

## **SOBRE ALGUNOS FACTORES DE LA INFESTACION OVINA CON PROTOSTRONGILIDOS**

*Por Eusebio Martínez Morales*

### **I. INTRODUCCION**

Las verminosis pulmonares en los animales domésticos tienen un gran significado. Los daños causados por ellas pueden ser, en determinadas ocasiones, muy considerables, pues no se limitan solamente a las pérdidas por muertes, sino también se reflejan en mermas de carne, leche y lana. No obstante la gran importancia de estas parasitosis en la rentabilidad del ganado lanar, existen todavía una serie de cuestiones que aún no se han podido aclarar. Entre otras, lo muy difundidos que están los vermes pulmonares, fundamentalmente los Protostrongylidae, en oveja y cabra.

La opinión de HOBMAIER y HOBMAIER (1934) según la cual las larvas de Protostrongylidae, cuando han alcanzado el desarrollo completo, permanecen en el hospedador intermediario y el hospedador definitivo se infesta al ingerir caracoles portadores de larvas infestantes, ha sido refutada por DAWIDJAN (1937, 1947, 1949) y KASSAI (1958 a), quienes afirman que las larvas abandonan, en determinadas circunstancias, el caracol y, entonces, el hospedador definitivo las toma libres. Pero no comparten la idea de estos autores MATJEKIN, TURLIGINA, SALAJEWA (1954) y otros.

Con el deseo de aportar una aclaración a tan divergente opinión, hemos emprendido el trabajo que constituye la presente tesis doctoral.

### **INVESTIGACIONES PERSONALES**

La finalidad de nuestros ensayos ha sido, fundamentalmente, aclarar, hasta qué punto es cierto que las larvas infestantes de los Protostrongylidae abandonan el hospedador intermediario, según se ha publicado en algunos trabajos, y en caso positivo, en qué magnitud sucede esto y qué importancia epizootológica puede tener. Las pruebas comprenden: *la comprobación directa e indirecta de la emigración de larvas III y el comportamiento de éstas frente a los agentes externos, así como su poder infestante.*

## 2. MATERIALES Y METODOS

Las larvas de Protostrongylidae con que se han llevado a cabo los ensayos pertenecían a las especies de *Mullerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens*, aunque con un marcado predominio de *Mullerius*. Se obtuvieron mezclados como consecuencia de existir una infestación mixta.

### 2. 1. Animales de experimentación

Con las larvas arriba indicadas se infestaron caracoles de las especies: *Arion hortensis*, *Cepaea nemoralis*, *C. hortensis*, *Arianta arbustorum*, *Monacha incarnata*, *Helicella arigonus* y *Eulota fruticum*. Para comprobar la posible existencia de larvas emigradas de los caracoles, se alimentó con material vegetal del habitat de aquellos un macho cabrío de un año, existente en el Instituto, y en el que previamente se realizó el análisis coprológico para comprobar la ausencia de infestación previa por Protostrongylidae.

Con el fin de probar el poder infestante de las larvas obtenidas mediante digestión artificial, hemos utilizado dos cabras de once meses de edad, además de conejos, cobayos y ratones blancos. Todos ellos nacidos y criados en el propio Instituto.

Los caracoles de la especie *Helicella arigonus* procedían de España, pero todas las restantes especies fueron recogidas en Giessen y sus alrededores. Una posible infestación natural de los moluscos con larvas de cualquier especie de Protostrongylidae hubiese perturbado totalmente nuestros ensayos, por lo que era de gran importancia que los caracoles a utilizar estuviesen libres de ellas. Por eso, desde un principio, se recogieron en lugares donde no existía ninguna posibilidad de infestación. A pesar de ello y después de su recogida se mató y examinó una parte de los moluscos. En ningún caso se comprobó la infestación natural con larvas de Protostrongylidae.

Raras veces se utilizaron en ensayos los moluscos al poco tiempo de recogidos, pues casi siempre se mantuvieron algún tiempo en reserva. Para ello se colocaron en grandes recipientes de cristal, de unos diez litros de capacidad que se cerraron con tapaderas de tela metálica. En el fondo del moluscario se colocó una capa de piedras pequeñas y sobre ellas césped, cubierto a su vez por hojas de árbol. Los moluscarios se colocaron en una habitación oscura a la temperatura de 20 a 25° C y a humedad relativa entre el 65 y 75 %. Diariamente recibían los caracoles, como comida, hojas de lechuga, trozos de pepino o salvado humedecido en un portaobjetos. Al mismo tiempo, se humedecía con agua la capa superficial de hojas de árbol. De vez en cuando los moluscarios eran reemplazados por otros limpios, con nuevas piedrecitas, césped y hojas frescas.

### 2. 2. Infestación de los caracoles

Condición previa a todo ensayo fue la infestación del hospedador intermediario. Las larvas I necesarias para ello, fueron recogidas de excrementos de oveja por el método BAERMANN-WETZEL. Se hizo recogida rectal de los excrementos en distintos animales de rebaños que pastaban en los alrededores de Giessen, y se

colocaron por separado en embudos. Hemos comprobado la existencia de gran número de larvas en la mayor parte de las ovejas, con predominio de *Mullerius capillaris* sobre *Protostrongylus rufescens*. Con las larvas I, así recogidas, se infestaron los moluscos inmediatamente, o bien después de cinco o seis días. Durante este tiempo el material estuvo en agua del grifo, en placas de Petri y a la temperatura de 3 a 5° C.

Para la infestación de los caracoles seguimos el método citado por KASSAI (1957 b) como óptimo. Para ello concentramos las larvas en una pequeña cantidad de agua (unas gotas) y las extendimos en capa fina sobre placas de Petri. Entonces, colocamos en cada placa de cuatro a seis caracoles de la especie a infestar. Se cuidó de la aireación de la placa, porque observamos que, poco tiempo después del cierre completo, disminuía la actividad de los caracoles. Asimismo, cuando algunos de éstos se deslizaban por la tapadera de la placa, se le puso rápidamente en contacto con el material infestante. Por observación microscópica pudimos comprobar que, después de seis a ocho horas, no había ya casi ninguna larva, pues la mayor parte de ellas habían penetrado en los moluscos. Entonces se colocaron los caracoles, en los ya descritos recipientes, con césped y hojas de árbol. Primeramente no se realizó con ellos ninguna manipulación, sino que permanecieron como los caracoles no infestados. En cada moluscario no había más de doce ejemplares.

### 2. 3. Investigación de la emigración larvaria a partir de los caracoles

Con varios ensayos se quiso comprobar, si, después que las larvas han alcanzado en el hospedador intermediario el estado infestante, disminuye el número de ellas en el trascurso del tiempo, o bien permanece más o menos constante. En ensayos anteriores (MARTINEZ MORALES, 1964) habíamos comprobado que con el método de infestación arriba indicado, se lograban resultados satisfactorios.

Las condiciones de mantenimiento de los moluscos fueron las mismas que para los infestados.

Los experimentos se realizaron a lo largo de un año y, por tanto, tuvieron lugar en invierno y en verano. A pesar de ello, las variaciones climatológicas apenas tuvieron influencia, ya que las condiciones del medio ambiente para los caracoles, por su conservación en el laboratorio, permanecieron constantes casi todo el tiempo, prescindiendo del grado de iluminación.

#### 2. 3. 1. Caracoles en moluscarios con habitat normal

Con la técnica aplicada a los distintos lotes de este experimento creíamos que se podría comprobar la emigración larvaria de los caracoles. Pensamos que el grado de infestación de éstos estaría muy equilibrado, dentro de los ejemplares de de un mismo lote. Por tanto, resultaría que el número de larvas III que obtendríamos en caracoles examinados a las cuatro semanas, sería superior al hallado en los matados, por ejemplo, tres ó cuatro meses *p. i.*, respectivamente.

A partir de las dos semanas *p. i.*, esto es, desde cuando se podía contar que el desarrollo de las larvas estaba completamente terminado, y hasta un plazo de unos seis meses, matamos primeramente uno o dos caracoles y utilizamos el pie, que se cortó en pequeños trozos y se examinó entre placas compresoras de las usa-

das en el análisis triquineloscópico. El número de larvas existentes fue determinado mediante recuento doble, al mismo tiempo que se observó el grado de desarrollo. En intervalos más o menos regulares, de dos a cinco semanas, se realizó igual manipulación y examen con los restantes moluscos. Se experimentó con los siguientes lotes.

**Lote 1.<sup>o</sup>**—Se infestaron *Arion hortensis* de los que se mataron dos ejemplares a los treinta días y otros dos a los 58 *p. i.*

**Lote 2.<sup>o</sup>**—Diez *Cepaea hortensis*. A partir del día catorce *p. i.* se mataron de dos en dos caracoles a los intervalos antes indicados, terminando el examen a los 95 días *p. i.*

**Lote 3.<sup>o</sup>**—Seis *Cepaea nemoralis*, que matamos de uno en uno y a intervalos, *p. i.*, muy diferentes, comenzando el día 20 *p. i.* y concluyendo a los 108 días *p. i.*

**Lote 4.<sup>o</sup>**—De los doce *Monarcha incarnata*, que integraban este grupo, murió en el curso del experimento uno y no pudo examinarse por estar en estado de putrefacción. Los once ejemplares restantes se examinaron individualmente a distintos intervalos *p. i.* empezando el día 19 *p. i.* y concluyendo a los 187 días *p. i.* fecha en que matamos, dos caracoles. El recuento larvario se hizo individualmente.

