



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**Susceptibilidad de caracoles del género *Lymnaea* a la infección
por *Fasciola hepatica* determinada por PCR**

TESIS

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias

PRESENTA

Claudia Patricia Rico Torres

TUTORA

Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán

COMITÉ TUTORAL

**Dra. Irene Cruz Mendoza
Dr. Héctor Quiroz Romero**

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi esposo Abel por hacer de mi vida un sueño y una bendición cada día de mi vida y sobretodo por brindarme la alegría de la vida. Te amo y sabes que eres lo más maravilloso que me pudo haber pasado y espero estar por siempre a tu lado.

A mi chiquitín que aunque todavía no te conocemos eres nuestro corazón y lo más hermoso de nuestras vidas. Este esfuerzo es por ti y por nuestra familia.

A mi mamá Paty, por ser un apoyo incondicional en mi vida y por ser la mujer que más admiro y quiero. Te dedicó este nuevo logro en mi vida que es el tuyo también. Le doy gracias a dios por tenerte conmigo y espero que siempre estemos juntas en las buenas y en las malas como hasta ahora.

A mi hermano Luis, por ser un ejemplo de madurez y responsabilidad. Gracias por tu apoyo y por creer en mí. Te adoro y sabes que siempre podrás contar conmigo.

A mi hermano Fernando por ser un ejemplo de vida. Gracias por tu cariño y comprensión. Siempre estaré orgullosa de tu alegría de vivir la vida y por ser una persona muy especial. Te quiero.

A mi hermano Raúl por ser un niño tierno, amoroso, inocente y dedicado. Eres mi retrato cuando tenía tu edad y espero seguir siendo el ejemplo que esperas en tu vida para ser una mejor persona cada día de tu vida. Estoy segura que en pocos años tú serás el que me dedique una dedicatoria en tu tesis.

A mi papá Antonio, por sembrar en mí la alegría vivir la vida y por hacer de mí una mujer trabajadora y responsable. Te dedico esta tesis porque estoy segura que donde te encuentres estarás orgulloso de mí.

A toda mi familia le agradezco su apoyo y cariño, porque este nuevo sueño es para ustedes.

A mis grandes amigos Belinda, Adriana, Carlos Catana, Jazmín, Juan, Norma, Anahí, Carlos Lugo, Alma, Roberto, Ángel y Cinthya por su amistad, cariño y apoyo. Espero que nuestra amistad perdure muchos años más. Los quiero.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizarme académicamente y profesionalmente.

A la Dra. Dolores Correa Beltrán por brindarme su cariño incondicional y sincero por todos estos años. Gracias por darme la oportunidad de realizar otro logro en mi vida y por hacer de mi una mejor persona académicamente y sobretodo un mejor ser humano. La admiro y la quiero mucho.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir su conocimiento y por brindarme su confianza.

A la Dra. Irene Cruz Mendoza por su cariño y paciencia. Mi más sincero agradecimiento por su apoyo y sobretodo por creer en mí.

A mis compañeros de laboratorio: José Luis, Sandra, Edith, Esther, Heriberto, Héctor, Irma, Carlitos, Armando, Mónica por brindarme su amistad, cariño y comprensión para poder realizar este trabajo.

Sitio donde se realizo la tesis:

Instituto Nacional de Pediatría INP.

Subdirección de Medicina Experimental. Laboratorio de Inmunología Experimental, Torre de Investigación.

Universidad Nacional Autónoma de México UNAM

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ. Laboratorio de Parasitología.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el proyecto de PAPIIT **IN208703**.

La alumna fue becaria del CONACYT, de agosto del 2005 a julio de 2007 con número de registro **201335**.

RESUMEN

La fasciolosis es causada por el trematodo *Fasciola hepatica*, de importancia económica en el ganado doméstico, en particular de ganado vacuno y ovino, y ocasionalmente el ser humano. Los caracoles de la familia *Lymnaeidae*, son los hospederos intermediarios de este parásito. Actualmente, se sabe que dentro del género *Lymnaea*, algunas especies son más permisivas que otras. En México se sabe que *L. humilis* y *L. bulimoides* son especies que permiten el desarrollo de este trematodo en condiciones naturales y no se conoce la susceptibilidad que presentan a la infección por este trematodo. Por otro lado, los métodos tradicionales para la detección de caracoles infectados se basan en cortes histológicos o la inducción de liberación de cercarias del caracol. Sin embargo, estas técnicas requieren tiempo y experiencia para distinguir los estadios de *F. hepatica* de los de otros trematodos que pueden estar presentes en el mismo hospedero. Actualmente, las técnicas de biología molecular son utilizadas como herramientas de diagnóstico; entre ellas se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes, las cuales han demostrado ser rápidas, sensibles y específicas. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estandarizar una PCR dúplex para la detección de caracoles del género *Lymnaea* infectados por *Fasciola hepatica* y de esta manera conocer la susceptibilidad que presentan *L. bulimoides* y *L. humilis* a la infección por este trematodo. Se purificó DNA de parásitos adultos y huevos de *F. hepatica*, así como de los caracoles del género *Lymnaea*. La técnica de PCR dúplex consistió en utilizar dos pares de oligonucleótidos específicos para la amplificación de dos genes en la misma reacción. Los segmentos de 618 pb del gen rRNA 28S y de 405 pb del gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa fueron específicos para *F. hepatica*. La prueba permitió la detección de un caracol infectado con el parásito a partir de las cuatro horas de post-infección. No se observaron reacciones cruzadas con el DNA de los caracoles *L. humilis*, *L. bulimoides*, el céstodo *Taenia sp.* ó el trematodo *Paramphistomum sp.* En cuanto a la susceptibilidad se encontró que los caracoles *L. bulimoides* se infectaron en menor frecuencia (80-87.5%) que los

L. humilis (92.3-100%), medida tanto por la PCR dúplex como por la desaparición de miracidios del pozo, aunque no hubo significancia estadística. En conclusión, la PCR dúplex puede ser una prueba efectiva, específica y sensible para la detección de caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* infectados por *F. hepática* y además ser utilizada en estudios epidemiológicos del parásito en zonas endémicas, así como para analizar la susceptibilidad de las diferentes especies de caracoles del género *Lymnaea* a la infección por este trematodo.

ABSTRACT

Fasciolosis caused by the trematode *Fasciola hepatica*, is a zoonosis of economic importance in domestic ruminants. Is a cosmopolitan trematode in areas of bovine, caprine and ovine production and is emerging as a chronic disease in humans. The intermediate hosts are lymnaeid snails. Several species are more permissive than others. In Mexico, *L. bulimoides* and *L. humilis* are naturally infected by *F. hepatica*, but is unknown their susceptibility to the infection by this parasite. Traditional diagnostic methods for *F. hepatica* in the intermediate hosts are usually performed by cercaria shedding, or tissue sectioning/crushing. Actually, the molecular techniques have been extensively used as diagnosis tools, especially the Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variants, which are rapid, sensitive and specific. The goal of this work was to perform a sensitive and specific duplex PCR for detection of *L. bulimoides* and *L. humilis* infected with *F. hepatica* and to determine their susceptibility. DNA was isolated from adults and eggs of the trematode and from *Lymnaea* sp. snails. A duplex PCR assay was standardized using two sets of primers which amplify a 618 bp product of the 28S rRNA gene and a specific region of 405 bp of the *F. hepatica* Cytochrome C oxidase subunit I gene. The profile with specific bands obtained through duplex PCR was observed in infected snails at different times of the infection. This technique allowed diagnosis of infected *L. bulimoides* and *L. humilis* from one snail after four hours post-infection. No cross-reactions were observed with samples from *Taenia* sp., *Paramphistomum* sp. (trematode which also infects these snails) and from the snail hosts. A slightly larger susceptibility of *L. humilis* in comparison to *L. bulimoides* was observed, although it was not statistically significant. In conclusion, the duplex PCR can be a fast, sensitive and specific technique for detection of the trematode in *L. humilis* and *L. bulimoides*.

Keywords: *F. hepatica*, DNA, PCR and *Lymnaea*.

INDICE

ANTECEDENTES.....	1
Fasciolosis.....	1
Ciclo biológico	1
Huésped intermediario	3
Susceptibilidad de caracoles del género <i>Lymnaea</i> a la infección por <i>Fasciola hepatica</i>	4
Interacción huésped-huésped	6
Interacción parásito-parásito	7
Diagnóstico.....	9
Expresión genética durante el desarrollo del parásito.....	11
Variabilidad genética en caracoles susceptibles a la infección por <i>F. hepatica</i>	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivo específico	16
METODOLOGÍA	17
Cultivo de caracoles del género <i>Lymnaea</i>	17
Obtención de miracidios de <i>Fasciola hepatica</i>	17
Obtención de parásitos adultos.....	18
Aislamiento de DNA	18
Cuantificación de DNA	19
Selección de oligonucleótidos	19
Especificidad teórica de oligonucleótidos.....	20
PCR dúplex	20
Ensayo de interferencia y cálculo de sensibilidad	21
Ensayo de especificidad.....	21
Infección de caracoles <i>L. humilis</i> y <i>L. bulimoides</i> con <i>F. hepatica</i>	22
Definición de las variables.....	23
RESULTADOS.....	24
Colecta de material biológico y obtención de huevos y parásitos adultos.....	24
Especificidad teórica de oligonucleótidos.....	24
Estandarización de las PCR simples y de la PCR dúplex	25
Ensayo de interferencia y cálculo de sensibilidad	26
Ensayo de especificidad.....	27
Infección de caracoles <i>L. bulimoides</i> y <i>L. humilis</i> con <i>Fasciola hepatica</i>	27
Susceptibilidad de <i>L. bulimoides</i> y <i>L. humilis</i> a la infección por <i>F. hepatica</i>	29
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	34
CUADROS.....	35
FIGURAS.....	40
REFERENCIAS	54

LISTA DE CUADROS

1. Especies de caracoles del género *Lymnaea* permisivas a la infección por *Fasciola hepatica* de forma natural o experimental.
2. Influencia del número de miracidios usados para la infección de caracoles *Lymnaea* por *Fasciola hepatica* sobre la carga parasitaria y la frecuencia de infestación.
3. Susceptibilidad de caracoles *Lymnaea* a la infección por *Fasciola sp* y *Paramphistomum sp*.
4. Competencia inter-específica entre *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum daubneyi* en caracoles *Lymnaea*.
5. Similitud de las secuencias de los genes rRNA 28S y COI de *F. hepatica* con otros trematodos.
6. Comparación de la susceptibilidad de infección de *L. bulimoides* y *L. humilis* por *F. hepatica*.

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
2. Diferentes especies de caracoles del género *Lymnaea* prevalentes en México.
3. Estandarización de una PCR simple para el gen rRNA 28S de *F. hepatica*.
4. Estandarización de una PCR simple para el gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*.
5. PCR dúplex para el gen rRNA 28S y la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*.
6. Condiciones óptimas de la PCR simple para los genes rRNA 28S y subunidad I de la Citocromo C oxidasa.
7. Condiciones óptimas de la PCR dúplex de los genes rRNA 28S y subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*.
8. Ensayos de interferencia y sensibilidad de los PCR's sencillos y dúplex.
9. Ensayo de especificidad de la PCR dúplex.
10. DNA de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* a diferentes tiempos después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*.
11. Tratamiento con RNAsa de los ácidos nucleicos de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* infectados con tres miracidios de *F. hepatica*.
12. PCR dúplex de caracoles *L. humilis* infectados con tres miracidios de *F. hepatica* a diferentes tiempos post-infección.

13. PCR dúplex de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* a 20 horas después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*.
14. PCR dúplex de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* a 4 horas después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*.

ANTECEDENTES

Fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad de importancia económica en el ganado doméstico, en particular de ganado vacuno, ovino, caprino y ocasionalmente el ser humano. La enfermedad es causada por un trematodo del Phylum *Platyhelminthes*, de la subclase *Digenea*, de la familia *Fasciolidae* y del género *Fasciola*. Existen dos especies comúnmente implicadas: *F. hepatica* y *F. gigantica*. *Fasciola hepatica* se distribuye por todo el mundo, pero predomina en zonas templadas, mientras que *F. gigantica* se encuentra en regiones tropicales, sin embargo en América no existe. El ciclo de vida de estos trematodos se caracteriza por tener como huéspedes intermediarios a los moluscos del género *Lymnaea*, en los que ocurre la multiplicación larvaria, y un vertebrado como huésped definitivo (ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, animales silvestres y ocasionalmente el ser humano), en el cual ocurre la reproducción sexual. Los miembros de la familia *Fasciolidae* son hermafroditas y su auto-fertilización puede ocurrir a través de la reproducción sexual que es normalmente por fertilización cruzada en el huésped definitivo (Quiroz, 1994; Dalton, 1999).

Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Fasciola hepatica* consiste en cinco fases. Los huevos que se alojan en la vesícula biliar, pasan al duodeno del huésped definitivo salen por medio de las heces al medio ambiente, los cuales son capaces de permanecer viables por largos períodos. Es necesario un medio hídrico, como charcos o potreros inundables, para continuar su desarrollo; en condiciones de temperatura adecuada, se forman los miracidios al final del desarrollo embrionario dentro del huevo. Los miracidios eclosionan a los nueve días, lo cual se ve favorecido con la

lluvia o cuando las heces son depositadas en agua; para su posterior desarrollo es necesario un huésped intermediario debido a que no pueden vivir más de 24 horas en vida libre o pocos días a bajas temperaturas. La acción fototrópica pasiva de la mancha ocular atrae al miracidio hacia la superficie del agua; nada de un lado a otro hasta que llega un caracol del género *Lymnaea*; en México pueden ser *L. bulimoides*, *L. cubensis*, *L. humilis*, *L. attenuata*, *L. palustris*, *L. viatrix*, *L. columella*, *L. palmeri*, *L. obrussa* y *Fossaria modicella*; a través del tegumento del pie o de la cavidad pulmonar del caracol es capaz de penetrar y alojarse dentro para seguir desarrollándose (Preveraud-Sindou *et al.*, 1994; Cruz-Mendoza *et al.*, 2008). Se piensa que la atracción del miracidio al caracol se debe a factores quimiotácticos liberados con las secreciones de éste, como glucosa, lípidos y algunos ácidos grasos. Al penetrar al caracol, el miracidio pierde su cubierta de cilios y se transforma en esporoquiste, en el cual se desarrollan de 5 a 10 masas germinativas, que dan lugar a las redias. *Fasciola hepatica* genera tres generaciones de redias en caracoles del género *Lymnaea* a una temperatura óptima de 20°C (Augot *et al.*, 1998). Cada redia madre (R1a) produce de 21 a 28 embriones, mientras cada una de las redias hijas (R2b) y las nietas (R3a) desarrollan de 16 a 23 embriones. En caracoles *L. truncatula* infectados con *F. hepatica*, se produjeron en promedio de 18.2 a 33 cercarias/redia y la mayoría de las cercarias fueron producidas por las redias R2a (Rondelaud *et al.*, 1987; Augot *et al.*, 1999). Después de 6 a 8 semanas, las cercarias abandonan a las redias y al caracol. Las cercarias liberadas poseen una cola propulsora que les permite nadar activamente de un lado a otro; después de poco tiempo la pierden, redondeándose su cuerpo y dando lugar a la metacercaria, la cual se adhiere a la superficie de plantas, pastos y objetos que se encuentran en los lugares donde vive (Quiroz, 1994; Dalton, 1999).

La infección del huésped definitivo ocurre por medio de la ingestión de pastos, alimentos o agua contaminados con metacercarias. En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el trematodo como adolescaria, la cual se nutre de sangre y es capaz de penetrar la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en el transcurso de 28 horas; luego penetra el tejido hepático y

se aloja ahí por semanas hasta llegar al conducto biliar convirtiéndose en adulto, causando hemorragia y fibrosis. Existe evidencia de que el trematodo puede llegar a alojarse en útero, pulmón, tejido subcutáneo y páncreas. Después de ocho semanas, se encuentran los huevos en la bilis y después en las heces, completando así su ciclo de vida (Quiroz, 1994; Dalton, 1999).

