es en la especie *P. metidjensis* donde se observa un menor valor máximo y no muy diferente de 1 (1,28), es decir, que, aunque los clusters no describan una circunferencia perfecta, se acercan mucho a serlo.

*B. truncatus* muestra un valor de redondez mayor (1,71) al de *P. metidjensis*, por lo que sus clusters se alejan de presentar morfología redonda, aunque no tanto como los de la especie *Lymnaea* sp. en los que el valor (2,65) da idea de que éstos presentan una forma más alargada que se acentúa más o menos según el número de huevos que posean los clusters.

A pesar de ser alargados en *Lymnaea* sp., los clusters que alcanzan una mayor longitud son los de *B. truncatus*, (7,77 mm) seguidos por los de *P. metidjensis* (6,12 mm) y aunque existe una diferencia evidente entre la longitud de los clusters de las tres especies, realmente no es a una magnitud tan grande como la que se muestra para el área de los mismos (Tabla 1).

Por lo que se refiere a la anchura o diámetro de los clusters de *B. truncatus*, el valor obtenido en nuestros estudios (5,12 mm) no dista demasiado del valor de alrededor de 6 mm que Germain obtuvo en 1931. Entre las especies *B. truncatus* y *P. metidjensis* prácticamente no existen diferencias para la anchura de los clusters (5,12 y 5,20 mm respectivamente), sin embargo, entre estas dos especies y *Lymnaea* sp. existe una diferencia importante, la cual muestra el valor más bajo (2,68 mm) para la anchura máxima alcanzada. De acuerdo con los valores de longitud y anchura para los clusters de Lymnaeidos obtenidos por Vergani (1955), nuestros valores son de 5 mm de longitud y 2,68 mm de anchura.

### 5.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HUEVOS

En lo que respecta a los huevos, entre *B. truncatus* y *P. metidjensis* prácticamente no existen diferencias para los valores de longitud (1,38 mm y 1,44 mm respectivamente) y anchura (1,36 mm y 1,39 mm respectivamente). Existe una uniformidad de tamaño y forma generalizada para los huevos de estas dos especies y éstos se disponen de forma contigua pegados unos a otros, observándose fácilmente el embrión y el movimiento del mismo en su interior.

La morfología de los huevos de las dos especies de planórbido es similar a la de los granos de una granada, aunque en el caso de *P. metidjensis* los contornos son más suaves. Ambas especies poseen huevos con un color amarillo anaranjado que en caso de *B. truncatus* es más intenso.

Los huevos de la especie *Lymnaea* sp. se caracterizan por su morfología ovalada o redondeada según sea el plano espacial en el que estén dispuestos. La longitud y anchura máximas alcanzadas son de 0'83 mm y 0'66 mm respectivamente. Estos

resultados difieren bastante de los valores de 50 y 55 micras obtenidos por Vergani (1955).

A diferencia de las dos especies de planórbido en las que los huevos se disponen en el mismo plano, en *Lymnaea* sp. como los huevos se disponen de forma aleatoria en distinto plano y de forma separada unos de otros, hay ocasiones en las que la morfología de los mismos puede verse distorsionada mostrando una aparente forma redonda a pesar de no ser así en realidad.

En esta especie de molusco vector también se observa con facilidad al embrión en el interior pudiendo observar su movimiento. No obstante, los huevos de *Lymnaea* sp. no presentan coloración, son totalmente transparentes en las primeras fases de maduración en las que el embrión es muy pequeño. Así mismo, no existe uniformidad en el tamaño de los huevos dentro de un mismo cluster en la mayoría de ellos pudiendo observarse huevos grandes, medianos y pequeños dentro de un mismo cluster.

## 5.2.-ANÁLISIS BIOLÓGICO COMPARADO DE LAS POBLACIONES

La biología de las tres especies estudiadas ha resultado ser diferente a pesar de ser mantenidas en las mismas condiciones de temperatura, horas de luz, alimentación, tipo de agua y sustrato en el laboratorio.

Así pues, de las tres especies, *B. truncatus* resultó ser la que mejor se adaptó a las condiciones estandarizadas del laboratorio mostrando la mayor tasa de crecimiento y reproducción en poco tiempo, siendo también la especie que más alimento consumió y la que más tiempo resistió en cautividad en el laboratorio.

A diferencia del comportamiento observado en *B. truncatus*, a los ejemplares de *P. metidjensis* les costó bastante más adaptarse y este hecho se hizo evidente con el largo período de tiempo que transcurrió hasta que emitieron la primera puesta, una menor frecuencia de alimentación, un crecimiento más lento y una menor tasa de reproducción.

Haciendo referencia a la bibliografía, Gretillat en 1967, ya exponía que los ensayos de cría de Lymnaeidos realizados en el laboratorio habían sido decepcionantes ya que los autores habían tenido dificultades para mantener la supervivencia de los caracoles utilizando acuaterrarios. Lee en 1962 estudiando el ciclo biológico de *Heterobilharzia americana*, constató que los Lymnaeidos se adaptaba con dificultad a las condiciones de cría del laboratorio. Este los mantenía con una alimentación basada en lechuga

fresca como en nuestro caso. Y lo cierto es que su adaptación a las condiciones estandarizadas de nuestro laboratorio resultó ser complicada al inicio.

Así pues, lo observado por estos autores coincide con lo que nosotros observamos en el laboratorio. A estas publicaciones se suman los estudios realizados por Vergani en 1955 en los que observó que los moluscos de esta familia acostumbran a salirse del agua y quedarse pegados en las paredes del recipiente, escondidos en sus conchas. Pero no duran mucho en esa situación y es por eso que a los pocos días se desprenden y vuelven por si mismos al agua recobrando su vitalidad. Este comportamiento de los ejemplares de *Lymnaea* sp. también observado en nuestros ejemplares sugiere la tendencia anfibia de esta especie.

Por su parte, los ejemplares de la especie *Lymnaea* sp. mostraron un crecimiento mayor y más regular cuando eran individualizados que cuando eran mantenidos en pecera a las mismas condiciones. Del mismo modo la emisión de puestas también se dió de forma más regular cuando estaban individualizados. Este rasgo de su biología permite suponer que aunque aparentemente sea una especie de difícil adaptación a las condiciones del laboratorio, se desarrolla y se reproduce con éxito mediante autofecundación, lo cual resulta clave para la transmisión de la enfermedad.

Gaud (1958) afirmó en su momento que la hipótesis de un ritmo orgánico interno se contradecía con los estudios que llevó a cabo sobre la cría en el laboratorio tanto de *B. truncatus* como de *P. metidjensis*.

Pero lo cierto es que el hecho de que en nuestro caso tanto el crecimiento como la cronología de emisión de los ejemplares de las tres especies estudiadas varíen a lo largo del tiempo mostrando picos en determinados meses, sugiere la posibilidad de que exista un ritmo interno en los moluscos que esté predeterminado según la especie de la que se trate. Esta idea no puede descartarse en nuestro caso ya que nuestras experiencias han sido llevadas a cabo bajo condiciones constantes y aun así los resultados han mostrado variaciones en el crecimiento y en la reproducción a lo largo de la vida de los moluscos.

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

En nuestro caso, dentro de una misma especie, no todas las generaciones o poblaciones mostraron una tendencia a la autofecundación similar, a excepción de *B. truncatus*, en la cual las tres generaciones mostraron el mismo porcentaje de autofecundación.

El clásico estudio de reproducción en *B. truncatus* llevado a cabo por Larambergue (1939) dio lugar a cuatro hallazgos fundamentales:

- 1- moluscos vírgenes aislados daban lugar a una progenie resultante de la autofecundación;
- 2- La fecundación cruzada también se da (demostrado por el uso de un marcador genético de la pigmentación del manto);
- 3- Las poblaciones en diferentes localidades pueden ser exclusivamente afálicas o eufálicas, o tener prevalencias intermedias de afalía;
- 4- La afalía tiene una base genética compleja (Brown, 1994).

De manera que, en la especie *B. truncatus*, nuestros resultados confirman que, al igual que en el estudio de Rollinson & Southgate (1985) en el cual muchas especies de *Bulinus* mostraron preferencia por la autofecundación, la especie *B. truncatus* prefiere también su propio esperma ya que el porcentaje de autofecundación obtenido en nuestro estudio fue del 100% en las tres generaciones estudiadas (30 ejemplares por generación).

No obstante, en *P. metidjensis* los porcentajes de autofecundación fueron del 73,3%, 50% y 60% para la primera, segunda y tercera generación, respectivamente. Por su parte, en *Lymnaea* sp. los porcentajes resultantes fueron más altos que los anteriores, siendo del 76,6%, 100% y 80% para la primera, segunda y tercera generación, respectivamente.

En los estudios llevados a cabo por Vergani (1955) sobre Galba/Fossaria, todos los ejemplares emitieron puestas partenogénicamente, sin embargo, en nuestro estudio de autofecundación, aunque los porcentajes fueron elevados, no todos los 90 ejemplares analizados escogieron esta estrategia de reproducción. Además, Vergani (1955) solo utilizó un total de 5 moluscos para estudiar esta característica, por lo que nuestros resultados tienen mucha más fuerza al ser mucho mayor nuestro tamaño muestral.

En el caso de *B. truncatus*, la primera generación se caracteriza por ser la que presenta los valores máximos para todas las características de autofecundación analizadas. Siendo la que más tiempo vive (máx. 641 días), se caracteriza además por presentar el mayor período de puesta, menor período prepuesta y mayor período post-puesta (máx. 492, 64 y 168 días, respectivamente), tardando un máximo de 75 días en emitir su primer cluster y emitiendo su última puesta a la edad más tardía (625 días).

Es pues también esta primera generación de *B. truncatus* la que posee una mayor capacidad de puesta y tasa de puesta (máx. 0,17 y 0,28 respectivamente) dentro del

período sexual. Según los resultados, esta especie de planórbido puede llegar a emitir 5 clusters en un mismo día, aunque lo más frecuente en las tres generaciones es la emisión de 1 cluster por día, dándose la emisión de 3 y 4 clusters por día a una frecuencia más baja.

La emisión de 5 clusters por día solo tuvo lugar en la primera y segunda generación. Dentro del período de puesta, los ejemplares de la primera generación fueron los que más días de puesta mostraron (máx. 55 días).

Del mismo modo que en *B. truncatus*, la primera generación de *P. metidjensis* fue la que más tiempo vivió (máx. 505 días) y también la que presentó un mayor período de puesta y post-puesta de máximo 283 y 254 días respectivamente, siendo también la que emitió su última puesta a una edad más tardía (máx. 461 días).

Sin embargo, fue la segunda generación de *P. metidjensis* la que presentó un mayor período prepuesta, edad de primera puesta, y en la que se da el mayor número de días de puesta con valores máximos de 315, 316 y 10 días respectivamente. Esta segunda generación alcanzó la mayor tasa de puesta en el período sexual con un valor de 2, mientras que fue la tercera la que resultó tener una mayor capacidad de puesta con un valor máximo de 0,12. *P. metidjensis* puede llegar a poner 7 clusters en un mismo día, sin embargo, lo más frecuente es poner 1 y 2 clusters por día. El máximo de clusters que pueden emitir en un día la primera, segunda y tercera generación son 3, 5 y 7 respectivamente.

Para *Lymnaea* sp. la primera generación fue la que resultó tener una mayor capacidad de puesta (máx. 0,09) y un mayor período post-puesta (máx. 146 días).

Pero por su parte, la segunda generación resultó ser la que más vivió (máx. 405 días), presentando también el mayor período de puesta (máx. 329 días), la mayor tasa de puesta con un valor máximo de 2 y resultó ser también la generación de mayor edad (máx. 393 días) en el momento de la emisión de su última puesta.

Al contrario de los resultados obtenidos por Vergani (1955) sobre la longevidad, nuestros resultados mostraron valores más elevados de longevidad. Según este autor los ejemplares pueden sobrevivir por lo menos 212 días, es decir, alrededor de 7 meses, sin embargo, nuestros resultados demuestran que pueden llegar a sobrevivir hasta 291, 405 y 377 días en la primera, segunda y tercera generación respectivamente.

Por lo que se refiere al período prepuesta y la edad de la primera puesta, la tercera generación fue la que mostró los valores más altos, siendo éstos de un máximo de 236 y 237 días respectivamente.

*Lymnaea* sp. en general puede llegar a emitir 5 clusters en un mismo día, pero lo más frecuente en las tres poblaciones analizadas es la emisión de 1 cluster por día, siendo la primera generación la que alcanza un mayor valor máximo para este caso. La segunda es la única que llega a emitir 5 clusters en un mismo día, pero esto no se dió de forma frecuente.

El número de huevos por cluster obtenido para la especie *Lymnaea* sp. en nuestro caso fue de un máximo de entre 9 y 14 huevos siendo 7 el promedio máximo. Por el contrario, Vergani (1955) en sus estudios afirma haber obtenido valores de entre 10 y 20 huevos por cluster. Esto podría explicarse si suponemos que la temperatura a la que dicho autor mantuvo a los ejemplares moluscos fue superior a nuestros 20°C, ya que de ser así, una mayor temperatura de cría podría estar favoreciendo su mayor tasa de reproducción y a su vez el incremento de la cantidad de huevos contenidos en los clusters

De entre los tres moluscos vectores analizados en la presente tesis doctoral, los planórbidos *B. truncatus* y *P. metidjensis* son los más longevos y entre estos dos, *B. truncatus* es la especie de molusco vector que más tiempo vive.

Dicha especie es a su vez la que alcanza la madurez sexual en un período más breve de tiempo, emitiendo su primera puesta a la edad máxima de 75 días, dato que difiere bastante respecto a lo obtenido por Gaud (1958) en sus estudios con *B. truncatus*, en los cuales dicho autor observó que tardaban menos de dos meses en empezar a emitir puestas.

*P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. por su parte tardaron un máximo de 316 y 237 días, respectivamente en emitir su primera puesta. En los estudios de Vergani (1955) los moluscos Lymnaeidos empiezan a emitir puestas a los 20-25 días de vida presentando un período de puesta de hasta 235 días; dichos resultados son muy diferentes a los nuestros en los que los moluscos empezaron a emitir máximo a los 168-236 días presentando un período de puesta máximo de 329 días.

Por lo que concierne al período de puesta, la especie de planórbido *P. metidjensis* es la que menos tiempo mantiene la emisión de puestas, mostrando un período de puesta máximo de solo 283 días frente a los 329 de *Lymnaea* sp. y los 492 días de *B. truncatus*. De los dos planórbidos, esta última especie emite puestas durante un poco más del doble de tiempo de lo que lo hace *P. metidjensis* y aunque dicha especie puede llegar a emitir 7 clusters en un mismo día, a diferencia de *B. truncatus* y *Lymnaea* sp. que como mucho emiten 5, lo que se da con más frecuencia en las tres especies es la emisión de 1 o 2 clusters por día. Las cantidades más elevadas de puestas emitidas por día se dan de forma esporádica.

Por último, es de interés comentar que *B. truncatus* es la única especie de las tres estudiadas en la que todos los ejemplares de las tres generaciones escogieron la autofecundación como estrategia de reproducción, el porcentaje obtenido fue del 100% y *P. metidjensis* mostró un 61% de autofecundación frente al 77% de *Lymnaea* sp. Pese a ser estos últimos porcentajes más bajos de autofecundación respecto a *B. truncatus*, por sí mismos son porcentajes lo suficientemente elevados como para que un solo ejemplar de estas especies pueda colonizar una determinada zona con condiciones óptimas para la supervivencia de los moluscos. Esto a su vez indica que en mayor o en menor medida, las tres especies de molusco estudiadas podrían expandirse geográficamente con relativa facilidad.

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

Por lo que se refiere a la cronología de emisión de puestas, un análisis pormenorizado del período de puesta de cada una de las especies demuestra que existen diferencias entre ellas, ya que los picos de emisión para cada especie se dan en épocas del año distintas. La dinámica de emisión de clusters y huevos, característica de cada especie se muestra en las Figuras 65, 66, 67, 68, 69 y 70.

En el caso de *B. truncatus*, los resultados muestran que, dentro del período de puesta, que se da de abril a octubre, el número de clusters emitidos en cada uno de esos 7 primeros meses supera los 100 clusters. Sin embargo, y de acuerdo con los estudios sobre fecundidad llevados a cabo por Gaud (1958), el pico de emisión se da en el mes de mayo con más de 200 clusters siguiéndole junio con unos 170 aproximadamente. La mayor emisión de puestas se da por tanto en la época de primavera-verano. A partir de los primeros meses, en los cuales se da la mayor emisión, con el paso del tiempo la emisión de puestas va disminuyendo, aunque se prolonga casi hasta el momento de la muerte de los ejemplares.

Para esta especie la dinámica seguida para la emisión de huevos es la misma que para los clusters, es decir, que la máxima emisión de huevos también se detecta en el mes de mayo con 1200 huevos emitidos. El mes de junio le sigue a mayo siendo el segundo mes de mayor emisión con un poco más de 1000 huevos y de abril a octubre (7 meses) el número de huevos emitidos supera los 600.

A diferencia de lo que ocurre en *B. truncatus*, la cronología de emisión de *P. metidjensis* se caracteriza por mostrar 2 picos de emisión cercanos en cuanto a número e importantes a lo largo de su período de puesta. El primero de ellos se da en

noviembre con más de 20 clusters y el segundo de ellos, el más importante, se da en julio con más de 30 clusters. Estos máximos en la emisión de puestas se dan en las épocas de otoño y en verano respectivamente. Los meses de mayor emisión de puestas para *B. truncatus* y *P. metidjensis* coinciden y este hecho coincide a su vez con lo que ya en su momento Pallary (1933) escribió: “los Bulinus y Planorbidos deben ser buscados a finales de primavera y aún mejor, en verano y en otoño”. Dándose los picos de emisión en mayo-junio para *B. truncatus* y noviembre y julio para *P. metidjensis*.

Para *P. metidjensis* existen 3 meses donde la emisión de huevos es mayor; noviembre con más de 50 huevos coincidiendo con el primer pico de emisión de clusters, mayo con más de 70 huevos, pero destaca julio con más de 100 huevos, coincidiendo con el segundo pico de emisión de clusters.

Además, resulta curioso que, en los meses de febrero, marzo, abril, mayo y junio, que se correspondería con la época de primavera y principios de verano, cuando se da una mayor emisión de clusters, la de huevos por el contrario resulta ser menor y del mismo modo, cuando la emisión de clusters es menor la de huevos es mayor. Es como si la especie tratara de compensar el menor número de clusters con un mayor número de huevos contenidos en ellos.

La cronología de emisión de puestas de *Lymnaea* sp. se caracteriza por poseer el pico de emisión de clusters en los meses de agosto y septiembre, coincidiendo con el final del verano, con casi 70 y 70 clusters respectivamente.

La dinámica de emisión seguida por *Lymnaea* sp. es una disminución en el número de puestas a partir del mes de marzo con el posterior pico que se da en agosto y septiembre para después desde octubre hasta enero mostrar una emisión muy baja, sin llegar a los 10 clusters en ninguno de esos 4 meses. A partir de febrero se da un aumento de la emisión de clusters aunque a un menor nivel que no dura mucho, ya que desde este último mes hasta el siguiente septiembre el número de puestas emitidas decae bastante.

En el caso de los huevos la dinámica seguida para su emisión es la misma que para la de clusters. El máximo de emisión de huevos también se da en los meses de agosto y septiembre con más de 400 y casi 450 huevos, respectivamente.

De marzo de 2015 a julio del mismo año, el número de huevos emitidos no supera los 150, de octubre de 2015 a enero de 2016, el número de huevos no supera los 50 y de marzo de 2016 a septiembre del mismo año tampoco supera los 150 excepto en febrero de 2016, mes en el cual la especie llega a emitir casi 200 huevos.

### 5.2.3.- CARACTERIZACIÓN CUANTITATIVA DE PUESTAS

Pese a que tanto el número de clusters como el de huevos son características importantes en la cuantificación de las puestas, realmente es el número de huevos lo que marca la descendencia potencial de la especie. Los resultados muestran que la cantidad de huevos difiere bastante entre los clusters de las tres especies estudiadas.

De modo que, en el caso de *B. truncatus* la cantidad máxima de clusters emitidos por ejemplar en toda su vida es de 82, a diferencia de *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. en las cuales los valores son prácticamente iguales emitiendo un máximo de 25 y 24 clusters por ejemplar respectivamente.