**Lote 5.<sup>o</sup>**—Nueve *Arianta arbustorum*. En un plazo comprendido entre los 21 y los 121 días *p. i.*, se mataron y examinaron, a intervalos diversos, siete caracoles, mantenidos en las condiciones generales ya discutidas. Los dos ejemplares restantes, se colocaron en un moluscario, también de cristal de un litro de capacidad, en cuyo interior se obtuvo una humedad relativa alta. Además los sometidos a la irradiación de la lámpara.

Para aumentar la humedad, en el interior del moluscario, se hizo lo siguiente: colocamos, dentro, una placa con agua; aquel se cubrió con una gasa, la cual mojamos tres o cuatro veces cada día; sobre la gasa pusimos una tapadera de cristal para evitar la evaporación del agua al exterior. La irradiación se llevó a cabo, no solo en este ensayo, sino también en todos los posteriores, con una lámpara de 60 vatios, colocada en un flexo de mesa. Situamos aquella siempre a una distancia de 15 cm del moluscario.

A los 130 días *p. i.*, se disecaron estos dos ejemplares en la forma acostumbrada.

**Lote 6.<sup>o</sup>**—Diez *Cepaea hortensis*. Durante casi cuatro meses *p. i.* se habían conservado los caracoles en las condiciones habituales. Matamos en este primer período, entre los 20 y 113 días *p. i.*, a diversos intervalos siete caracoles. Los tres restantes, a partir de los 113 días *p. i.*, se colocaron en un moluscario pequeño con follaje, donde recibieron sesiones de la lámpara a lo largo de dieciocho días consecutivos. Durante seis a ocho horas diarias. Al fin de este tiempo, esto es, a los 131 días *p. i.*, matamos un caracol. Los dos restantes continuaron durante treinta y tres días más, en las mismas condiciones, salvo que aumentamos la humedad como en el lote 5.<sup>o</sup>, y les aplicamos de nuevo, sesiones de seis a ocho horas diarias bajo la lámpara. A partir de este momento (164 días *p. i.*), pasamos los dos caracoles todavía en experimentación, a un moluscario seco y sin contenido alguno durante dieciocho días. Cada dos o tres fechas los pusimos de seis a ocho horas en

placas de Petri con agua. Este agua y la resultante de lavar la placa se examinó al microscopio previamente.

Habíamos observado a lo largo de nuestro trabajo, como se especifica más adelante (epígrafe 3. 3. 6.), que, cuando poníamos en agua los trocitos del pie del caracol usados para recuento de larvas en las placas compresoras, las larvas III no abandonan la musculatura del hospedador a las seis u ocho horas *post mortem*, sino al cabo de veinticuatro a cuarenta y ocho horas. Esto nos llevó a pensar que el tiempo de inmersión de los caracoles vivos en el agua, para lograr la emigración de las larvas, pudo, probablemente, haber sido demasiado corto. Por ello, colocamos los dos caracoles del lote 6.<sup>o</sup>, aún existentes, durante cuarenta y ocho horas ininterrumpidas en placa de Petri casi completamente llena de agua, de manera tal, que el pie del caracol estuviese constantemente sumergido en el agua. Finalmente, examinamos el líquido. Uno de los moluscos había muerto en esta prueba. El otro, último del grupo, seguidamente lo pasamos al moluscario pequeño, libre de comida y follaje, durante tres días. A continuación lo pusimos, por segunda vez, otras cuarenta y ocho horas en placa de Petri casi llena de agua. De nuevo examinamos ésta en busca de larvas emigradas. Cuando se cumplían 189 días *p. i.* matamos el último caracol del grupo.

**Lote 7.<sup>o</sup>**—Cinco *Helicella arignonis*. Los experimentos realizados con este grupo son muy semejantes a los llevados a cabo con los *C. hortensis* del anterior. A los treinta y tres días *p. i.* matamos un caracol, que examinamos en las habituales placas compresoras. Pocos días más tarde se encontró un ejemplar muerto, que desechamos. A partir de los dos meses *p. i.* pasamos los tres caracoles restantes a un moluscario pequeño, conteniendo césped y follaje. Diariamente estuvieron de seis a ocho horas bajo la acción de la lámpara y, además, elevamos, de la forma ya descrita, la humedad en el frasco. Cuando habían transcurrido ocho días, matamos un caracol e hicimos el recuento larvario. Los otros dos continuaron en las condiciones últimas hasta un total de veintidós días, es decir, hasta el octogésimo día *p. i.* Seguidamente los pasamos a un moluscario con comida solamente, hojas de lechuga, donde permanecieron dos días. Al cabo de éstos, lavamos los restos de lechuga y el moluscario. El agua del lavado se examinó al microscopio. Finalmente, pusimos los caracoles cuarenta y ocho horas en placas de Petri casi llenas de agua. Examinamos el agua en busca de larvas emigradas. A continuación, matamos los dos últimos *Helicella* del grupo, cuando, precisamente, se cumplían los ochenta y cuatro días *p. i.*

**Lote 8.<sup>o</sup>**—Nueve *Cepaea hortensis*. En el curso del experimento murieron cinco caracoles, que no se pudieron examinar porque, prácticamente, sólo quedaba de ellos la concha. Así, pues, hicimos los experimentos con cuatro ejemplares, solamente. Matamos uno a los treinta y tres y otro a los cuarenta y ocho días *p. i.*, respectivamente, y contamos las larvas de la manera habitual. Los dos restantes, separados, se pusieron, a los cuarenta y ocho días *p. i.*, en placa de Petri con agua. Uno murió dentro de las primeras veinticuatro horas y examinamos prontamente el líquido de la placa. El otro continuó en agua hasta completar unas cuarenta y ocho horas. Entonces, examinamos microscópicamente el fondo de la placa, como en otros ensayos. Seguidamente, matamos el caracol y realizamos el recuento de larvas.

Lote 9.<sup>o</sup>—Seis *Cepaea nemoralis*. A los cuarenta y uno días *p. i.* matamos un caracol y examinamos las larvas. Al día siguiente pusimos los cinco restantes en una placa de Petri, casi completamente llena de agua, donde permanecieron cuarenta y ocho horas. Al final examinamos el agua al microscopio. Después, pasamos los caracoles a moluscarios sin ningún contenido, durante seis a ocho horas, y seguidamente los pusimos, de nuevo, uno en cada placa llena de agua. Cuando habían transcurrido veinticuatro horas hicimos un examen microscópico del agua. Comprobamos, además, que dos caracoles habían muerto. Los tres todavía vivos los colocamos en un moluscario con solo hojas de lechuga unas veinticuatro horas. Seguidamente lavamos los restos de comida y examinamos el sedimento del lavado. De nuevo los pasamos a una placa con agua, la cual examinamos microscópicamente después de veinticuatro horas. Otra vez los colocamos en el moluscario con hojas de lechuga, cuyos restos se lavaron, después de veinticuatro horas, y examinamos el sedimento del lavado. A continuación pasaron a un moluscario sin comida y sin césped, en el que permanecieron una semana en estivación. Finalizada esta semana, los pusimos por separado en placas de Petri con agua. A las veinticuatro y a las cuarenta y ocho horas de la citada inmersión de los caracoles, examinamos al microscopio el fondo de la placa en busca de larvas. Seguidamente matamos los tres caracoles e hicimos el recuento larvario por separado. Habían transcurrido, entonces, cincuenta y seis días *p. i.*

### 2. 3. 2. Caracoles en moluscarios vacíos

Paralelamente a la experiencia anterior (3. 3. 1.) y desde el comienzo del trabajo, hemos llevado a cabo los ensayos que constituyen la presente. Tratamos de encontrar, como en la experiencia anterior, las larvas III que, posiblemente, hubiesen abandonado el hospedador intermediario, pero empleando otras técnicas. No hemos matado los caracoles a intervalos regulares *p. i.*, como en la experiencia anterior, sino que realizamos los ensayos con todos los caracoles, hasta 5,5 a 7 meses *p. i.*, y los terminamos matando en el respectivo día todos los caracoles de cada grupo correspondiente.

Durante el primer mes *p. i.* se mantuvieron los caracoles como los no infestados. A continuación, los pasamos a moluscarios completamente secos y vacíos y, una vez por semana, se colocaban todos juntos o bien separados, individualmente, durante cuatro a cinco horas en placas de Petri, en cuyo fondo había una capa fina de agua. Algunos de los moluscos se situaban en la cara interna de la tapadera de la placa, con lo que el pie no permaneció todo el tiempo, en contacto con el líquido. Finalmente, observamos al microscopio el líquido de la placa y, además, el sedimento resultante del líquido de lavado, tanto tapadera como base, de dicha placa. Toda esta manipulación se repetía una vez más en el mismo día.

En la noche de ese día, pasamos los caracoles a sus frascos habituales con comida abundante: hojas de lechuga y trozos de pepino. Al día siguiente se lavaron bien el frasco y los restos de comida y se examinó el sedimento. Todas estas manipulaciones se repetían, como se ha dicho arriba, una vez por semana a lo largo del experimento. Terminamos éste, matando los caracoles para obtener el número de larvas. No hicimos el recuento individualmente para cada caracol, sino que calculamos la media, larvas/caracol, en los respectivos lotes:

Lote 1.<sup>o</sup>—Cinco *Cepaea nemoralis*. Se tuvieron en experimentación durante seis meses.