Huésped intermediario

La presencia de caracoles es esencial para completar el ciclo de vida de *F. hepatica*, por ende, se requiere de una apreciación de la ecología de los caracoles en un lugar dado para considerar el desarrollo del trematodo (figura 2). Los caracoles del género *Lymnaea* son capaces de sobrevivir largos períodos en ambientes secos, pueden vivir a temperaturas bajas, tienen una velocidad de reproducción muy rápida y además tienen una migración activa, siendo estas características esenciales para el desarrollo del parásito (Dalton, 1999). A causa del desarrollo del miracidio en el caracol, éste sufre varios daños como son: el descontrol en el metabolismo, como el gigantismo, la destrucción de la glándula digestiva y la destrucción de los sistemas reproductores, a pesar de que los caracoles cuentan con un sistema protector, o inmunorespuesta que difiere del sistema inmunológico de los mamíferos, ya que no se producen anticuerpos y no existe memoria inmunológica. Los antígenos que detecta la superficie epitelial del caracol son reconocidos por lectinas. Sin embargo, la mejor defensa contra la invasión de trematodos son respuestas celulares mediadas por hemocitos (células fagocíticas) que liberan sustancias solubles capaces de inmovilizar a los miracidios, dañar al trematodo y llegar a eliminarlo; razón, por la cual, la producción de cercarias es limitada en algunas especies de caracoles, como ocurre con *Lymnaea fuscus* que presenta una resistencia parcial a la infección por *F. hepatica* relacionada con la edad del caracol (Quiroz, 1994; Dalton, 1999; Dreyfuss *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2006). Algunos estudios realizados en varias partes del mundo, incluyendo México, han corroborado que la transmisión de *F. hepatica* en caracoles está íntimamente ligada a un patrón estacional, donde el trematodo

puede desarrollarse rápidamente o no desarrollarse. Se sabe que en el verano aumenta la reproducción de caracoles y por ende la producción de cercarias (Dreyfuss *et al.*, 1997; Dreyfuss *et al.*, 1999; Cruz-Mendoza *et al.*, 2002; Rondelaud *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha observado que los cambios bruscos de temperatura o de estrés en los caracoles les propician estados de susceptibilidad a la infección por *F. hepatica* u otro trematodo (Abrous *et al.*, 2001).

Además de considerarse la especie de caracol, la especie del vertebrado del que provienen los miracidios esta íntimamente relacionada con la producción de redias y cercarias en el huésped intermediario (Vignoles *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2008). Por ejemplo, se evaluó la influencia de la procedencia de los miracidios de *F. hepatica* (vaca, nutria, conejo y borrego) en la infección de *L. truncatula*, y se observó que el número de cercarias liberadas en los caracoles infectados con miracidios provenientes de la nutria fue mayor en comparación con los demás grupos de infección (Vignoles *et al.*, 2001).

Susceptibilidad de caracoles del género *Lymnaea* a la infección por *Fasciola hepatica*

Una población de caracoles se considera susceptible si presenta una alta prevalencia de infección y una alta producción de cercarias. Dentro del género *Lymnaea*, existen especies más permisivas que otras para el desarrollo de *Fasciola hepatica*. A los caracoles de las especies *L. truncatula* y *L. tormentosa* se les considera como los huéspedes intermediarios más permisivos. De forma natural se han encontrado infectadas con este trematodo especies como *L. truncatula*, *L. glabra*, *L. columella*, *L. humilis*, *L. bulimoides*, *L. cubensis* y otras (cuadro 1) (Busson *et al.*, 1982; Boray *et al.*, 1985; Dreyfuss *et al.*, 1995; Dreyfuss *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1997; Abrous *et al.*, 1998; Dreyfuss *et al.*, 1999; Rangel, 1999; Abrous *et al.*, 2000a; 2000b; 2001; Dreyfuss *et al.*, 2002; Vignoles, 2002; Coelho *et al.*, 2003; Prepelitchi *et al.*, 2003; Cruz-Mendoza *et al.*, 2004; Dreyfuss *et al.*, 2004; Rondelaud *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006). A nivel de laboratorio se han infectado

algunas especies de caracoles que en la naturaleza no se han encontrado parasitadas; tal es el caso de *L. auricularia*, *L. cousini*, *L. fuscus*, *L. natalensis*, *L. palustris*, *L. peregra* y *L. ovata* (Christensen *et al.*, 1976; Massoud *et al.*, 1980; Busson *et al.*, 1982; Castro-Trejo *et al.*, 1990; Dreyfuss *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Dreyfuss *et al.*, 2000; Mostafa *et al.*, 2003; Velusamy *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006). Dentro de las especies permisivas está *L. truncatula*, que se considera un modelo experimental para monitorear el número de redias y cercarias producidas (Vignoles *et al.*, 2002).

Se ha observado que la frecuencia de infección de caracoles *L. truncatula* aumenta conforme se incrementa el número de miracidios de uno a 20, pero no hay diferencias significativas en la producción de metacercarias (Dreyfuss *et al.*, 1999; Rondelaud *et al.*, 2004). Por otro lado, en los caracoles *L. viridis* la producción de metacercarias fue mayor cuando se infectaron a los caracoles con tres miracidios que con uno y cinco miracidios (cuadro 2) (Lee *et al.*, 1995). Por lo tanto, la especie del huésped intermediario y la cantidad de miracidios a la que se expone juegan un papel muy importante en la adaptación y desarrollo del parásito.

El estrés también puede aumentar la susceptibilidad de los caracoles a la infección por este parásito, como se ha demostrado en *L. truncatula*, en el cual se observó un aumento en la frecuencia de infección del 50 al 94% debida al estrés experimental (Abrous *et al.*, 2001). Se sabe que la humedad y la temperatura son factores que influyen en la infectividad del parásito a su huésped intermediario. En caracoles *L. viridis*, la producción de cercarias fue mayor en el rango de temperatura de 20 a 24°C que a temperaturas menores de 19°C ó mayores de 24°C (Lee *et al.*, 1995). Asimismo, los cambios del pH del medio afectan de manera importante la supervivencia del caracol, como lo demuestra un estudio realizado por Cruz-Mendoza y colaboradores (2006), donde se observó que a pH's bajos y altos (≤ 5 y ≥ 10) disminuye la supervivencia de caracoles *L. humilis* infectados por este trematodo. La edad (o el tamaño) puede aumentar o disminuir el grado de susceptibilidad en algunos limneidos; por ejemplo, los caracoles *L. columella*, *L. fuscus* y *L. glabra* jóvenes son más susceptibles a la infección que los adultos

(Abrous *et al.*, 1998; Dreyfus *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2008). Por el contrario, los caracoles adultos de *L. cubensis* mostraron ser más susceptibles a la infección que los jóvenes, con una frecuencia de infección de 0% en caracoles de 1 mm en comparación con 18.5% en caracoles de 9-10 mm (Kaplan *et al.*, 1997). Actualmente, se sabe que algunas de las especies de caracoles del género *Lymnaea* susceptibles a la infección por *F. hepatica* y *F. gigantica*, son capaces de actuar también como huéspedes intermediarios de otros trematodos del género *Paramphistomum*, como *P. cervi* ó *P. daubneyi*; tal es el caso de *L. glabra* y *L. truncatula* que permiten el desarrollo de *F. hepatica*, *P. daubneyi* o ambos, en condiciones naturales (cuadro 3) (Massoud *et al.*, 1980; Busson *et al.*, 1982; Boray *et al.*, 1985; Castro-Trejo *et al.*, 1990; Dreyfuss *et al.*, 1994; Dreyfuss *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Dreyfuss *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1997; Abrous *et al.*, 1998; Dreyfuss *et al.*, 1999; Abrous *et al.*, 2000a; 2000b; 2001; Dreyfuss *et al.*, 2002; Mage *et al.*, 2002; Vignoles, 2002; Coelho *et al.*, 2003; Mostafa *et al.*, 2003; Prepelitchi *et al.*, 2003; Cruz-Mendoza *et al.*, 2004; Dreyfuss *et al.*, 2004; Rondelaud *et al.*, 2004; Velusamy *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006).

Interacción huésped-huésped

Existe controversia en cuanto a la interacción huésped-huésped que existe entre algunas especies de caracoles cuando comparten el microhábitat. En algunos estudios, se ha observado que el parásito se adapta a la especie de caracol que se encuentre en el ambiente, sin importar si es una especie permisiva o no. Sin embargo, cuando en el hábitat existe más de una especie de caracol, el parásito es capaz de seleccionar al huésped más permisivo para desarrollarse y seguir sobreviviendo, como se observó en un estudio en el cual la prevalencia de infección en *L. glabra* fue del 2% cuando se encontraba *L. truncatula* en el mismo microhábitat, sin embargo, esta prevalencia aumentó al 11% cuando sólo se encontraba *L. glabra*. Por lo tanto, este parásito fue capaz de desarrollarse preferentemente en *L. truncatula* que en *L. glabra* cuando ambas especies vivían en el mismo lugar. (Abrous *et al.*, 1999; Dreyfuss *et al.*, 2002). En otro reporte, la frecuencia de

infección en *L. truncatula* disminuyó en presencia de caracoles poco susceptibles como *L. palustris* y *L. stagnalis* (Christensen *et al.*, 1976). En el estado de Hidalgo, México se han encontrado diferentes poblaciones de caracoles en un mismo ambiente como *L. humilis* y otro género de moluscos *Succinea sp*, que está asociado con los huéspedes intermediarios de este trematodo. Las interacciones entre estos dos géneros de caracoles posiblemente provocan que se establezcan fenómenos de competencia, que pueden tener efectos directos sobre sus poblaciones debido a que ocupan un mismo ambiente, o bien una especie actúa como depredadora de la otra, ejerciendo control biológico indirectamente sobre el parásito (Cruz-Mendoza *et al.*, 2002; Vignoles *et al.*, 2002).

Interacción parásito-parásito

Además de los factores ambientales, el desarrollo de *F. hepatica* puede estar afectado por la competencia inter-específica que involucra interacciones entre los estadios de diferentes trematodos que infectan y se desarrollan en el mismo huésped intermediario. Estas interacciones resultan en la eliminación, el retraso o el aumento en el desarrollo de uno de los parásitos. El efecto de la competencia inter-específica de algunos trematodos ha sido estudiada en caracoles del género *Lymnaea* infectados con *F. hepatica* y *Paramphistomum daubneyi*. De manera experimental, se han infectado caracoles *L. truncatula* y *L. glabra* mediante la exposición cruzada de un miracidio de *F. hepatica* y *P. daubneyi* y viceversa. El desarrollo de redias, la liberación de cercarias y la prevalencia de infección fue influida por el orden de exposición de ambos parásitos, ya que fue mayor en el grupo de caracoles infectado primero con *P. daubneyi* y luego con *F. hepatica*, en comparación con el grupo infectado en el orden inverso: *F. hepatica* → *P. daubneyi* o con los grupos controles infectados sólo con *F. hepatica* o *P. daubneyi* (Augot *et al.*, 1996; Abrous *et al.*, 1996; 1999a). El orden de exposición *P. daubneyi*/*F. hepatica* en el caracol, permitió el desarrollo de redias y la liberación de cercarias de ambos trematodos. Por otro lado, el orden de exposición *F. hepatica*/*P.*

daubneyi, permitió el desarrollo de redias de ambos parásitos pero sólo se liberaron cercarias de *F. hepatica* (cuadro 4).

De igual manera, se demostró que un huésped inusual de *F. hepatica* como *L. glabra*, fue capaz de soportar una co-infección de *F. hepatica* y *P. daubneyi* en condiciones de laboratorio. Se sabe que el miracidio de *F. hepatica* tiene una mayor oportunidad de desarrollarse cuando penetra por los bordes del manto que por el pie ó los tentáculos del caracol y por otro lado, el miracidio de *Paramphistomum sp* entra al caracol por la cavidad respiratoria. Por lo tanto, el dominio de un trematodo sobre el otro, puede ser consecuencia de la vía de penetración de los miracidios de cada parásito en el caracol (Préveraud-Sindou *et al.*, 1994; Augot *et al.*, 1996).

La influencia de la temperatura juega un papel importante en la producción de metacercarias de estos dos trematodos. En caracoles *L. truncatula* infectados con *F. hepatica* y *P. daubneyi*, se observó una máxima producción de metacercarias de *F. hepatica*, a la temperatura de 20°C que disminuyó a temperaturas bajas de 6 a 8°C, las cuales favorecieron la liberación de metacercarias de *P. daubneyi* (cuadro 4).

Diagnóstico

Durante décadas, se ha desarrollado una diversidad de técnicas en el laboratorio para la detección de caracoles infectados por *F. hepatica* como son la microscopía, que se basa en la observación de cercarias libres y cortes histológicos, siendo muy práctica y barata, con el inconveniente de requerir una gran experiencia para distinguir a *F. hepatica* de otros trematodos.

En los últimos años, la biología molecular ha tenido grandes avances en la aplicación de técnicas que implican la manipulación de DNA y RNA, permitiendo un mejor conocimiento y manejo del genoma de diferentes microorganismos. El surgimiento de las técnicas moleculares para la detección de caracoles infectados con *F. hepatica* comenzó en los 90's con el uso de sondas de ácidos nucleicos, las cuales reconocen secuencias específicas de DNA y RNA (Heussler *et al.*, 1993; Kaplan *et al.*, 1995; Rognlie *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1998). Shubkin y colaboradores en 1992, usaron una sonda de rRNA para la detección del parásito en *Lymnaea columella*. Además, se clonó un segmento repetido de DNA de 124 pares de bases (pb) para el diseño de una sonda para la detección en *L. cubensis* y *L. columella*, la cual demostró ser muy específica y no presentó reacción cruzada con el DNA proveniente de los caracoles ni con el de otros trematodos (Kaplan *et al.*, 1995). La prevalencia de infección de caracoles *L. cubensis*, se estudió mediante esta sonda, la cual presentó una sensibilidad del 100% y una especificidad mayor al 99%. Sin embargo, la utilización de sondas ha disminuido considerablemente debido al manejo de material radioactivo. Recientemente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes han sido usadas para la detección directa de *F. hepatica* o *F. gigantica* en algunas especies de caracoles infectados de manera natural o experimental, en diferentes partes del mundo (Rognlie *et al.*, 1994; Mostafa *et al.*, 2003; Velusamy *et al.*, 2004). Estas técnicas se basan en la amplificación de fragmentos específicos de DNA o RNA de *F. hepatica*. La detección de caracoles infectados por PCR es muy útil cuando existen varias especies de caracoles presentes en un ambiente acuático (Kaplan *et al.*, 1995; Rognlie *et al.*, 1996). Su sensibilidad es muy alta, pues permiten detectar caracoles

infectados después de un día de infección (Magalhaes *et al.*, 2004). La especificidad es cercana al 99.9%, aunque en algunos casos los oligonucleótidos de *F. hepatica* pueden producir reacciones positivas con el DNA de otras especies de la familia *Fasciolidae* (Rognlie *et al.*, 1994). Los principales blancos de amplificación de estas técnicas son el DNA ribosomal (rDNA), el DNA mitocondrial (mDNA) y los ITS 1 y 2 (Internal Transcribed Spacers) (Blair *et al.*, 1989; Shubkin *et al.*, 1992; Rognlie *et al.*, 1994; Le *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Magalhaes *et al.*, 2004; Bargues y Mas-Coma, 2005; Itagaki *et al.*, 2005; Cusher, 2006; Alasaad *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007; Kralova *et al.*, 2008). Con ayuda de una PCR simple, se han identificado caracoles de campo *L. columella* y *L. viatrix* infectados, utilizando el gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de este trematodo. Con esta técnica se demostró una prevalencia de infección del 51.3% en caracoles *L. columella*, mientras que por microscopía fue del 17.5%; en el caso de *L. viatrix* las mismas pruebas mostraron un 61.8 y 2.9%, respectivamente (Cusher *et al.*, 2006). La PCR multiplex se ha utilizado para la detección *F. hepatica* en *L. columella*, utilizando como blancos al DNA mitocondrial y a los ITS, pudiéndose detectar caracoles infectados con cinco miracidios a partir del primer día de infección (Magalhaes *et al.*, 2004). La RT-PCR (de las siglas en inglés “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”) se ha utilizado para la detección de rRNA de *F. hepatica* en varias especies de caracoles y presenta una sensibilidad de 10 fentogramos (fg) de RNA total (Shubkin *et al.*, 1992; Rognlie *et al.*, 1994).

Expresión genética durante el desarrollo del parásito

La identificación de etapas específicas del parásito ha sido estudiada mediante la técnica del despliegue diferencial (“differential display”) de RNA mensajero (mRNA). Reed y colaboradores en 1998, utilizaron esta técnica para estudiar la variación de expresión de diversos genes entre la forma juvenil de 14 días de edad y el adulto de *F. hepatica*, observándose un 22% de bandas específicas para la estadio adulto y 14% del parásito joven. Estos resultados apoyaron la noción de que existe un gran cambio en la expresión genética durante el desarrollo del parásito (Reed *et al.*, 1998).