Son también de interés los índices de capacidad de puesta ( $n^{\circ}$  clusters/período de vida en días) y de capacidad de puesta en el período sexual ( $n^{\circ}$  clusters/período de puesta), teniéndose en cuenta que no guardan relación directa con el número absoluto de clusters emitidos por ejemplar. Los valores máximos para el primer y el segundo índice son de 0,17 y 0,28 para *B. truncatus*, de 0,12 y 2 para *P. metidjensis* y de 0,09 y 2 para *Lymnaea* sp.

Teniendo en cuenta que el número de huevos emitidos a lo largo de toda la vida de los moluscos es lo que posee mayor relevancia, cabe destacar que en *B. truncatus* se alcanzan valores máximos de 483 huevos por ejemplar a lo largo de toda su vida, lo que difiere de forma notable de los 70 de *P. metidjensis* y de los 133 de *Lymnaea* sp.

La especie que presenta valores máximos de emisión de clusters y huevos es *B. truncatus*, sin embargo, por lo que se refiere a clusters *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. alcanzan valores muy similares, aunque respecto al número de huevos es la especie *Lymnaea* sp. la que presenta valores más elevados respecto a *P. metidjensis*.

A diferencia de lo que obtuvo Gaud (1958) en su experiencia de fecundidad en el laboratorio (de 7 a 8 huevos por puesta), nuestros resultados mostraron que el número de huevos por cluster en la especie *B. truncatus* oscila alrededor de un promedio de 6 a 7 huevos por cluster, de modo que nuestro valor promedio máximo de huevos por cluster coincide con el valor mínimo promedio obtenido por Gaud.

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

Según los resultados siempre existe un porcentaje de huevos que no se llega a desarrollar por completo para dar lugar a individuos nuevos. Este hecho resulta

importante ya que realmente solo serán considerados descendencia potencial aquellos huevos que lleguen a eclosionar desarrollándose exitosamente, dando lugar a moluscos recién nacidos. Con todo, siempre es más elevado el porcentaje de huevos eclosionados que el de no eclosionados, pero el porcentaje de eclosión resulta ser diferente entre las especies analizadas.

Entre las tres generaciones de cada una de las tres especies estudiadas en la presente tesis, existen diferencias por lo que se refiere a valores absolutos, lo cual se refleja en los porcentajes de eclosión de huevos.

En los estudios realizados por Gaud (1958) el tiempo al cual se observaba la primera eclosión variaba de simple a doble en el transcurso del año, pasando de ser de más de 20 días en diciembre, enero y febrero, a 10 días en agosto y septiembre. Sin embargo, según nuestros resultados el tiempo máximo de eclosión de los huevos para las tres especies, fue de 12 días independientemente del mes en que se produjo la eclosión de los mismos.

En *B. truncatus*, de acuerdo con (Germain, 1931), el tiempo máximo que tardan los huevos en eclosionar es de 12 días manteniéndose a lo largo de las generaciones, a diferencia del tiempo mínimo que si que varía de 7 a 9 de la primera a la tercera generación. El número total de huevos emitidos pasa de ser del orden de 10.399 en la primera generación, a 8.333 en la segunda y de 5.920 en la tercera, siendo los porcentajes de eclosión del 98,6%, 97,8% y 96,2% para la primera, segunda y tercera generación respectivamente. Se trata de porcentajes muy elevados ya que la gran mayoría eclosionan.

Para *P. metidjensis* los tiempos mínimo y máximo de eclosión de los huevos no varían entre las generaciones, siendo de 11 y 12 días respectivamente. El número total de huevos eclosionados es de 190, 395 y 336 para la primera, segunda y tercera generación respectivamente. Éstos resultan ser valores notablemente más bajos que los alcanzados por *B. truncatus*, traduciéndose en porcentajes de 69,59%, 70,66% y de 79,62% para la primera segunda y tercera generación respectivamente. Así como en *B. truncatus* es la primera generación en donde más huevos eclosionan, en *P. metidjensis* es en la segunda.

En el caso de *Lymnaea* sp. tanto el tiempo mínimo como el máximo de eclosión de los huevos varía entre 5 y 12 días a lo largo de las generaciones. Aunque los valores absolutos también son menores que los obtenidos en *B. truncatus*, en *Lymnaea* sp. la cantidad de huevos eclosionados favorablemente es en general bastante más elevada que en *P. metidjensis* ya que, en la primera generación eclosionan 397 huevos, pero en la segunda y en la tercera los valores son del orden de 1223 y 1126,

respectivamente. Para *Lymnaea* sp. los porcentajes resultantes fueron de 73,65%, 87,23% y de 90,51% para la primera, segunda y tercera población.

Basándonos en los porcentajes de eclosión de los huevos obtenidos para cada especie, es *B. truncatus* la que presenta la progenie con mayor viabilidad, siguiéndole *Lymnaea* sp., con una progenie de viabilidad que, aunque también elevada, resulta ser intermedia respecto al conjunto de las tres especies en cuestión y es *P. metidjensis* la especie que presenta una menor viabilidad de la progenie.

Por ende, en términos de transmisión de enfermedades como la schistosomiasis y la fascioliasis que dichas especies vectorizan, estaríamos en condiciones de decir que *B. truncatus* es la especie con el mayor potencial como vector, ya que la mayoría de los huevos que emite esta especie eclosionan y se desarrollan con éxito, mientras que, de las tres, *P. metidjensis* resulta ser la especie con un menor potencial como vector basándonos en la viabilidad de su progenie.

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

Desde un punto de vista general, los estudios llevados a cabo en la presente Tesis doctoral ayudan a ampliar y actualizar los conocimientos sobre la distribución geográfica de las tres especies de moluscos vectores y paralelamente a hacernos una idea de los cambios que se van dando en la distribución de las distintas enfermedades que estos moluscos transmiten.

Dichos estudios poseen gran relevancia tanto a nivel epidemiológico y de transmisión como a nivel de control y prevención de las enfermedades parasitarias tratadas en nuestros estudios.

De modo que, por un lado, el seguimiento quincenal del crecimiento permite saber la talla alcanzada con el paso del tiempo, conocer el momento o la época en que se da un mayor crecimiento pudiéndolo asociarlo en parte, con el intervalo de tiempo en el que probablemente se haya alcanzado también la madurez sexual.

Conocer la dinámica de crecimiento de las especies de molusco, permite predecir su capacidad para adaptarse a nuevos enclaves ya que, por ejemplo, un crecimiento rápido en los primeros meses facilitaría la rápida adaptación del molusco. También se podría suponer a partir de la dinámica de crecimiento la capacidad de las especies para repoblar una zona determinada y hasta incluso según el tamaño y la rapidez con la que se alcanza dicho tamaño, poder deducir cuando se alcanza la madurez sexual.

Las medidas morfométricas tanto de clusters como de huevos ayuda en el caso de los clusters a poder distinguir los moluscos analizados a nivel de género y en ocasiones a nivel de especie ya que las medidas de longitud y anchura son por lo general características para cada género y para la mayoría de especies.

En el caso de los huevos, la forma y la disposición dentro del cluster suelen ser características para cada especie con alguna excepción. Por tanto, el análisis morfológico tanto de clusters como de huevos resulta útil para distinguir géneros y especies.

De todas las características de autofecundación estudiadas, el período de prepuesta determina de forma aproximada el tiempo que transcurre entre las lluvias y la producción del suficiente número de ejemplares moluscos para poblar la zona y que se pueda dar la transmisión de la enfermedad.

La capacidad de autofecundación aporta información sobre la capacidad del molusco para repoblar una nueva zona ya que en caso de autofecundarse, un solo espécimen sería capaz de dar lugar a una nueva población en poco tiempo en el caso también de que su tasa de reproducción fuera elevada favoreciendo así la expansión geográfica del molusco vector y en consecuencia la posible transmisión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta la longevidad de los moluscos vectores, resulta lógico pensar que contra más tiempo vivan más tiempo durará la transmisión de la enfermedad.

Otra característica que posee aplicabilidad en los estudios de epidemiología y control es la cronología de emisión de las puestas ya que, el período de tiempo en el que se dé la mayor emisión de huevos será a su vez el de mayor riesgo de transmisión de la enfermedad.

Es por ello que, conociendo la época en la que más se reproducen estos moluscos vectores, se podrá predecir cuándo es más probable que se dé la transmisión de la enfermedad y de este modo se podrían llevar a cabo pautas de control más adecuadas.

Aunque la cantidad de huevos emitidos revela la capacidad de reproducción del molusco y en consecuencia su capacidad para colonizar nuevos enclaves es la viabilidad de los huevos, es decir, la cantidad de huevos que eclosionan y se desarrollan favorablemente dando lugar a nuevos individuos, lo que realmente da información del potencial que posee el molusco como vector, es decir, su potencial para transmitir la enfermedad.

Los estudios sobre crecimiento y reproducción de planórbidos y lymnaeidos llevados a cabo con anterioridad a los nuestros, son por lo general bastante antiguos, aunque

no por ello menos importantes ya que constituyen la base del conocimiento en la que se centran los aspectos que nosotros hemos tratado. Dicho esto, cabe destacar la gran importancia de la labor de investigación llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral al realizarse de forma tan detallada, haciendo un análisis minucioso de todas y cada una de las características tanto de la morfología como de la biología de las diferentes poblaciones de moluscos vectores.

Nuestros resultados aportan una información más completa y valiosa de lo que hasta ahora habían aportado otros estudios de aplicabilidad en epidemiología y control tanto de la schistosomiasis como de la fascioliasis que son dos de las grandes enfermedades parasitarias tropicales olvidadas. Conociendo más al detalle la morfología y biología de los moluscos vectores, se pueden optimizar muchísimo más las medidas de prevención y control de dichas enfermedades. Esto resulta de vital importancia, por un lado, para reducir en la medida de lo posible la mortalidad y morbilidad debidas a la schistosomiasis y fascioliasis en aquellos países donde estas dos enfermedades parasitarias son endémicas y por otro lado, para poder predecir con más precisión la posible introducción de la enfermedades desde países endémicos a no endémicos, así como también predecir la posible introducción de especies vectoras de moluscos desde zonas endémicas a no endémicas.

### 5.3.1.- INTERÉS EN SISTEMÁTICA

En general, para la familia Planorbidae, lo que más relevancia posee a nivel sistemático y filogenético es la morfología del complejo del pene, la mandíbula, la pseudobranquia y la rádula, así como también la microescultura de la protoconcha en el caso de *B. truncatus*. La mandíbula para *Bulinus* y *Planorbarius* presenta un esquema principal basado en una placa superior larga y esclerotizada, ligeramente estriada que puede tener forma de herradura de caballo más o menos variable y la estriación puede disponerse solo el lado inferior (*Bulinus*) o a lo largo de toda la placa superior (*Planorbarius*) (Fig. 84 y Fig. 85).

La rádula está constituida por un diente central bicúspide, seguido de dientes laterales tricúspides internos, centrales y externos (hasta 10 en *Bulinus* y hasta 12 en *Planorbarius*) y dientes marginales (hasta 18 en *Bulinus* y hasta 15 en *Planorbarius*) de aspecto serrado por la presencia de una serie de picos (Girod, 1980). Además de todas estas características, la morfología y morfometría de los clusters y huevos, así como la

disposición intracluster de los mismos es de suma importancia para poder diferenciar entre géneros y hasta incluso especies, como ya se ha comentado con anterioridad.

Desde antiguo se conocía ya el hecho de que la morfología y morfometría de los clusters y huevos en los lymnaeidos difería entre unas especies y otras. Sin embargo, la complejidad y coste que suponen los cultivos experimentales de las especies y su seguimiento cronológico hasta el desarrollo completo de nuevos especímenes que empiecen a emitir puestas, ha hecho que este aspecto de potencial importancia a la hora de distinguir entre especies se ignorara en términos generales.

Por tanto, también ha sido ignorado en sistemática y quizás en taxonomía. Esto queda demostrado de forma evidente en la ausencia de estudios de este tipo en la mayor y más completa obra sobre esta familia de moluscos (Hubbendick, 1951) en los que se focaliza sobretodo en las características de la concha y el sistema reproductor sin hacer referencia a la morfología de los clusters y huevos.

Ya Girod (1980), en su guía para el reconocimiento de los moluscos acuáticos de Italia, incluía dibujos muy detallados de clusters de moluscos del género *Lymnaea*.

Otro autor que incluye esquemas y dibujos de clusters de diferentes especies en lo que sería la revisión más reciente de esta familia de moluscos Gasterópodos es Kruglov (2005), el cual no especifica si los clusters ilustrados se corresponden con puestas jóvenes, intermedias o maduras.

Nuestros resultados demuestran lo útil que resulta el estudio morfométrico tanto de puestas como de huevos, así como también de la concha, en la diferenciación de géneros y especie y por ende en la sistemática y taxonomía de la familia Lymnaeidae.

En la publicación sobre *Lymnaea schirazensis*, Barges *et al.* (2011) demuestran que este tipo de estudios permiten incluso diferenciar dos especies morfológica, anatómica, ecológica y etológicamente en principio indiferenciables como son *L. schirazensis* y *G. truncatula*.

Los clusters emitidos por primera vez, o que contengan un número escaso o reducido de huevos no poseen utilidad práctica en sistemática y taxonomía ya que a ese nivel las características morfológicas y morfométricas de los clusters de diferentes especies se solapan impidiendo una diferenciación clara y fiable.

El tamaño, la distribución y disposición de los huevos dentro del cluster también pueden ser utilizadas en ciertos casos para la diferenciación de especies.

### **5.3.1.1.- DIFERENCIACIÓN DE POBLACIONES Y ESPECIES**

Del análisis morfológico y biológico comparado que se ha hecho de las poblaciones, existen características que, en mayor o menor medida, resultan útiles para poder diferenciar especies.

En primer lugar, de entre todas las medidas morfométricas realizadas sobre la concha de los moluscos vectores, para el estudio de su crecimiento, la longitud total de la concha, la de la abertura, la de la espira y la de la última vuelta de espira, así como también la forma del ápice y la posición y forma de la abertura, son las de mayor utilidad para poder distinguir entre especies.

En segundo lugar, es importante destacar que, aunque los análisis moleculares son muy importantes en la identificación de especies, es necesario que se combinen con el análisis de las morfologías interna y externa de los moluscos para obtener información más completa que a su vez refuerce dichos resultados moleculares.

De esta manera se tendrá una mayor certeza en el momento de distinguir entre géneros y especies. Rasgos como la ornamentación de la concha, la microescultura de la protoconcha o concha con la que nacen, la morfología de la pseudobranquia y tentáculos, posición de los ojos y el número y morfología de los dientes que conforman la rádula; son todos ellos caracteres relevantes en la diferenciación de las especies.

Por otro lado, la longevidad, el período de prepuesta, la edad a la que se emite la primera puesta y la duración el período de puesta, son característicos de especie. Pero también lo son la cantidad de clusters y huevos emitidos, el tamaño y forma de éstos y por supuesto la época del año en la que son emitidos, es decir, la cronología de emisión.

Por último, los resultados muestran que, por un lado, el número de huevos por cluster, junto con la morfología tanto de clusters como de huevos, así como la disposición de éstos dentro del cluster, permiten distinguir entre especies ya que se trata de rasgos muy característicos para cada una de ellas, aunque es importante tener en cuenta que para poder diferenciar bien, los clusters han de ser maduros ya que la morfología y apariencia de las formas jóvenes de clusters de algunas especies se solapan, por lo que es mucho más fiable comparar clusters ya maduros.

### **5.3.2.- INTERÉS EN EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL**

La mayor parte de estudios sobre autofecundación se han desarrollado en moluscos de la familia Planorbidae y más concretamente sobre especies del género *Bulinus* (Rudolph & Bailey, 1985).

En principio se creyó que la autofecundación era la estrategia de reproducción a la que recurrían aquellos ejemplares carentes de pene llamados afálicos, aunque posteriormente se supo que también aquellos que lo poseían recurrían a la autofecundación, sugiriendo esto la preferencia por su propio esperma. Son muchas las publicaciones al respecto sobre todo en la especie *Bulinus truncatus* (Njiokou *et al.*, 1993, 1994; Doums & Jarne, 1996; Viard *et al.*, 1996).

Algunas investigaciones mostraron que las estrategias de reproducción en *Bulinus* son muy variadas implicando desde autofecundación y reproducción cruzada, afalía, inseminación múltiple y almacenamiento de esperma. Parece que los pulmonados de agua dulce son activos en ambos roles sexuales para la mayor parte, si no toda de su vida reproductiva (Brown, 1994).

Junto con los estudios realizados por Brown (1994) sobre la reproducción de moluscos pulmonados de agua dulce como son los pertenecientes a los géneros *Bulinus* y *Lymnaea*, son bastantes los estudios que se focalizan en ese aspecto (Jarne *et al.*, 1993; Jarne, 1995; Jarne & Städler, 1995; Jarne & Auld, 2006; Puurtinen *et al.*, 2007).

Cabe destacar el hecho de que los moluscos en cuestión recurran a la autofecundación o a la fecundación cruzada, aparentemente no implica que sea ese el origen de las diferentes capacidades para albergar y transmitir especies parásitas ni tampoco que recurrir a una estrategia u otra les haga perder esa capacidad de transmisión (Puurtinen *et al.*, 2004).

De modo que, en ese sentido, la autofecundación de los moluscos solo afectará la dinámica de transmisión de las enfermedades de las cuales son vectores estos moluscos y no a la transmisión de la enfermedad en sí.

La autofecundación en lymnaeidos ya fue estudiada hace muchos años en *Pseudosuccinae columella* por Sellers Colton a principios del siglo pasado (Sellers Colton, 1912). Posteriormente se han llevado a cabo otros estudios sobre algunos aspectos de la biología de Lymnaeidos moluscos vectores de fascioliasis en Cuba, los cuales incluían aspectos sobre la oviposición, longevidad y cronología de emisión de puestas de esta especie de molusco (Sánchez *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2000).

Son también interesantes los trabajos realizados sobre *Galba truncatula*, por ser la especie de molusco vectora de la fascioliasis por excelencia (Smith, 1981; Varelle-Morel *et al.*, 2002; Trouve *et al.*, 2003,2005; Meunier *et al.*, 2003, 2004).

Gretillat (1967) destacaba que los Lymnaeidos son gasterópodo con una ecología bastante particular, que requiere que se tomen ciertas precauciones para las campañas de eliminación del molusco ya que en estado de diapausa (estado fisiológico

de inactividad en el que entran la mayor parte de los especímenes criados en peceras) no es destruido.

Este hecho es importante a tener en cuenta en términos de epidemiología y para el control de este molusco vector de fascioliasis.

### 5.3.2.1.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EXPANSIÓN GEOGRÁFICA

De acuerdo con las definiciones originales (Mandahl-Barth, 1957), las especies dentro del grupo de *B. truncatus* eran frecuentemente afáticas incluidas entre los hospedadores intermediarios de *S. haematobium*.

Existen cuatro aspectos interrelacionados de la biología de *Bulinus* que deben ser considerados en relación con el éxito de estos moluscos:

- 1- la estivación; permite la supervivencia en pequeños cuerpos de agua ricos en nutrientes que se secan temporalmente;
- 2- reproducción; logra un incremento rápido en número durante estaciones cortas de cría; por lo que colonizar nuevas zonas le resulta relativamente fácil;
- 3- poliploidía; *B. truncatus* que es tetraploide ( $2n = 72$ ) frente al resto de planórbidos que en general presentan una dotación genética de  $2n = 18$ ; de modo que su mayor variación genética le confiere cierto nivel de resistencia respecto al resto de planórbidos;
- 4- tolerancia a los parásitos; el eficiente uso de los recursos ambientales y la elevada capacidad de reproducción permite a *Bulinus* mantener la densidad de población y a su vez dar soporte a una gran biomasa de parásitos trematodos (Brown, 1994).

Por tanto, la capacidad de expansión geográfica de *B. truncatus* se ve favorecida por estos cuatro aspectos anteriormente descritos.

Por lo que respecta al sistema de reproducción, Brown (1994) ya explicaba que la elevada tasa de incremento de la población de *Bulinus* es el resultado de la estrategia de reproducción que incluye dos componentes principales, el ciclo de vida, que se adapta al entorno y el sistema de cría.