Lote 2.<sup>o</sup>—Cuatro *Cepaea hortensis*. Con estos *Cepaea* realizamos los experimentos a lo largo de cinco meses y medio.

### 2. 3. 3. Caracoles sometidos a la irradiación de la lámpara

Como se ha explicado en la experiencia 3. 3. 1., sometimos, ya al final del ensayo de cada lote, los dos o tres ejemplares de los lotes a la acción de la lámpara, pero alternando a intervalos diferentes, en cada grupo, con la inmersión en agua de los moluscos o bien con distintos períodos de estivación. Véase experiencia 3. 3. 1., lotes 5.<sup>o</sup>, 6.<sup>o</sup>, y 7.<sup>o</sup>.

Pero en la presente experiencia se sometieron los caracoles sólo a la acción de la lámpara, en medio húmedo, durante seis a ocho horas diarias a lo largo de sesenta a setenta días. A partir de los dos meses *p. i.*, colocamos los caracoles en un moluscario conteniendo, únicamente, follaje esterilizado. No pusimos césped ni piedrecitas.

Lote 1.<sup>o</sup>—Cinco *Arianta arbustorum*. Cada dos semanas examinamos parte del contenido del moluscario por el método BAERMANN-WETZEL. Seguidamente añadíamos en aquel algo de follaje nuevo. Transcurridos los sesenta o setenta días, arriba indicados, de la experiencia, esto es, a los ciento veinte días *p. i.*, matamos los caracoles, que examinamos en placas compresoras para comprobar si estaban infestados y en qué grado.

Lote 2.<sup>o</sup>—Seis *Cepaea nemoralis*. Desde los sesenta días *p. i.* se colocaron a la acción de la lámpara, en la forma y ambiente citados, durante setenta días. Finalizado este período, es decir, a los ciento treinta días *p. i.*, matamos los caracoles e hicimos, en placas compresoras, el examen larvario. El follaje, en que aquellos habían estado los setenta días de ensayo, fue dado a comer a un macho cabrío de un año de edad, que había estado treinta horas en ayunas, como preparación. Habíamos tenido las hojas de árbol, una vez eliminados los caracoles, cinco días a la temperatura del laboratorio, con el fin de comprobar la resistencia y la capacidad infestante de las larvas, posiblemente liberadas, que como mínimo estarían seis días fuera del hospedador. La existencia de una posible infestación por Protostrongylidos en el hospedador definitivo fue investigada por diario análisis coprológico durante sesenta y cinco días, a partir de los treinta posteriores a la posible infestación, y por necropsia del animal a los noventa y cinco días *p. i.*, respectivamente.

### 2. 3. 4. Caracoles sometidos a cambios bruscos de temperatura

Realizamos esta experiencia, simultáneamente, con tres lotes de caracoles, pertenecientes a tres especies diferentes. Pusimos cada lote en una placa de Petri, cuyo fondo habíamos humedecido con agua. Con una grapa se impedía que la tapa de aquella ajustase, de cuya manera, los moluscos no podían salir de su respectiva placa y, al mismo tiempo, se mantenía un ambiente húmedo, logrado de la forma siguiente: en el fondo de una placa cuadrangular, de unos 30 cm de lado y 8 cm de altura, colocamos papel de filtro mojado y, sobre éste, las placas de Petri con los respectivos moluscos. Tapamos la placa cuadrangular con cubierta de cristal. Todo ello lo llevamos al frigorífico a unos 2<sup>o</sup> C y, después de veinticuatro horas, lo pusimos a la temperatura del laboratorio durante cuatro horas. Seguidamente exami-

namos al microscopio el fondo, todavía húmedo, de cada placa de Petri. A continuación, lavamos, tanto base como tapadera de cada una de éstas, respectivamente separadas y examinamos microscópicamente el sedimento correspondiente al líquido de cada lavado. Finalmente, colocamos, de nuevo, cada lote de caracoles en sus respectivas placas de Petri, cuyo fondo estaba humedecido con agua. En estas condiciones y a la temperatura del laboratorio, permanecieron seis horas bajo la lámpara. Seguidamente, repetimos el examen microscópico del fondo de la placa y el sedimento, resultante del lavado de la misma, como habíamos hecho anteriormente.

Terminadas estas manipulaciones, matamos los caracoles e hicimos el examen de larvas en las placas compresoras. Se calculó el promedio larvas/caracol de cada grupo y, con ello, se concluyó el experimento. a composición y detalles de los lotes fue la siguiente:

Lote 1.<sup>o</sup>.—Seis *Cepaea nemoralis*. Se iniciaron, con ellos, los ensayos a los siete meses *p. i.*

Lote 2.<sup>o</sup>.—Ocho *Arianta arbustorum*. Con éstos, a diferencia del lote anterior, empezamos los ensayos a los cinco meses *p. i.*

Lote 3.<sup>o</sup>.—Ocho *Eulota fruticum*. Igualmente que con el lote segundo, empezamos los ensayos a los cinco meses *p. i.*

### 2. 3. 5. Caracoles infestados con un número determinado de larvas I

La finalidad de este ensayo fue determinar, aproximadamente, el número de larvas I que, por término medio, podría haber invadido cada caracol de los respectivos grupos. El promedio larvas I/caracol lo compararíamos con el número de larvas III, encontradas en cada caracol examinado a partir de los treinta días *p. i.*, es decir, matado cuando, normalmente, las larvas han alcanzado el desarrollo completo en el hospedador.

A los treinta días, o en fechas posteriores *p. i.*, matamos a uno o dos ejemplares de un determinado lote y los restantes a intervalos posteriores. Pensábamos que, como para la investigación del apartado 3. 3. 1., nos sería posible determinar el número de larvas III que abandonasen al hospedador intermedio, las que serían en número creciente en el curso del tiempo. Por tanto, la cantidad de larvas encontradas en los caracoles matados a los tres meses de la infestación, por ejemplo, sería inferior a la existente en los examinados al mes y medio o dos meses antes.

El material obtenido para infestar un lote de caracoles, se concentró por centrifugación, en dos o tres ml de agua. Seguidamente tomamos con una pipeta fina 0,1 ml, previa agitación del líquido, soplando sobre la misma pipeta, para que las larvas estuviesen distribuidas por igual y no concentradas en el fondo del líquido centrifugado. El 0,1 ml con las larvas se puso sobre un porta y realizamos al microscopio, tres recuentos, que estimamos como número de larvas por 0,1 ml. Multiplicamos dicho número por el de mililitros de líquido, obteniendo, por tanto, la cifra total de larvas existentes.

El método y técnicas para infestar los caracoles han sido los mismos que los anteriores ensayos. A continuación, pusimos aquéllos en moluscarios con igual hábitat que para los caracoles en reserva, véase más arriba. Pero la placa de Petri, donde se había llevado a cabo la infestación, se lavó bien y, por centrifugación del líquido, se concentraron las larvas I, existentes después de la infestación de los correspondientes caracoles. Para el recuento y cálculo de éstas, repetimos el mismo método

que para determinar su número antes de la infestación de los moluscos. La diferencia entre el número de larvas, antes y después de la infestación, expresaría las que habían invadido los caracoles.

Transcurrido el tiempo suficiente para que las larvas hubieran alcanzado el tercer estado larvario en los caracoles, matamos éstos, a intervalos diferentes, y examinamos mediante placas compresoras, o bien, después de cortar el pie, con tijeras, en trozos pequeños, realizando la digestión artificial. La solución utilizada en la digestión artificial fue:

Pepsina seca /Merk.....	0,5 - 1,0 g
CLH (concentrado) .....	0,3 - 0,5 ml
Agua destilada .....	100 ml

De esta solución tomamos, en un vaso de precipitados, de 75 a 100 ml, sobre los que echamos el material preparado para la digestión. En un agitador magnético se llevó a cabo ésta, durante una hora a 36° C de temperatura. Finalmente, se pasó el material por un colador, se dejó sedimentar la parte líquida y, después, se centrifugó para concentrar las larvas, cuyo recuento se hizo como al principio de este experimento. Al número de larvas así obtenido, había que sumar las encontradas en los trozos de pie digeridos, que quedaron en el colador y que examinamos, posteriormente, en placas compresoras. La suma resultante determinaría el número de larvas que había en cada caracol, en los diferentes intervalos de tiempo *p. i.* Al mismo tiempo se comprobó el estado de desarrollo larvario.

Realizamos esta experiencia con cuatro lotes de caracoles:

Lote 1.<sup>o</sup>.—Diez *Cepaea nemoralis*. Se examinaron a partir del día treinta y cinco *p. i.* y los últimos en el ochenta día *p. i.*

Lote 2.<sup>o</sup>.—Nueve *Cepaea nemoralis*. Desde el día treinta al ochenta *p. i.*

Lote 3.<sup>o</sup>.—Catorce *Arianta arbustorum*. Entre el cuarenta y el noventa día *p. i.*

Lote 4.<sup>o</sup>.—Siete *Arianta arbustorum*. Entre el cuarenta y cinco y el ochenta día *p. i.*

### 2. 3. 6. Investigación sobre la emigración de las larvas III de los caracoles muertos.

Se sabe que las larvas infestantes de Protostrongylidae sobreviven cierto tiempo a la muerte de los caracoles, pero, sin embargo, están divididas las opiniones respecto a su posible emigración del caracol muerto. Sobre esto, podemos dar a conocer ciertas observaciones personales.