Variabilidad genética en caracoles susceptibles a la infección por *F. hepatica*

El uso de la técnica de RAPD-PCR (de “Random Amplification of Polymorphic DNA”) ha permitido analizar las diferencias genéticas entre caracoles susceptibles y resistentes de *L. columella* a la infección por *F. hepatica* y las diferentes especies de *Fasciola* (Gutiérrez *et al.*, 2003; Calienes *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2006; McGarry *et al.*, 2007). En Cuba se identificó a una población de *L. columella* resistente a la infección por este parásito, descubriéndose por primera vez resistencia natural. Este antecedente abrió nuevas perspectivas para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia y susceptibilidad de los huéspedes intermediarios como vía para la búsqueda de nuevos métodos para el control de la fasciolosis. En este estudio no se observó una variabilidad genética entre las poblaciones de caracoles susceptibles, pero en las poblaciones resistentes se observó un perfil particular que permitió distinguirlas de las susceptibles a través los marcadores moleculares analizados por perfiles de RAPD-PCR (Gutiérrez *et al.*, 2003; Calienes *et al.*, 2004). Por otro lado, la técnica de PCR-RFLP (de las siglas en inglés “Restriction Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction”) ha sido utilizada para distinguir el polimorfismo en diferentes especies del género *Lymnaea* como: *L. columella*, *L. viatrix* y *L. diaphena*, utilizando como blanco el DNA mitocondrial (mDNA), el rRNA y los ITS (Bargues *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2004;

Bargues *et al.*, 2005). Esta técnica, también se implementó para la detección diferencial de *F. hepatica* y *F. gigantica* utilizando diversas enzimas de restricción. Con esta prueba se observó que no existen variaciones intra-específicas entre muestras de *Fasciola hepatica* de diferentes orígenes, pero sí hay diferencias inter-específicas entre especies del género *Fasciola* (Blair *et al.*, 1989; Adlard *et al.*, 1993; Abdeltawab *et al.*, 2000; Itagaki *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2002; Ramadan *et al.*, 2004). Actualmente, la PCR en Tiempo Real puede ser una alternativa en el diagnóstico de caracoles infectados con este parásito ya que posee algunas ventajas en comparación con una PCR simple, como ser más rápida y más práctica, tener una mayor sensibilidad y poseer menor riesgo de contaminación; además, no requiere realizar pasos post PCR, como geles que requieren el uso de bromuro de etidio. Utiliza sondas fluorescentes específicas para monitorear y cuantificar la acumulación de amplicones producidos a lo largo de una reacción de PCR, lo que permite entre otras cosas, realizar estudios de cinética de infección, estudios epidemiológicos y de susceptibilidad. Recientemente, se utilizó para determinar la prevalencia de infección de *L. truncatula* en granjas de cría de bovinos, con el fin de recabar información sobre el riesgo de infección que tienen los rumiantes de ser infectados por este parásito. Se encontró una prevalencia de infección del 7% en caracoles *L. truncatula* que habitan en zonas encharcadas y riachuelos (Schweizer *et al.*, 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se sabe que *L. humilis* y *L. bulimoides* son dos de las especies de caracoles que permiten el desarrollo de *F. hepatica* en condiciones naturales. En el estudio realizado en Chapa de Mota, Estado de México, se observó una prevalencia de infección en caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* de 75.2% y 76.9% respectivamente. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la proporción de redias y cercarias liberadas, siendo mayor el número de redias en *L. bulimoides* que en *L. humilis* y de cercarias en *L. humilis* que en *L. bulimoides* (Cruz-Mendoza *et al.*, 2004). Se sabe que la capacidad de invasión del parásito depende de factores ambientales (humedad, temperatura y pH) y de la probabilidad de contacto con su huésped intermediario. Sin embargo, no se ha evaluado si la capacidad de infección también está asociada a características intrínsecas del caracol de cada especie. Lo anterior además tendría repercusiones en cuanto a la transmisión al huésped definitivo y a la probabilidad de infección o la carga ambiental de metacercarias, y por ende de dosis infectiva. Estos factores a su vez repercutirían en la salud del animal mamífero y en su capacidad de liberar huevos posteriormente.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen varias estrategias para controlar la fasciolosis como programas de drenado o el cercado de zonas encharcadas que favorecen el desarrollo de caracoles y del trematodo. Sin embargo, estas estrategias no son costeables en países en desarrollo (Quiroz, 1994; Dalton, 1999). Además de estas medidas de control, existen en el mercado algunos molusquicidas que se utilizan en aguas infestadas con caracoles para reducir su población, pero que tienen el inconveniente de ser de corta duración y además pueden perjudicar el entorno ecológico (Cruz-Mendoza *et al.*, 2005). Si se conoce la susceptibilidad de las especies de limneidos que habitan en una zona en particular, es posible tomar medidas de control biológicas que no afecten el equilibrio ecológico. Por ejemplo, se pueden poblar zonas afectadas con especies de caracoles resistentes a la infección por *F. hepatica* y así disminuir la liberación de cercarias y por ende la transmisión del parásito a los rumiantes y al ser humano. Por otro lado, es importante contar con una técnica confiable en el laboratorio para identificar caracoles infectados con este parásito, ya que con las técnicas tradicionales la distinción de redias y cercarias es complicada y es necesaria la ayuda de un experto en el tema, ya que pueden confundirse con las de otros parásitos. Actualmente, las técnicas de biología molecular son utilizadas como herramientas de diagnóstico. La PCR y sus variantes han demostrado ser más rápidas, sensibles y específicas que las técnicas tradicionales; además, la modalidad de PCR-RFLP se puede utilizar para la rápida identificación de diferentes especies de caracoles del género *Lymnaea* presentes en un biotopo específico. La técnica de PCR en Tiempo Real por otro lado, puede ser una alternativa para el estudio de la susceptibilidad de *L. humilis* y *L. bulimoides* a la infección por *F. hepatica*, de manera natural o experimental.

HIPÓTESIS

- *Lymnaea humilis* es más susceptible que *Lymanea bulimoides* a la infección por miracidios de *Fasciola hepatica*.
- Mediante la técnica de PCR se identifican caracoles infectados con un miracidio a partir del primer día de infección.

OBJETIVO GENERAL

- Comparar la susceptibilidad de *Lymnaea humilis* y *Lymnaea bulimoides* a la infección por *Fasciola hepatica* determinada por PCR.

Objetivo específico

- Estandarizar una prueba de PCR para la detección directa de *Fasciola hepatica* en caracoles *Lymnaea humilis* y *L. bulimoides*.

METODOLOGÍA

Cultivo de caracoles del género *Lymnaea*

Se colectaron caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* de Chapa de Mota, Estado de México. Por otro lado, se obtuvo lodo fresco de la zona donde se colectaron los caracoles para el cultivo de caracoles en el laboratorio, el lodo fue filtrado a través de una malla y se colocó en charolas. Se adicionó carbonato de calcio (gis molido), aproximadamente 5g/kg de tierra. Se esterilizó en autoclave (121 lb, 20 min). Se colocó en cajas de Petri y se dejó secar hasta obtener una superficie firme y uniforme. En estas cajas se sembraron caracoles de 7 a 10 días de edad, se limpiaron con agua aerada y se alimentaron de dos a tres veces por semana con alga molida (*Oscillatoria sp*) y alimento comercial (Tetramin). A partir de los 20 a 30 días se colectaron las masas ovígeras, manteniéndolas en agua hasta la eclosión de caracoles recién nacidos. Posteriormente fueron trasladados a nuevas cajas Petri con medio de cultivo estéril, se limpiaron y alimentaron con alga molida y alimento comercial de dos a tres veces por semana hasta obtener de nuevo masas ovígeras. Estos procesos se realizaron constantemente para mantener la línea de caracoles en el laboratorio (Cruz-Mendoza *et al.*, 2002).

Obtención de miracidios de *Fasciola hepatica*

A partir de vesículas biliares de bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*, se obtuvo el contenido y se colocó en vasos de precipitados; se adicionó una cantidad igual de agua destilada y se dejó reposar para que sedimentaran los huevos del trematodo. Se realizaron de 4 a 5 lavados. Se eliminó el sobrenadante del último lavado y los huevos se colocaron en

oscuridad a 27°C, durante 20 a 23 días. Se revisó c onstantemente el desarrollo de los huevos hasta la observación del embrión con manchas oculares. Después de su maduración, los huevos se colocaron en refrigeración a 4°C y en oscuridad. Para la eclosión de los miracidios, se colocaron los huevos maduros a 30 cm de una fuente de luz blanca, durante 20 a 30 min, al microscopio se apreciaron los miracidios en movimiento (Cruz-Mendoza *et al.*, 2002; Cruz-Mendoza *et al.*, 2006).

Obtención de parásitos adultos

Se obtuvieron hígados de animales infectados con *F. hepatica* provenientes del rastro municipal de Toluca. Se colectaron las fasciolas adultas de los hígados, se lavaron tres veces con un amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH= 7.2 (PBS) estéril, a 37° C y se guardaron a -20°C para el m omento de purificar su DNA.

Aislamiento de DNA

Se utilizó un kit comercial de la marca Puregene (Marca Gentra) para la purificación de DNA de parásitos adultos, huevos y caracoles del género *Lymnaea*. Cada muestra de 100 mg se trató con 3 mL de una solución de lisis celular (Tris-base, EDTA y SDS) a una temperatura de 65°C durante 60 minutos. Posteriormente, se adicionaron 15 µL de una solución a una concentración de 20 mg/mL de Proteinasa K y se incubó durante 60 minutos a 55°C. Para el caso de huevos del parásito y caracoles se realizó una incubación extra a la misma temperatura de 55°C, durante toda la noche. Ocasionalmente, se adicionaron 1.5 µL de una solución de RNAsa (4 mg/mL) y se incubó a 37°C, durante 60 minutos. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó 1 mL de una solución de precipitación (acetato de amonio) con el fin de eliminar el contenido proteico. Se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se depositó en un tubo limpio

de 15 mL y se colocaron 3 mL de isopropanol al 100% para precipitar al DNA. Se centrifugó a 3,000 rpm durante un minuto. El botón resultante, se lavó 3 veces con etanol al 70% y se volvió a centrifugar entre cada lavado. Finalmente, se resuspendió en una solución de hidratación (Tris-base, EDTA). En el caso de la purificación de los huevos del parásito y de los caracoles, se requirió la incubación de la muestra con proteinasa K (20 mg/mL) a una temperatura de 55°C durante toda la noche (Magalhaes *et al.*, 2004; Cucher *et al.*, 2006).

Cuantificación de DNA

Después de obtener el DNA de caracoles, huevos y adultos del parásito, se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos por medio de un espectrofotómetro para determinar su concentración en µg/mL. Posteriormente, se analizó la pureza e integridad del DNA en geles de agarosa al 1%.

Selección de oligonucleótidos

Se realizó una búsqueda bibliográfica para la selección de genes blanco para la estandarización de una PCR dúplex. A partir del genoma mitocondrial de *Fasciola hepatica*, que se encuentra disponible en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) del Genbank (número de acceso X15613.1), se seleccionaron dos oligonucleótidos específicos para el gen de la subunidad I de la citocromo C oxidasa (COI) del parásito, los cuales amplifican un segmento de 405 pb (Cucher *et al.*, 2006). La designación de los oligonucleótidos fue: FhCOIF (5'-TATGTTTTGATTTTACCCGGG-3') y FhCOIR (5'-ATGAGCAACCACAAACCATGT-3'), con una temperatura de alineamiento de 56°C. Por otro lado, se eligieron dos oligonucleótidos 28F1 (5'-ACGTGATTACCCGCTGAACT-3') y 28R600 (5'-CTGAGAAAGTGCACTGACAAG-3') para el gen rRNA 28S (número de acceso AJ439738) con una temperatura de alineamiento de 60°C (Marcilla *et al.*, 2002).

Especificidad teórica de oligonucleótidos

Las secuencias del rRNA 28S y de la subunidad I de la Citocromo oxidasa, con números de registro AJ439738 y X15613.1, respectivamente, fueron sometidas a análisis en el "GenBank" para determinar el porcentaje de similitud con otras especies. La especificidad teórica de los oligonucleótidos para estos genes se analizó en el programa BLAST/NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) del GenBank y el programa DNAMAN.

PCR dúplex

La estandarización de la PCR dúplex se llevó a cabo en dos etapas. Primero, se estandarizó una PCR simple para cada gen, utilizando el par de oligonucleótidos correspondiente y variando su concentración, así como las concentraciones de cloruro de magnesio y de Taq Polimerasa, utilizando el DNA obtenido de los parásitos adultos, de los huevos y de los caracoles. La segunda parte de la estandarización consistió en utilizar los dos pares de oligonucleótidos en la misma reacción de PCR, para lo cual, se probaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio y diferentes temperaturas de alineamiento. Los oligonucleótidos FhCOIF y FhCOIR flanquearon una región del DNA mitocondrial de *Fasciola*, mientras que el otro par, 28F1 y 28R600 abarca una región conservada de 618 pb en el parásito. La amplificación de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, con las siguientes cantidades de reactivos: 0.5 μ g de DNA, 7 pMolar de cada oligonucleótido, 200 μ M de una mezcla de dNTP's (Roché), 1 unidad de Taq polimerasa (TaqGold, Applied Biosystems) en un amortiguador que contiene 10mM de Tris-HCl, pH= 8.5, 50 mM de KCl y 1.5 mM de $MgCl_2$ (Applied Biosystems). Además cada tubo de reacción fue cubierto con 20 μ L de aceite mineral. Las muestras se corrieron en un termociclador (Applied Biosystems). El programa utilizado consistió en un paso de pre-desnaturalización a 98°C, durante 3 minutos,

seguido por 30 ciclos que consistieron en: una desnaturalización de 60 segundos a 90°C, un paso de alineamiento a una temperatura de 56 a 61°C de 60 segundos y una extensión de 90 segundos a una temperatura de 72°C. Finalmente, una extensión a 72°C durante 3 minutos. Para observar los productos de PCR, se corrieron geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) (Cucher *et al.*, 2006).

Ensayo de interferencia y cálculo de sensibilidad

Se probó la amplificación de cada gen, así como la PCR dúplex mezclando DNA del parásito con DNA del caracol, para determinar si había interferencia del segundo sobre la PCR. Se probaron diferentes cantidades de DNA del parásito y DNA de caracoles *L. humilis* µg/µg (0.1/0.4, 0.3/0.2, 0.3/0.2, 0.5/0 y 0/05). Posteriormente, se sometieron a PCR simple para cada gen y los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. De igual manera, se realizó la PCR dúplex utilizando las mismas mezclas de DNA del parásito/caracol y ambos pares de oligonucleótidos en el mismo tubo de reacción. Por otro lado, se calculó la cantidad de DNA que se obtiene por parásito a partir del DNA obtenido por huevo, tomando en cuenta que cada huevo contiene un solo miracidio.

Ensayo de especificidad

El ensayo de especificidad se realizó utilizando DNA de otro trematodo que se aloja en los caracoles del género *Lymnaea sp*, conocido como *Paramphistomum sp*. El DNA de esta trematodo se purificó utilizando el mismo protocolo utilizado para todas las muestras probadas en este trabajo. Y finalmente, se corrió una PCR dúplex y se visualizó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Infección de caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* con *F. hepatica*

Se infectaron caracoles jóvenes *L. humilis* y *L. bulimoides* provenientes de la línea de cultivo que se mantiene actualmente en el laboratorio. La infección se llevó a cabo en pozos de placas de ELISA que contenían 200 μ L de una solución de glicina 0.1mM, pH=7.2. Posteriormente, se depositaron tres miracidios del trematodo recién eclosionados y un caracol por pozo. Se infectaron caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* de 21 a 30 días de edad por separado, durante 4 horas a temperatura ambiente y después se colocaron en cajas de lodo estéril hasta la toma de muestra correspondiente, que fue a las cuatro, 24 horas y a los 3 y 6 días (Cruz-Mendoza *et al.*, 2006). En cada una de las infecciones, se observó el número de miracidios restantes en cada uno de los pozos y se tomó una muestra de caracoles no infectados, como control. Después de cada toma, se limpió cada caracol con agua destilada para quitar los restos de tierra provenientes de las cajas de cultivo y se sacó el molusco de su concha para facilitar la purificación de DNA. Se tomaron de 1 a 10 moluscos y se depositaron en un tubo con 300 a 500 μ L de solución de lisis celular (Puregene) y se guardaron a -20°C hasta su uso. Se realizó la prueba estadística de χ^2 para comparar la susceptibilidad de infección entre las dos especies de caracoles determinada tanto por la observación directa de miracidios en los pozos así como por la PCR dúplex.

Definición de las variables

- Variable independiente cuantitativa continua: tiempo (días de infección).
- Variable independiente cuantitativa discreta: número de miracidios con los que se infectó.
- Variables dependiente cualitativas observación directa de miracidios en pozos y bandas observadas en los geles de agarosa.

RESULTADOS

Colecta de material biológico y obtención de huevos y parásitos adultos

Se realizaron 22 visitas al Rastro Municipal de Toluca, Estado de México, en el periodo de agosto de 2006 a septiembre de 2007, para coleccionar vesículas e hígados de bovinos infectados con *Fasciola hepatica*; a partir de ellos se recuperaron los huevos y los parásitos adultos.

Especificidad teórica de oligonucleótidos

Para la estandarización de la PCR dúplex, se eligieron dos pares de oligonucleótidos específicos de *F. hepatica*, los cuales amplifican un segmento de 618 pb del gen del rRNA 28S y un amplificado de 408 pb del gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa (COI). La similitud de las secuencias de ambos genes y la especificidad de los oligonucleótidos seleccionados, fueron analizadas y comparadas con las de los mismos genes en otros parásitos, usando el programa BLAST/NCBI del GenBank. Los resultados se muestran en el cuadro 5. Como se puede observar el porcentaje de similitud con *F. gigantica* fue de 99% para el 28S ribosomal y 92% para la COI, pero para otros trematodos estos porcentaje fueron menores. Los oligonucleótidos para estos dos genes presentaron un valores de $E=0.038$ y 0.015 , lo que indica que son altamente específicos.