Esto junto a la tetraploidía de *B. truncatus* hace de esta especie de *Bulinus* la de más amplia distribución y abundancia. En su libro, Brown (1994) afirma que, al parecer, la evolución de la tetradiploidía permite una considerable expansión en la distribución del género *Bulinus*, basándose en el hecho de que *B. truncatus* se desarrolla en una

amplia variedad de hábitats naturales y artificiales y su distribución puede estar aún en aumento.

Por lo que, el hecho de que los 90 ejemplares de *B. truncatus* estudiados en la presente Tesis se autofecunden al 100%, apoya la idea de que esta especie presenta una elevada tasa de reproducción y que prefiere la autofecundación tanto si son afálicos o eufálicos, lo que podría explicar su éxito como vector.

La elevada tasa de reproducción obtenida en *B. truncatus* indica que un solo ejemplar es capaz de repoblar una zona o área en poco tiempo debido a su rápido crecimiento y a la temprana edad a la que alcanzan su madurez sexual.

Aunque en *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. los porcentajes de autofecundación fueron de 61% y 77% respectivamente, siguen siendo porcentajes considerablemente altos.

De modo que, desde el punto de vista de la transmisión, epidemiología y control de la Schistosomiasis y Fascioliasis transmitida por planórbidos (*B. truncatus* y *P. metidjensis*) y lymnaeidos respectivamente, la capacidad de autofecundación resulta ser clave al implicar la posibilidad de que el transporte pasivo de un único ejemplar sea suficiente para poder disparar una nueva población y con ello la colonización de un nuevo enclave.

Aunque Gretillat (1967) realizó sus prospecciones malacológicas sobre Lymnaeidos en diferentes lugares de Martinica, de acuerdo con sus hallazgos, también nosotros recolectamos ejemplares tanto en pequeños cursos de agua, canales de irrigación, en agua clara con fondo arcilloso fuertemente oxigenada, en pequeños cuerpos de agua estancada y poco aireadas, pero también de fondos fangosos, con vegetación acuática y agua con un pH de 6.8. Por lo que, el hallazgo en diversos sitios y con características abióticas del agua distintas, sugiere que podría expandirse geográficamente viviendo en enclaves de características bióticas y abióticas similares a los descritos por el autor mencionado anteriormente.

La expansión de estas tres especies de moluscos vectores se puede dar bien por fuerzas de la naturaleza como sería el arrastre por corrientes de agua en subidas de nivel de ríos como consecuencia de precipitaciones abundantes, bien mediante el transporte en el barro que queda adherido en las patas de animales que frecuentan los hábitats de estos moluscos para por ejemplo beber agua, tales como el ganado u otros mamíferos y aves silvestres y migratorias; o bien por actividades llevadas a cabo por el hombre como la construcción de presas, canales de irrigación y demás.

Y aunque aparentemente más complicado, también cabe la posibilidad de que los moluscos lleguen a nuevas áreas debido al comercio de plantas acuáticas para su uso

en acuarios, pudiendo quedar adheridos en las hojas de las plantas y musgos las puestas o ejemplares pequeños de los moluscos.

### 5.3.2.2.- ASPECTOS RELACIONADOS CON EPIDEMIAS

Tanto el cambio climático como el cambio global son aspectos relacionados con las epidemias, aunque también son, en cierto modo, los causantes en mayor o menor medida de éstas. Esto es así porque, por un lado, los cambios en la temperatura y las precipitaciones influyen sobre el ciclo biológico tanto de los moluscos hospedadores intermediarios como del parásito ya que éste último depende a su vez del hospedador.

Las actividades humanas relacionadas con el cambio global crean nuevas oportunidades para la reproducción y colonización por parte de los moluscos, así como también para la expansión del parásito y en consecuencia de las enfermedades.

En este sentido, todas las características de la autofecundación estudiadas entre las que se incluyen la duración del período de puesta y la capacidad de emisión de clusters y huevos de cada una de las especies analizadas en esta tesis, pasan a ser decisivas.

Sin embargo, la característica más destacable en términos de epidemiología es el período prepuesta o, dicho de otro modo, el tiempo transcurrido entre el nacimiento de los ejemplares y la emisión de la primera puesta. El período de vida antes de la primera puesta determinará el tiempo que ha de transcurrir entre las lluvias y la producción de la población suficiente para que se dé un aumento de la transmisión de la enfermedad.

Este factor es crucial tanto en epidemiología como en control, al permitir predecir de algún modo el tiempo que tardarán en aparecer las epidemias y a su vez predecir también la posibilidad y conveniencia de poner en marcha medidas apropiadas de control.

Nuestros resultados en el laboratorio muestran que, de entre los dos planórbidos transmisores de la schistosomiasis, *B. truncatus* es el que presenta un menor período prepuesta de 64 días frente a los 315 días de *P. metidjensis*, lo cual lo hace un molusco vector más potente y con más éxito al alcanzar la madurez sexual a una temprana edad junto con su elevada tasa de reproducción.

De modo que, teniendo en cuenta esto y que la especie *B. truncatus* es la que emite más cantidad de clusters y huevos a lo largo de toda su vida poseyendo también el período de puesta más largo, sería por tanto la especie con mayor capacidad para

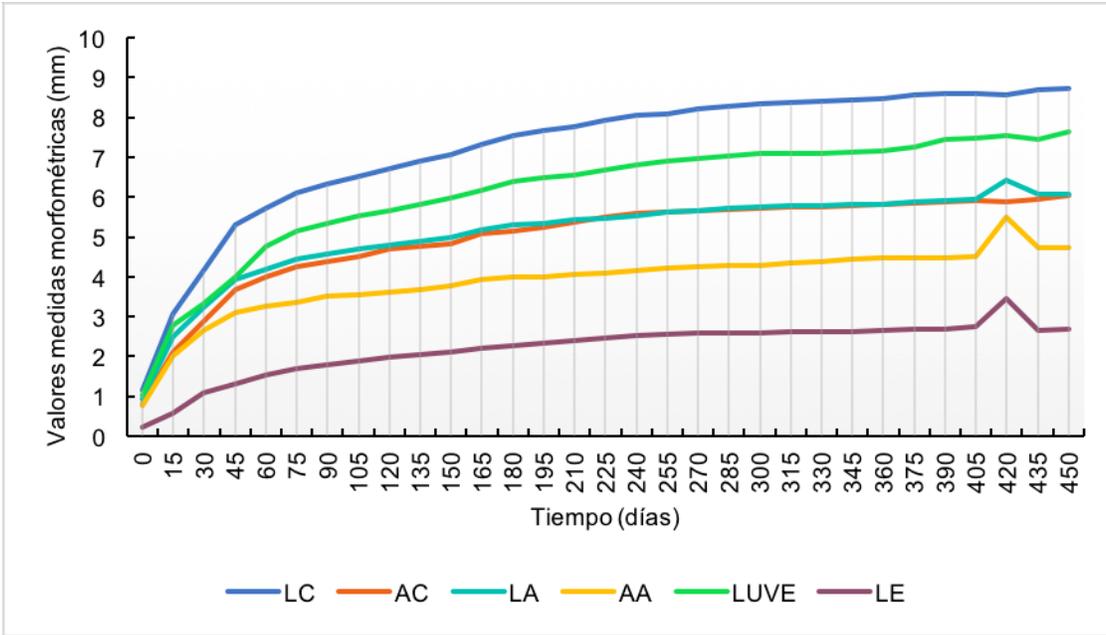
provocar una epidemia de forma más rápida y a su vez sería la más difícil de controlar por su elevada tasa de crecimiento y reproducción.

*P. metidjensis* es una especie más delicada que crece más lentamente, tarda más tiempo en alcanzar la madurez sexual y emite menos clusters y huevos durante un período de tiempo más corto que *B. truncatus*.

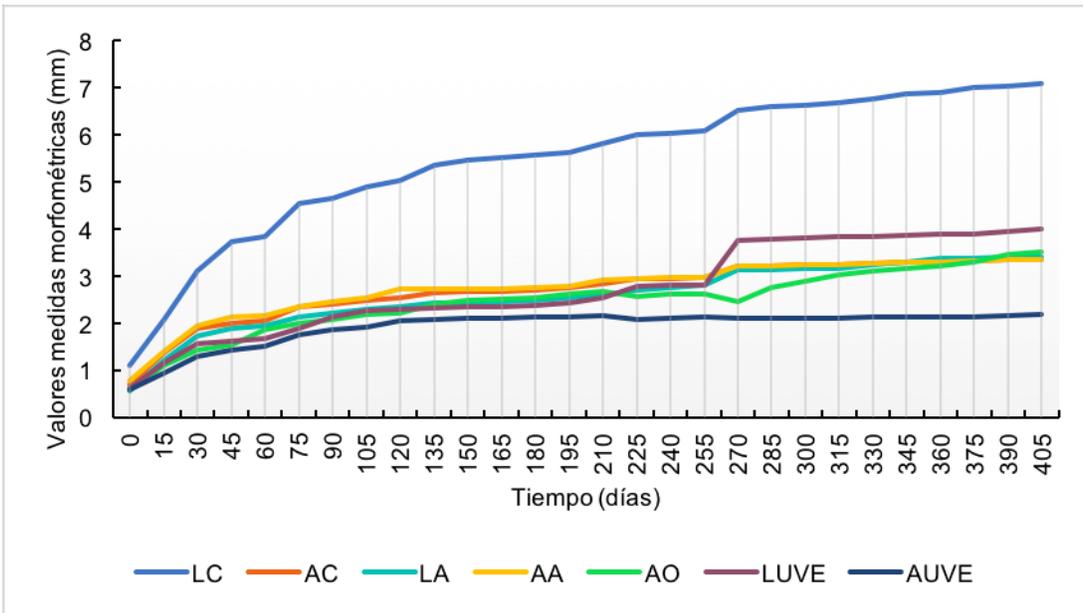
No obstante, *Lymnaea* sp. por su parte, aunque presenta un período pre-puesta máximo de 236 días siguiendo a *P. metidjensis*, aun así emite mayor cantidad de clusters y huevos que *P. metidjensis* y durante un mayor período de tiempo, por lo que *Lymnaea* sp. se situaría en segundo puesto como mejor especie de molusco vector, en este caso de fascioliasis, que presenta una capacidad considerable para provocar epidemias teniendo en cuenta que el porcentaje de autofecundación obtenido también fue elevado.

Los resultados conseguidos en los análisis realizados en la presente Tesis Doctoral abren un nuevo y amplio campo de estudio con importantes implicaciones en epidemiología, predicción y control. En un futuro convendría llevar a cabo estudios similares en poblaciones de otras especies vectoras para poder cuantificar todos estos aspectos y poderlos incluir en las correspondientes fórmulas matemáticas que permitan hacer los cálculos de los índices de predicción.

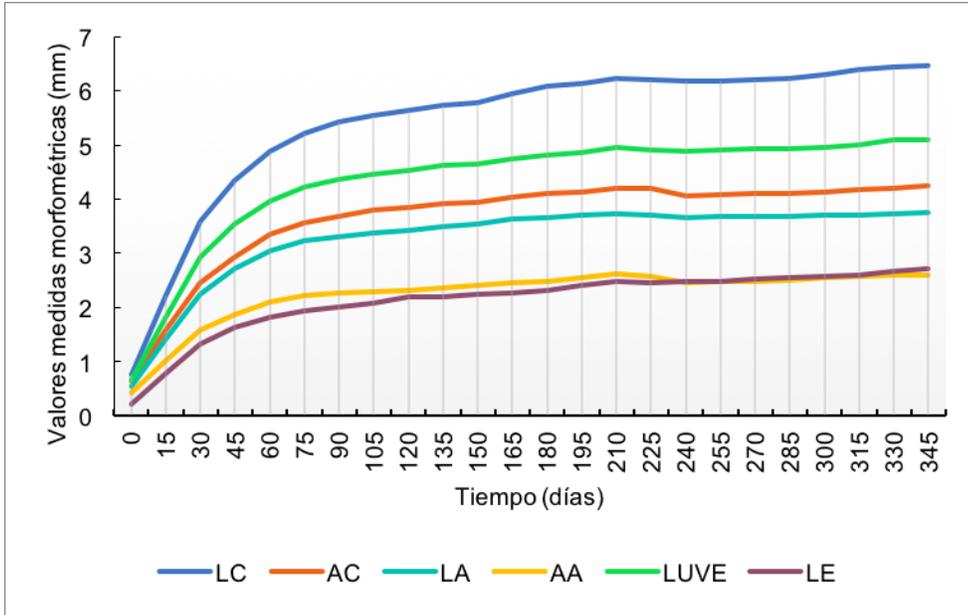




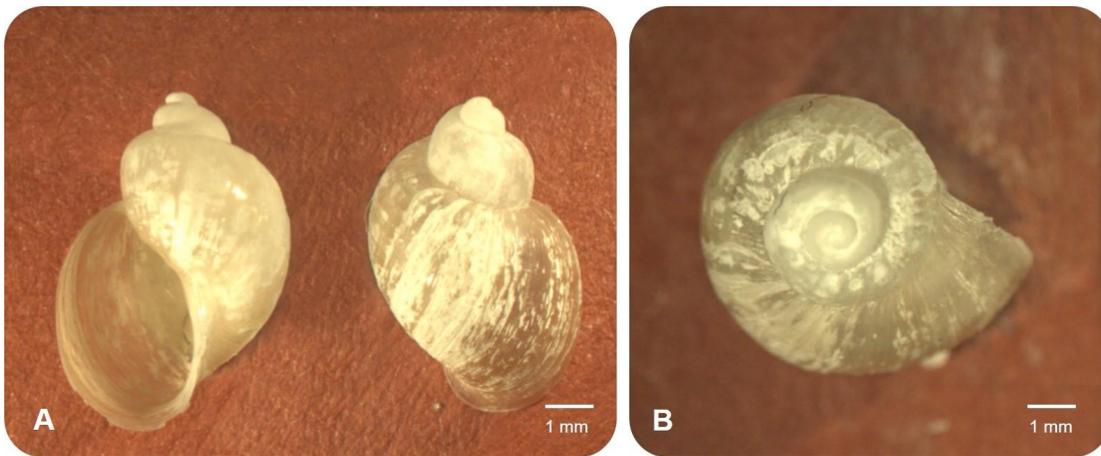
**Fig. 71.-** Dinámica seguida por *B. truncatus*, para los valores promedio de cada medida morfométrica, para el conjunto de las tres generaciones. **LC=** Longitud Concha, **AC=** Anchura Concha, **LA=** Longitud Abertura, **AA=** Anchura Abertura, **LUVE=** Longitud Última Vuelta Espira y **LE=** Longitud Espira.



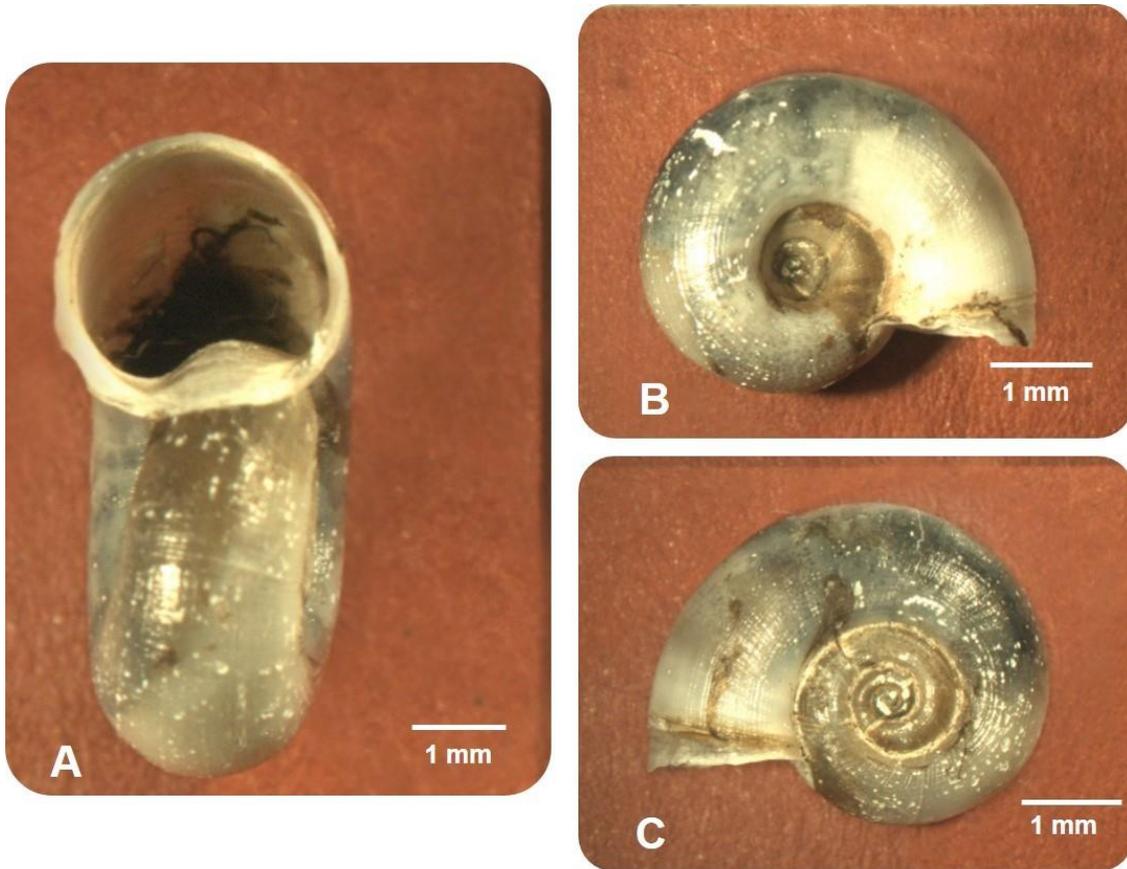
**Fig. 72.-** Dinámica seguida por *P. metidjensis* para los valores promedio de todas las medidas morfométricas realizadas sobre el conjunto de las tres generaciones. **LC=** Longitud Concha, **AC=** Anchura Concha, **LA=** Longitud Abertura, **AA=** Anchura Abertura, **AO=** Anchura Ombligo, **LUVE=** Longitud Última Vuelta Espira, **AUVE=** Ancho Última Vuelta Espira.



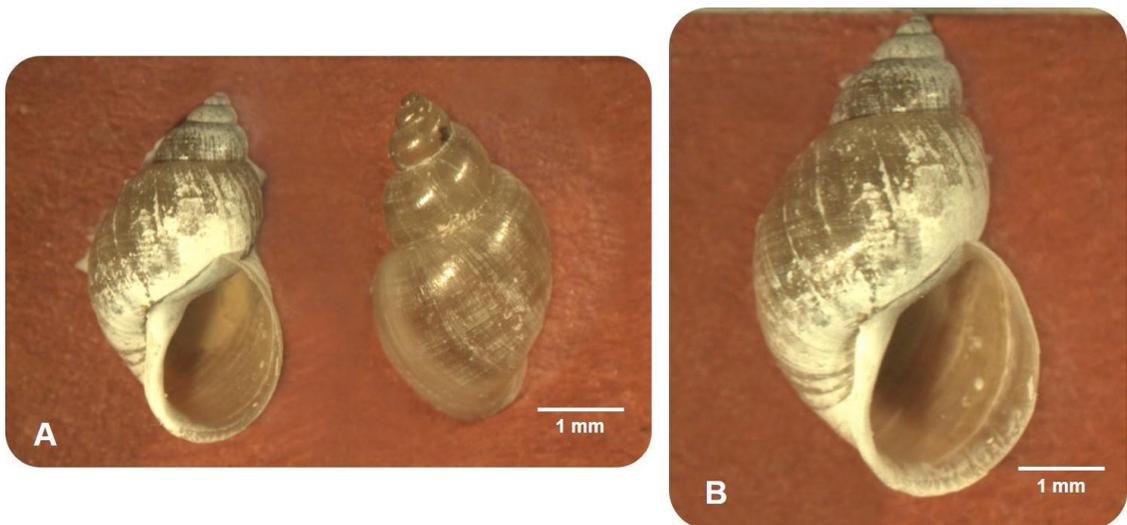
**Fig. 73.-** Dinámica seguida por *L. sp* para los valores promedio de las medidas morfométricas del conjunto de las tres generaciones analizadas. **LC=** Longitud Concha, **AC=** Anchura Concha, **LA=** Longitud Abertura, **AA=** Anchura Abertura, **LUVE=** Longitud Última Vuelta Espira y **LE=** Longitud de la Espira.