Hemos utilizado, en esta experiencia, siete caracoles pertenecientes a diferentes lotes de los empleados en la experiencia 3. 3. 1. La técnica y ensayos llevados a cabo, ha sido semejante para los siete moluscos, pues modificamos, solamente, las condiciones ambientales, como a continuación detallamos en cada caso:

1.<sup>o</sup>.—Un *Helicella arignonis* (3. 3. 1., lote 7.<sup>o</sup>). Lo matamos a los treinta y tres días *p. i.* y lo examinamos mediante las placas compresoras. Seguidamente, pusimos los trozos de caracol en agua, en una placa de Petri, a la temperatura del laboratorio. De cinco a seis horas más tarde hicimos un examen microscópico del líquido en busca de larvas emigradas, lo que repetimos a las veinticuatro y cuarenta

ta y ocho horas siguientes, respectivamente. Por último, examinamos, otra vez los trozos del caracol en las placas compresoras.

2.<sup>o</sup>.—Un *Cepaea hortensis* (3. 3. 1., lote 8.<sup>o</sup>). Lo matamos a los treinta y tres días *p. i.* Las técnicas, que hemos aplicado a este caracol, han sido exactamente las mismas que para el anterior.

3.<sup>o</sup>.—Dos *Cepaea nemoralis* (3. 3. 1., lote 9.<sup>o</sup>). Transcurridos cuarenta y seis días *p. i.*, a lo largo del ensayo, los pusimos individualmente en placas de Petri llenas de agua, donde murieron en el curso de veinticuatro horas. Inmediatamente, examinamos al microscopio el líquido de la placa. Después, los situamos separadamente, en una placa de Petri con agua, donde permanecieron veinticuatro horas, puestos en el frigorífico, a 8° C. Seguidamente, examinamos, de nuevo, el fondo de las respectivas placas en busca de larvas emigradas. Por último, cortamos en trozos con la tijera el pie de cada molusco e hicimos el recuento larvario con las habituales placas.

4.<sup>o</sup>.—Un *Cepaea nemoralis* (3. 3. 1., lote 3.<sup>o</sup>). Muerto a los noventa y dos días *p. i.*, cortamos el pie en trozos pequeños e hicimos, inmediatamente el recuento de las larvas en las placas compresoras. A continuación, pusimos el material en agua a la temperatura del laboratorio. A las cinco y veinticuatro horas más tarde, respectivamente, investigamos al microscopio el líquido, donde estaba el tejido del caracol.

5.<sup>o</sup>.—Un *Cepaea nemoralis* (3. 3. 1., lote 3.<sup>o</sup>). Lo matamos a los ciento ocho días *p. i.* y realizamos la investigación de larvas en las placas compresoras. Después, pusimos los trozos del pie, en una placa de Petri con agua, en el frigorífico a 8° C durante veinticuatro horas. Al final de este plazo hicimos un examen microscópico del líquido en busca de larvas emigradas. Seguidamente, dejamos el material a la temperatura del laboratorio. Nuevamente, examinamos el líquido de la placa después de las cinco y veinticuatro horas siguientes, a la temperatura del laboratorio.

6.<sup>o</sup>.—Un *Arianta arbustorum* (3. 3. 1., lote 5.<sup>o</sup>). Lo matamos y examinamos, en las placas compresoras, a los ciento veintiún días *p. i.* Dejamos el material dieciséis horas, en el frigorífico, a 8° C. Seguidamente examinamos el líquido al microscopio. A continuación, permaneció a la temperatura del laboratorio. Entre tres y cuatro horas, después, repetimos el examen del líquido e hicimos el recuento de las larvas.

#### 2. 4. Investigación de la resistencia de las larvas III, liberadas del caracol, ante las influencias ambientales

Según las investigaciones de algunos autores, como asimismo nuestras propias observaciones, las larvas de Protostrongylidae pueden en el tercer estado larvario, una vez que han alcanzado su completo desarrollo, abandonar activamente su hospedador intermediario, tanto si éste está vivo como muerto. Es interesante, por tanto, determinar hasta qué punto y cuánto tiempo pueden vivir dichas larvas, liberadas del hospedador intermediario y qué influencia tiene sobre ello los factores ambientales. En sí, no es la emigración de las larvas del hospedador

intermediario el hecho de mayor importancia epizootológica en las protostongilidosis, sino que las larvas liberadas de esta manera han de estar en condiciones de resistir, al menos durante un cierto tiempo, las influencias ambientales, para que puedan completar de este modo su ciclo evolutivo.

Hemos utilizado, en el presente ensayo, las larvas III emigradas de los moluscos, que se emplearon en el experimento 3. 3. 6. Tomamos, con una pipeta capilar, de diez a veinte larvas que se pusieron en pocillos de histología con agua. Diversos lotes se sometieron a distintas temperaturas: en la estufa de cultivos a 30° C, a la temperatura del laboratorio entre 20 y 23° C y, también, en el frigorífico a 5° C. También se han realizado estudios sobre la acción de la irradiación sobre las larvas III, exponiendo lotes de éstas, en pocillos de histología con agua, durante siete a ocho horas diarias bajo la lámpara, cuyas características ya se han explicado. Con otros lotes de larvas hemos ensayado su resistencia a una completa desecación.

Cada tres o cuatro días poníamos, mediante la pipeta capilar, las larvas en otro pocillo de histología con agua limpia. A veces, perdimos larvas en esta manipulación. Cuando aparecían larvas muertas, a lo largo del ensayo, las retiramos del correspondiente pocillo con la pipeta capilar.

##### 2.4.1. Resistencia a distintas temperaturas.

Lote 1.<sup>o</sup>.—En estufa de cultivos a 30° C. Colocamos cuatro grupos de larvas en la estufa. Diariamente observamos al microscopio su aptitud: si estaban enrolladas o relajadas, si representaban débiles movimientos o, incluso, se desplazaban de lugar. A los quince días de haber iniciado el ensayo, comprobamos la reacción de las larvas, todavía vivas, ante el estímulo luminoso con la lámpara. El ensayo duró cincuenta días.

Lote 2.<sup>o</sup>.—A la temperatura del laboratorio, 20-23° C. Tomamos cuatro grupos de larvas, que colocamos en otros tantos pocillos de histología. La actividad larvaria se examinó diariamente al microscopio. A los treinta y sesenta días posteriores al ensayo, respectivamente, comprobamos la reacción, ante el estímulo de la lámpara, durante cinco minutos. Con los grupos uno y dos realizamos el ensayo hasta los noventa días, con los tres y cuatro hasta los cincuenta y ocho días respectivamente.

Lote 3.<sup>o</sup>.—En el frigorífico a 5° C. También en este ensayo hemos utilizado cuatro grupos de larvas, las que hemos examinado diariamente al microscopio. Observamos, qué motilidad presentaban inmediatamente después de sacarlas del frigorífico, después, de permanecer de diez a quince minutos a la temperatura del laboratorio y cuando, seguidamente, se les estimulaba cinco minutos bajo la lámpara. Con los cuatro grupos de larvas verificamos el ensayo hasta los noventa días.

##### 2. 4. 2. Resistencia bajo la lámpara

De todos los factores ambientales que acortan la vida de las larvas I de Protostrongylidae, tiene la luz la máxima importancia. De ahí que sea justificado investigar, hasta qué punto la radiación es, también, un factor importante sobre la longevidad de las larvas III, emigradas del hospedador intermediario. A continuación se describen las técnicas de este ensayo.

En tres pocillos de histología hemos colocado otros tantos lotes de larvas. El número de éstas en cada lote y el tiempo que habían parasitado en el caracol, así como la experiencia con ellas realizada, es como sigue:

*Lote 1.º.*—Treinta larvas, procedían de un caracol infestado durante cuatro meses.

*Lote 2.º.*—Treinta y tres larvas, procedían de un caracol infestado durante treinta y cuatro días.

*Lote 3.º.*—Cuarenta larvas procedentes del mismo caracol que las del «lote 1.º».

Las larvas de los tres lotes se recogieron unas ocho a diez horas después de matar al caracol. Los lotes «1» y «2» se sometieron diariamente, de siete a ocho horas, a la acción de la lámpara. El lote «3» permaneció como testigo. A partir del primer día del experimento observamos, al microscopio, la motilidad y actitud de los tres lotes. Transcurridas tres semanas en ensayo, sometimos el lote testigo cinco minutos a la acción de la lámpara, para probar si reaccionaba.

#### 2. 4. 3. Resistencia a la desecación.

El fin de esta experiencia era comprobar, si las larvas III de Protostronfylidae, emigradas del caracol, soportan una desecación completa y, en caso positivo, durante cuantas horas. Para ello, dejamos que se evaporase, completamente, el agua de los pocillos de histología, que contenían un determinado número (entre diez y veinte) de larvas. A continuación, una vez que éstas habían permanecido en absoluta desecación todo el tiempo deseado, llenamos los pocillos, nuevamente, de agua. Observamos, al microscopio, la actitud de las larvas inmediatamente después de agregarles agua y en las dos o tres horas siguientes.