Estandarización de las PCR simples y de la PCR dúplex

Para cada PCR simple se probaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio, Taq polimerasa y cantidades del DNA del parásito y de caracoles *L. humilis* a las temperaturas de alineamiento (Tm) de 60 y 56°C, para los genes rRNA 28S y COI respectivamente. Como se puede observar en las figuras 3 y 4, las concentraciones óptimas fueron 2.5 mM de cloruro de magnesio y 0.5 µg de DNA en ambos casos.

Como siguiente paso, se realizó el primer intento de la PCR dúplex utilizando 56°C como temperatura de alineamiento (figura 5). Se observó la amplificación de los segmentos de 618 y 405 pb con el DNA del adulto, así como con el de los huevos del parásito, pero también en las muestras de DNA de caracoles *L. humilis* apareció una banda tenue de 618 pb, esto es del mismo peso molecular que el 28S (figura 5, flecha). Estos resultados indicaron una posible reacción inespecífica en las muestras de caracoles para el gen 28S RNA ribosomal, debido a que se disminuyó la Tm para la amplificación de este gen de 60 a 56°C. Por lo tanto, se varió la temperatura de alineamiento en el intervalo desde 56 hasta 61°C para cada PCR simple y la PCR dúplex. En la figura 6 se puede observar la amplificación de la PCR simple de cada gen a la temperatura de alineamiento de 61°C, teniendo una reacción positiva en las muestras de DNA provenientes del adulto y los huevos del trematodo y negativa en las muestras de DNA de caracoles *Lymnaea*.

Se probó nuevamente la PCR dúplex con esta última temperatura de alineamiento; en la figura 7 se observan dos bandas en el DNA del adulto y huevos del parásito, que corresponden a los amplificados de 618 y 405 pb respectivamente, y que no se presentaron en el DNA de caracoles no infectados, tanto *L. humilis* y *L. bulimoides*. Por otro lado, en una muestra de caracoles de campo de Chapa de Mota infectados con el parásito, se aprecia la amplificación de ambos genes, lo que indicó que las dos bandas son específicas del parásito.

Este resultado se corroboró con la observación de cercarias por microscopía en los caracoles de ese muestreo.

Ensayo de interferencia y cálculo de sensibilidad

Se probó la amplificación de cada gen, así como la PCR dúplex mezclando DNA del parásito con DNA del caracol, para determinar si había interferencia del segundo sobre la PCR (figura 8). Se logró amplificar desde 0.1 µg de DNA del parásito en presencia de 0.4 µg de DNA del caracol (20% vs 80%) en los PCR's simples para ambos genes del rRNA 28S y de la COI (figura 8A y B), así como en la PCR dúplex (figura 8C), por lo que no parece haber interferencia del DNA del hospedero en la reacción.

Por otro lado, se calculó la cantidad de DNA que se obtiene por parásito, y encontramos que un adulto tiene aproximadamente 150 µg de DNA, mientras que cada huevo tiene 6.5 nanogramos (ng); cada huevo contiene un solo miracidio, por lo que esta cantidad se consideró para esta fase del parásito. El DNA total de un caracol es de 1.0 µg, por lo que la técnica fue capaz de detectar 6.5 ng en 1,000 ng de DNA del hospedero. Como se utilizaron 0.25-0.5 µg de DNA del hospedero infectado, se calculó que se puede identificar cuando menos un caracol infectado en un lote de cuatro moluscos.

Ensayo de especificidad

Se verificó la especificidad de los oligonucleótidos utilizados en la PCR dúplex utilizando el DNA del trematodo *Paramphistomum sp*, el cual también puede alojarse en caracoles del género *Lymnaea*. Como se muestra en la figura 9, no hubo amplificación de alguno de los genes utilizados en esta prueba. También se incluyó una muestra de DNA del céstodo *Taenia sp*, la cual tampoco dio reacción positiva.

Infección de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* con *Fasciola hepatica*

Se infectaron caracoles *L. humilis* y *L. bulimoides* con tres miracidios del parásito. Se purificó el DNA de los moluscos y posteriormente se corrieron geles de agarosa al 1% para observar la integridad del DNA obtenido de los caracoles a los diferentes tiempos de infección. Como se puede observar en la figura 10, las muestras purificadas tanto de *L. humilis* como de *L. bulimoides* presentaron una banda de alto peso molecular, la cual corresponde al DNA y a las cuatro horas post-infección se aprecia un acumulo aparente de ácidos nucleicos de bajo peso molecular que posiblemente corresponden a rRNA. Se prosiguió a corroborar si estos barridos se trataban de segmentos de RNA degradados, por lo que se trataron las muestras con una solución de 500 µg/mL de RNAsa, durante una hora a 37°C, y se observó la eliminación del RNA contaminante en todas las muestras de la infección (figura 11). Posteriormente, se realizó la PCR dúplex y se apreció que la presencia de RNA degradado inhibe la reacción de amplificación, pues eliminándolo la reacción de PCR es positiva (figura 12). En las muestras de DNA de caracoles *L. humilis* expuestos a los miracidios del parásito después de las 4, 24 y 72 horas post-infección se observó el duplete específico del parásito. Por lo tanto, la PCR dúplex estandarizada fue capaz de detectar caracoles *L. humilis* infectados a partir de las cuatro horas post-infección.

En vista de los resultados obtenidos, en adelante a todas las muestras de DNA se trataron con RNAsa para evitar falsos negativos en la prueba de PCR dúplex.

Se realizó otra infección de caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* de 21 a 30 días de edad y se tomaron muestras a las 20 horas post-infección. Se observó la amplificación de ambos genes a partir un caracol infectado hasta 4 caracoles en el caso de *L. bulimoides*, y de uno hasta 6 caracoles en el caso de *L. humilis* (figura 13).

Se realizó otra infección de caracoles con el fin de tomar muestras a partir de las cuatro horas post-infección y someterlas a PCR dúplex. Se infectaron caracoles de 22 a 29 días de edad de ambas especies de caracoles. Se trataron de la misma forma para obtener el DNA a partir de 1 hasta 6 caracoles y posteriormente fueron tratadas con RNAsa. Enseguida se sometieron a PCR dúplex. Como se muestra en la figura 14, se observaron las dos bandas características de la presencia de este parásito a partir del DNA obtenido de un solo caracol infectado, para ambas especies de caracoles.

Susceptibilidad de *L. bulimoides* y *L. humilis* a la infección por *F. hepatica*

En el cuadro 6 se puede observar que los caracoles *L. bulimoides* se infectaron en menor frecuencia que los *L. humilis*, medido tanto por la desaparición de miracidios del pozo como por la PCR dúplex, aunque no hubo significancia estadística entre experimentos o entre especies.

DISCUSIÓN

Los procedimientos más utilizados para el control de la fasciolosis en el ganado se basan en el tratamiento de los animales con drogas o la aplicación de molusquicidas en el campo donde pasta el ganado. La primera elección no ha resultado eficaz, debido a que no todas las etapas del parásito son susceptibles a los fasciolicidas o desarrollan resistencia (Quiroz, 1994; Dalton, 1999). La segunda genera problemas ecológicos y también se ha descrito el desarrollo de resistencia en los hospederos intermediarios (Gutiérrez *et al.*, 2003; Calienes *et al.*, 2004). Una alternativa es la prevención del pastoreo en áreas en las que haya caracoles infectados, para lo cual hay que diagnosticar a los moluscos. Tradicionalmente, el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en diferentes hospederos intermediarios se basa en la exposición del caracol a la luz para provocar la liberación de cercarias. Este método tiene varias desventajas, entre ellas, que los caracoles mueran antes de liberar al parásito, o que estén infectados con otros trematodos como *Paramphistomum sp*, lo que complica el diagnóstico diferencial debido a la similitud de los estadios jóvenes. Por ello, se han empezado a usar las técnicas de biología molecular como herramientas para la detección de *F. hepatica* en sus hospederos intermediarios, ya que poseen alta sensibilidad y especificidad.

En el presente estudio, primero se estandarizó una PCR simple para la detección de caracoles *Lymnaea* infectados con *F. hepatica*, para lo que se eligió un par de oligonucleótidos específicos para amplificar un segmento de 618 del gen rRNA 28S, el cual fue utilizado por Marcilla y colaboradores (2002) para diferenciar *F. hepatica* de *F. gigantica* mediante la técnica de RFLP; sin embargo, al utilizar esta PCR con DNA de los caracoles, se amplificó un fragmento del mismo peso molecular; al analizar este par de oligonucleótidos por el programa de BLAST en el Genbank se observó que uno de ellos no era específico para *F. hepatica* posiblemente porque tanto el parásito como el molusco son invertebrados. Por lo tanto, se decidió buscar otro blanco de amplificación y se eligió el gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*, el cual ya había sido utilizado para detectar a este parásito en

caracoles del género *Lymnaea* infectados de manera natural (Cucher *et al.*, 2006); los oligonucleótidos para este gen fueron específicos para *F. hepatica* en el programa BLAST del Genbank. Al estandarizar la PCR de este nuevo blanco no se observó reacción positiva con el DNA de caracoles. Por otro lado, se aumentó la T_m en la amplificación del gen 28S del rRNA, y así desapareció la banda tenue que presentaban las muestras de DNA de caracoles *Lymnaea*; por eso se decidió a estandarizar una PCR dúplex, que resultó altamente específica, como se demostró al usar no sólo el DNA de los caracoles de ambas especies, sino también de un céstodo (*Taenia sp*) y el trematodo *Paramphistomum sp*.

En cuanto a la sensibilidad, la técnica permitió detectar menos de un miracidio por hospedero intermediario pues: a) un miracidio tiene ~6.5 ng de DNA; b) la reacción dio positiva usando 0.25-0.5 µg de DNA de caracol infectado; y c) un caracol tiene ~ 1.0 µg de DNA. De acuerdo a Cusher y colaboradores (2006) se puede amplificar el segmento de la COI en 10 pg y 100 pg de DNA del parásito en presencia de 1.0 y 20 pg de DNA del hospedero, respectivamente, lo que sugiere que sí hay interferencia del hospedero. En la naturaleza el DNA del caracol está en un porcentaje mayor que el del parásito, en etapas tempranas de infección: según los cálculos del presente trabajo el DNA del caracol es el 99.3% a las cuatro horas de infección; sin embargo, no se encontró interferencia en una relación 20% parásito - 80% caracol (0.1 µg – 0.4 µg, respectivamente). Estas discrepancias podrán ser resueltas mediante PCR en tiempo real en estudios cinéticos de diferentes combinaciones parásito/hospedero. Sin embargo, de acuerdo a los hallazgos mencionados, se puede detectar un caracol infectado con un miracidio en una mezcla total de 4 caracoles. Más aun, cuando los caracoles están en etapas más tardías de infección, es probable que la proporción de DNA de parásito/hospedero aumente, pues de un miracidio se producen en promedio 600 cercarias al final de la parasitosis. Más aun, con la PCR dúplex estandarizada en este trabajo, se logró detectar caracoles infectados de las dos especies, *L. humilis* y *L. bulimoides*. Estos resultados son prometedores para estudios en campo, pues

no sería necesario diagnosticar individualmente a los caracoles, sino estudiar algunos lotes y determinar si hay infección en la zona.

En caracoles *L. bulimoides* y *L. humilis* infectados con tres miracidios de *F. hepatica*, se observó una aparente degradación de RNA. Esta degradación pudo ser debida al manejo de la muestra durante la extracción o realmente un daño severo a nivel de RNA durante la invasión del miracidio al caracol, pues en caracoles no infectados esta degradación no se observó. Estos resultados podrían sugerir que durante el tiempo promedio de 4 horas que le toma al parásito penetrar al caracol, éste libera además de proteasas capaces de degradar el epitelio del caracol, enzimas que degraden el RNA ribosomal, con lo que podrían adueñarse de la síntesis de proteínas, por lo menos durante la fase de establecimiento. Estas observaciones deben corroborarse extrayendo los nucleótidos en presencia de inhibidores de RNAsas.

Dentro del género *Lymnaea*, algunas especies son más susceptibles que otras para el desarrollo de *Fasciola hepatica*. En México se sabe que *L. humilis* y *L. bulimoides* son dos de las especies de caracoles que permiten su desarrollo en condiciones naturales. El objetivo de este estudio fue identificar la susceptibilidad de estas dos especies a la infección por *F. hepatica* y se encontró que los caracoles *L. bulimoides* se infectaron en menor frecuencia (80-87.5%) que los *L. humilis* (92.3-100%), medido tanto por la PCR dúplex como por la desaparición de miracidios del pozo, aunque no hubo significancia estadística entre especies, posiblemente porque se trabajó con muestras pequeñas de hospederos. Estos resultados son aparentemente contradictorios con lo observado en un estudio realizado en Chapa de Mota, Estado de México por Cruz-Mendoza y colaboradores (2004), en el cual se encontró una prevalencia de infección mayor en caracoles *L. bulimoides* (76.9%) que en *L. humilis* (75.2%) de manera natural; sin embargo, los factores ambientales como la humedad, temperatura y pH son cruciales para la invasión y desarrollo del parásito; por ejemplo, los caracoles *L. bulimoides* habitan sitios más profundos que *L. humilis*, que se aloja preferentemente en las orillas de los charcos, así la probabilidad de contacto con el miracidio de *F. hepatica* varía de una especie a otra, siendo mayor para *L. bulimoides*. Por otro lado, la capacidad de infección

también debe estar asociada a características intrínsecas del caracol de cada especie. En Chapa de Mota, se encontraron diferencias significativas en la proporción de reñas y cercarias liberadas, siendo mayor el número de reñas en *L. bulimoides* que en *L. humilis* y de cercarias en *L. humilis* que en *L. bulimoides* (Cruz-Mendoza *et al.*, 2004). Por otro lado, se han identificado poblaciones susceptibles y resistentes de caracoles *L. columella*, utilizando diferentes marcadores moleculares mediante la técnica de RAPD-PCR (Gutiérrez *et al.*, 2003). Los estudios comparativos de cinética de infección por PCR en tiempo real podrán responder esta y otras preguntas en el caso de los caracoles estudiados en la presente tesis.

En este estudio, no se observaron diferencias en cuanto la producción de cercarias debido a que la toma de muestra fue hasta los tres días post-infección; sin embargo, la PCR dúplex permitirá en próximos experimentos identificar la presencia del parásito en caracoles del género *Lymnaea* de manera natural y experimental de manera rápida y específica. Esta técnica podrá ser una herramienta de apoyo en estudios epidemiológicos y de control del parásito en zonas endémicas del país. Además, con ayuda de técnicas como la PCR en tiempo real dúplex o múltiple se podrá especiar al caracol, diagnosticar su infección por *F. hepatica*, y determinar el número de copias de DNA producidas por el miracido después de invadir a su huésped intermediario, lo que será una alternativa para el estudio de la susceptibilidad de *L. humilis* y *L. bulimoides* a la infección por *F. hepatica*, de manera natural o experimental.

CONCLUSIONES

- Se encontró una susceptibilidad ligeramente mayor a la infección por *Fasciola hepatica* en *Lymnaea humilis* que en *L. bulimoides* de manera experimental, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.
- La prueba de PCR dúplex estandarizada fue capaz de detectar caracoles *Lymnaea bulimoides* y *Lymnaea humilis* infectados con un miracidio de *Fasciola hepatica* a partir de las cuatro horas post-infección.