**Fig. 74.-** Morfología de la concha de *B. truncatus*: **(A)** vista ventral y dorsal; **(B)** vista apical.



**Fig. 75.-** Morfología de la concha de *P. metidjensis*: (A) vista ventral; (B) vista umbilical y (C) vista apical de la concha.



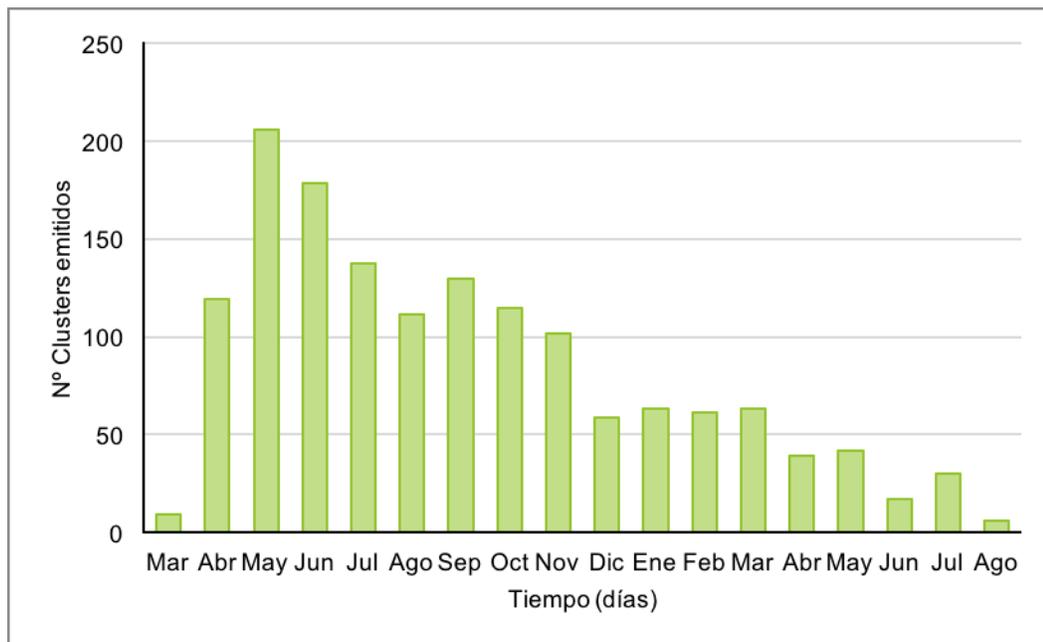
**Fig. 76.-** Morfología de la concha de *Lymnaea* sp.: (A) vista ventral y dorsal y (B) detalle a más aumento de la parte ventral de la concha.



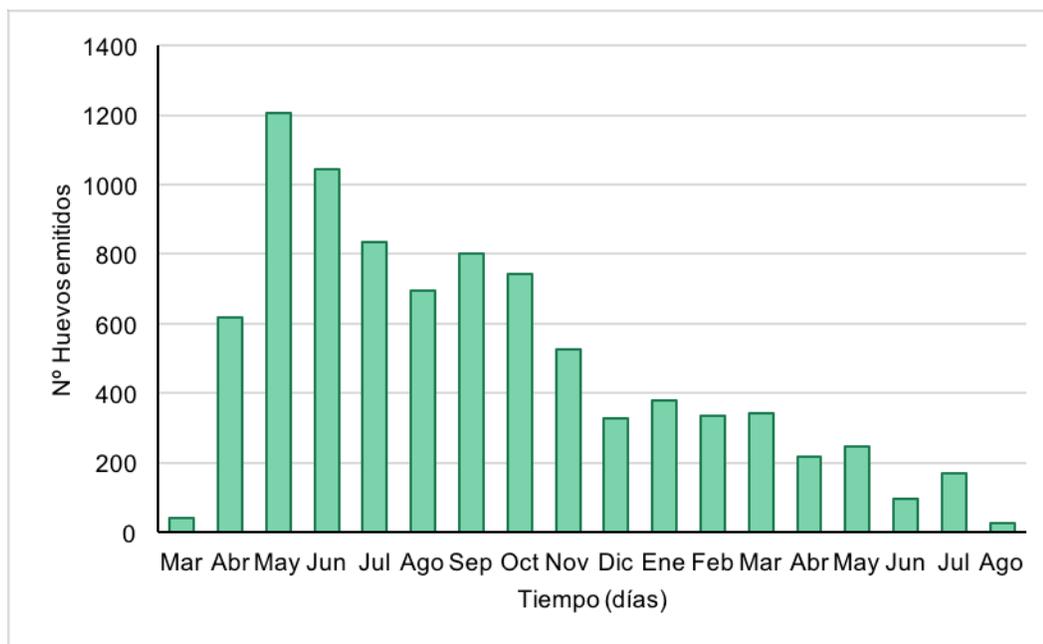
**Fig. 77.-** Imágenes de clusters emitidos por las tres especies de molusco estudiadas: **(A-D)** clusters de *B. truncatus*; **(A)** clusters jóvenes o recién emitidos con 6 y 9 huevos; **(B)** cluster intermedio de 7 días aproximadamente con 8 huevos; **(C)** clusters maduro e intermedio con 9 y 5 huevos respectivamente; **(D)** cluster maduro de 12 días con 6 huevos; **(E-H)** clusters de *P. metidjensis*; **(E)** cluster joven con 4 huevos; **(F)** clusters intermedios de 7 u 8 días con 4 y 6 huevos, **(G)** clusters con maduración de huevos irregular con 7 y 3 huevos; **(H)** cluster maduro de 12 días con 5 huevos; **(I-L)** clusters de *Lymnaea* sp.; **(I)** clusters jóvenes con 10 y 6 huevos; **(J)** cluster joven con 11 huevos; **(K)** clusters intermedios de 7 días con 4 y 3 huevos; **(L)** cluster maduro de 10 días.

	Clusters			Huevos		
	<i>B. truncatus</i>	<i>P. metidjensis</i>	<i>L. sp</i>	<i>B. truncatus</i>	<i>P. metidjensis</i>	<i>L. sp</i>
Área (mm <sup>2</sup> )	32,5689	22,9360	8,4918	–	–	–
Redondez	1,7177	1,2834	2,6513	–	–	–
Longitud (mm)	7,7735	6,1250	5,0159	1,3868	1,4410	0,8392
Anchura (mm)	5,1299	5,2000	2,6810	1,3667	1,3970	0,6633

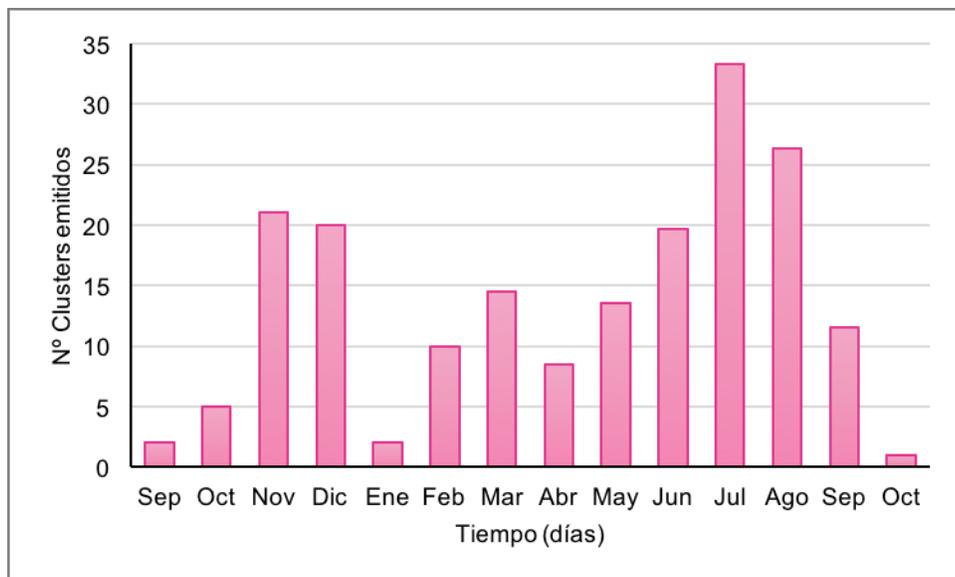
**Tabla 1.-** Comparación de los valores máximos alcanzados por las tres especies de moluscos vectores estudiadas para cada medida morfométrica realizada sobre clusters y huevos.



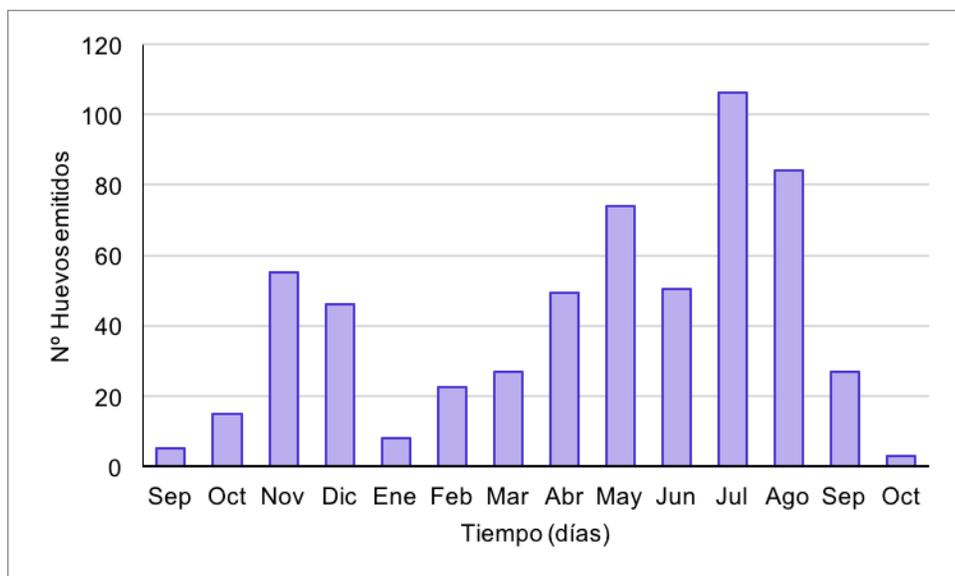
**Fig. 78.-** Cronología de la emisión de clusters promedio de las tres generaciones analizadas de *B. truncatus*.



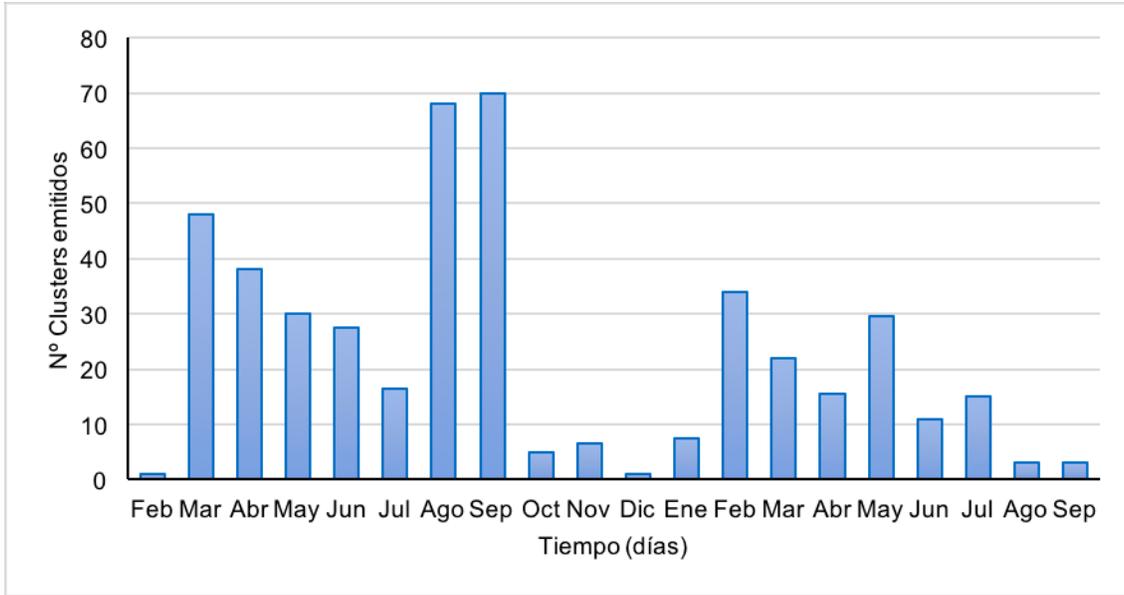
**Fig. 79.-** Cronología de la emisión promedio de huevos de las tres generaciones analizadas de *B. truncatus*.



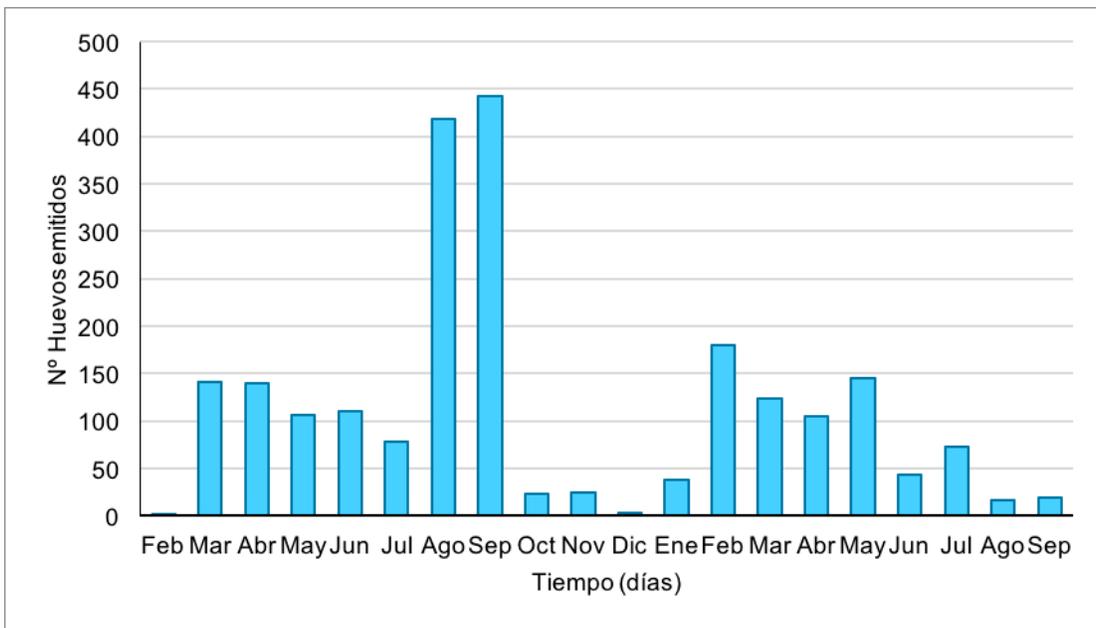
**Fig. 80.-** Cronología de la emisión promedio de clusters de las tres generaciones analizadas de *P. metidjensis*.



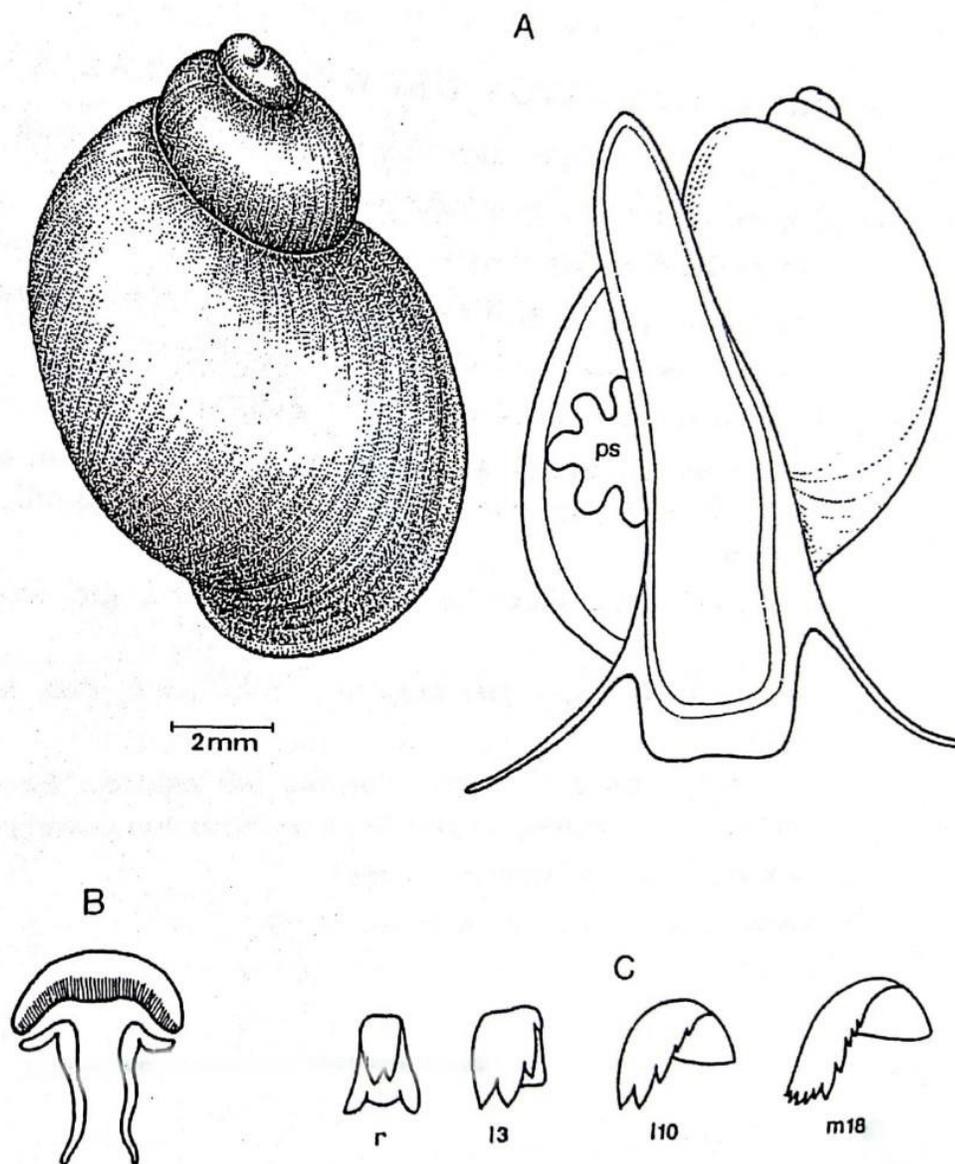
**Fig. 81.-** Cronología de la emisión promedio de huevos de las tres generaciones analizadas de *P. metidjensis*.