Los intervalos, que permanecieron las larvas en absoluta desecación, se incrementaron de uno o dos, en los primeros ensayos, a veinticuatro horas, en los primeros ensayos, a veinticuatro horas, en los posteriores, respectivamente. En todos estos ensayos, que podíamos denominar previos, hemos observado, solamente, el número de larvas vivas, en cada lote, después de haberles agregado el agua, pero no estudiamos su longevidad en los días siguientes. Las larvas procedían de un mismo caracol y, además, permanecieron todo el tiempo en desecación, únicamente, a la temperatura del laboratorio.

Completamos esta experiencia utilizando larvas, que se habían aislado recientemente del caracol, o bien, unas semanas antes. Las recogidas semanas antes se sometieron, hasta iniciar la experiencia con ellas, a diferente temperatura. Tanto de estas larvas, como de las recogidas recientemente, hicimos unos lotes, que colocamos en desecación, durante un tiempo y a una temperatura distinta, hasta agregarles el agua. A partir de este momento, controlamos con el microscopio las larvas que habían muerto durante las horas de desecación y las que sucumbían en los días sucesivos en el medio líquido. Realizamos tres ensayos diferentes, que a continuación detallamos:

*Grupo 1.* Con larvas recientemente aisladas del caracol. Empleamos seis lotes entre once y diez y seis larvas. Dejamos que el agua se evaporase a la temperatura del laboratorio. Seguidamente, pusimos los pocillos de histología, conteniendo

las larvas en desecación, en lotes de a dos, a temperatura diferente durante veintiocho horas:

- Lotes «1» y «2», en la estufa de cultivos a 30° C
- » «3» y «4», a temperatura del laboratorio, 22° C
- » «5» y «6», en el frigorífico a 5° C

Transcurridas las veintiocho horas, agregamos agua sobre las larvas y las dejamos en los días siguientes a la temperatura del laboratorio. Cada dos días examinamos, al microscopio, y controlamos las larvas que habían muerto, hasta los setenta días.

*Grupo II.* Con larvas aisladas recientemente del hospedador y, otras, quince días antes. En esta experiencia permanecieron las larvas setenta y dos horas, en absoluta desecación, a la temperatura del laboratorio. Después de agregarles agua, continuaron durante cuarenta y tres días también, a la temperatura del laboratorio. Las larvas utilizadas procedían de distintos caracoles, pero éstos pertenecían a idéntico lote de infestación. Empleamos los lotes siguientes:

- Lote «1» y «2», larvas recientemente recogidas.
- Lote «3», estaban ya quince días en la estufa de cultivos, a 30° C.
- Lote «4», estaban ya quince días en el frigorífico a 5° C.

*Grupo III.* Con larvas aisladas veintidós días antes del hospedador y, otras recientemente. Hemos utilizado en este ensayo seis lotes. Excepto las larvas recientemente aisladas, las de los otros lotes se sometieron a una temperatura inicial de 5° C durante siete días y, a continuación, cada lote a distinta temperatura durante quince días, respectivamente:

- Lote «1», en la estufa de cultivos a 30° C.
- Lote «2», a la temperatura del laboratorio, 22° C.
- Lote «3», en el frigorífico a 8° C.
- Lote «4», en el frigorífico, a 0° C.
- Lotes «5» y «6», recientemente aislados.

Dejamos las larvas de los seis lotes durante noventa horas en desecación a la temperatura del laboratorio. Seguidamente, agregamos agua en los pocillos de histología y observamos, diariamente al microscopio, la viabilidad de las larvas durante siete días a la temperatura del laboratorio.

#### 2.5. Investigación, in vivo, de la capacidad infestante de las larvas III.

SVARC y ZMORAY (1960) y otros investigadores distinguen, en el tercer estado larvario, una larva «preinfestante» de otra «infestante». Estos dos tipos de larvas, indican SVARC y ZMORAY, abandonan el pie del caracol, con movimientos giratorios, cuando éste se trata en un medio de digestión artificial. En cambio, las larvas que no han alcanzado el estado «preinfestante», no logran salir activamente del caracol, sino que quedan libres por digestión completa del tejido envolvente.

Teniendo en cuenta las indicaciones de SVARC y ZMORAY, pensamos que el valor biológico de las larvas, que abandonan activamente los caracoles *in vivo*, no difiere mucho del de las que lo hacen en un medio de digestión artificial.

En esta experiencia usamos dos cabras de once meses de edad y animales de laboratorio (conejos, cobayos, cricetos y ratones blancos) a los que administramos, *per os*, el material infestante. Para un primer lote de hospedadores definitivos habíamos obtenido las larvas infestantes mediante digestión artificial. Al segundo lote administramos el tejido del caracol conteniendo las larvas infestantes.

#### 2.5.1. Mediante larvas obtenidas por digestión artificial.

La fórmula del líquido y la técnica de digestión fueron como las explicadas en el epigrafe 3.3.5. Matamos a los dos meses, *p. i.*, un número suficiente de caracoles hasta reunir el material infestante necesario. Seguidamente administramos, *per son-da esofagica*, a los distintos hospedadores las dosis siguientes:

- 1 cabra, con 3.000 larvas en tres dosis: 1.000 larvas cada día.
- 4 conejos, con 250 larvas cada uno.
- 4 cobayos, con 200 larvas cada uno.
- 4 cricetos, con 100 larvas cada uno.
- 8 ratones blancos, con 80 larvas cada uno.

A partir de los cuarenta días examinamos, diariamente, las heces del rumiante y las de los roedores por el método BAERMANN-WETZEL. A los noventa días, *p. i.*, matamos los animales de laboratorio y examinamos los pulmones. En cambio, no se verificó el examen de pulmón de la cabra, pues al finalizar este trabajo aun vivía.

#### 2.5.2. Mediante larvas contenidas en el tejido muscular del caracol.

Los caracoles, conteniendo larvas III, utilizados en esta experiencia pertenecían, junto con los de la anterior, a un mismo lote de infestación. El recuento de larvas se hizo en placas compresoras. La cabra recibió el material infestante en una capsula de gelatina y los animales de laboratorio, lo recibieron, mezclando con salado humedecido, en las dosis siguientes:

- 1 cabra, con 3.000 larvas en tres dosis: 1.000 larvas cada día.
- 2 conejos, con 250 larvas cada uno.
- 2 cobayos, con 200 larvas cada uno.
- 2 cricetos, con 125 larvas cada uno.
- 5 ratones blancos, con 80 larvas cada uno.

Transcurridos cuarenta días después de la infestación, iniciamos el examen coprológico, tanto de la cabra como de los roedores, diario por el método BAERMANN-WETZEL. Lo mismo que en la experiencia anterior, matamos los roedores a los noventa días, *p. i.*, e hicimos el examen de pulmón. En esta experiencia tampoco observamos el pulmón de la cabra, pues vivía cuando terminamos el trabajo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Comprobación de la emigración larvaria a partir de los caracoles.

##### 3.1.1. Caracoles en moluscarios con habitat normal.

En los cuadros I, II, III y IV están resumidos los resultados correspondientes a los lotes de caracoles 1.º, 2.º, 3.º y 4.º respectivamente, de esta experiencia (3.3.1). Como puede apreciarse, el número de larvas era distinto en los diversos caracoles, dentro de un mismo grupo, pero sin embargo, siempre permaneció en la misma magnitud, no habiéndose observado al final del ensayo ninguna disminución.

Además, hemos de decir, que en estos ensayos, como más tarde, también, hemos comprobado en otros, se diferencian dos clases de larvas III. Mientras que las de un tipo presentaban todavía, granulaciones en la sección intestinal y estaban inmóviles y enrolladas aparecían otras, la mayoría por cierto, claras y vítreas y, no pocas veces, muy vivaces. Puesto que la actividad de las larvas es, probablemente, de gran significado para una posible emigración, hemos separado, por eso, ambos tipos en los cuadros. Por evitar confusiones, hemos usado los conceptos de larvas III «preinfestante» e «infestante», que se han generalizado en la bibliografía, pero, personalmente, estimamos que no se debe predeterminar su capacidad infestante.

En el cuadro V aparecen los resultados obtenidos con el lote 5.º Los dos últimos caracoles, a pesar de haber estado sometidos durante dieciocho días a la acción de la lámpara y en medio con humedad elevada, no manifestaron cambio alguno perceptible, en el número de larvas, si lo comparamos con el de los dos caracoles examinados al principio, a los 21 y 36, o con el examinado a los 121 días, *p. i.*, respectivamente.

En el cuadro VI se recogen los resultados correspondientes al lote 6.º Tampoco encontramos en este lote evidencia alguna, de la emigración larvaria, al comprobar el número de larvas de los siete caracoles examinados entre los veinte y ciento trece días *p. i.*. Otro tanto podemos decir sobre los resultados de los ensayos realizados, posteriormente, con los tres restantes ejemplares del lote, e incluso, después de estar sometidos a la acción de la lámpara durante un largo período, y con humedad relativa alta.