CUADROS

Cuadro 1. Especies de caracoles del género *Lymnaea* permisivas a la infección por *Fasciola hepatica* de forma natural o experimental

Especie de caracol	Tipo de infección	
	<i>Natural</i>	<i>Experimental</i>
<i>Lymnaea auricularia</i>	---	X
<i>Lymnaea bulimoides</i>	X	---
<i>Lymnaea columella</i>	X	---
<i>Lymnaea cousini</i>	X	X
<i>Lymnaea cubensis</i>	X	---
<i>Lymnaea fuscus</i>	---	X
<i>Lymnaea glabra</i>	X	X
<i>Lymnaea humilis</i>	X	X
<i>Lymnaea ovata</i>	X	X
<i>Lymnaea palustris</i>	---	X
<i>Lymnaea peregra</i>	---	X
<i>Lymnaea stagnalis</i>	---	X
<i>Lymanea tormentosa</i>	X	X
<i>Lymnaea truncatula</i>	X	---
<i>Lymnaea viatrix</i>	X	---
<i>Lymnaea viridis</i>	---	X

--- No se reportan datos

Cuadro 2. Influencia del número de miracidios usados para la infección de caracoles *Lymnaea* por *Fasciola hepatica* sobre la carga parasitaria y la frecuencia de infestación

Especie de caracol	No. de miracidios	No. de metacercarias	Frecuencia de infección (%)
<i>Lymnaea truncatula</i>	1	114.9 ± 80.3	55
	2	92.2 ± 66.0	---
	5	104 ± 65.9	---
	10	99.8 ± 86.3	---
	20	97.36 ± 103.6	96.8
<i>Lymnaea viridis</i>	1	921.0 ± 145.1	38
	3	1636.2 ± 923.8	---
	5	835.5 ± 491.4	45

Cuadro 3. Susceptibilidad de caracoles *Lymnaea* a la infección por *Fasciola sp* y *Paramphistomum sp*

Especie de caracol	Especie de trematodo			
	<i>F. hepatica</i>	<i>F. gigantica</i>	<i>P. daubneyi</i>	<i>P. cervi</i>
<i>Lymnaea auricularia</i>	X	X		
<i>Lymnaea glabra</i>	X		X	
<i>Lymnaea humilis</i>	X			X
<i>Lymnaea palustris</i>	X	X		X
<i>Lymnaea peregra</i>	X	X		
<i>Lymanea tormentosa</i>	X	X		
<i>Lymnaea truncatula</i>	X	X	X	

Cuadro 4. Competencia inter-específica entre *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum daubneyi* en caracoles *Lymnaea*

Especie de caracol	Trematodo	Número de miracidios	Redias de <i>F. hep</i>	Redias de <i>P. daub</i>	Cercarias de <i>F. hep</i>	Cercarias de <i>P. daub</i>	Frecuencia de infección	Bibliografía	
<i>L. truncatula</i>	Pd/Fh		13*	1*	30.4±18.1	36.6±8	61%	<i>Augot, 1996</i>	
	Fh/Pd		1**	5**	2.3	0	37%		
	Pd/Pd				---	5.7±9.9	21%		
	Fh/Fh				1±2.2	---	37%		
	Pd/Fh				40 (20°C) 18 (6°C)	25 (20°C) 50 (6°C)	12.1% 16.2%	<i>Abrous, 1999b</i>	
	Fh/Fh	1/1		----	70 (20°C) 10 (6°C)	0	32.4% 6.7%		
	Pd/Pd				0	5 (20°C) 30 (6°C)	1.3% 37.8%		
	Simultánea						0 - 5.8%		
	<i>L. glabra</i>	Pd/Fh		1-4	1-3	13-21	8-14	10%	<i>Abrous, 1996</i>
		Pd/Pd		0	3-7	0	0	13.60%	
Fh/Fh			2-5	0	15-25	0	13%		

P. daub = *Paramphistomum daubneyi*

F. hep = *Fasciola hepatica*

* = Día 21 post-infección

** = Día 35 post-infección

--- = No hay datos reportados

Cuadro 5. Similitud de las secuencias de los genes rRNA 28S y COI de *F. hepatica* con otros trematodos

Parásito	Porcentaje de identidad	
	rRNA 28S	Citocromo C oxidasa subunidad I
<i>Fasciola hepatica</i>	99	100
<i>Fasciola gigantica</i>	99	91 - 92
<i>Echinostoma caproni</i>	93	88
<i>Echinostoma revolutum</i>	92	89
<i>Euparyphium melis</i>	91	---
<i>Fascioloides magna</i>	---	90
<i>Pleorchis polyorchis</i>	89	---
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	89	---
<i>Aporchis aequalis</i>	87	---
<i>Bucephalus polymorphus</i>	86	---
<i>Steringophorus dorsolineatum</i>	86	---
<i>Cercaria shikokuensis</i>	---	82
<i>Schistosoma hippopotami</i>	---	81
<i>Paragonimus mexicanus</i>	---	80
<i>Trichobilharzia ocellata</i>	---	79
<i>Schistosoma japonicum</i>	---	77

--- No se reportan datos

Cuadro 6. Comparación de la susceptibilidad de infección de *L. bulimoides* y *L. humilis* por *F. hepatica*

Experimento	Especie de caracol	No. de caracoles examinados	Observación de pozos*		Detección por PCR dúplex	
			Número de infectados	Porcentaje (%)	Número de infectados	Porcentaje (%)
I	<i>L. bulimoides</i>	21	19	90.5	18	85.7
	<i>L. humilis</i>	13	13	100.0	12	92.3
II	<i>L. bulimoides</i>	10	7	70.0	8	80.0
	<i>L. humilis</i>	11	10	90.9	11	100.0

*Por desaparición de miracidios del pozo. Las diferencias entre especies no fueron significativas independientemente del método empleado ($\chi^2=1.99$, $P=0.166$)

FIGURAS

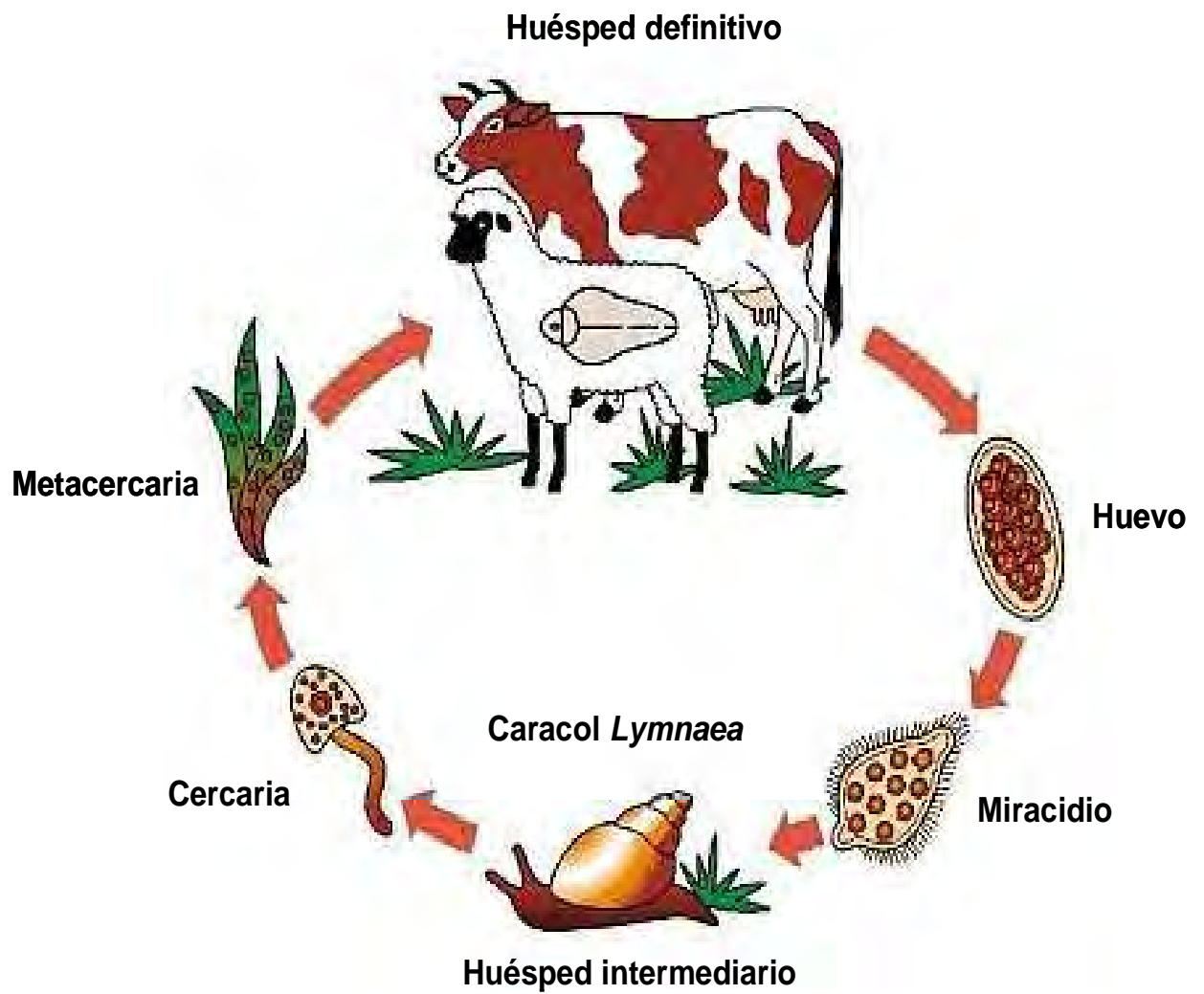


Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
Imagen tomada de: Animal Health-Online Survey

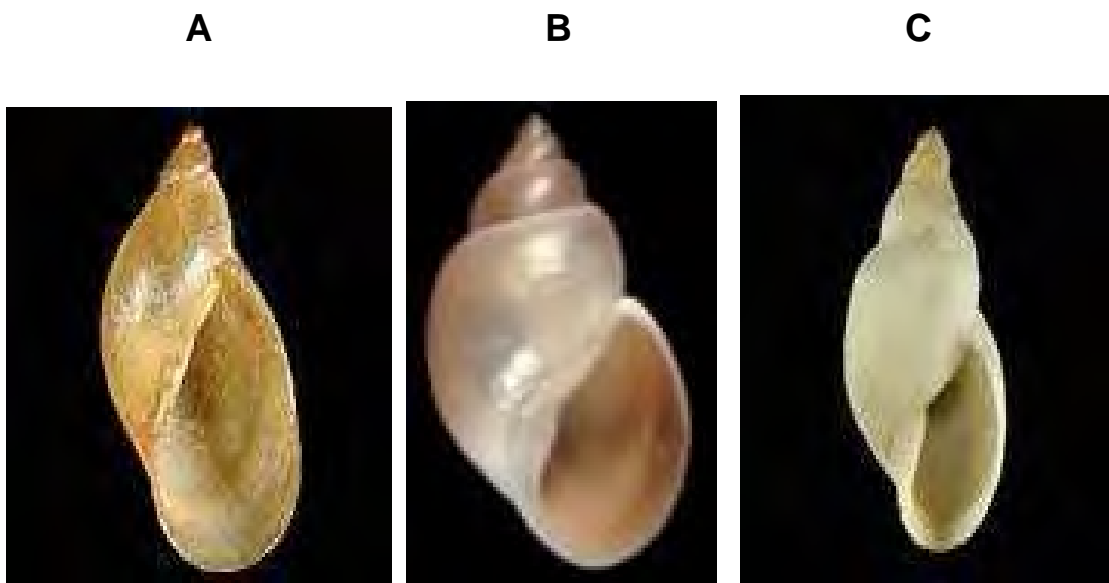


Figura 2. Diferentes especies de caracoles del género *Lymnaea* prevalentes en México
A) *L. columella*; B) *L. bulimoides*; C) *L. humilis*. Imágenes tomadas de Conchology, INC,
www.conchology.be/.../Label/240000tb/241814.jpg

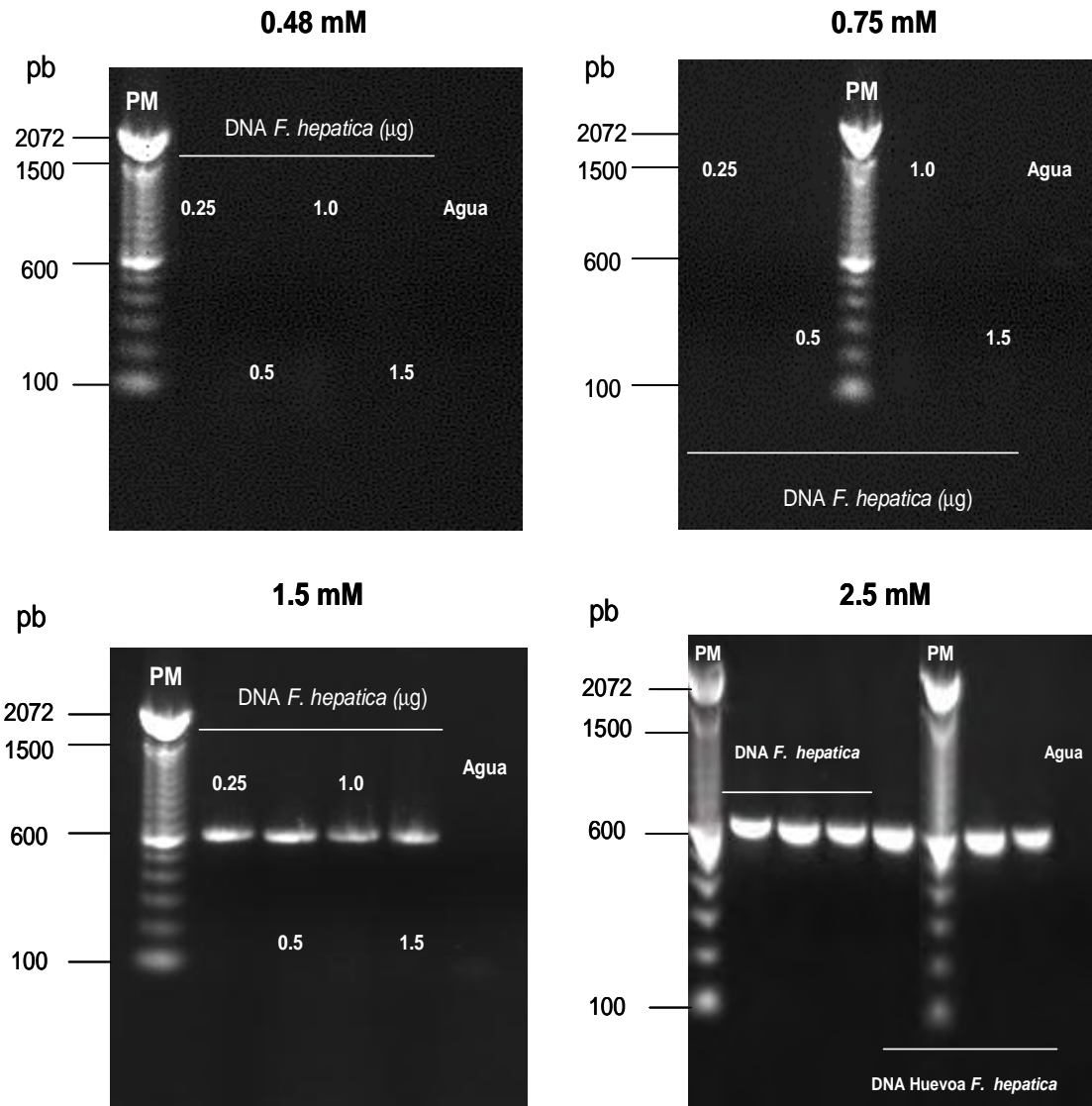


Figura 3. Estandarización de una PCR simple para el gen rRNA 28S de *F. hepatica*, en la que se varió la concentración de $MgCl_2$ y la cantidad de DNA (en μg , números internos); En 2.5 mM se muestran los resultados de triplicados de la PCR y 0.5 μg de DNA del adulto y de los huevos de *F. hepatica*; $T_m = 60^\circ C$, PM: Marcador de Peso Molecular de 100 p b.

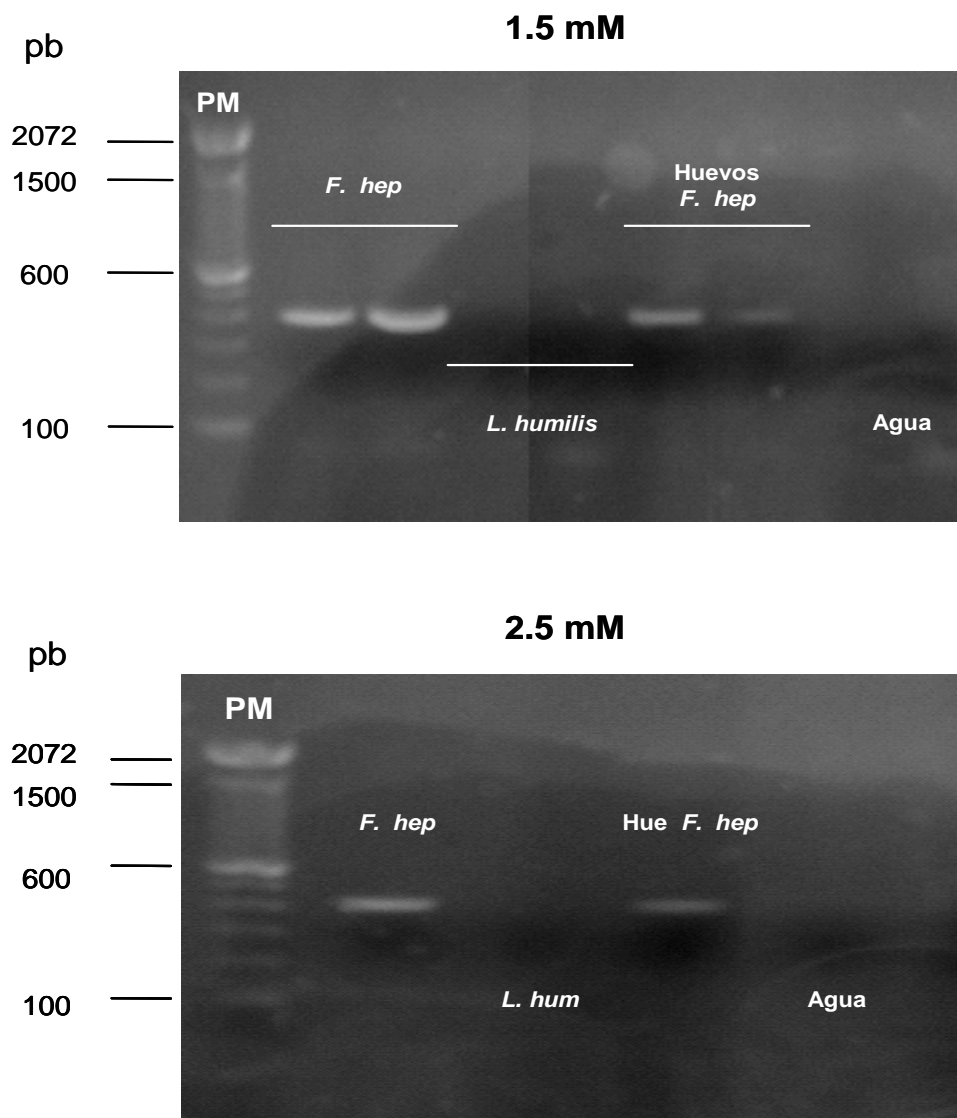


Figura 4. Estandarización de una PCR simple para el gen de la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*. Se usaron dos concentraciones de $MgCl_2$ y 0.5 μg de DNA de *Fasciola hepatica* (*F. hep*), Huevos de *F. hepatica* (*Hue F. hep*) y *Lymnaea humilis* (*L. humilis*). PM; Marcador de Peso Molecular de 100 pb; $T_m=56^\circ C$.