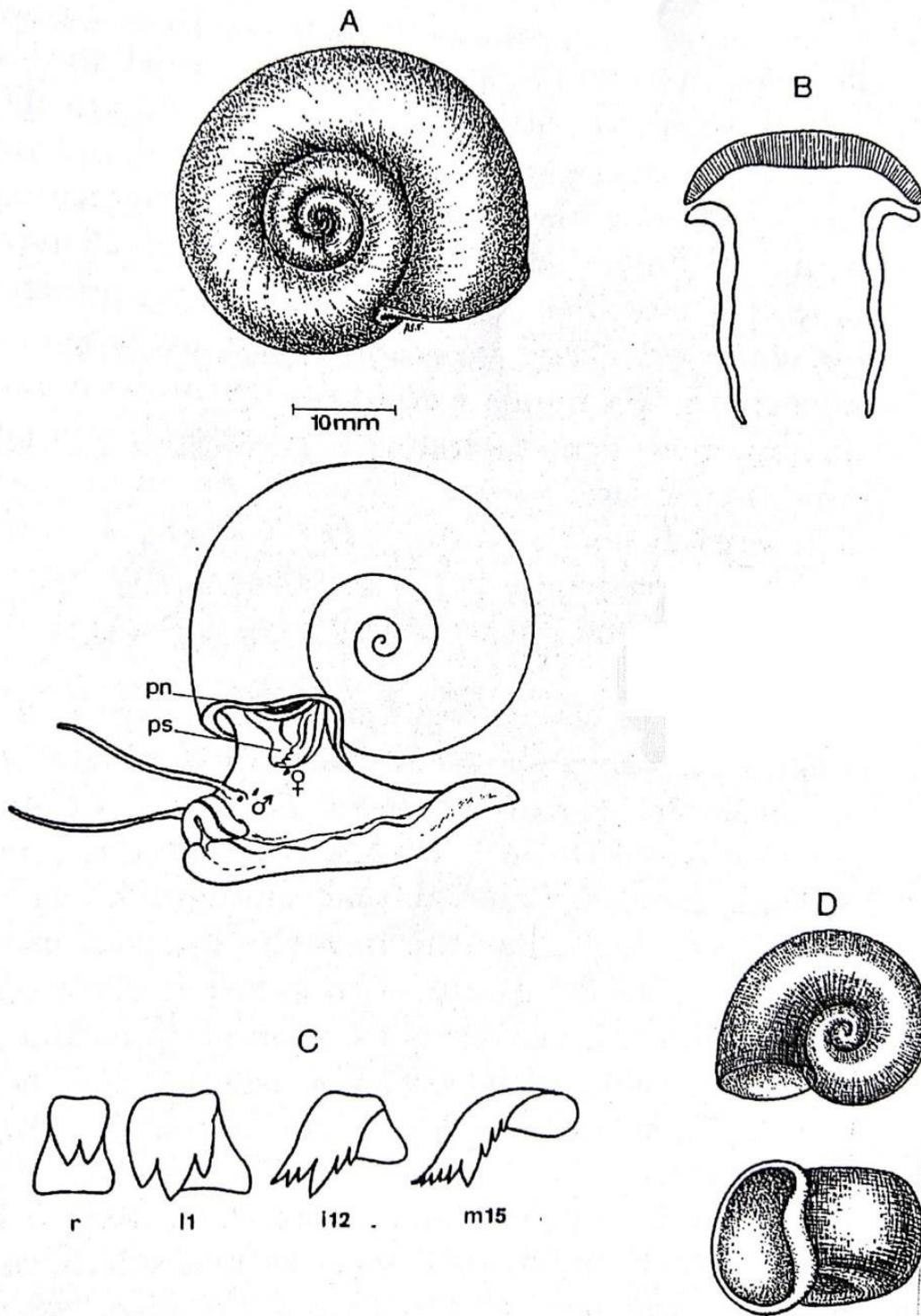
**Fig. 82.-** Cronología de la emisión promedio de clusters de las tres generaciones analizadas de *Lymnaea* sp.



**Fig. 83.-** Cronología de la emisión promedio de huevos de las tres generaciones analizadas de *Lymnaea* sp.



**Fig. 84- Estructuras de *B. truncatus* de interés en sistemática: (A) *Bulinus truncatus*, ps= pseudobranquia; (B) mandíbula; (C) esquema de la rádula: diente radial o central, 3er diente lateral, 10º diente lateral y 18º diente marginal. Fuente: Giroid *et al*, 1980 en *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*.**



**Fig. 85.- Estructuras del género *Planorbarius* de interés en sistemática: (A)** Visión lateral de *Planorbarius*, **pn**= pneumostoma, **ps**= pseudobranquia; **(B)** mandíbula; **(C)** esquema de la rádula: diente racial o central, 1er diente lateral, el 12º diente lateral, el 15º diente marginal; **(D)** aspecto de la concha de un individuo neonato. Fuente: Giroid *et al*, 1980 en *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*.



**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**



## 6.- CONCLUSIONES

Las conclusiones que cabe extraer de nuestro trabajo son numerosas y variadas. Por ello, procedemos a enumerarlas según el orden en que se han discutido los resultados.

- Por lo que se refiere a la caracterización morfométrica de las conchas, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes generaciones de las especies *B. truncatus*, *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. a nivel de valores promedio para las medidas de longitud y anchura de la concha, longitud y anchura de la abertura, longitud de la última vuelta de espira, ángulo del ápice, longitud de la espira y nº de vueltas.

- En *B. truncatus*, a nivel de valores mínimos existen diferencias significativas entre la primera y la tercera y entre la segunda y la tercera generación para los valores del ángulo de la espira, así como también existen diferencias significativas para esta misma característica a nivel de valores máximos entre la primera y la segunda generación estudiadas.

- De las tres especies estudiadas, *B. truncatus* es la que alcanza valores más altos para las medidas morfométricas de la concha llevadas a cabo, siendo la que presenta un mayor crecimiento respecto a las otras dos especies.

- Los ejemplares de *B. truncatus* nacidos en Mayo crecieron más rápido que los nacidos en Agosto, por tanto, esto sugiere que la época del año en la que nacen influye en el mayor o menor crecimiento, aunque hayan sido criados y mantenidos en las mismas condiciones. A las especies *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. no parece afectarles la época en la que nacen ya que el crecimiento muestra la misma dinámica.

- Basándonos en la literatura y en los resultados obtenidos, temperatura y pH no afectan la dinámica de crecimiento seguida por *Lymnaea* sp., pero sí al crecimiento en sí, ya que, en nuestro caso, a menor temperatura y mayor pH que los usados en otros estudios, obtuvimos valores más elevados para la longitud y anchura de la concha.

- Las medidas morfométricas de los clusters analizadas más importantes para la diferenciación de especies son el área, la longitud y la anchura. Sin embargo, el valor

de la anchura de los clusters no es útil para diferenciar *B. truncatus* y *P. metidjensis*, ya que se obtuvieron valores muy similares para esta característica.

- Ha de tratarse de clusters maduros para poder diferenciar géneros o especies con mayor seguridad ya que la morfología de los clusters jóvenes de algunas especies se solapa dificultando así su distinción.

- Entre *B. truncatus* y *P. metidjensis*, es complicado distinguir entre las dos especies a nivel de morfología de huevos, ya que la forma y disposición de los mismos es similar en ambas especies.

- Las medidas de longitud y anchura no son determinantes para poder diferenciar entre *B. truncatus* y *P. metidjensis* ya que se obtienen valores muy similares, sin embargo, sí que resultan útiles estas medidas en la diferenciación de estas dos especies de planórbido respecto a *Lymnaea* sp.

- Del análisis biológico de las poblaciones se deduce que *B. truncatus* es la especie que mejor se adapta o que mejor responde a las condiciones de laboratorio bajo las que se han realizado los cultivos experimentales y el resto de experiencias.

- *Lymnaea* sp. por su parte demuestra ser una especie más bien anfibia al sobrevivir por más tiempo con una menor cantidad de agua (1 cm) y al tener la capacidad de poder quedar en diapausa durante días sin morir.

- Aun en presencia de 1 cm de agua prefieren permanecer encima de las hojas de lechuga o de la rejilla utilizada a modo de pequeña plataforma entre el sustrato calcáreo del fondo y la superficie del agua, lo que confirma su tendencia anfibia.

- *P. metidjensis* es, de las tres especies estudiadas, la más delicada y la que se adapta con más dificultad, ya que es la que presenta un mayor período prepuesta y crece y se reproduce con mayor lentitud.

- Existe la posibilidad de que los moluscos de estas tres especies analizadas posean un ritmo orgánico interno, ya que, a pesar de ser mantenidos a las mismas condiciones constantes de temperatura, fotoperiodo y tipo de alimentación, se dan variaciones en el

crecimiento y la emisión de puestas y además cada especie sigue presentando una dinámica de crecimiento y una cronología de emisión de puestas característica.

- La especie de planórbido *B. truncatus* presenta un porcentaje de autofecundación del 100% por lo que un solo individuo podría poblar una zona en poco tiempo, más concretamente en poco más de dos meses que es el tiempo que dura aproximadamente su período de prepuesta.

- Hay ejemplares de *B. truncatus* eufálicos y afálicos y aunque la afalía es lo que más predomina, la presencia/ausencia de pene no interfiere en la capacidad para autofecundarse ya que teniendo la posibilidad de utilizar como estrategia de reproducción la fecundación cruzada, eligen con más frecuencia la autofecundación prefiriendo por tanto su propio esperma.

- Según la capacidad de autofecundación de mayor a menor podemos ordenar las especies de la siguiente manera: *B. truncatus*-*Lymnaea* sp.-*P. metidjensis*.

- *B. truncatus* es la especie con el mejor perfil de molusco vector ya que de las tres especies estudiadas es la de mayor longevidad, menor porcentaje de mortalidad, menor período prepuesta, mayor período de puesta y postpuesta, alcanzando la madurez sexual a una edad temprana (no superior a los dos meses), siendo a su vez la que mayor cantidad de clusters y huevos emite durante un período de tiempo más prolongado y además el porcentaje de viabilidad de los huevos emitidos por dicha especie es elevado. Por tanto, reúne todas las características que favorecen la transmisión de la schistosomiasis que es la enfermedad que vectoriza.

- *P. metidjensis*, respecto a sus características de autofecundación, es de los dos planórbidos, la especie que consideramos con menor potencial como vector de la schistosomiasis, ya que es el que más tiempo tarda en empezar a emitir puestas (entre 3 y 4 meses aproximadamente) y a su vez es el molusco planórbido que posee un período de puesta más corto, un menor porcentaje de autofecundación y el que menor cantidad de clusters y huevos emite a lo largo de toda su vida.

- Para cada especie de las tres estudiadas en la presente Tesis Doctoral, el pico de emisión de puestas se da en una época del año diferente y que resulta ser característico para cada una de ellas.

- En *B. truncatus* el máximo de emisión de clusters y huevos se da en los meses de Mayo y Junio que se corresponde con la época de primavera-verano. Esta especie emite clusters de forma casi continua a lo largo de su vida (la máxima longevidad en cautividad ha sido de 1 año y 3 meses) aunque se da de forma más notable en los primeros 7 meses de vida. A partir de esa edad, aunque continúa, la emisión va decayendo progresivamente.
  
- En *P. metidjensis* se dan dos picos de emisión de clusters y huevos en los meses de Noviembre y Julio, correspondiéndose con las épocas de otoño y verano respectivamente.
  
- *P. metidjensis* tiende a compensar los meses de menor emisión de clusters con una mayor carga de huevos de los mismos y del mismo modo cuando la emisión de clusters es mayor la cantidad de huevos contenidos en éstos es menor.
  
- *Lymnaea* sp. presenta su máxima emisión de clusters y huevos en los meses de Agosto y Septiembre, es decir a finales de verano. En esta especie la emisión se da de forma más irregular que en las dos especies de planórbido también estudiadas.
  
- *B. truncatus* posee la mayor capacidad de puesta (nº de clusters/período de vida) siendo la que mayor cantidad promedio de clusters y huevos emite por ejemplar.
  
- *P. metidjensis* y *Lymnaea* sp. alcanzan valores muy similares en lo que a emisión de clusters se refiere y respecto a la cantidad de huevos es *Lymnaea* sp. la que más cantidad emite.
  
- De las tres especies, *Lymnaea* sp. es la que presenta la menor capacidad de puesta.
  
- La viabilidad de los huevos emitidos por *B. truncatus* es muy alta, siendo los porcentajes de eclosión de los huevos casi del 100%, tardando un máximo de 12 días en eclosionar. Por tanto, esta especie de planórbido posee una elevada capacidad de colonización y expansión, favoreciendo a su vez el mantenimiento de la schistosomiasis en una determinada zona.

- En *P. metidjensis* los porcentajes de eclosión de los huevos son más bajos, lo que se traduce en cierto modo en una menor capacidad de expansión y disminución de la probabilidad de encuentro entre *Schistosoma* y su molusco vector, ya que la cantidad de moluscos es menor. En esta especie es en la que menor cantidad de huevos eclosionan, es decir, la especie con la progenie menos viable. *P. metidjensis* es por tanto, la especie con menor potencial como vector de las tres estudiadas.
  
- El hallazgo de las dos nuevas localizaciones para *B. truncatus* en España (Alicante y Almería) en 2014 y la infección experimental positiva de estos ejemplares, sugiere la ampliación del riesgo de diseminación de la enfermedad, así como la posible introducción de dicha trematodiasis en España.
  
- Las elevadas tasas de reproducción y crecimiento de *B. truncatus* permiten que un solo individuo de esta especie de gasterópodo planórbido dé lugar a toda una población en poco tiempo, aumentando así el riesgo de transmisión de la enfermedad.
  
- La schistosomiasis podría introducirse en España porque en toda la zona del Levante mediterráneo la temperatura es favorable tanto para la supervivencia y dispersión del molusco *B. truncatus* que actúa como hospedador intermediario, como para el desarrollo y supervivencia de las fases larvarias de vida libre del parásito.
  
- Si a la temperatura favorable se le suma el hecho de que *B. truncatus* es endémico en algunas regiones de España cercanas o bañadas por el mar Mediterráneo, la presencia del molusco vector específico para el parásito y el fenómeno de inmigración de personas infestadas desde zonas endémicas a zonas no endémicas; estamos frente a la combinación perfecta para que la schistosomiasis urogenital pueda llegar a España y establecerse una transmisión autóctona.
  
- La duración o tiempo de vida de los moluscos marca la duración del riesgo de infección humana, ya que las cercarías de *Schistosoma* liberadas por los caracoles de agua dulce infectan directamente al humano mediante penetración transcutánea.
  
- Teniendo en cuenta que la emisión de cercarías puede durar lo que dure la vida del molusco vector, si un molusco vive por más tiempo, podrá emitir mayor número de cercarías y durante un período de tiempo más prolongado, aumentando así el riesgo de transmisión de la enfermedad.

- La especie *P. metidjensis* también muestra susceptibilidad a la infección por schistosomiasis, y por tanto esto supone también al igual que en *B. truncatus* la expansión de la enfermedad.
  
- Los ejemplares de *Lymnaea* sp. nacidos en el laboratorio a partir de las puestas emitidas por los moluscos hallados y recolectados en dos zonas de la Comunidad Valenciana, resultan ser susceptibles a la infección por una cepa de *F. hepatica* de origen europeo.
  
- De todas las características de la autofecundación analizadas, el período de vida antes de la emisión de la primera puesta es el de mayor importancia a nivel de epidemiología y control, ya que, este período determinará el tiempo a transcurrir entre las lluvias y la producción del suficiente número de ejemplares moluscos para que se dé un aumento en la transmisión de la enfermedad.
  
- El período pre-puesta permite predecir el tiempo de aparición de epidemias y la posibilidad de poner en marcha medidas de control adecuadas.
  
- Conocer la época en la que se da el máximo de emisión de puestas permite conocer el período de tiempo en el que el riesgo de transmisión de la enfermedad es mayor y a su vez poder actuar en el momento adecuado para asegurar una mayor eficacia en las medidas de prevención y control.
  
- Para los planórbidos, el carácter o los caracteres que mayor relevancia poseen a nivel de sistemática y filogenia son la morfología del pene, la mandíbula, pseudobranquia y la rádula, más concretamente el número total de dientes laterales, marginales y centrales, el cual determinará la fórmula dentaria que resulta ser característica.

**CAPÍTULO VII**  
**BIBLIOGRAFÍA**



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Nasser A., 2008. Prevalence of urinary schistosomiasis and infections with trematode larval stages in *Bulinus truncatus* snails from Qena Upper Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*, 4: 1610-1617.
- Acosta-Ferreira W., Vercelli-Retta J. & Falconi L.M., 1979. *Fasciola hepatica* human infection. Histopathological study of sixteen cases. *Pathological Anatomy and Histology*, 383: 319-327.
- Adema C.M. & Loker E.S., 1997. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In: *Advances in Trematode Biology* (Fried B. & Graczyk T.K., Eds), CRC Press, Boca Ratón, pp: 229-264.
- Afshan K., Fortes-Lima C.A., Artigas P., Valero M.A. & Mas-Coma S., 2013. 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.
- Agence du Tourisme de la Corse, 2013. Observation et strategie touristiques (<http://www.bastia.aeroport.fr/Administration/accueil/pdf/pdfdoss20121227141029.pdf>) (accessed May 2, 2016).
- Aguirre Errasti C., Merino Angulo J., Flores Torres M. & De Los Rios A., 1981. Unusual forms of *Fasciola hepatica* infestation. Report of two cases. *Medicina Clinica Barcelona*, 76: 125-128.
- Alicata J.E., 1938. Observations on the life history of *Fasciola gigantica*, the common liver fluke of cattle in Hawaii, and the intermediate host, *Fossaria ollula*. *Hawaii Agriculture Experimental Station Bulletin*, 80: 1-22.
- Anjarwalla K.A., 1971. Carcinoma of the bladder in the coast province of Kenya. *East African Medical Journal*, 48 (9): 502-509.
- Anthony P.P., 1974. Carcinoma of the urinary tract and urinary retention in Uganda. *British Journal of Urology*, 46 (2): 201-208.
- Apt W., Aguilera X., Vega F., Miranda C., Zulantay I., Perez C., Gabor M., Apt P., 1995. Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazole: drug efficacy and serologic response. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52 (6): 532-535.
- Arjona R., Riancho J.A., Aguado J.M., Salesa R. & Gonzalez-Macias J., 1995. Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine*, 74 (1): 13-23.

- Armengol G., Eissa S. & Lozano J.J., 2007. Genomic imbalances in *Schistosoma*-associated and non-*Schistosoma*-associated bladder carcinoma. An array comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 177 (1): 16-19.
- Ash L. & Orihel T., 2010. Atlas de Parasitología Humana. 5ª ed: Médica Panamericana, Buenos Aires, 556 pp.
- 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 (6): 636-649.
- Ashrafi K., Massoud J., Holakouei Naini K., Jo-Afshani M.A., Mahmoodi M. & Ebadati N., Rezvani S.M., Artigas P., Bargues M.D. & Mas-Coma S., 2007. Nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequence characterization of *Fasciola hepatica* and *Galba truncatula*. *Iranian Journal of Public Health*, 36 (4): 42-49.
- Ashrafi K., Valero M.A., Massoud J., Sobhani A., Solaymani-Mohammadi S., Conde P., Khounane 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.
- Audousset J.C., Rondelaud D., Dreyfuss G. & Vareille-Morel C., 1989. Les émissions cércariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7 (2): 217-224.
- Badawi A.F., 1996. Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Letters Journal*, 105 (2): 123-138.
- Barbosa F.S., Barbosa I. & Morais Rêgo A., 1959. Laboratory infections of the snail *Planorbarius metidjensis* (Forbes) from French Morocco with a Brazilian strain of *Shistosoma mansoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 53 (3): 314-315.
- Bargues M.D., 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 *L. meridensis* n. sp. (Gastropoda: Lymnaeidae), *Parasites and Vectors*, 4: 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.

- Bargues M.D., Artigas P., Khoubbane M., Ortiz P., Naquira C. & Mas-Coma S., 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Perú and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors*, 5: 174.
- Bargues M.D., Artigas P., Mera y Sierra R.L., Pointier J.P. & 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. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101 (7): 621-641.
- Bargues M.D., Fuentes M.V., Mansoorian A.B., Moghaddam A.S., Ashrafi K. & Savioli L.Y., 2002a. Determinación específica de los parásitos implicados en la Fascioliasis humana y animal en la provincia de Gilán, Irán, mediante secuenciación del ADN ribosomal nuclear. III Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional, Libro de Resúmenes, Cuenca, España, pp: 165.
- Bargues M.D., González L.C., Artigas P. & Mas-Coma S., 2011c. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. *Parasites and Vectors*, 4: 200.
- Bargues M.D., Horak P., Patzner R.A., Pointier J.P., Jackiewicz M., Meier-Brook C. & Mas-Coma S., 2003. Insights into the relationships of Palearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, 10 (3): 243-255.
- Bargues M.D., Mera y Sierra R.L., Gómez 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*, 9: 77-82.
- 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.
- Barsoum R.S., 2012. Urinary Schistosomiasis: Review. *Journal of Advanced Research*, 4 (5): 453-459.
- Basch P., 1991. Schistosomes: Development, reproduction, and host relations. Oxford University Press, United States, New York ,7, pp: 248.
- Bech M., 1990. Fauna malacològica de Catalunya. Mol·luscs terrestres i d'aigua dolça. *Treballs de la Institució Catalana d'Història Natural*, 12: 1-229.