A los ciento sesenta y cuatro días *p. i.*, vivían, solamente, dos caracoles, que sometimos a estivación en un moluscario vacío, pero se les estimulaban sus movimientos y, por tanto, la contracción muscular, poniéndolos en una placa de Petri con un poco de agua, durante seis a ocho horas cada dos o tres días. El examen de este agua y la del lavado de la placa fue negativo. Continuamos la experiencia colocando los dos caracoles en una placa de Petri, completamente llena de agua, durante cuarenta y ocho horas ininterrumpidas. Seguidamente encontramos una larva III de Protostrongylidae en el líquido, pero uno de los caracoles estaba muerto. No es prueba evidente de la emigración larvaria, ya que la larva encontrada podría haber emigrado *post mortem* del caracol sucumbido. El resultado, días más tarde, después de repetir la última prueba con el único caracol vivo fue negativo.

En el cuadro VII figuran los resultados logrados con el lote 7.º Este ensayo no condujo a una comprobación directa de la emigración de las larvas, ni tampoco la sugiere el grado de infestación de los caracoles examinados, *p. i.*, a intervalos más o menos regulares.

En el cuadro VIII se aprecian los resultados observados con el lote 8.º En una de las fases de ensayo con este lote, colocamos los caracoles, individualmente, en agua. En la placa de uno de ellos encontramos dos larvas III sin que el molusco hubiera muerto. Esto prueba la emigración directa de larvas infestantes de Protostrongylidae del caracol *Cepaea hortensis*. El número de larvas comprobadas no ha sido, ciertamente, elevado. La intensidad del parasitismo en los caracoles no cambió, en esencia, en el curso del ensayo.

El cuadro IX recoge los resultados del lote 9.º En este ensayo se repite, evidentemente, la emigración directa de larvas infestantes de Protostrongylidae del hospedador *Cepaea nemoralis*. Habíamos colocado cinco caracoles en una placa de Petri llena de agua y, después de cuarenta y ocho horas, examinamos al microscopio el líquido. Encontramos once larvas III. Unas horas más tarde, colocamos los caracoles, individualmente, en placas de Petri con agua. Dos de estos murieron y encontramos nueve larvas en una y una en la otra placa, respectivamente. En las de los que vivían, el resultado fue negativo. Sin embargo, diez días más tarde, repetimos la inmersión de los tres vivos en agua y obtuvimos, de nuevo, resultado positivo. Encontramos dos larvas III, una en cada placa.

Alternamos la inmersión de los caracoles en agua con períodos en el moluscario, ya en estivación, ya con comida. En el examen del sedimento del lavado del moluscario o del moluscario y restos de comida, respectivamente, nunca encontramos larvas III emigradas del hospedador.

En este ensayo, después de la inmersión de los caracoles en agua durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas, se obtuvo, repetidas veces, la prueba directa de la emigración de larvas III de *Cepaea nemoralis*, aunque el número de ellas fuera bajo en relación al grado de infestación encontrado en los caracoles. Respecto al número de larvas halladas en cada caracol en el curso del ensayo, no se advierte ninguna variación que pudiese justificar la emigración de los parásitos del hospedador intermediario, como puede comprobarse en los resultados del cuadro IX.

### 3.1.2. Caracoles en moluscarios vacíos.

Con los dos lotes de caracoles utilizados en este ensayo no hemos podido comprobar la emigración de larvas III. Respecto al grado de infestación en los hospedadores, determinado *post mortem*, encontramos, en el lote *Cepaea nemoralis*, 215 larvas III/caracol y, en el lote *Cepaea hortensis*, 14 larvas III/caracol, respectivamente.

### 3.1.3. Caracoles sometidos a la irradiación de la lámpara.

Por el método BAERMANN-WETZEL examinamos el contenido de un moluscario (hoja de árbol) en el que había estado el lote 1.º de caracoles. No encontramos ninguna larva III. Finalmente, comprobamos, por el examen de los moluscos en placas compresoras, que el número de larvas albergadas por éstos fue de 315 larvas III/caracol.

El habitat del lote 2.º fue dado a comer a una cabra de un año. Ni el examen coprológico diario, durante sesenta y cinco días, ni tampoco el de los pulmones, *post mortem*, dieron pruebas de estar este animal atacado de Protostrongylidae. El recuento de larvas de los caracoles dio un promedio de ciento setenta larvas III/caracol.

### 3.1.4. Caracoles sometidos a cambios bruscos de temperatura.

Con ensayos de cambios bruscos de temperatura, en ambiente con humedad elevada, no se ha demostrado la emigración de las larvas infestantes. Otro tanto observamos cuando, posteriormente, se sometieron a la irradiación con la lámpara.

El promedio de larvas III, encontrado en los caracoles de cada lote fue:

Lote 1.º — 150 larvas/caracol

Lote 2.º — 110 larvas/caracol

Lote 3.º — 42 larvas/caracol

### 3.1.5. Caracoles infestados con un número determinado de larvas I.

Este ensayo tampoco nos ha permitido comprobar, que las larvas abandonen el caracol, después que han alcanzado el desarrollo completo. Como puede observarse en los cuadros X, XI, XII y XIII no existe ninguna disminución en el número de larvas encontradas en los caracoles, de los respectivos lotes, que examinamos a los ochenta o noventa días *p.i.*, respecto al de los que se examinaron con un mes o mes y medio, por ejemplo, de anterioridad.

Asimismo, como puede comprobarse en los cuadros arriba citados, no existe correlación alguna entre el número de larvas que teóricamente, podrían haber invadido los moluscos, y el que se ha obtenido en el examen minucioso de los mismos. Sin duda alguna, en las manipulaciones con el material (paso del tubo de ensayo a la placa Petri y viceversa, para el segundo recuento) perdimos gran cantidad de larvas. Es posible, también, que no se haya perdido en las manipulaciones un número tan elevado de larvas, sino que, por el contrario, muchas de las larvas I, que invadieron el caracol, no hubieran continuado el desarrollo y, en el examen con las placas compresoras, no encontramos ningún vestigio de ellas.

### 3.1.6. Investigación sobre la emigración de las larvas III de los caracoles muertos.

1.º—Un *Helicella arignonis* matado a los treinta y tres días *p. i.*, (cuadro VII). Contamos setenta y siete larvas, cuarenta preinfestantes y treinta y siete infestantes en el examen con las placas. Dejamos, seguidamente, los trocitos de caracol en placa de Petri con agua a la temperatura del laboratorio. De cinco a seis horas más tarde examinamos el líquido de la placa, directamente, al microscopio. No encontramos ninguna larva III emigrada del tejido del caracol. El material permaneció a la temperatura del laboratorio y repetimos, veinticuatro y cuarenta y ocho horas más tarde, nuevamente, el examen microscópico. Tampoco ahora encontramos larva alguna liberada de los trozos de caracol.

2.º—Un *Cepaea hortensis* matado a los treinta y tres días *p.i.*, (cuadro VIII). En el examen con las placas compresoras encontramos 364 larvas del tipo «infestante». Pusimos los trocitos de pie en agua a la temperatura del laboratorio: de cuatro a seis horas más tarde, según nuestro reconocimiento microscópico, habían emigrado un 20 % de las larvas y, al día siguiente, contamos 320, o sea, que en veinticuatro horas habían emigrado un 88 % de las larvas.

3.º—Dos *Cepaea nemoralis*, murieron a los cuarenta y seis días *p.i.*, (cuadro IX). Utilizábamos estos dos caracoles, sumergidos en agua, para investigar la posible emigración de las larvas III, y en el curso del ensayo, murieron. Encontramos nueve larvas III en la placa de uno y una en la del otro. A continuación, los pusimos a 8º C durante veinticuatro horas en las respectivas placas con agua. Al final de este plazo, encontramos, de nuevo, diez y ocho larvas III, respectivamente. En el examen con placas compresoras, encontramos que el grado de invasión, en ambos caracoles era relativamente alto: 294 y 495 larvas infestantes, respectivamente.

4.º—Un *Cepaea nemoralis*, muerto a los noventa y dos días *p.i.*, (cuadro III). Encontramos cien larvas III en el examen con las placas. Seguidamente, pusimos los trocitos del caracol en agua a la temperatura del laboratorio. Examinamos el líquido de la placa de Petri, directamente al microscopio, cinco y veinticuatro horas, más tarde, y hallamos cincuenta y noventa larvas III, respectivamente.

5.º—Un *Cepaea nemoralis*, matado a los ciento ocho días *p. i.*, (cuadro III). Contamos ciento cincuenta y una larvas III en las placas. Después, colocamos los trozos de caracol en agua a 8º C, en el frigorífico, durante veinticuatro horas. Al final de este plazo, examinamos el agua en busca de larvas emigradas y obtuvimos resultado negativo. Pero, cuando había permanecido el material cinco horas a la temperatura del laboratorio, encontramos sesenta y cinco y a las veinticuatro horas, otras cincuenta y cuatro larvas, respectivamente. Así que, habían emigrado en total ciento veinte larvas, que representaban un 78 % de las que parasitaban el caracol.

6.º—Un *Arianta arbustorum*, matado a los ciento veintiún días *p.i.*, (cuadro V). En las placas compresoras contamos ochenta y siete larvas III. A continuación, dejamos los trozos de caracol durante dieciséis horas a 8º C en el frigorífico, en placas de Petri con agua. En el examen microscópico, inmediatamente después, no encontramos ninguna larva. Posteriormente, dejamos la placa de Petri, conteniendo el material, a la temperatura del laboratorio. De tres a cuatro horas, después, contamos ochenta larvas III libres en el medio, o sea, un 92 % del total.