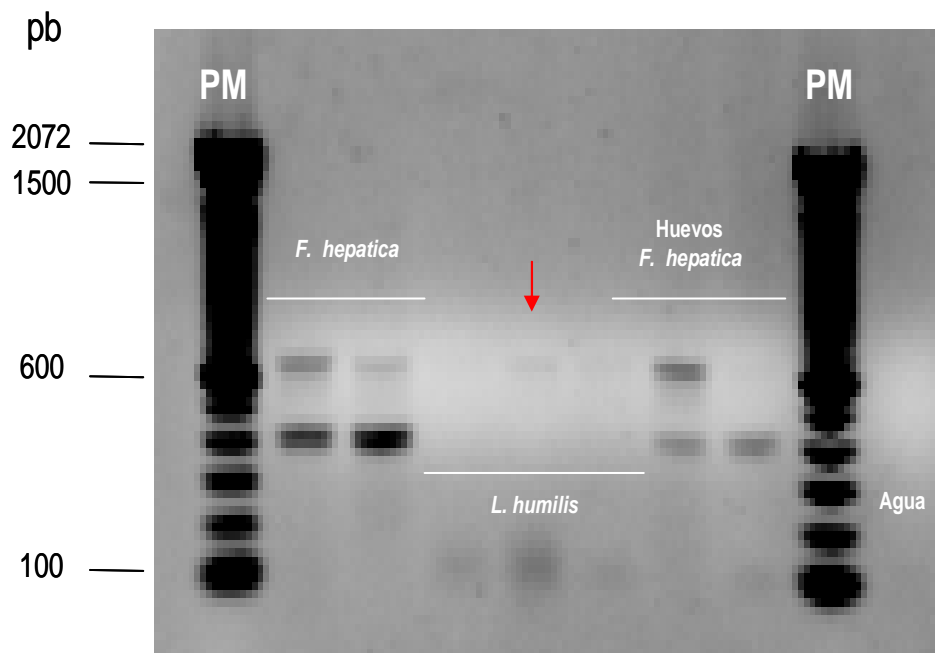


Figura 5. Gel de agarosa al 1% que muestra la PCR dúplex para el gen rRNA 28S y la subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*, usando DNA del adulto, de los huevos y del hospedero intermediario *L. humilis*. Concentración de $MgCl_2$: 2.5 mM; DNA: 0.5 μ g; $T_m=56^\circ C$; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; Flecha: banda tenue de 618 pb.

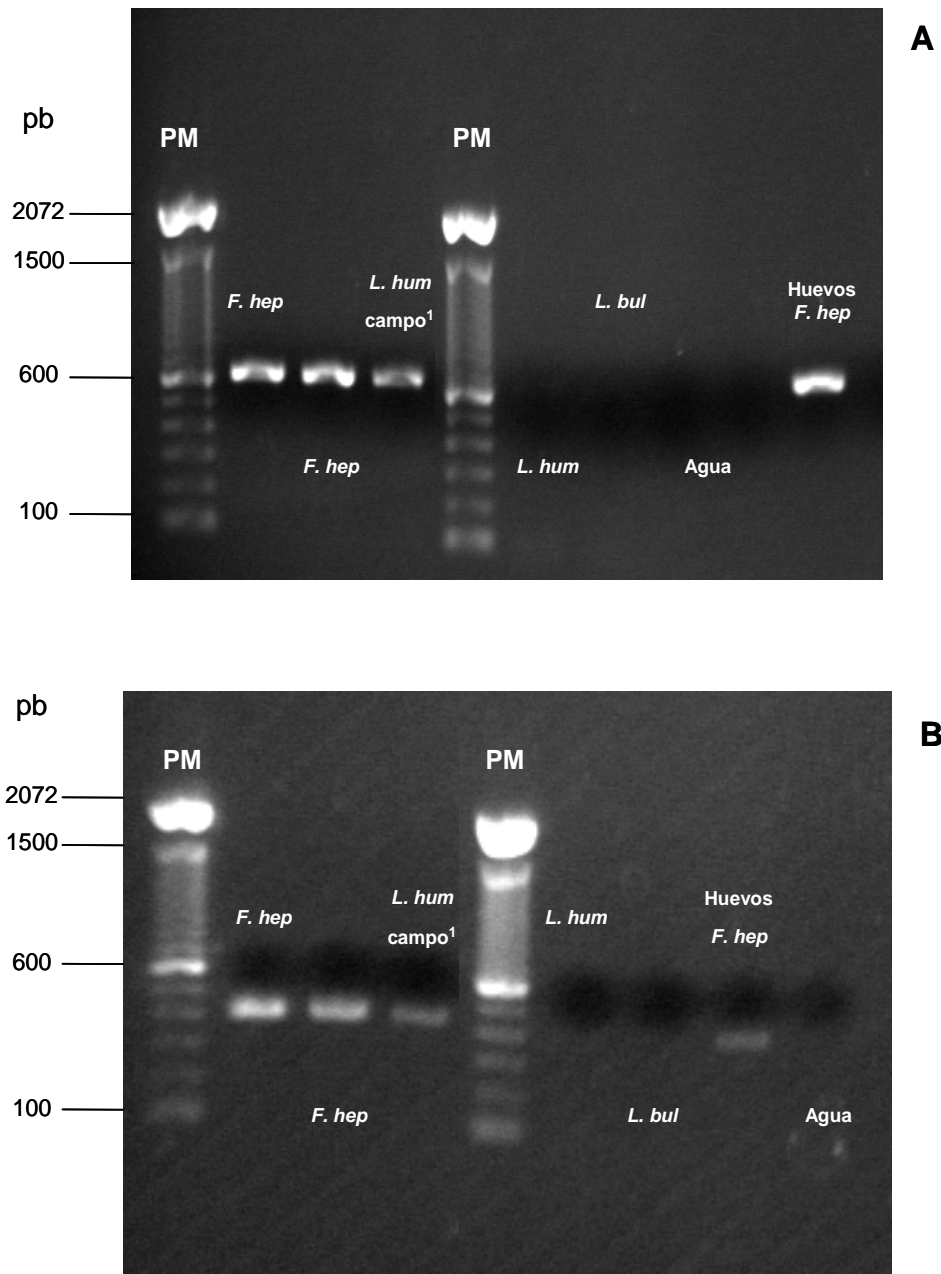


Figura 6. Geles de agarosa al 1% que muestran las condiciones óptimas de la PCR simple para los genes rRNA 28S (A) y subunidad I de la Citocromo C oxidasa (B) de *F. hepatica*, corridas simultáneamente en tubos separados. Concentración de $MgCl_2$: 2.5 mM; DNA 0.5 μg ; T_m =.61°C; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*; Hue *F. hepatica*= Huevos de *Fasciola hepatica*; 1. Caracol de campo infectado con el parásito.

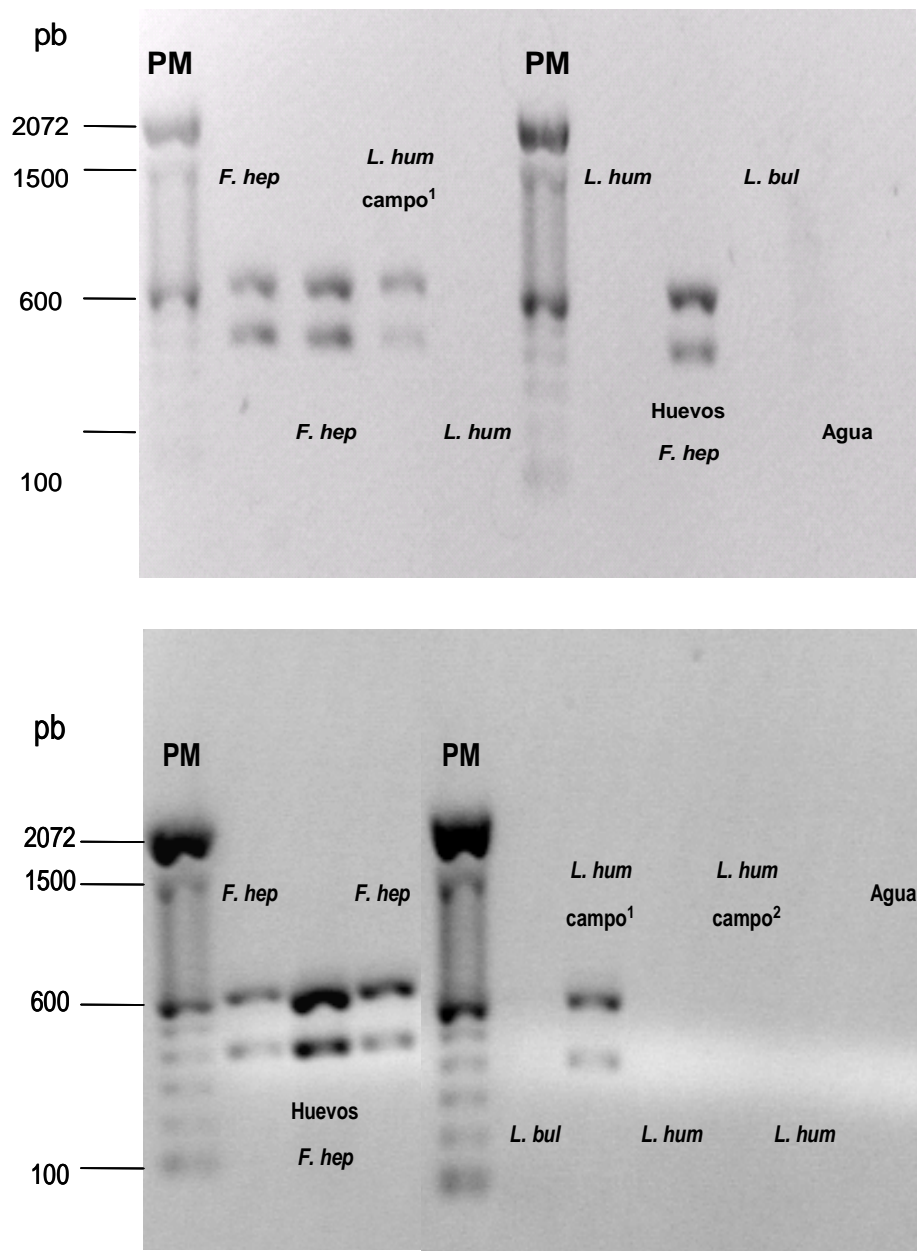


Figura 7. Geles de agarosa al 1% que muestran las condiciones óptimas de la PCR dúplex de los genes rRNA 28S y subunidad I de la Citocromo C oxidasa de *F. hepatica*. Concentración de $MgCl_2$: 2.5 mM; DNA: 0.5 μ g; $T_m=61^\circ C$; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; **1.** Caracol de campo infectado con el parásito; **2.** Caracol de campo no infectado con el parásito; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*; Hue *F. hepatica*= Huevos de *Fasciola hepatica*.

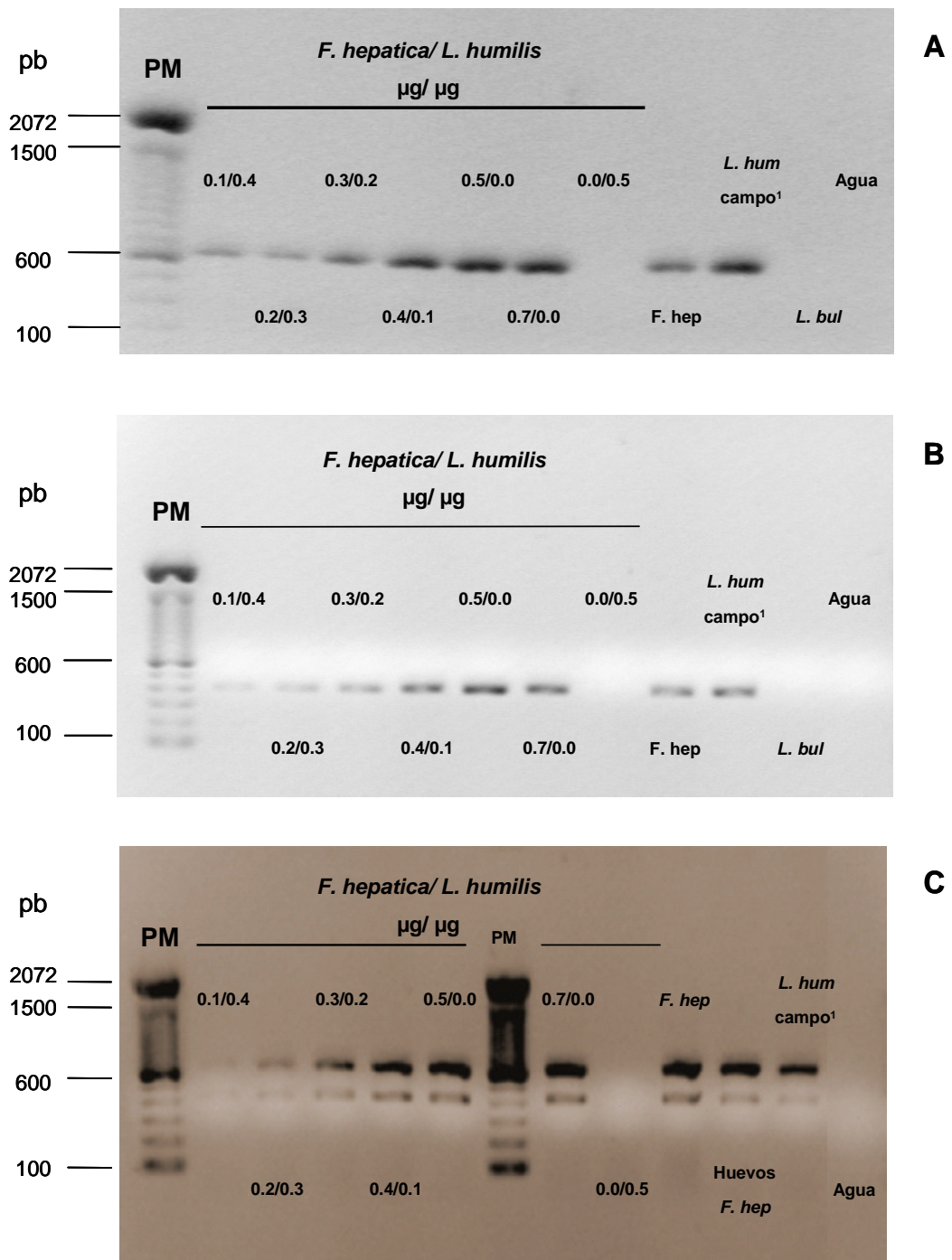


Figura 8. Geles de agarosa al 1% que muestra ensayos de interferencia y sensibilidad de los PCR's sencillos y dúplex. A) PCR para el rRNA 28S; B) subunidad I de la Citocromo C oxidasa; C) PCR dúplex. Se utilizaron diferentes proporciones de DNA del adulto de *Fasciola hepatica* y DNA de caracoles *Lymnaea humilis*. PM: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1. Caracol de campo infectado con el parásito; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*.