- Beckmann K.H., 2007. Die Land-und Süßwassermollusken der Balearischen Inseln. Clecom–Projekt. ConchBooks Ed., Hackenheim, 255 pp.
- Becquert R. & Delassus J., 1961. Particularités évolutives et thérapeutiques d'une observation de distomatose hépatique à *Fasciola hepatica*. *Journal des Sciences Médicales de Lille*, 79: 503-516.
- Bedwani R., Renganathan E. & El Kwshky F., 1998. Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *British Journal of Cancer*, 77: 1186-1189.
- Beltran S. & Boissier J., 2008. Schistosome monogamy: who, how, and why? *Trends in Parasitology*, 24 (9): 386-391.
- Beltran S., Galinier R., Allienne J.F. & Boissier J., 2008. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 501-503.
- Bergeon P. & Laurent M., 1970. Différences entre la morphologie testiculaire de *Fasciola hepatica* et *Fasciola gigantica*. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 23: 223-227.
- Bergquist N.R., 2001a. A concept for the collection, consolidation and presentation on epidemiological data. *Acta Tropica*, 79: 3-5.
- Bergquist N.R., 2001b. Vector-borne parasitic diseases: new trends in data collection and risk assessment. *Acta Tropica*, 79: 13-20.
- Berry A., 2016. Schistosomose urogénitale et cancer. *Bulletin de la Société Française de Pathologie Exotique*, 110 (1): 68-75.
- Berry A., Fillaux J., Martin-Blondel G., Boissier J., Iriart X., Marchou B., Magnaval J. F. & Delobel P., 2015. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France. *Eurosurveillance*, 21 (1).
- Berry A., Iriart X. & Fillaux J., 2016. Schistosomose urogénitale. *Bulletin de Veille Sanitaire*, (20): 2-3.
- Berry A., Moné H., Iriart X., Mouahid G., Abbo O., Boissier J., Fillaux J., Cassaing S., Debuisson C., Valentin A., Mitta G., Théron A. & Magnaval J.F., 2014. *Schistosomiasis haematobium*, Corsica, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (9): 1595-1597.
- Bettencourt A. & Borges I., 1922. Le *Planorbis metidjensis*, hôte intermédiaire du *Schistosoma haematobium* au Portugal. Confirmation expérimentale. *Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie et de ses filiales*, 87: 1039-1040.
- Bierman W.F., Wetsteyn J.C. & Van Gool T., 2005. Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. *Journal of travel medicine*, 12 (1): 9-13.

- Biocca E., 1980. Mollusc vectors of schistosomiasis in Sardinia and in the Mediterranean area: taxonomy and epidemiology. *Parassitologia*, 22 (3): 247-255.
- Blach O., Rai B., Oates K., Franklin G. & Bramwell S., 2012. An outbreak of schistosomiasis in travellers returning from endemic areas: the importance of rigorous tracing in peer groups exposed to risk of infection. *Journal of Public Health Oxford*, 34: 32-36.
- Blankespoor H.D., Babiker S.M. & Blankespoor C.L., 1989. Influence of temperature on the development of *Schistosoma haematobium* in *Bulinus truncatus*. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 1: 123-131.
- Boissier J., Chlichlia K., Digon Y., Ruppel A. & Moné H., 2003. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 91: 144-150.
- Boissier J., Grech-Angelini S., Webster B.L., Allienne J.F., Huyse T., Mas-Coma S., Toulza E., Barré-Cardi H., Rollinson D., Kincaid-Smith J., Oleaga A., Galinier R., Foata J., Rognon A., Berry A., Mouahid G., Henneron R., Moné H., Noel H. & Mitta G., 2016. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16 (8): 971-979.
- Boissier J., Moné H., Mitta G., Bargues M.D., Molyneux D. & Mas-Coma S., 2015. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 15: 757-758.
- Boix-Busson D., Rondelaud D. & Combes C., 1985a. Étude des facteurs influençant la durée du période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 5-10.
- Boix-Busson D., Rondelaud D. & Combes C., 1985b. L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Les caractéristiques des émissions cercariennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 11-21.
- Boray J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7: 95-210.
- Boray J.C., 1978. The potential impact of exotic *Lymnaea spp.* on fascioliasis in Australia. *Veterinary Parasitology*, 4: 127-141.
- Boray J.C., 1982. Fascioliasis. In: CRC Handbook Series in Zoonoses (Hillyer G.V. & Hopla C.E., edit.), Section C. Parasitic Zoonoses, CRC Press, Boca Raton-Florida, 3: 71-88.
- Boray J.C., 1994. Chemotherapy of infections with Fasciolidae. In: Abstracts of the 8th ICOPA (M.A. Özcel & M.Z. Alkan edit.), Turkish Society for Parasitology, 1, 97.

- Boray J.C., Crowfoot P.D., Strong M.B., Allison J.R., Shellenbaum M., Von Orelli M. & Sarasin G., 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record*, 113: 315-317.
- Bouchet F., Harter S. & Le Bailly M., 2003. The state of the art of palaeoparasitological research in the Old World. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 95-101.
- Bouzid M., Colon-Gonzalez F.J., Lung T., Lake I.R. & Hunter P.R., 2014. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BioMed Central Public Health*, 14: 781.
- Boyett D. & Hsieh M.H., 2014. Wormholes in host defense: how helminths manipulate host tissues to survive and reproduce. *PLoS Pathogens*, 10: e1004014.
- Brady M.T., O'Neill S.M., Dalton J.P. & Mills K.H., 1999. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 67 (10): 5372-5378.
- Brindley P.J. & Hotez P.J., 2013. Break out: urogenital schistosomiasis and *Schistosoma haematobium* infection in the post-genomic era. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7: e1961.
- Brogli A. & Kapel C., 2011. Changing dietary habits in a changing world: emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 182: 2-13.
- Brooker S., Rowlands M., Haller L., Savioli L. & Bundy D.A.P., 2000. Towards an atlas of human helminth infection in sub-Saharan Africa: the use of geographical information systems (GIS). *Parasitology Today*, 16: 303-307.
- Brown D., 1980. Freshwater Snails of Africa and their medical importance. 2nd ed: *Taylor & Francis*, London, 608 pp.
- Brown D., 1994. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2nd ed., Department of Zoology, Natural History Museum, Taylor & Francis Ltd, London, United Kingdom, 30 (3), 487 pp.
- Brown H.W. & Neva F.A., 1982. Vesical schistosomiasis. In: Basic Clinical Parasitology (Brown H.W., edit.), 5th ed, ACC, New York, pp: 237-240.
- Brumpt E., 1929. Cycle évolutif du *Schistosoma bovis* (Bilharzia crassa); infection spontanée de *Bulinus contortus* en Corse. *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences*, Series III; CLXXXI: 879.
- Brumpt E., 1930. Cycle évolutif complet de *Schistosoma bovis*, infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. *Annales du Parasitologie Humaine Comparée*, 8: 17-50.

- Brumpt E., 1930. Cycle évolutif complet de *Shistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. *Annales du Parasitologie Humaine Comparée*, 8: 17-50.
- Bürgi K., 1936. Ein Fall von Leberdistomatose *Fasciola hepatica*. Kasuistik und Klinik dieser Erkrankung. *Mitt Grenz Med Chir*, 44: 488-537.
- Capron A., Dessaint J.P. & Capron M., 1982. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunological Reviews*, 61: 41-66.
- Caramelli D., 2006. The origins of domesticated cattle. *Journal of Human Evolution*, 21: 107-122.
- Carnevale S., Cabrera M.G., Cucher M.A., di Risio C.A., Malandrini J.B., Kamenetzky L. & Velásquez J.N., 2013. Direct, immunological and molecular techniques for a fasciolosis survey in a rural area of San Luis, Argentina. *Journal of Parasitic Diseases*, 37 (2): 251-259.
- Carnevale S., Rodríguez M.I., Guarnera E.A., Carmona C., Tanos T. & Angel S.O., 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cysteine proteinase. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 41 (1-2): 43-49.
- Chatterjee K.D., 1975. *Fasciola hepatica*. In: Parasitology: Protozoology and Helminthology (K.D. Chatterjee edit.), 10th ed, *Saraswaty Press Ltd*, Calcutta, India, pp: 146-148.
- Checkley A.M., Chiodini P.L., Dockrell D.H., Bates I., Thwaites G.E., Booth H.L., Brown M., Wright S.G., Grant A.D., Mabey D.C., Whitty C.J.M. & Sanderson F., 2010. Eosinophilia in returning travellers and migrants from the tropics: UK recommendations for investigation and initial management. *Journal of Infection*, 60: 1-20.
- Chen M.G. & Mott K.E., 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin*, 87 (4): 1-38.
- Chester W., 1928. *Fasciola hepatica*: a fatal case in a european soldier. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 51 (6), pp. 463
- Chitchang S., Mitarnum W. & Ratananikom N., 1982. *Fasciola hepatica* in human pancreas, a case report. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 65: 345-349.
- Chitsulo L., Engels D., Montresor A. & Savioli L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77: 41-51.
- Cho S.Y., Yang H.N., Kong Y., Kim I.C., Shin K.W. & Koo B.S., 1994. Intraocular fascioliasis: a case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 349-353.

- Chu K.Y., Massoud J. & Sabbaghian H., 1966. Host-parasite relationship of *Bulinus truncatus* and *Schistosoma haematobium* in Iran. Effect of water temperature on the ability of miracidia to infect snails. *Bulletin of the World Health Organization*, 34 (1): 131-133.
- Chugh K.S., Harries A.D., Dahniya M.H., Nwosu A.C., Gashau A. & Thomas J., 1986. Urinary schistosomiasis in Maiduguri, north east Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 80 (6): 593-599.
- Cioli D., Pica-Mattoccia L., Basso A. & Guidi A., 2014. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and biochemical parasitology*, 195 (1): 23-29.
- Coltman D.W., Smith J.A., Bancroft D.R., Pilkington J., MacColl A.D., Clutton-Brock T.H. & Pemberton J.M., 1999. Density-dependent variation in lifetime breeding success and natural and sexual selection in Soay rams. *The American Naturalist*, 154: 730-746.
- Cordova M., Reategui L. & Espinoza J.R., 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93 (1): 54-57.
- Cribb T.H., Bray R.A. & Littlewood D.T.J., 2001. The nature and evolution of the association among digeneans; molluscs and fishes. *International Journal of Parasitology*, 31: 997-1011.
- Cruz-Reyes A. & Malek E.A., 1987. Suitability of six lymnaeid snails for infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 24: 203-210.
- Dan M., Lichtenstein D., Lavochkin J., Stavorowsky M., Jedwab M. & Shibolet S., 1981. Human fascioliasis in Israel, an imported case. *Israel Journal of Medical Sciences*, 17: 430-432.
- Danis M., Nozais J.P. & Chandénier J., 1985. La distomatose à *Fasciola hepatica*. II: La fasciolose humaine en France. *Action Veterinaire*, 907, VII–VIII.
- Davis A., 2009. Schistosomiasis. In: Manson's tropical diseases (Cook G.C. & Zumla A.I., edit.), 22nd ed., *El sevier*, Edinburgh, Saunders, pp:1425-1460.
- Dawes B. & Hughes D.L., 1964. Fascioliasis: the invasive stage of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Advances in Parasitology*, 2: 97-168.
- Dawes B. & Hughes D.L., 1970. Fascioliasis: the invasive stages in mammals. *Advances in Parasitology*, 8: 259-274.
- Dazo B.C., Hairston N.G. & Dawood I.K., 1996. The ecology of *Bulinus truncatus* and *Biomphalaria alexandrina* and its implications for the control of bilharziasis in the Egypt-49 project area. *Bulletin of the World Health Organisation*, 35: 339-356.

- De Azevedo J.F., Da Silva J.B., Matos Coito A., Coelho M.F. & Colaco A., 1948. O foco Portugues de schistosomiase. *Anais do Instituto de Medicina Tropical (Lisboa)*, 5: 175-221.
- De Bont J. & Vercruyse J., 1997. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology Today*, 13: 255-262.
- De Brito P.A., Kazura J.W. & Mahmoud A.A., 1984. Host granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*. Antibody and cell-mediated damage of parasite eggs in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 74 (5): 1715-1723.
- De la Torre-Escudero E., Manzano-Román R. & Pérez-Sánchez R., 2012. Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen. *Veterinary Parasitology*, 190: 530-540.
- De Leon D., Quiñones R. & Hillyer G.V., 1981. The prepatent and patent periods of *Fasciola hepatica* in cattle in Puerto Rico. *Journal of Parasitology*, 67: 734-735.
- De Martel C., Ferlay J. & Franceschi S., 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncology*, 13: 607-615.
- Delanoe P., 1929. Quatrième cas algérien de distomatose humaine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 8: 673-674.
- Dinnik J.A. & Dinnik N.N., 1956. Observations on the succession of redial generations of *Fasciola gigantica* Cobbold, in a snail host. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie*, 7 (4): 397-419.
- Dinnik J.A. & Dinnik N.N., 1964. The influence of temperature on the succession of redial and cercarial generations of *Fasciola gigantica* in a snail host. *Parasitology*, 54: 59-65.
- Doby J.M., Rault B., Deblock S. & Chabaud A., 1966. *Bulins* et bilharziose en Corse. Repartition, frequence et biologie de "*Bulinus truncatus*". *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 41: 337-349.
- Dolfus R., 1922. On the presence in France and Corsica of *Bulinus contortus* (Michaud), intermediate host of *Schistosoma haematobium* (Bilharz). Preliminary note. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 15 (4): 208-212.
- 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.
- Dugernier T., Geubel A., Bigaignon G., Cesbron J.Y. & Coche E., 1986. Human fascioliasis: cure by mebendazol? A case report. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 10: 513-516.

- El Morshedy H., Farghaly A., Sharaf S., Abou Basha L. & Barakat R., 1999. Triclabendazole in the treatment of human fascioliasis: A community-based study. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 5 (5): 888-894.
- El-Aaser A.A., El-Merzabani M.M., Higgy N.A. & El-Habet A.E., 1982. A study on the etiological factors of bilharzial bladder cancer in Egypt. The possible role of urinary bacteria. *Tumori Journal*, 68: 23-28.
- El-Awady M.K., Gad Y.Z. & Wen Y., 2001. *Schistosoma haematobium* soluble egg antigens induce proliferation of urothelial and endothelial cells. *World Journal of Urology*, 19: 263-266.
- El-Azazy O.M.E. & Schillhorn van Veen T.W., 1983. Animal fascioliasis and schistosomiasis in Egypt and Sudan. *Helminthology Abstracts*, Series A, 52: 421-428.
- El-Khoby T., Galal N., Fenwick A., Baraka R., El-Hawey A., Nooman Z., Habib M., Abdel-Wahab F., Gabr N.S., Hammam H.M., Hussein M.H., Mikhail N.N., Cline B.L. & Strickland G.T., 2000. The epidemiology of schistosomiasis in Egypt: summary findings in nine governorates. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62: 88-99.
- El-Mawla N.G., El-Bolkainy M.N. & Khaled H.M., 2001. Bladder cancer in Africa: update. *Seminars in Oncology*, 28 (2): 174-178.
- Erasmus D.A., 1972. *The Biology of Trematodes*. Edward Arnold Publ., London, 312 pp.
- Espinoza J.R., Maco V., Marcos L., Saez S., Neyra V., Terashima A. & Bargues M.D., 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., Bargues M.D. & Mas-Coma S., 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: A review. *Research and Reviews in Parasitology*, 58 (1): 13-42.
- Esteban J.G., Flores A., Angles R. & Mas-Coma S., 1999. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93: 151-156.
- Evans N.A., 1985. The influence of environmental temperature upon transmission of the cercariae of *Echinostoma liei* (Digenea: *Echinostomatidae*). *Parasitology*, 90: 269-275.

- Ezzat E., Tohamy M., El-Sherif A. & Omer A.H., 1978. Immunopathological study of glomerulonephritis associated with *Schistosoma haematobium* infection. In: Proceedings of the international conference on schistosomiasis, Cairo, pp: 625-628.
- Facey R.V. & Marsden P.D., 1960. Fascioliasis in man: an outbreak in Hampshire. *British Medical Journal*, 2: 619-625.
- Fenwick A., Rollinson D. & Southgate V., 2007. Implementation of human schistosomiasis control: challenges and prospects. In: Control of Human Parasitic Diseases (Molyneux, D.H.). Elsevier-Academic Press, London, pp: 567-622.
- Ferreira P.M., Calado M.M., Ferreira C.C., Guimarães M. & Gracio M.A., 2006. Study of freshwater molluscs of Portugal between 2000 and 2006. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 13 (1-2): 23-25.
- 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: 87-95.
- 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. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*, 93: 835-850.
- Gaillet P., 1982. Contribution a l'étude de la distomatose humaine à *Fasciola hepatica* en France métropolitaine. A propos de quelques 10.000 cas. Faculté de Médecine, Créteil University, France, pp: 1-164.
- Gaillet P., Liance M., Rivollet D. & Houin R., 1983. Situation de la fasciolose humaine en France, enquête retrospective portant sur les 30 dernières années. *Bulletin de la Société française de Parasitologie*, 1: 79-82.
- Galaktionov K.V. & Dovrovolskij A.A., 2003. The Biology and Evolution of Trematodes. 1st Edition, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London.
- Gállego Berenguer J., 2006. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, Universitat de Barcelona, 516 pp.
- Garcia-Rodríguez J.A., Martin Sanchez A.M. & Garcia Luis E.J., 1985. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica* distomatosis. Study of 7 cases. *Medicina Clinica Barcelona*, 85: 179-182.
- Gaud J., 1958. Rythmes biologiques des mollusques vecteurs des bilharzioses. Facteurs saisonniers et climatiques influençant le cycle de reproduction de *Bulinus truncatus* et de *Planorbium metidjensis* en Afrique du Nord. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 18: 751-769.

- Gerdes F., 2007. Focus Migration. Country profile: Senegal. Hamburg Institute of International Economics, 10: 2-10.
- Germain L., 1931. Mollusques terrestres et fluviatiles. Faune de France, Libraire de la Faculté des Sciences, Paris 22 (2): 479-897.
- Ghoneim M.A., El-Mekresh M.M., El-Baz M.A., El-Attar I.A. & Ashamalla A., 1997. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder, critical evaluation of the results in 1026 cases. *Journal of Urology*, 158 (2): 393-399.
- Giroid A., Bianchi I. & Mariani M., 1980. Gasteropodi, 1 (Gasteropoda: 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.
- Gironènes N., Valero M.A., García-Bodelón M.A., Chico-Calero I., Punzón C., Presno 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.
- Githeko A.K., Lindsay S.W., Confalonieri U.E. & Patz J.A., 2000. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: 1136-1147.
- Giusti F., Manganelli G. & Schembri P.J., 1995. The non-marine molluscs of the Maltese Islands. Monografie XV, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 610 pp.
- Gloër P. & Meier-Brook C., 1998. Süßwassermollusken. Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. 12th ed. *Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung*, Hamburg, Germany, 131 pp.
- González L.C., Esteban J.G., BARGUES M.D., Valero M.A., Ortiz P., Náquira C. & Mas-Coma S., 2011. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Tropica*, 120 (1): 119-129.
- Gouda I., Mokhtar N., Bilal D., El-Bolkainy T. & El-Bolkainy N.M., 2007. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 19 (2): 158-162.
- Goumghar M.D., Vignoles P., Rondelaud D., Dreyfuss G. & Benlemlih M., 2004. Relations entre l'amphibiose de *Galba truncatula* (Mollusca Gastropoda: Lymnaeidae), l'altitude et la nature de ses habitats dans le centre du Maroc. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155: 97-103.