### 3.2. Investigación de la resistencia de las larvas III, liberadas del caracol, ante las influencias ambientales.

#### 3.2.1. Resistencia a distintas temperaturas.

1.º—En la estufa de cultivos a 30º C. Durante los primeros cinco a ocho días manifestaban las larvas movimientos, pero sin cambiar de lugar. Después de este período aparecían enrolladas, aproximadamente, la mitad y extendidas la otra mitad. A los quince días, después de estar sometidas a esta temperatura, estaban todas relajadas y unas pocas, solamente, presentaban débiles movimientos ante el estímulo luminoso.

El cuadro XIV muestra que a partir del día 7.º comienzan a morir algunas larvas. Al cabo de un mes habían muerto la mayoría y a los cincuenta días, prácticamente, habían muerto el 100 %, pues tan solo vivía una larva de uno de los lotes.

2.º—A la temperatura del laboratorio (20 a 23º C). Durante los primeros veinte días del ensayo, dos tercios de las larvas manifestaban movimientos intensos; el resto permanecían enrolladas, sin moverse. Poco a poco llegaron a estar inmóviles

todas las larvas y, al cabo de un mes, aparecían extendidas. Pero en este período, todavía era posible el que se pusiesen en movimiento, después de estimularles durante cinco minutos intensamente bajo la lámpara. No obstante, no se desplazaban de un lado para otro. Finalmente, a los dos meses de iniciado el ensayo, estaban todas las larvas en absoluta inmovilidad y no reaccionaban ante el estímulo de la lámpara. Los resultados a lo largo del ensayo están recogidos en el cuadro XV. Como puede verse en éste, a los noventa días habían muerto de los grupos 1.º y 2.º, el 63,6 % y el 50 % de las larvas, respectivamente. Los grupos 3.º y 4.º permanecieron en ensayo hasta los cincuenta y ocho días, solamente. Al cabo de este período, habían muerto un 25 % del 3.º y un 10 % del 4.º grupo respectivamente.

3.º—En el frigorífico a 5º C. En los reconocimientos, llevados a cabo diariamente, comprobamos el diferente comportamiento de las larvas según avanzaba el tiempo. Durante los quince primeros días, se movían todas, incluso en el momento en que se sacaban del frigorífico. Poco después de las dos semanas, aparecían sin movimiento y enrolladas, pero bastaban diez a quince minutos a la temperatura del laboratorio, para que manifestasen pequeños movimientos, y otros cinco minutos a la iluminación de la lámpara, para que iniciasen, de nuevo, sus desplazamientos. Este comportamiento, que presentaban el 100 % de las larvas del ensayo, pudo observarse hasta, aproximadamente, mes y medio después de iniciado el mismo. En adelante, cuando poníamos las larvas a la temperatura del laboratorio, de media a una hora, permanecían completamente en reposo, pero con el estímulo luminoso de la lámpara manifestaban movimientos, aunque una tercera parte, solamente, se desplazaban. Con esta conducta permanecieron las larvas hasta los noventa días que finalizamos el ensayo. Como puede verse en el cuadro XVI habían muerto, al cabo de los tres meses, un 20 % de las larvas de los grupos 1.º y 2.º y ninguna de los grupos 3.º y 4.º. En los cuatro grupos se observaron bajas por pérdidas en las manipulaciones.

#### 3.2.2. Resistencia bajo la lámpara.

Observamos al microscopio, diariamente el comportamiento de las larvas de los lotes bajo la lámpara y el de aquéllas cuyos lotes servían como testigo.

Las larvas de los grupos irradiados mostraron, durante los dos primeros días del ensayo, movimientos muy vivaces que cesaron ya al tercer día. Un tercio de estas larvas yacían entonces extendidas, mientras que el resto estaban todavía enrolladas. Después de tres semanas estaban todas las larvas inmóviles. En cambio, las del grupo testigo no estaban al principio, ciertamente, tan vivaces, pero permanecieron en actividad hasta tres semanas y, además, después de este plazo, reaccionaban al estímulo luminoso de la lámpara.

Llama la atención, que las larvas sometidas a la iluminación sufrieron una alteración más rápida de su estructura interna y que tenían un aspecto más claro que las testigo. Como puede verse en el cuadro XVII y en el gráfico 1, los lotes testigos sobrepasaron los cuarenta y cuatro días de ensayo sin observar bajas dignas de mención. Sin embargo, en los lotes irradiados empezaron pronto a sucumbir. A los diecisiete días habían muerto todas las larvas del lote 1.º y a los cuarenta y cuatro el 78,8 % de las del 2.º, respectivamente.

Se observa, además, diferente resistencia entre los grupos irradiados. En el grupo 1.º habían muerto todas las larvas a los diecisiete días, mientras que en el 2.º

no murieron tan pronto. Una explicación de ello sería, que las larvas del grupo 1.º habían parasitado el caracol durante cuatro meses, mientras que las del grupo 2.º, solamente, treinta y cuatro días.

### 3.2.3. Resistencia a la desecación.

Hemos observado, que cuando agregábamos agua sobre las larvas en desecación, manifestaban éstas un aspecto muy diferente al que presentan normalmente. Su estructura interior aparecía muy cambiada, observándose rayas transversales muy marcadas. Aproximadamente la mitad de las larvas se movían inmediatamente después de añadirles el agua, las restantes quedaban inmóviles, pero, poco a poco, después de una a dos horas, manifestaban los primeros movimientos.

#### Grupo I. Larvas recientemente aisladas del caracol.

Los resultados de este ensayo pueden verse en el cuadro XVIII. Según aparece en él, un número muy elevado de larvas soportaron la desecación más de veintiocho horas. Además, se aprecia que tampoco existe diferencia notable en relación con los distintos grados de temperatura estudiados en desecación. No obstante, la temperatura tiene, probablemente, influencia en la mortalidad sucesiva, que es mayor con la más alta.

#### Grupo II. Larvas aisladas quince días antes y otras recientemente.

Los resultados se resumen en el cuadro XIX, en el que puede verse que las larvas aisladas recientemente del caracol son más resistentes que las que se habían recogido quince días antes. Mientras que en los lotes 1.º y 2.º se produjo, ninguna y dos (10 %) bajas, respectivamente, durante la etapa de desecación, en el lote 3.º, que se mantuvo en el frigorífico, murieron ocho larvas ( un 66 % ) y en el 4.º, que se tuvo en la estufa de cultivos, murieron todas. En cuanto a la longevidad posterior en agua, observamos que, a los cuarenta y tres días, vivían catorce larvas del 1.º lote y diecisiete del 2.º lote, es decir un 87,5 % y un 85 %, respectivamente, de las iniciales, y del lote 3.º vivían dos larvas, que representan un 16,6 %.

#### Grupo III. Larvas aisladas veintidós días antes y otras recientemente.

Los resultados están resumidos en el cuadro XX. Según indicamos en, «Materiales y Métodos», 3.4.3. Grupo III, las larvas de este ensayo permanecieron noventa horas en desecación a la temperatura del laboratorio, pero previamente se habían tenido, excepto las recientemente aisladas, en agua a diferente temperatura.

*Lote 1.º*—Murieron doce larvas, el 60 %, durante el período de desecación y las ocho restantes al día siguiente de haberles agregado el agua en el pocillo de histología.

*Lote 2.º*—Durante la desecación murieron ocho larvas, el 40 %. Al día siguiente de agregada el agua murieron tres en fechas posteriores sucumbieron algunas más. El día veinte vivían solamente dos larvas.

*Lote 3.º*—Durante la desecación murieron cuatro larvas, el 20 %. Dos días después de agregarles el agua murieron dos y el día veinte vivían, todavía, trece.

*Lote 4.º*—Durante la desecación murieron cinco larvas, el 20,8 %. A los dieciséis días de agregarles el agua sucumbió una y al veinte día vivían dieciocho.

*Lote 5.º*—En el período de desecación no murió ninguna larva. A los tres días de agregarles el agua sucumbieron dos y el veinte día vivían veinticuatro.

*Lote 6.º*—Durante la desecación murieron dos larvas y al octavo día después de ponerles agua una. El veinte día vivían veintitrés.

### 3.3. Investigación, in vivo, de la capacidad infestante de las larvas III.

#### 3.3.1. Larvas liberadas por digestión artificial.

A partir de los cuarenta días *p.i.*, hicimos diariamente el examen coprológico de la cabra y de los animales de laboratorio, hasta los noventa días *p.i.*

El examen coprológico, diariamente a lo largo de cincuenta días, de la cabra y de los animales de laboratorio tuvo un resultado negativo. Asimismo, verificamos el examen *post mortem* de los pulmones de los animales de laboratorio y no encontramos Protostrongylidae adultos, ni larvas I.

#### 3.3.2. Larvas contenidas en el tejido muscular del caracol.

El examen coprológico de los animales de laboratorio resultó negativo desde los cuarenta hasta los noventa días *p.i.*, fecha en que los matamos. El análisis de los pulmones, *post mortem*, tampoco probó que se hubiese logrado la infestación en ellos. Pero el examen coprológico de la cabra resultó positivo, a los cuarenta días después de la infestación, con la presencia de cuatro larvas I. En los días sucesivos se incrementó el número de éstas considerablemente.