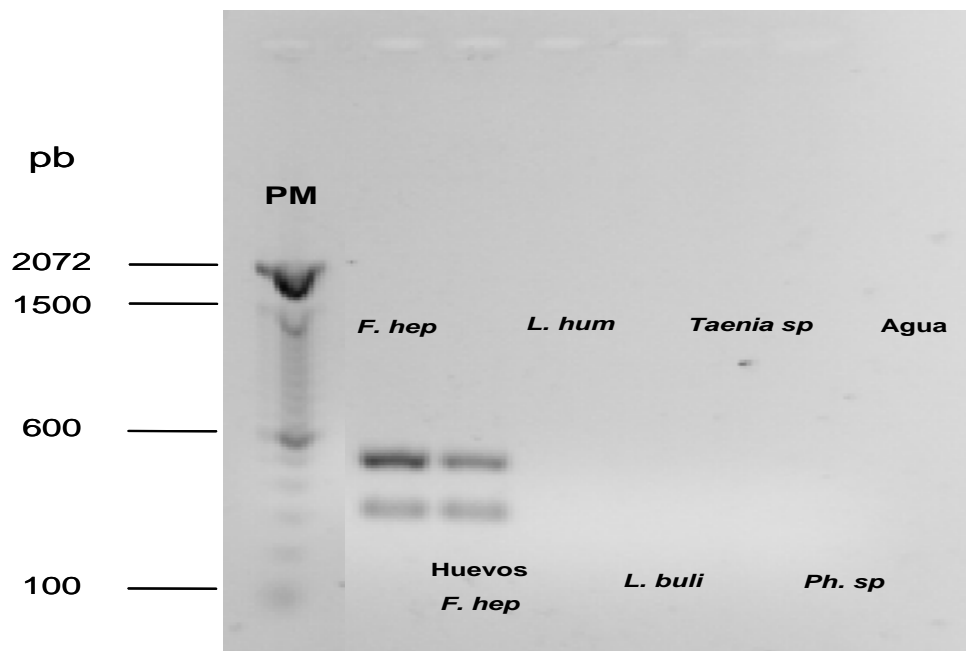


Figura 9. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio que muestra el ensayo de especificidad de la PCR dúplex. *F. hep*= *Fasciola hepatica*; Hue *F. hepatica*= Huevos de *Fasciola hepatica*; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *Ph. sp*= *Paramphistomum sp*; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

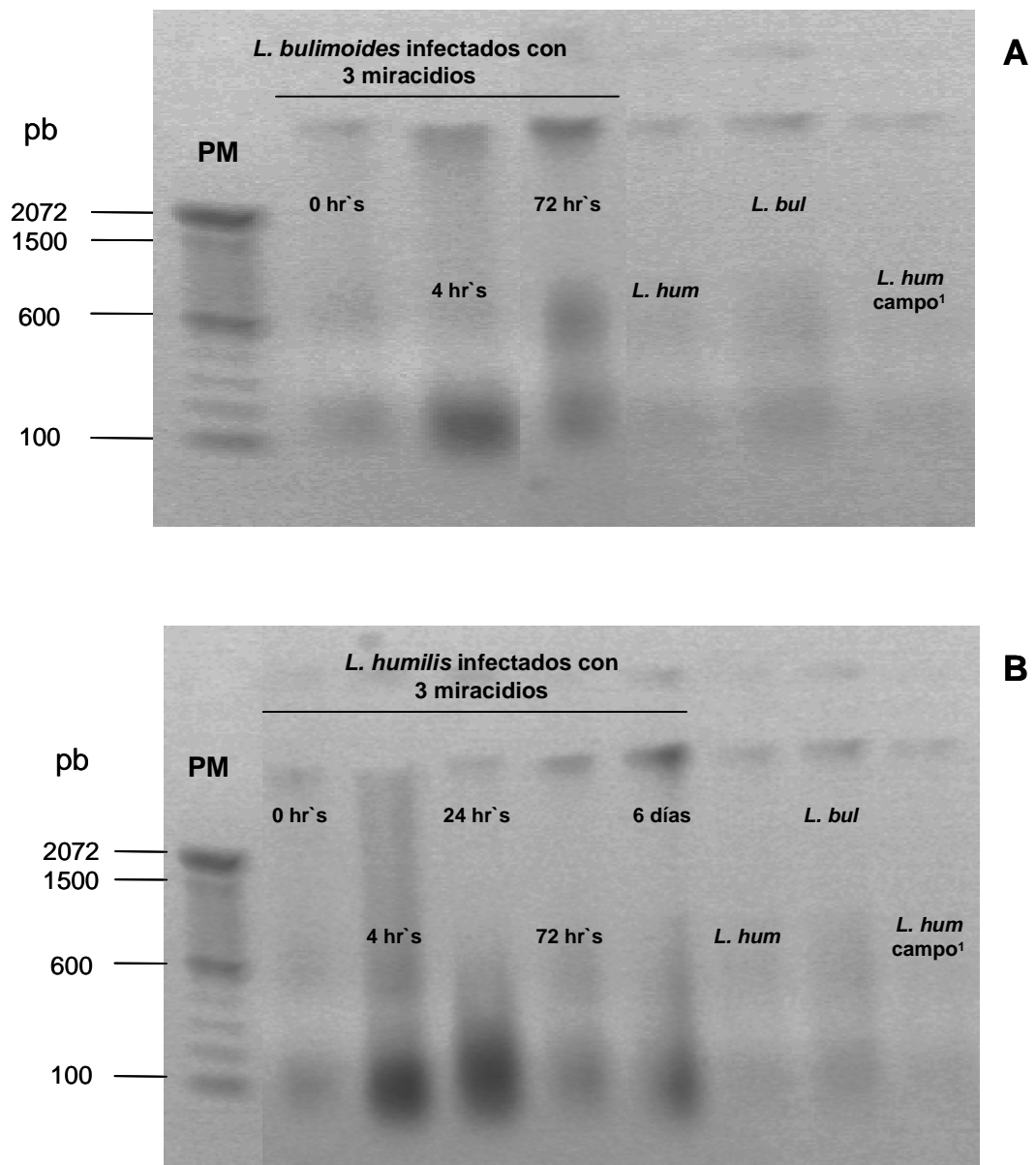


Figura 10. Geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio que muestran el DNA de caracoles A) *L. bulimoides* y B) *L. humilis* a diferentes tiempos después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; 1. Caracol de campo infectado con el parásito; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*.

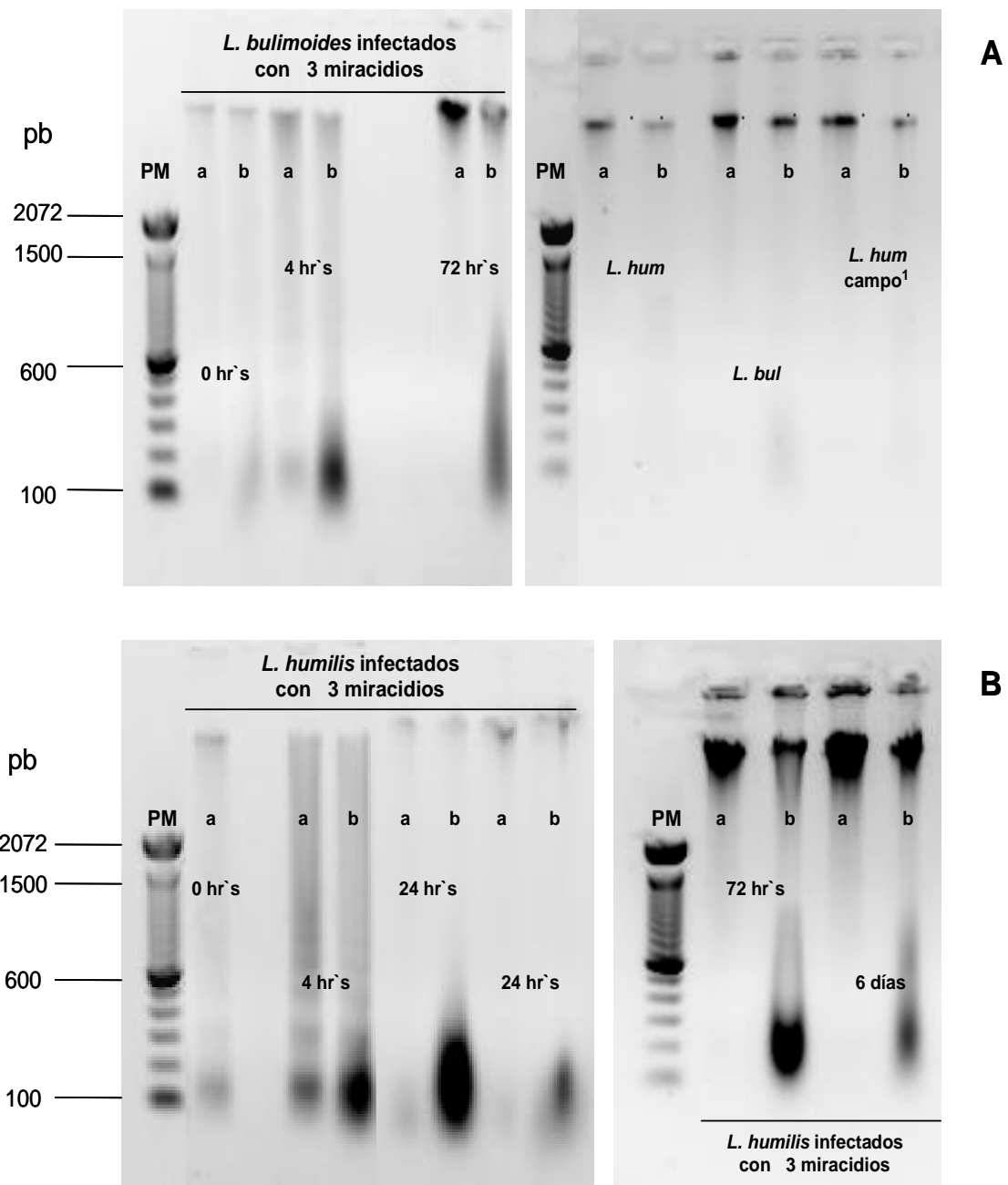


Figura 11. Geles de agarosa al 1% que muestra el tratamiento con RNAsa de los ácidos nucleicos de caracoles *L. bulimoides* (A) y *L. humilis* (B) infectados con tres miracidios de *F. hepatica*, teñido con bromuro de etidio; a= tratamiento con RNAsa; b= sin tratamiento con RNAsa; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; 1. Caracol de campo infectado con el parásito; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*.

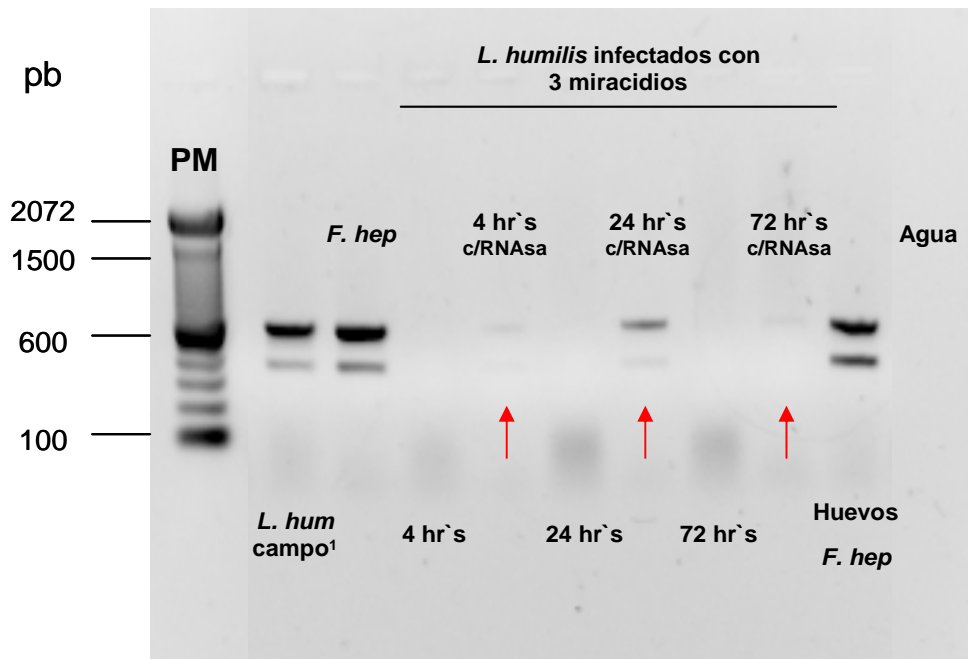
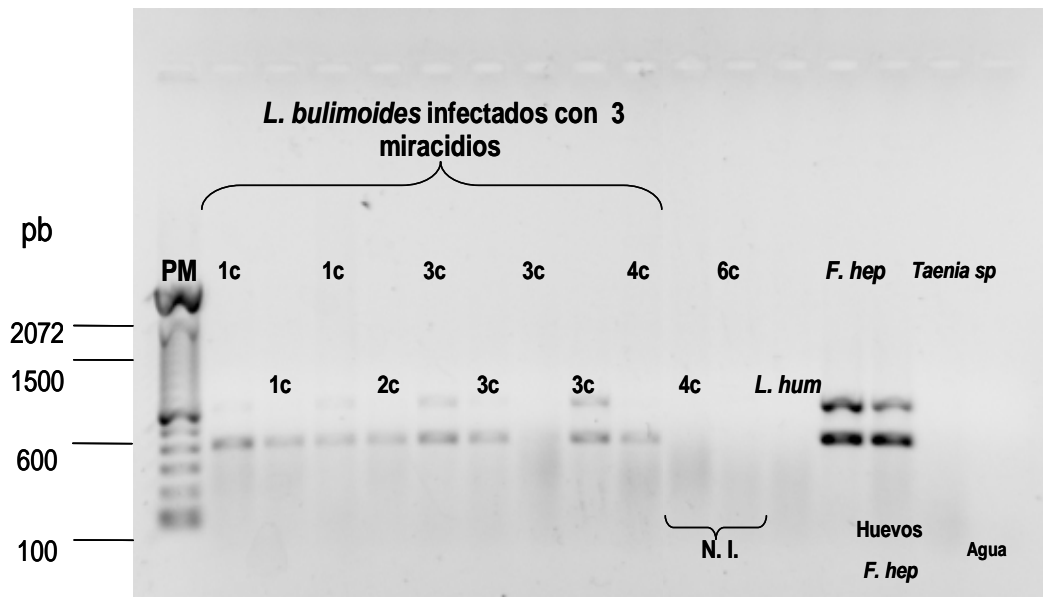
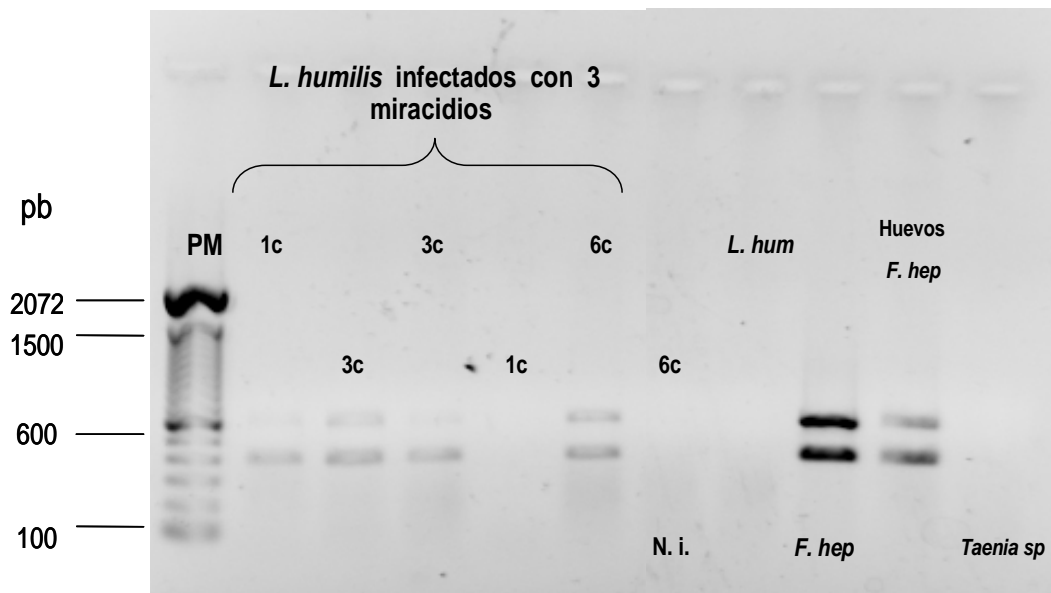


Figura 12. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra la PCR dúplex de caracoles *L. humilis* infectados con tres miracidios de *F. hepatica* a diferentes tiempos post-infección; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; Hue *F. hepatica*= Huevos de *Fasciola hepatica*; 1. Caracol de campo infectado con el parásito; c/RNAsa= muestras de DNA tratadas con RNAsa.



A



B

Figura 13. Geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestran la PCR dúplex de caracoles A) *L. bulimoides* y B) *L. humilis* a 20 horas después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*; Huevos de *F. hepatica*; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; N.I. = Caracoles sin infectar; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; DNA fue tratado con RNAsa.