- Gracio M.A., 1983. Distribution and habitats of six species of freshwater pulmonate snails in Algarve, southern Portugal. *Malacological Review*, 16: 17-23.
- Greten F.R. & Karin M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140: 883-899.
- Grétilat S., 1963. Epidémiologie de certaines affections à trématodes des animaux domestiques en Corse (Bilharziose bovine et distomatose bovine et ovine). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 38: 471-481.
- Grétilat S., 1967. Prospections malacologiques aux Antilles françaises. Observations sur l'écologie et l'élevage au laboratoire de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 20(2): 279-289.
- Grivennikov S.I., Greten F.R. & Karin M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140 (6) :883-899.
- Gryseels B., 2012. Schistosomiasis. *Infectious disease clinics of North America*, 26 (2): 383-397.
- 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). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95(5): 747-752.
- Haiba M.H. & Selim M.H., 1960. Detailed study on the morphological status of *Fasciola* worms infesting buffaloes, cows and sheep in Egypt. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 19: 525-534.
- Hakim Saad A., Abu el Enin H.M., Abdel-Hakem Abdel-Gaber R. & Mahfouz Mansour S., 2016. Diversity and comparative studies on *Bulinus* snails collected from two localities in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 46(3): 509-518.
- Halawani A. & Tamamai M., 1955. Preliminary report on the cytological diagnosis and incidence of the Bilharzia-cancer of the bladder in Egypt. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 38: 455-465.
- Hanash K.A., 1984. Carcinoma of the bilharzial bladder. *Progress in Clinical and Biological Research*, 2: 249-274.
- Hardman E.W., Jones R.L.H. & Davies A.H., 1970. Fascioliasis a large outbreak. *British Medical Journal*, 3: 502-505.
- Hazoug-Boehm E., Chaker E., Abdi A., Molet B., Kien T. T. & Kremer M., 1979. La distomatose à *Fasciola hepatica* dans le Maghreb. A propos de deux cas algériens nouveaux. *Archives de l'Institut Pasteur Tunis*, 56 (1-2): 105-106.
- Heckenroth F. & Guilliny T.H; 1932. Sur un cas d'infestation doublé à *Fasciola hepatica* et *Schistosoma mansoni* chez un somalí. *Marseille Médecine*, 69: 817-821.

- Hicks R.M., Ismail M.M. & Walters C.L., 1982. Association of bacteriuria and urinary nitrosamine formation with *Schistosoma haematobium* infection in the Qalyub area of Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical. Medicine and. Hygiene*, 76: 519-527.
- Hicks R.M., Walters C.L. & Elsebai I., 1977. Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 70: 413-417.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. & Lewalski H., 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity*, 89: 113-120.
- Hill M.J., 1979. Role of bacteria in human carcinogenesis. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 33: 416-426.
- Hillyer G.V., 1982. Schistosomiasis. In: CRC Handbook Series in Zoonoses (J.H. Steel edit.), Section C: Parasitic Zoonoses (G.V. Hillyer & C.H. Hoppla edit.), CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 3: 177-210.
- Hillyer G.V., 1999. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. In: Fasciolosis (Dalton J.P., ed), CAB International, Wallingford, Oxon, 13: 435-447.
- Holtfreter M.C., Moné H., Muller-Stover I., Mouahid G. & Richter J., 2014. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *European Surveillance*, 19 (22): pii 20821.
- Hotez P.J., 2006. The “biblical diseases” and U.S. vaccine diplomacy. *Brown Journal of World Affairs*, 12: 247-58.
- Hotez P.J., Brindley P.J., Bethony J.M., King C.H., Pearce E.J. & Jacobson J., 2008a. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118: 1311-1321.
- Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Kumaresan J., Sachs E.S., Sachs J.D. & Savioli L., 2007. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, 357: 1018-1027.
- Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Ottesen E., Ehrlich Sachs S. & Sachs J.D., 2006b. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, malaria. *PLoS Medicine*, 3 (5): e102.
- Hotez P.J., Ottesen E., Fenwick A. & Molyneux D., 2006a. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. *Advances in Experimental Biology Medicine*, 582: 22-33.

- Hubbendick B., 1951. Recent *Lymnaeidae*. Their variation, morphology, taxonomy, nomenclature and distribution. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, Fjärde Serien*, 3 (1): 1-223.
- Huyse T., Webster B.L. & Geldof S., 2009. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathogens*, 5 (9): e1000571.
- Ikeda T., 1998. Cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59 (2): 286-290.
- Inoue K., Kanemasa H., Inoue K., Matsumoto M., Kajita Y., Mitsufuji S. & Tegoshi T., 2007. A case of human fasciolosis: Discrepancy between egg size and genotype of *Fasciola* sp. *Parasitology Research*, 100 (3): 665-667.
- Intapan P.M., Maleewong W., Wongkham C., Tomanakarn K., Ieamviteevanich K., Pipitgool V. & Sukolapong V., 1998. Excretory-secretory antigen components of adult *Fasciola gigantica* recognized by infected human sera. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine of Public Health*, 29 (83): 579-583.
- Intapan P.M., Sadee P., Wongkham C. & Maleewong W. 2004. Development of rapid agglutination test using *Fasciola gigantica* specific antigen for serodiagnosis of human fascioliasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*, 35 (Suppl. 1): 313-317.
- International Agency for Research on Cancer, 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter Pylori*. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organisation International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France, 61: 45-77.
- International Agency for Research on Cancer, 2012; Estimated cancer incidence, mortality and prevalence. International Agency for Research on Cancer, Globocan, IARC website: (<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>) (acceso 12-11-16).
- International Association for Medical Assistance to Travellers, 2015. Be aware of Schistosomiasis, pp. 1-7. IAMAT website: ([https://www.iamat.org/assets/files/Be%20Aware%20of%20Schistosomiasis\\_2015.pdf](https://www.iamat.org/assets/files/Be%20Aware%20of%20Schistosomiasis_2015.pdf)) (acceso 26-09-2016).
- Irving J.A., Spithill T.W., Pike R.N., Whisstock J.C. & Smooker P. M., 2003. The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution*, 57 (1): 1-15.

- Jaffar Z., Sivakuru T. & Roberts K., 2004. CD4(+) CD25(+) T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *Journal of Immunology*, 172 (6): 3842-3849.
- 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. & 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., 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.
- Jaureguiberry S., Paris L. & Caumes E., 2010. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (3): 225-231.
- Johns D.R. & Dickeson S.J., 1979. Efficacy of albendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 55: 431-432.
- Jones E.A., Kay I.M., Milligan H.P. & Owens D., 1977. Massive infection with *Fasciola hepatica* in man. *American Journal of Medicine*, 63: 836-842.
- Jourdane J. & Theron A., 1980. *Schistosoma mansoni*: cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Experimental Parasitology*, 50: 349-357.
- Jourdane J., 1983. Mise en évidence d'un processus original de la reproduction asexuée chez *Schistosoma haematobium*. *Comptes Rendues de l'Académie de Sciences Paris*, 296, Serie 3: 419-424.
- Jourdane J., Theron A. & Combes C., 1980. Demonstration of several sporocysts generations as normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 37: 177-182.
- Kamat A.M., Hahn N.M., Efsthathiou J.A. & Lerner S.P., 2016. Bladder cancer. *Lancet*, 388 (10061): 2796-2810.
- Kechemir N. & Combes C., 1982. Development of *Schistosoma haematobium* in *Planorbarius metidjensis* by means of microsurgical transplantations. *Comptes Rendues des Séances de l'Académie des Sciences*, 3 (295): 505-508.
- Keen P. & Fripp P.J., 1980. Bladder cancer in an endemic schistosomiasis area: geographical and sex distribution. *South African Journal of Science*, 76: 228-230.
- Kendall S.B. & Parfitt J.W., 1959. Studies on the susceptibility of some species of *Lymnaea* to infection with *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 53: 220-227.

- Kendall S.B., 1970. Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan host. *Advances in Parasitology*, 38: 251-258.
- Khallaayoune K., Stromberg B.E., Dakkak A. & Malone J.B., 1991. Seasonal dynamics of *Fasciola hepatica* burdens in grazing Timahdit sheep in Morocco. *International Journal for Parasitology*, 21: 307-314.
- Kincaid-Smith J., Toulaz E. & Boissier J., 2016. La bilharziose en Corse: de la génétique parasitaire aux aspects environnementaux. *Bulletin de Veille sanitaire*, (20): 4-5.
- King C.H., Dickman K. & Tisch D.J., 2005. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*, 365: 1561–1569.
- King K.C. & Lively C.M., 2012. Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations? *Heredity*, 109: 199-203.
- Kitinya J.N., Laurèn P.A. & Eshleman L.J., 1986. The incidence of squamous and transitional cell carcinomas of the urinary bladder in northern Tanzania in areas of high and low levels of endemic *Schistosoma haematobium* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 935-939.
- Kjetland E.F., Norseth H.M. & Taylor M., 2014. Classification of the lesions observed in female genital schistosomiasis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 127: 227-228.
- Kloos H. & Thompson K., 1979. Schistosomiasis in Africa: an ecological perspective. *The Journal of Tropical Geography*, 48: 31-46.
- Kovats R.S., Bouma M.J., Hajat S., Worrall E. & Haines A., 2003. El Niño and health. *Lancet*, 362: 1481-1489.
- Kruglov N.D., 2005. Molluscs of the family *Lymnaeidae* (Gastropoda, Pulmonata) in Europe and Northern Asia. *SGPU Publishing*, Smolensk, 507 pp.
- Lammie P.J., Fenwick A. & Utzinger J., 2006. A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. *Trends Parasitology*, 22: 313-321.
- Lapage G., 1968. Chapter 17: Some Trematoda parasitic in farm animals. In: *Veterinary Parasitology*, 2nd edition. Edinburgh and London, pp: 329-345.
- Larambergue M., 1939. Etude de l'autofécondation chez les gastéropodes pulmonés. Recherche sur l'aphallie et fécondation chez *Bulinus* (*Isidora*) *contortus* Michaud. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, 73 (1-2): 19-231.
- Laughlin L.W., 1984. Schistosomiasis. In: Hunter's Tropical Medicine and emerging infectious diseases (Strickland G.T., edit.), 6th edition, W.B. Saunders Company, Saunders, Philadelphia, pp: 708-740.

- Laughlin L.W., Farid Z. & Mansour N., 1978. Bacteriuria in urinary schistosomiasis in Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27: 916-918.
- Lecaillon J.B., Gobdillon J. & Campestrini J., 1998. Effect of food on bioavailability of triclabendazole in patients with fascioliasis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45 (6): 601-604.
- Lee H.F., 1962. Life history of *Heterobilharzia americana* Price 1929 a schistosome of rancoon and other mammals in south Eastern United States. *Journal of Parasitology*, 48(5): 728-739.
- Lehman J.S., Farid Z. & Smith J.H., 1973. Urinary schistosomiasis in Egypt: clinical, radiological, bacteriological and parasitological correlations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 384-399.
- Lewis F.A. & Tucker M.S., 2014. Chapter 3: Schistosomiasis. In: Digenetic Trematodes. *Advances in Experimental Medicine and Biology Series* (R. Toledo & B. Fried, Eds.), Springer Science + Business Media, New York, 766: 47-75.
- Liang F.X., Bosland M.C. & Huang H., 2005. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *Journal of Cell Biology*, 171: 835-844.
- Loker E.S., 1983. A comparative study of the life histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*, 87: 343-369.
- Mac Hugh D.E. & Bradley D.G., 2001. Livestock genetic origins: Goats buck the trend. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98: 5382-5384.
- Magrin G., Gay Garcia C., Cruz Choque D., Gimenez J.C., Moreno A.R., Nagy G.J., Nobre C. & Villamizar A., 2007. Latin America. In: *Climate Change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability* (Parry M.L., Canziani O.F., Palutikof J.P., van der Linden P.J., Hanson C.E., eds.), Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 581-615.
- Makar N. & Fawzy R.M., 1947. Bilharzial carcinoma of the urinary bladder: a note on some unusual cases. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 30: 261-266.
- Makhyoun N.A., El-Kashlan K.M., Al-Ghorab M.M. & Mokhles A.S., 1971. Aetiological factors in bilharzial bladder cancer. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 73-78.
- Maleewong W., Wongkham C., Intapan P.M. & Pipitgool V., 1999. *Fasciola gigantica*-specific antigens: Purification by a continuous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61 (4): 648-651.

- Malek E.A., 1985. Snail hosts of Schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. *Pan American Health Organization*, Washington, 478 pp. ix + 325 pp
- Malik M.O., Veress B., Daoud E.H. & El-Hassan A.M., 1965. Pattern of bladder cancer in the Sudan and its relation to schistosomiasis: a study of 255 vesical carcinoma. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 219-223.
- Malone J.B., 1986. Fascioliasis and cestodiasis in cattle. In: *Epidemiology and Control* (Gibbs H.C., Herd R.P. & Murrell K.D., edit.), Part 2: Parasites, The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, W.B. Saunders Company, Philadelphia. 2: 261-275.
- Malone J.B., Gommers R., Hansen J., Yilma J.M., Slingenberg J., Snijders 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 (2): 87-101.
- Mandahl-Barth G., 1957. Intermediate hosts of *Schistosoma*, African *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Bulletin of the World Health Organisation*, 17: 1-65.
- Mangos P. & Menzies S., 1973. Human fascioliasis in Australia. *Medical Journal of Australia*, 1: 295-296.
- 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.
- Martínez-Fernández A.R., 2007. Cambio climático y parasitismos en España. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 11: 437-472.
- Martínez-Ortí 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.
- Martínez-Sernández V., Muiño L., Perteguer M.J., Gárate T., Mezo M., González-Warleta M., Muro A., Correia da Costa J.M., Romarís F. & Ubeira F.M., 2011. Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 (11): e1376.
- Mas-Coma S. & Bargues M.D., 1997. Human Liver Flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 57 (3-4): 145-218.
- Mas-Coma S. & Bargues M.D., 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* (Combes C. &

- Jourdane J., (eds.), Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan, France, 2: 81-123.
- Mas-Coma S., 2004. Human fascioliasis. In: *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control* (Cotruvo J.A., Dufour A., Rees G., Bartram J., Carr R., Cliver D.O., Craun G.F., Fayer R. & Gannon V.P.J., (eds.)), World Health Organization (WHO), IWA Publishing London, U.K., pp: 305-322.
- Mas-Coma S., 2005. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas, *Journal of Helminthology*, 79 (3): 207-216.
- Mas-Coma S., Agramunt V.H. & Valero M.A., 2014b. 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., 1999. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine & International Health*, 4: 454-467.
- Mas-Coma S., Bargues M.D. & Esteban J.G., 1999a. Human fasciolosis. In: *Fasciolosis* (Dalton J.P., (ed.)), CAB International Publishing Wallingford, Oxon, UK, pp: 411-434.
- Mas-Coma S., Bargues M.D. & Valero M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 35: 1255-1278.
- Mas-Coma S., Bargues M.D. & Valero M.A., 2007. Plant-borne trematode zoonoses: Fascioliasis and fasciolopsiasis. In: *Food-Borne Parasites, Fish and Plant-Borne Parasites. World Class Parasites* (Murrell, D. and Fried, B., eds.), Springer-Verlag, New York, 11: 293-334.
- Mas-Coma S., Bargues M.D. & Valero M.A., 2014a. Fascioliasis. In: *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Vienna: Springer Vienna, pp: 93-122.
- Mas-Coma S., Bargues M.D., & Valero M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35 (11-12): 1255-1278.
- Mas-Coma S., Bargues M.D., Marty A.M. & Neafie R.C., 2000. Hepatic trematodiasis. In: *Pathology of infectious diseases* (Meyers W.M., Neafie R.C., Marty A.M. & Wear D.J., (eds)), Helminthiasis. *Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology*, Washington DC, 1: 69-92.
- Mas-Coma S., Esteban J.G. & Bargues, M.D., 1999b. 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 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. *Rivista di Parassitologia*, 5: 73-78.

- Mas-Coma S., Funatsu I.R. & Bargues M.D., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123: S115-S127.
- Mas-Coma S., Valero M.A. & Bargues M.D., 2009a. Fasciola lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 69: 41-146.
- Mas-Coma S., Valero M.A. & Bargues M.D., 2009b. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163 (4): 264-280.
- Mas-Coma S., Valero M.A. & Bargues M.D., 2014c. Advances in Experimental Medicine and Biology. In: Digenetic Trematodes., Chapter 4 (Mas-Coma S., Valero M.A. & Bargues M.D.), Springer Science+Business Media, New York, 766, pp:77-114.
- McCarthy A.M., 1999. The influence of temperature on the survival and infectivity of the cercariae of *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea: *Echinostomatidae*). *Parasitology*, 118: 383-388.
- McClelland W.J., 1965. The production of cercariae by *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* and methods for estimating the numbers of cercariae in suspension. *Bulletin of the World Health Organization*, 33 (2): 270-276.
- Meltzer E., Artom G., Marva E., Assous M.V., Rahav G. & Schwartz E., 2006. Schistosomiasis among travelers: new aspects of an old disease. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (11): 1696-1700.
- Meunier C., Hurtrez-Bousses S., Durand P., Rondelaud D. & Renaud F., 2004. Snail 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.
- Mezo M., Gonzalez-Warleta M. & Ubeira F.M., 2003. Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by fast-D protein liquid chromatography fractionation of *F. hepatica* excretory-secretory antigens. *Journal of Parasitology*, 89 (4): 843-849.
- Mezo M., González-Warleta M., Carro C. & Ubeira F.M., 2004. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90 (4): 845-852.

- Min Z.P., Liu Y.Q., Tan F.F., Li S.M., Nong S.L., Luo B.G. & Feng Q.X., 1983. Albendazole in the treatment of farm cattle infected with *Fasciola hepatica*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 9: 22-23.
- Minchella D. & LoVerde P.T., 1993. Laboratory comparison of the relative success of *Biomphalaria glabrata* stocks which are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 19: 335-344.
- Mohamed A.S., 1954. The association of bilharziasis and malignant disease in the urinary bladder; pathogenesis of bilharzial cancer in the urinary bladder. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 37: 1066-1085.
- Molyneux D.H., Hotez P.J., Fenwick A., 2005. "Rapid-impact interventions": how a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS Medicine*, 2 (11): e336.
- Moné H., Holtfreter M.C., Allienne J.F. & Mouhaid G., 2015. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitology Research*, 114: 4127-4133.
- Moné H., Mouahid G. & Morand S., 1999. The distribution of *Schistosoma bovis* Son-sino, 1876 in relation to intermediate host mollusc-parasite relationships. *Advances in Parasitology*, 44: 99-138.
- Morgan J.A.T., De Jong R.J., Snyder S.D., Mkoji G.M. & Loker E.S., 2001. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, 123: S211-S228.
- Morgan J.A.T., DeJong R.J., Jung Y., Khallaayoune K., Kock S., Mkoji G.M. & Loker E.S., 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 477-488.
- Mott K.E., Dixon H. & Osei-Tutu E., 1983. Relation between intensity of *Schistosoma haematobium* infection and clinical haematuria and proteinuria. *Lancet*, 1: 1005-1008.
- Mouritsen K.N. & Poulin R., 2002. Parasitism, climate oscillations and the structure of natural communities. *Oikos*, 97: 462-468.
- Muniz-Junqueira M.I., Tosta C.E. & Prata A., 2009. *Schistosoma* associated chronic septicemic salmonellosis: evolution of knowledge and immunopathogenic mechanisms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42 (4): 436-445.
- Nickel B., Sayasone S., Vonghachack Y., Odermatt P. & Marti H., 2015. *Schistosoma mansoni* antigen detects *Schistosoma mekongi* infection. *Acta tropica*, 141: 310-314.