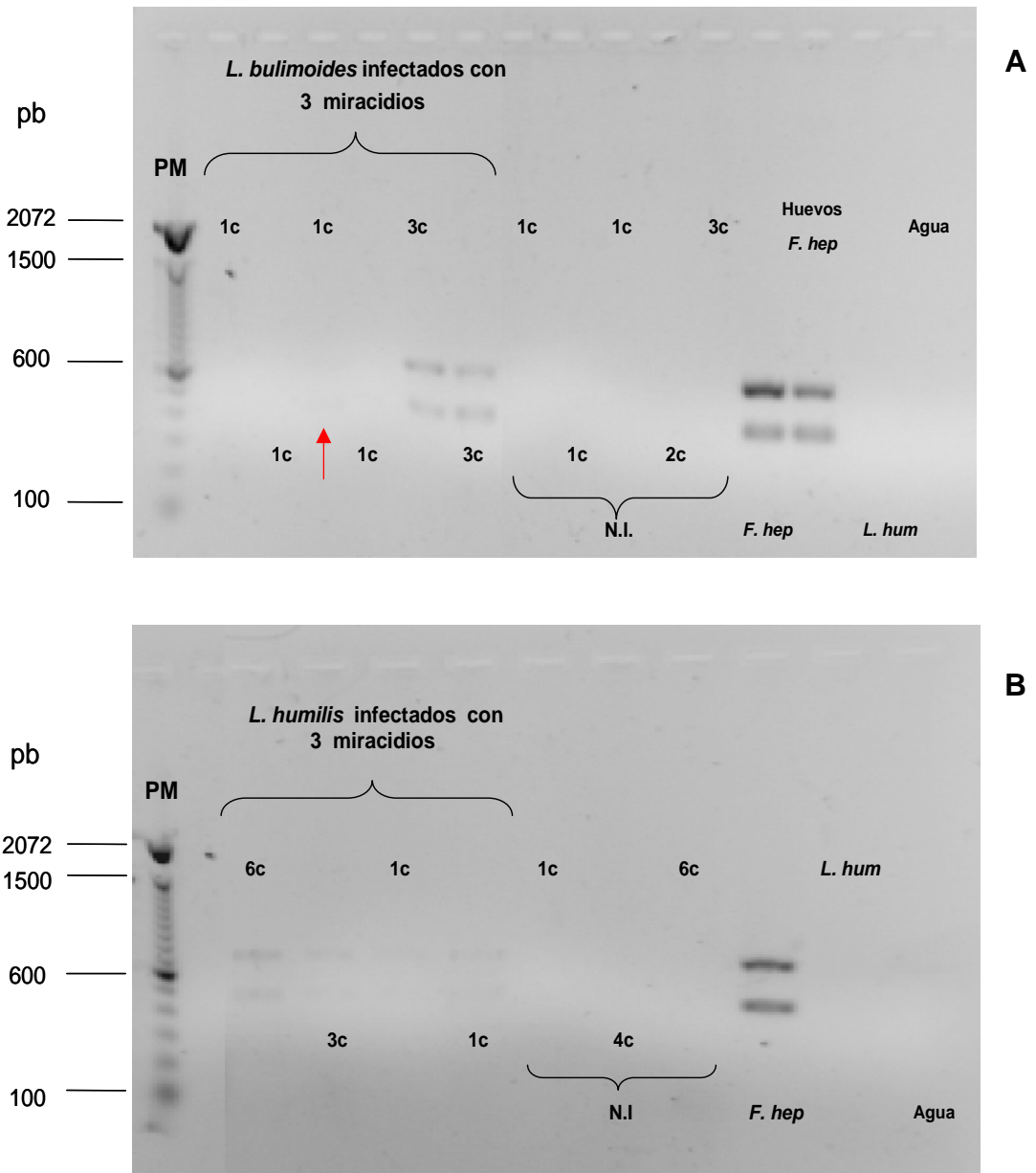


Figura 14. Geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestran la PCR dúplex de caracoles A) *L. bulimoides* y B) *L. humilis* a 4 horas después de ser infectados con tres miracidios de *F. hepatica*; *F. hep*= *Fasciola hepatica*; Huevos de *F. hepatica*; *L. hum*= *Lymnaea humilis*; *L. bul*= *Lymnaea bulimoides*; N.I. = Caracoles sin infectar; PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; DNA fue tratado con RNAsa.

REFERENCIAS

- Abdeltawab AH, Shahat SA, Abdou M, Metwally KM and Woodward SR. 2000. DNA sequence polymorphisms in two strains of *Fasciola hepatica* from Egypt and Europe. J. Egypt. Soc. Parasitol. 30:821-828.
- Abrous M, Rondelaud D and Dreyfuss G. 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: The effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. J. Parasitol. 82:1026-1029.
- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G and Cabaret J. 1998. Unusual transmission of the liver fluke *Fasciola hepatica* by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. J. Parasitol. 84:1257-1259.
- Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G and Cabaret J. 1999. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. Vet. Res. 30:113-118.
- Abrous M, Rondelaud D and Dreyfuss G. 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. Parasitol. Res. 85:765-769.
- Abrous M, Rondelaud D and Dreyfuss G. 2000. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymnaea truncatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *Fasciola hepatica*. J. Helminthol. 74:1-5.
- Abrous M, Rondelaud D and Dreyfuss G. 2000. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. J. Helminthol. 74:189-194.
- Abrous D, Rondelaud D and Dreyfuss G. 2001. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. Exp. Parasitol. 99:49-51.
- Adlard RD, Barker SC, Blair D and Cribb TH. 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of *Fasciolidae* (Digenea). Int. J. Parasitol. 23:423-425.
- Alasaad S, Huang CQ, Li QY, Granados JE, García-Romero C, Pèrez JM and Zhu XQ. 2007. Characterization of *Fasciola* samples from different host

species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed specers of rDNA. *Parasitol. Res.* 101:1245-1250.

- Augot D, Abrous M, Rondelaud D and Dreyfuss G. 1996. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracial cross-exposures. *Parasitol. Res.* 82:623-627.
- Augot D, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J, Bayssade-Dufour C and Albaret JL. 1998. Characterization of *Fasciola hepatica* redial generations (Trematoda: *Fasciolidae*) by morphometry and chaetotaxy under experimental conditions. *J. Helminthol.* 72:193-198.
- Augot D, Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss D, Dreyfuss G and Cabaret J. 1999. *Fasciola hepatica*: an unusual development of redial generations in an isolate of *Lymnaea truncatula*. 73:27-30.
- Barges MD, Mangold AJ, Munoz-Antoli C, Pointier JP and Mas-Coma S. 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *J. Parasitol.* 83:1086-1092.
- Barges MD and Mas-Coma S. 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. *J. Helminthol.* 79: 257-267.
- Blair D and McManus DP. 1989. Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 201-208.
- Boray JC, Fraser GC, Williams JD and Wilson JM. 1985. The occurrence of the snail *Lymnaea columella* on grazing areas in New South Wales and studies on its susceptibility to *Fasciola hepatica*. *Aust. Vet. J.* 62:4-6.
- Busson P, Busson D, Rondelaud D and Pestre-Alexandre M. 1982. Experimental data on the infestation of the young of 5 species of *Lymnaea* by *Fasciola hepatica*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57: 555-563.
- Calienes AF, Fraga J, Pointier JP, Yong M, Sánchez J, Coustau C, Gutierrez A and Théron A. 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: *Lymnaeidae*) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: *Digenea*) using RAPD markers. *Acta Tropica.* 92: 83-87.

- Cardoso PC, Caldeira RL, Lovato MB, Coelho OM, Berne ME and Carvalho Odo S. 2006. Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: *Lymnaeidae*), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: *Digenea*). *Acta Trop.* 97: 339-345.
- Carvalho OM, Cardoso PC, Lira PM, Rumi A, Roche a, Berne E, Muller G and Caldeira RL. 2004. The use of the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: *Lymnaeidae*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99:503-507.
- Castro-Trejo L, García-Vásquez Z and Casildo-Nieto J. 1990. The susceptibility of *Lymnaeid* snails to *Paramphistomum cervi* infections in Mexico. *Vet. Parasitol.* 35:157-161.
- Christensen NO, Cansen P and Frandsen F. 1976. Molluscs interfering with the capacity of *Fasciola hepatica* miracidia to infect *Lymnaea truncatula*. *Parasitol.* 73:161-167.
- Coelho LH and Lima WS. 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *J. Helminthol.* 77:7-10.
- Coelho LH, Guimaraes MP and Lima WS. 2008. Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol.* 82:77-80.
- Cruz-Mendoza I, Ibarra-Velarde F, Naranjo-García E, Quintero Martínez MT y Lecumberrí López J. 2002. Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México. *Vet. Méx.* 33: 189-199.
- Cruz-Mendoza I, Figueroa JA, Correa D, Ramos-Martínez E, Lecumberri-López J and Quiroz-Romero H. 2004. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. *Vet. Parasitol.* 121:87-93.
- Cruz-Mendoza I, Ibarra-Velarde F, Quintero-Martinez MT, Naranjo-Garcia E, Lecumberri-Lopez J and Correa D. 2005. Seasonal transmission of *Fasciola*

hepatica in cattle and *Lymnaea Fossaria humilis* snails in central Mexico. Parasitol. Res. 95:283-286.

- Cruz-Mendoza I, Naranjo-García E, Quintero-Martínez MT, Ibarra-Velarde F and Correa D. 2006. Exposure to *Fasciola hepatica* miracidia increases the sensitivity of *Lymnaea (Fossaria)* to high and low pH. J. Parasitol. 92:650-652.
- Cruz-Mendoza I, Naranjo-García E, Quintero-Martínez MT, Correa D y Quiroz-Romero H. 2008. Huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica* en México. En: Fasciolosis en México. Quiroz-Romero H (ed.) (en prensa).
- Cucher MA, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé JH and Wisnivesky-Colli C. 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. Vet. Parasitol. 137: 74-82.
- Dalton JP. 1999. Fasciolosis. CABI Publishing. Dublín City University Republic of Ireland. 544 p.
- Dreyfuss G, Moukrim A, Rondelaud D and Vareille-Morel. 1994. Field observations concerning infection of *Lymnaea palustris* by *Fasciola hepatica*. J. Helminthol. 68:115-118.
- Dreyfuss G and Rondelaud D. 1995. Comparative studies on the productivity of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea tomentosa* that died after a cercarial shedding or without emission. Parasitol Res. 81:531-536.
- Dreyfuss G and Rondelaud D. 1997. *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*: a comparative study some characteristics of *Fasciola* infection in *Lymnaea truncatula* infected by either of the two trematodes. Vet. Res. 28: 123-130.
- Dreyfuss G, Abrous M, Vignoles P and Rondelaud D. 1999. *Fasciola hepatica*: characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. Exp. Parasitol. 92:19-23.
- Dreyfuss G, Abrous M and Rondelaud D. 2000. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 86:158-60.
- Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M and Rondelaud D. 2002. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. Parasite. 9:113-120.

- Dreyfuss G, Abrous M, Vignoles P and Rondelaud D. 2004. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. Parasitol. Res. 94:70-73.
- Gutiérrez A, Pointier J-P, Fraga J, Jobet E, Modat S, Pérez RT, Yong M, Sanchez J, Loker ES and Théron A. 2003. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail host. Exp. Parasitol. 105:211-218.
- Heussler V, Kaufmann H, Strahm D, Liz J and Dobbelaere D. 1993. DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails. Mol. Cel. Prob. 7:261-267.
- Huang WY, He B, Wang CR and Zhu XQ. 2004. Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. Vet. Parasitol. 120:75-83.
- Itagaki T, Honnami M, Ito D, Ito K, Tsutsumi K, Terasaki K, Shibahara T and Noda Y. 2001. Mitochondrial DNA polymorphism of a triploid form of *Fasciola* in Japan. J. Helminthol. 75:193-196.
- Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T and Fukuda K. 2005. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola spp.* in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitol. 131:679-685.
- Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR and Courtney CH. 1995. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. Int. J. Parasitol. 25: 601-610.
- Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR and Couuurtney CH. 1997. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. Int. J. Parasitol. 27:1585-1593.
- Kralova-Hromadova I, Spakulova M, Horackova E, Turcekova L, Novobilsky A, Beck R, Koudela B, Marinculic A, Rajskey D and Pybus M. 2008. Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and diffetentiation from *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 94:58-67.
- Kramer F and Schnieder T. 1998. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. Int. J. Parasitol. 28:1923-1929.

- Lee CG, Cho SH and Lee CY. 1995. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 58: 313-318.
- Le TH, Blair D and McManus DP. 2001. Complete DNA sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the liverfluke, *Fasciola hepatica* L. (Platyhelminthes; *Trematoda*). *Parasitol.* 123:609-621.
- Lin RQ, Dong SJ, Nie K, Wang CR, Song HQ, Li AX, Huang WY and Zhu XQ. 2007. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. *Parasitol. Res.* 101: 813-817.
- Magalhaes KG, Passos LK and Carvalho OM. 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 421-424.
- Mage C, Bourgne H, Toullier JM, Rondelaud D and Dreyfuss G. 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33: 439-447.
- Marcilla A, Bargues MD and Mas-Coma S. 2002. A RFLP assay for the distinction between *F. hepatica* and *F. gigantita*. *Mol. Cel. Prob.* 16: 327-333.
- Massoud J and Sadjadi. 1980. Susceptibility of different species of *Lymnaea* snails to miracidia of *Fasciola gigantica* and *F. Hepatica* in Iran. *J. Helminthol.* 54: 201-202.
- McGarry JW, Ortíz PL, Hodgkinson JE, Goreish I and Williams DJ. 2007. PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: *Fasciolidae*), using primers based on RAPD-derived sequences. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101: 415-421.
- Mendes EA, Lima WS and Melo AL. 2008. Development of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* infected with miracidia derived from cattle and marmoset infections. *J. Helminthol.* 82:81-84.
- Mostafa OM, Taha HA and Ramadan G. 2003. Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 33:733-742.

- Prepelitchi L, Kleiman F, Pietrokovsky M, Moriena RA, Racioppi O, Alvarez J and Wisnivesky-Colli C. 2003. First report of *Lymnaea columella* Say, 1987 (Pulmonata: *Lymnaeidae*) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus,1758) (Trematoda: *Digenea*) in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98:889-891.
- Preveraud-Sindou M, Dreyfuss G and Rondelaud D. 1994. Comparison of the migrations of *Fasciola hepatica* sporocysts in *Lymnaea truncatula* and other related snail families. Parasitol. Res. 80:342-345.
- Quiroz Romero H. 1994. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Limusa. México. 876 pp.
- Ramadan NI and Saber LM. 2004. Detection of genetic variability in nonhuman isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by the RAPD-PCR technique. J Egypt Soc Parasitol. 34:679-89.
- Rangel Ruíz JL. 1999. Seasonal variation in *Fossaria viatrix* in the municipality of Taepa, Tabasco, México. Malacol. Rev. 28:71-79.
- Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA and Panaccio M. 1998. *Fasciola hepatica*: stage-specific expression of novel gene sequences as identified by differential display. Exp. Parasitol. 89:169-179.
- Rognlie MC, Dimke KL and Knapp SE. 1994. Detection of *F. hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. J. Parasitol. 80:748-755.
- Rognlie MC, Dimke KL, Potts RS and Knapp SE. 1996. Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNA-based assay. Vet. Parasitol. 65:297-305.
- Rondelaud D and Barthe D. 1987. *Fasciola hepatica* L: étude de la productivité d' un sporocyste en fonction de la taille de *Lymnaea truncatula*. Parasitol Res. 74:155-160.
- Rondelaud D, Vignoles Pandy Dreyfuss G. 2004. *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. Parasitol. Res. 94:183-187.
- Salazar L, Estrada VE and Velásquez LE. 2006. Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: *Digenea*) on the life history traits of *Lymnaea*

cousini and *Lymnaea columella* (Gastropoda: *Lymnaeidae*). *Exp. Parasitol.* 114:77-83.

- Schweizer G, Meli ML, Torgerson PR, Lutz H, Deplazes P and Braun U. 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet. Parasitol.* 150:164-169.
- Shubkin CD, White MW, Abrahamsen MS, Roglie MC and Knapp SE. 1992. A nucleic acid-based test for detection of *F. hepatica*. *J. Parasitol.* 78: 817-821.
- Velusamy R, Singh BP and Raina OK. 2004. Detection of *F. hepatica* gigantica infection in snails by polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 120: 85-90.
- Vignoles P, Menard A, Rondelaud D, Chauvin A and Dreyfuss G. 2001. *Fasciola hepatica*: The characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitol. Res.* 87:945-949.
- Vignoles, Dreyfuss D and Rondelaud D. 2002. Larval development of *Fasciola hepatica* in experimental infections: variations with populations of *Lymnaea truncatula*. *J. Helminthol.* 76:179-183.
- Walker SM, Fletcher HL, Hanna RE, Kantzoura V, Hoey EM and Trudgett A. 2007. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infropopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101:117-125.