- 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.
- obstructive uropathy as determined by 1311-Hippuran renography. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 627-630.
- Olaechea F., Lovera V., Larroza M., Raffo F. & Cabrera R., 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*, 178 (3): 364-366.
- Oldham G., 1985. Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 39: 357-363.
- Oliveira D.R., Ferreira D.M., Stival C.C., Romero F., Cavagnolli F., Kloss A., Araújo F.B., Molento M.B., 2008. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandare, Parana, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17 (1): 149-153.
- Olsen O.W., 1974. Animal parasites, their life cycles and ecology. 3rd ed., University Park Press, Baltimore, United States, pp: 267-273.
- O'Neill S.M., Brady M.T., Callanan J.J., Mulcahy G., Joyce P., Mills K.H. & Dalton J.P. 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, 22 (3): 147-155.
- O'Neill S.M., Parkinson M., Dowd A.J., Strauss W., Angles R. & Dalton J.P., 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (5): 749-751.
- O'Neill S.M., Parkinson M., Strauss W., Angles R. & Dalton J.P., 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* (Fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (4): 417-423.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2016. Schistosomiase (bilharziose)., Genève, Aide-mémoire N° 115, OMS Website: (<http://www.who.int/topics/schistosomiasis/fr/>) (accessed 17 February 2016).
- Ortiz P., Scarcella S., Cerna C., Rosales C., Cabrera M., Guzmán M., Lamenza P. & Solana H., 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in

- Cajamarca (Peru): A clinical trial and in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195 (1): 118-121.
- Osada Y., Kumagai T. & Masuda K., 2005. Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the umu-test and V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitology International Journal*, 54: 29-34.
- Ottesen E.A., 1982. Immunology. In: Schistosome infections in humans: perspectives and recent findings (Nash T.E., Cheever A.W., Ottesen E.A., Cook J.A., (eds), *Annals of Internal Medicine*, 97: 740-754.
- Pallary P., 1933. Résultats généraux d'une prospection malacologique effectuée en Syrie de 1929 à 1932. *Bulletin du Musée d'Histoire Naturelle*, Paris, 2 (5): 148-154.
- Pantelouris E.M., 1965. The Common liver fluke *Fasciola hepatica*. L., Pergamon Press, Oxford, 259 pp.
- Paraf A., Rousset J. & Trad J., 1968. Distomatose hépatique à *Fasciola gigantica* (douve tropicale): Importance des troubles psychiques. *Revue Médico Chirurgicale des Maladies du Foie*, 43: 83-90.
- Parck C.I., Ro J.Y., Kim H. & Gutierrez Y., 1984. Human ectopic fascioliasis in the cecum. *American Journal of Surgical Pathology*, 8: 73-77.
- Pearson R.D. & Guerrant R.L., 1983. Praziquantel: a major advance in anthelmintic therapy. *Annals of Internal Medicine*, 99: 195-198.
- Pechenik J.A. & Fried B., 1995. Effect of temperature on survival and infectivity of *Echinostoma trivolvis* cercariae: a test of the energy limitation hypothesis. *Parasitology*, 111: 373-378.
- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J.J., Gutierrez-Gil B., San Primitivo F. & Bayon Y., 2005. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 272: 2211-2217.
- Pereira F., Davis S.J.M., Pereira L., McEvoy B., Bradley D.G. & Amorim A., 2006. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 1420-1426.
- Pérez-Quintero J.C., Bech Taberner M. & Huertas Dionisio L., 2004. Los moluscos de las aguas continentales de la provincia de Huelva (SO España). *Iberus*, 22 (2): 19-31.
- 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.

- Poulin R., 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, 132: 143-151.
- Prasad A., 1992. Studies on the pattern of cercarial emergence in *Fasciola gigantica* from *Lymnaea auricularia* race *rufescens* under different light regimes. *Indian Journal of Parasitology*, 16: 173-176.
- Pugh R.N.H., Jakubowski A.W. & Gilles H.M., 1979. Malumfashi endemic diseases research project: VI. Urinary schistosomiasis: abnormal urograms in infected males from the Malumfashi study area, northern Nigeria., *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73: 37-44.
- 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.
- Ragab M. & Farag H.F., 1978. On human fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Medical Association*, 61: 773-780.
- Ramajo Martin V., 1972. Contribución al estudio epizootiológico de la esquistosomiasis bovina (*Schistosoma bovis*) en la provincia de Salamanca. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, 18: 151-214.
- Ray D., Nelson T.A. & Fu C.L., 2012. Transcriptional profiling of the bladder in urogenital schistosomiasis reveals pathways of inflammatory fibrosis and urothelial compromise. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1912.
- Rey L., 1991. Parasitologia. 2nd Edition. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 731 pp.
- Rimbault C., 1981. Une epidemie de distomatose dans une communauté rurale de Haute-Loire. Université de Clermont Ferrand, 61 pp.
- Robertson J.L., Sprong H., Ortega Y.R., van der Giessen J.W.B. & Fayer R., 2014. Impacts of globalisation on foodborne parasites. *Trends of Parasitology*, 30: 37-52.
- Rokni M.B., Massoud J., O'Neill S.M., Parkinson M. & Dalton J.P., 2002. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: Application of cathepsin L-ELISA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 44 (2): 175-179.
- Rolán E., Vilas F. & Nombela M.A., 1987. Fauna malacológica de los estuarios-lagoones y sus variaciones por cambios de salinidad. *Iberus*, 7 (1): 59-65.

- Rollinson D. & Simpson A.J.G., 1987. The biology of Schistosomes. From genes to latrines. In: *Advances in Parasitology* (Baker J.R. & Muller R., (eds), Academic Press, London, 97 (3), p. 506.
- Rollinson D. & Southgate V. R., 1985. Schistosomes and snail populations: genetic variability and parasite transmission. In: *Ecology and Genetics of Host-Parasite Interactions* (Rollinson D. & Anderson R. M., (eds), Academic Press, London, 91-109.
- Rollinson D., Stothard J.R. & Southgate V.R., 2001. Interactions between intermediate snail hosts of the genus *Bulinus* and schistosomes of the *Schistosoma haematobium* group. *Parasitology*, 123 (Suppl.): s245-s260.
- 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., 1987. *Fasciola hepatica*. L'étude du developpement des rédies chez quatre espèces de limnées. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 5: 99-104.
- Rondelaud D., & Barthe D., 1986. Les générations rédiennes de *Fasciola hepatica* L. Premières observations chez des limnées tronquées en fin de cycle parasitaire. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 4: 29-38.
- Rondelaud D., 1994. *Fasciola hepatica*: the infection rate and the development of redial generations in *Lymnaea truncatula* exposed to miracidia after experimental desiccation and activation in water. *Journal of Helminthology*, 68: 63-66.
- Rondelaud D., Belfaiza M., Vignoles P., Moncef M. & Dreyfuss G., 2009. Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *Journal of Helminthology*, 83 (3): 245-254.
- Rondelaud D., Vignoles P. & Dreyfuss G., 2004. *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally-infected *Galba truncatula*. *Parasitology Research*, 94: 183-187.
- Rosenzweig C., Casassa G., Karoly D.J., Imeson A., Liu C., Menzel A., Rawlins S., Root T.L., Seguin B. & Tryjanowski P., 2007. Assessment of observed changes and responses in natural and managed systems. In: *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability* (Parry M.L., Canziani O.F., Palutikof J.P., van der Linden P.J., Hanson C.E., (eds.), Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 79-131.

- Rosin M.P., Anwar W.A. & Ward A.J., 1994. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: the schistosomiasis model. *Cancer Research*, 54 (Suppl): 1929s-1933s.
- Rozendaal, J.A., 1997. Vector control: methods for use by individuals and communities. Chapter 8: Freshwater snails (Intermediate hosts of schistosomiasis and foodborne trematode infections). *World Health Organization*, 412 pp.
- 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.
- Ruggieri F., Correa A.E. & Mariez E., 1967. Cerebral distomiasis: case report. *Journal of Neurosurgery*, 27: 268-273.
- Sadun EH. & Biocca E., 1962. Intradermal and fluorescent antibody tests on humans exposed to *Schistosoma bovis* cercariae from Sardinia. *Bulletin of the World Health Organization*, 27: 810-14.
- Sahba G.H., Arfaa F., Faramandian I. & Jalali H., 1972. Animal fascioliasis in Khuzestan, Southwestern Iran. *Journal of Parasitology*, 58: 172-176.
- Salem A.I., Abou Basha L.M. & Farag H.F., 1987. Immunoglobulin levels and intensity of infection in patients with fascioliasis, single or combined with schistosomiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 17: 33-40.
- Salgame P., Yap G.S. & Gause W.C., 2013. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nature Immunology*, 14: 1118-1126.
- Sampaio Silva M.L., Vindimia M., Watre P. & Capron A., 1985. IgE antibodies in human *Fasciola hepatica* distomiasis. *Pathologie et Biologie (Paris)*, 33: 746-750.
- Sampaio-Silva M.L., Da Costa J.C., Da Costa A.V., 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54 (2): 146-148.
- Sánchez R., Perera G. & Sánchez J., 1995. Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata: Lymnaeidae) hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus) en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 47 (1): 1-3.
- Sarwar M.M., 1957. *Faciola indica* Varma, a synonym of *Fasciola gigantica* Cobbold. *Biologica*, 3: 168-175.
- Savioli L., Chistulo L. & Montresor A., 1999. New opportunities for the control of fascioliasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (4), pp: 300.
- Schmid-Hempel S., 1998. Parasites and flower choice of bumblebees. *Animal Behaviour Journal*, 55: 819-825.

- Schmidt-Nielsen K., 1997. *Animal Physiology: adaptation and environment*, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 595 pp.
- Schur N., Hurlimann E. & Garba A., 2011. Geostatistical model-based estimates of schistosomiasis prevalence among individuals aged  $\leq 20$  years in West Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 (6): e1194.
- Schütt H., 1987. *Bulinus truncatus* in Crete. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*, 74 (2): 243-245.
- Schwartz D.A., 1981. Helminths in the induction of cancer: II. *Schistosoma haematobium* and bladder cancer. *Tropical and Geographical Medicine*, 33: 1-7.
- Schwetz J., Bauman H. & Fort M., 1955. Nouveaux essais de transmission de *Schistosoma mansoni* par *Pl. dufori* (*Pl. metidjensis*) du Portugal et par *Pl. corneus* (de Bruxelles). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 48: 658-661.
- Sellers Colton H., 1912. *Lymnaea columella* and self-fertilization. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 64: 173-183.
- Sène M., Southgate V.R. & Vercruysse J., 2003. *Bulinus truncatus* intermediate host of *Schistosoma haematobium* in the Senegal River Basin. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 97: 29-32.
- Senevet G., 1920. Un cas de distomatose hépatique. *Archives de l'Institute Pasteur de Tunis*, 11: 166-168.
- Sheehan G.J., Sekla L. & Godfrey K.M., 1984. Urinary schistosomiasis: a report of four cases and a review. *Canadian Medical Association Journal*, 131: 1361-1364.
- Shiff C., Veltri R. & Naples J., 2006. Ultrasound verification of bladder damage is associated with known biomarkers of bladder cancer in adults chronically infected with *Schistosoma haematobium* in Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 847-54.
- Smith G., 1981. Copulation and oviposition in *Lymnaea truncatula* (Muller). Research note. *Journal of Molluscan Studies*, 47: 108-111.
- Smith H., Doenhoff M., Aitken C., Bailey W., Ji M. & Dawson E., 2012. Comparison of *Schistosoma mansoni* soluble cercarial antigens and soluble egg antigens for serodiagnosing schistosome infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (9): e1815.
- Smithers S.R., 1982. Fascioliasis and other trematode infections. In: Immunology of Parasitic Infections, (Cohen S. & Warren K.S., (eds.)), 2nd edition, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, pp: 608-621.

- Soliman M.S., 1998. Control of veterinary fascioliasis. In: Infectious Diseases and Public Health. A Research and Clinical Update (Angelico & Rocchi eds.), Balaban Publishers, Philadelphia, L'Aquila, pp: 334-346.
- Steiner F., Ignatius R., Friedrich-Jaenicke B., Dieckmann S., Harms G., Poppert S. & Mocken haupt F.P., 2013. Acute schistosomiasis in European students returning from field work at Lake Tanganyika, Tanzania. *Journal of Travel Medicine*, 20 (6): 380-383.
- Strauss W., O'Neill S.M., Parkinson M., Angles R. & Dalton J.P., 1999. Diagnosis of human fascioliasis: Detection of anti-cathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (5): 746-748.
- Talib 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 (11): 777-782.
- Talib H., 1970. The problem of carcinoma of bilharzial bladder in Iraq. *British Journal of Urology*, 42: 571-579.
- Tang J.E., Wang R.J., Zhong H., Yu B. & Chen Y., 2014. Vitamin A and risk of bladder cancer: a meta analysis of epidemiological studies. *World Journal of Surgical Oncology*, 12: 130.
- Tantrawatpan C., Maleewong W., Wongkham C., Wongkham S., Intapan P.M. & Nakashima K., 2005. Serodiagnosis of human fascioliasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (1): 82-86.
- Taylor E.L., 1964. Fascioliasis and the liver fluke. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, 234 pp.
- Tchuenté L.A.T., Southgate V.R., Jourdane J., Webster B. L. & Vercruysse J., 2003. *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Trends in Parasitology*, 19 (9): 389-393.
- Tchuenté L.T., Southgate V.R., Njiokou F., Njiné T., Kouemeni L.E. & Jourdane J., 1997. The evolution of schistosomiasis at Loum, Cameroon: replacement of *Schistosoma intercalatum* by *S. haematobium* through introgressive hybridization. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91 (6): 664-665.
- Thapar G.S. & Tandon R.S., 1952. On the life history of liver fluke, *Fasciola gigantica* Cobbold, 1955 in India. *Indian Journal of Helminthology*, 4: 1-36.

- Therón A. & Jourdane J., 1979. Séquence de reconversión des sporocystes de *Schistosoma mansoni* producteurs de cercaires en vue de la production de nouvelles générations de sporocystes. *Zeitschrift fur Parasitenkunde-Parasitology Research*, 61: 63-71.
- Thomas J.E., Bassett M.T., Sigola L.B. & Taylor P., 1990. Relationship between bladder cancer incidence, *Schistosoma haematobium* infection, and geographical region in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 551-553.
- Tinar R., 1984. Yumurta boyutlarına göre *Fasciola gigantica* ile *Fasciola hepatica* nin ayırımı üzerinde araştırmalar. *Veteriner Fakültesi Ankara Üniversitesi*, 31: 207-229.
- Totev T. & Georgiev E., 1979. Fascioliasis, a cause of mechanical jaundice. *Khirurgiya (Sofiya)*, 32: 357-358.
- Tricker A.R., Mostafa M.H., Spiegelhalter B. & Preussmann R., 1991. Urinary nitrate, nitrite and Nitroso compounds in bladder cancer patients with schistosomiasis (bilharzia). *IARC Scientific Publications*, 105: 178-181.
- 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62 (4): 518.
- Turner K., Armour J. & Richards R.J., 1984. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Record*, 114: 41-42.
- Ubeira F.M., Muiño L., Valero M.A., Periago M.V., Pérez-Crespo I., Mezo M., González-Warleta M., Romarís 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.
- 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., 2006a. Crowding effect on adult growth, pre-patent period and egg shedding of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 133 (4): 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., 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., Navarro M., Garcia-Bodelon M.A., Marcilla A., Morales M., Hernandez J. L. & Mas-Coma S., 2006b. High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100 (1): 17-23.
- Valero M.A., Perez-Crespo I., Khoubbane M., Artigas P., Panova M., Ortiz P., Maco V., Espinoza J.R. & Mas-Coma S., 2012a. *Fasciola hepatica* phenotypic characterisation in Andean human endemic areas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Perú. *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 (2): 150-159.
- Valero M.A., Periago M.V., Pérez-Crespo I., Angles R., Villegas F., Aguirre C. & Tamayo H., 1997. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: Immunodominant antigens in human fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57 (6): 660-666.
- Valero M.A., Periago M.V., Pérez-Crespo I., Angles R., Villegas F., Aguirre C. & Tamayo H., 2012b. 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.

- Van Damme D., 1984. The freshwater mollusca of Northern Africa: Distribution, Biogeography and Paleoecology. Dr. W. Junk Publishers, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Van der Werf M.J., de Vlas S.J. & Brooker S., 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 86: 125-139.
- Van Gool T., Vetter H., Vervoort T., Doenhoff M.J., Wetsteyn J. & Overbosch D., 2002. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. *Journal of clinical microbiology*, 40 (9): 3432-3437.
- Van Vliet M.T.H., Vodele S. & Rubbelke D., 2013. Water constraints on European power supply under climate change: impacts on electricity prices. *Environmental Research Letters*, 8: 1-10.
- 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.
- Vareille-Morel V., Dreyfuss G. & Rondelaud D., 1993. Premières données sur la dispersion et le devenir des métacercaires flottantes de *Fasciola hepatica*. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 11: 63-69.
- Varma A.K., 1953. On *Fasciola indica* n.sp. with some observations on *F. hepatica* and *F. gigantica*. *Journal of Helminthology*, 27 (3-4): 185-198.
- Vera C., Mouchet F., Bremond P., Sidiki A., Sellin E. & Sellin B., 1992. Natural infection of *Bulinus senegalensis* by *Schistosoma haematobium* in a temporary pool focus in Niger: characterization by cercarial emergence patterns. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86 (1): 62.
- Vergani F., 1955. Datos biológicos experimentales sobre el caracol Linnaea (Galba) cubensis P.1911. *Boletín del Instituto de Investigaciones Veterinarias*, 7(23): 34-55.
- 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.
- Vincent J., Chiappini J.D., Leccia G., Mozziconacci J., Macarry A. & Pélangéon A., 2016. Stratégie de gestion du risque bilharziose en Corse. *Bulletin de Veille Sanitaire*, (20): 8-9.

- Warren K.S., 1982. Schistosomiasis: host-pathogen biology. *Reviews of Infectious Diseases*, 4: 771-775.
- Wasowa D., Andrzejak A. & Janicki K., 1979. Fascioliasis in man according to the data of the district sanitary-epidemiological center in Cracow. *Annals of Parasitology*, 25 (4): 445-451.
- Watson J.M., 1958. Ecology and distribution of *Bulinus truncatus* in the Middle East; with comments on the effect of some human activities in their relationship to the snail host on the incidence of bilharziasis haematobia in the Middle East and Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 18 (5-6): 833-894.
- Webster B.L., Diaw O.T., Seye M.M., Webster J.P. & Rollinson D., 2013. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (4): e2110.
- Wei D.X., 1984. *Fasciola* and fascioliasis. In: Chinese Medical Encyclopaedia, Parasitology and Parasitic Diseases, (Wu Z.J., Mao S.P. & Wang J.W., (eds.)), Shanghai Publishing House for Sciences and Technology, pp: 67-68.
- Welter-Schultes F., 2012. European non-marine molluscs, a guide for species identification. Planet Poster Editions, Museum of Natural History, Wrocław University, Sienkiewicza, No 23712, 760 pp.
- Whitty C.J., Mabey D.C., Armstrong M., Wright S.G. & Chiodini P.L., 2000. Presentation and outcome of 1107 cases of schistosomiasis from Africa diagnosed in a non-endemic country. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (5): 531-534.
- Wilkins H.A., Goll P. & Marshall T.F., 1979. The significance of proteinuria and haematuria in *Schistosoma haematobium* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 74-80.
- World Health Organization, 1995. Control of foodborne trematode infections, WHO technical report series. World Health Organization, Geneva, 849: 1-157.
- World Health Organization, 2007. Report of the WHO Informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control, World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp: 1-39.
- World Health Organization, 2008. Fact sheet on fascioliasis. In: Action against worms. Headquarters Geneva: World Health Organization, Newsletter, 10: 1-8.
- World Health Organization, 2013 Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, WHO Headquarters. WHO website:

([http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/)) (accessed 20 April 2015)

World Health Organization, 2014. Schistosomiasis. World Health Organization, Geneva, N°115, WHO website: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>) (accessed 26 May 2014).

World Health Organization, 2017. Schistosomiasis. World Health Organization, Geneva, WHO website: ([www.who.int/schistosomiasis/disease/en/](http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/)) (acceso 18-12-2016).

Yang G.J., Gemperli A., Vounatsou P., Tanner M., Zhou X.N. & Utzinger J., 2006. A growing degree-days based time series analysis for prediction of *Schistosoma japonicum* transmission in Jiangsu Province, China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 549-555.

Yilma J. & Malone J., 1998. A geographic information system forecast model for strategic control of fasciolosis in Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 78 (2): 103-127.

Young S.W., Farid Z. & Bassily S., 1979. Efficacy of medical treatment of schistosomal obstructive uropathy as determined by 131I-Hippuran renography. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 627-630.

Zein-Eddine R., Djuikwo-Teukeng F. F., Al-Jawhari M., Senghor B., Huyse T. & Dreyfuss G., 2014. Phylogeny of seven *Bulinus* species originating from endemic areas in three African countries, in relation to the human blood fluke *Schistosoma haematobium*. *Evolutionary Biology*, 14 (271): 1-12.

Zhou X.N., Yang G.J., Yang K., Wang X.H., Hong Q.B., Sun L.P., Malone J.B., Kristensen T.K., Bergquist N.R. & Utzinger J., 2008. Potential impact of climate change on schistosomiasis transmission in China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 188-94.

Zumaquero-Ríos J.L., Sarracent-Pérez J., Rojas-García R., Rojas-Rivero L., Martínez-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.