## 4. DISCUSION

Se aceptó en general el ciclo evolutivo de los Protostrongylidae dado a conocer por HOBMAIER y HOBMAIER (1929), según el cual, las larvas después de logrado su completo desarrollo, permanecen en el hospedador intermediario y la infestación del hospedador definitivo se realiza por la ingestión accidental de los caracoles atacados. En contraposición a ello, y por primera vez, se manifestó MAWTAJAN (1937, 1947, 1949), fundado en experimentos propios, afirmando que las larvas infestantes en condiciones ambientales óptimas (temperatura y humedad), emigran regularmente del hospedador intermediario, verificándose la infestación del hospedador definitivo, esencialmente, por la ingestión de las larvas libres. Otros autores rusos (MATHEKIN, TURLIGINA y SALAJEWA, 1954) no consiguieron comprobar los hallazgos de DAWTJAN. Pero KASSAI (1958 a) se unió completamente al concepto de éste, pues también él aceptó el punto de vista de que la oveja se infesta principalmente al tomar con la comida larvas infestantes libres, aunque igualmente pueda tener una cierta importancia la ingestión casual de caracoles infestados.

Mientras que el concepto de DAWTJAN y KASSAI sobre la salida de las larvas de Protostrongylidae de su hospedador intermediario está bien fundamentado, faltan indicaciones detalladas sobre la proporción en que sucede y el valor epizootológico correspondiente a esta aptitud de las larvas. DAWTJAN citó una serie de factores, los

que deben tener influencia sobre la magnitud de la emigración. Además de los ya citados (temperatura y humedad óptimas) tiene gran importancia la actividad de los caracoles porque repercute en contracciones del pie. La intensidad de invasión, así como la especie de caracol, dice DAWTJAN tienen influencia.

Nuestros propios ensayos probaron que las larvas de *Mullerius capillaris* y de *Protostrongylus rufescens*, cuando han alcanzado su completo desarrollo, son capaces de abandonar al caracol y salir al exterior.

Nuestros hallazgos no están de acuerdo con los antecedentes bibliográficos, ya que éstos señalan que la emigración de las larvas se presenta regularmente y en masa ante la existencia de las circunstancias favorables. Por eso pensamos que sería fundamental en nuestros ensayos, proporcionar suficiente humedad y elevada temperatura. Para ello tuvimos los caracoles constantemente a la temperatura de 20-23° C, que es muy superior a la que están sometidos en condiciones naturales, especialmente en la época en que se presenta también la segunda condición importante para la salida de las larvas: humedad en forma de rocío o lluvia. En nuestra opinión tampoco tienen lugar la emigración en un medio demasiado seco. Por eso en los recipientes utilizados se mantuvo siempre elevada la humedad del aire y la del substrato, porque diariamente se humedecía el follaje y la hierba, elevándose todavía más al cubrir algunos de los recipientes con una tapadera. Por último el colocar, de cuando en cuando, los caracoles en placas de Petri completamente llenas de agua significó llegar al aporte máximo de humedad. Pues esto mismo, durante unas cuantas horas, tampoco bastó para lograr la salida de las larvas, sino que fueron precisas más de veinticuatro horas.

Así, pues, respecto a los factores de humedad y calor, en nuestros ensayos se cubrió toda la gama de posibles condiciones para una fuerte emigración.

Se sabe, que valores constantes de humedad y temperatura no actúan frecuentemente como estímulo biológico, sino que éste aparece cuando tienen lugar cambios bruscos de esos factores. Por ejemplo, una salida más o menos repentina de las cercarias de *Fasciola hepatica* o del *Lymnaea truncatula*, se presenta cuando éste se lleva a durante poco tiempo a un ambiente muy húmedo y de nuevo, rápidamente se lleva a un ambiente cálido. Pero si permanece sin interrupción a la temperatura del laboratorio, entonces salen las cercarias lentamente. Otro tanto sucede con la liberación de las «bolas de mucus» que contienen la *Cercaria vitrina* de *Dicrocoelium dentriticum* a partir de los moluscos terrestres, primeros hospedadores intermediarios (CORDERO, comunicación personal). Con este fundamento realizamos en nuestros ensayos un estímulo en los caracoles mediante cambios intensos de temperatura y de humedad. Sin embargo, no descartamos que las condiciones naturales que se presentan en el prado sean las más adecuadas para que, por oscilación de temperatura, tenga lugar la salida de las larvas de Protostrongylidae.

Según DAWTJAN las contracciones del pie del caracol actúan favorablemente en la emigración de las larvas. Esta circunstancia, sin duda, se dio también en nuestros ensayos. Aparte de que algunas veces los caracoles estuvieron durante cierto tiempo en estivación, cuando se mantuvieron en frascos sin substrato, sin comida ni humedad adecuada, en el resto del ensayo se mostraron siempre muy activos. El micro-habitat en el recipiente correspondió siempre, más o menos, al que existe en la naturaleza después de la lluvia o por la mañana con el rocío. Naturalmente los moluscos también reposaban durante largo tiempo en estas condiciones diariamente. Sin embargo, se manifestaron muy activos en el momento de recibir la comida, pero sobre todo cuando se humedecía el contenido del recipiente, en cuyo caso la actividad fue más prolongada. Un ulterior inconveniente para la emigración de las larvas hubiese sido

una larga pasividad que lleva consigo la falta de contracciones, en el caso de que el caracol hubiese estado todo el tiempo en el interior de la concha sin tener relación alguna con el exterior. Pero en nuestros ensayos no se dio esta circunstancia.

La emigración de las larvas infestantes de Protostrongylidae sucedió, evidentemente, antes en los caracoles muertos que en los vivos. También aquí fue preciso un máximo de humedad, y es digno de mención que la cantidad de larvas emigradas aumentó cuando se cortó mecánicamente en trozos el pie del caracol, lo que suponía abrir nuevas vías de salida. En este caso pasaron en dos días casi todas las larvas al agua del medio. Los resultados de nuestros ensayos sugieren que, junto a una cierta temperatura, tiene la mayor significación para la emigración de las larvas un grado de humedad extremadamente alto. Puede ocurrir que, el verdadero impulso para la activación de las larvas existentes en el pie del caracol, parta de un cambio de las condiciones osmóticas. En favor de ello está, que en caracoles vivos, cuyo pie se remojó largo tiempo en agua, pudo verse que aumentaba de tamaño por imbibición y al mismo tiempo se presentaba claramente transparente. Esto fue todavía más evidente en los casos en que se cortó el pie en trozos.

Una vez liberadas las larvas III de *Mullerius capillaris* y de *Protostrongylus rufescens* pueden permanecer largo tiempo con vida y manifiestan gran resistencia ante la acción del medio exterior.

Según KOTLAN (1960) las larvas de *Cystocaulus ocreatus* son muy resistentes ante la sequedad y están en condiciones de permanecer varios meses con vida ante la desecación completa del suelo. Nuestras observaciones sobre las larvas infestantes de *Mullerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* señalan que igualmente, son resistentes contra la desecación completa. Pueden soportar este estado durante largo tiempo. La duración de la vida a temperaturas elevadas es notablemente más corta, que cuando la conservación se hace a pocos grados por encima del punto de congelación. Dichas larvas manifiestan ser muy sensibles a la luz directa.

En resumen, puede compararse biológicamente el comportamiento en la naturaleza de las larvas III de Protostrongylidae liberadas del caracol, con el de las larvas I, cuando, con las heces, llegan al exterior. También éstas pueden soportar muy bien las influencias externas, sobre todo la sequedad extrema, pero por el contrario son muy sensibles a la luz directa (SUPPERER, 1956; ROSE 1957 b; y otros).

El hecho de que la prueba de infestación con larvas obtenidas de caracoles, mediante digestión artificial, haya resultado negativa, no permite dar una conclusión definitiva sobre la capacidad infestante de tales larvas. Estas procedían de oveja y se administraron a un hospedador apropiado, una cabra, pero por tratarse de un solo individuo no es suficiente para dar una solución completa sobre el particular. Respecto a los animales de laboratorio utilizados, no son hospedadores naturales de estos vermes, y sólo el conejo puede albergar una especie de *Protostrongylus*. Según nuestros resultados tampoco son experimentalmente receptivos a las larvas por nosotros utilizadas, de origen ovino.

En suma, la larva III de los Protostrongylidae puede vivir, bajo condiciones normales, largo tiempo al aire libre. Por ello cabe pensar que el modo de infestación con larvas emigradas puede tener importancia. Pero hasta qué punto la salida de las larvas tiene lugar en condiciones naturales, no ha podido aclararse en nuestros ensayos, según los cuales parece no tener un gran valor práctico. Por lo tanto, según esto, probablemente la ingestión de caracoles infestados tiene mucha mayor importancia para la infestación del hospedador definitivo. Si bien en nuestros ensayos se cumplieron las condiciones señaladas por DAWTJAN (1937, 1947, 1949) y KASSAI (1958 a) como principales (temperatura y humedad suficientes), llegamos a resul-

tados que están en contraposición con la tesis de dichos autores, según la cual la emigración de las larvas tiene el máximo valor epizotológico. Nuestras observaciones, en cambio, concuerdan con las de MATJIKIN, TURLIGINA y SALAJEWA (1954), quienes no lograron, tampoco, confirmar experimentalmente los resultados de DAWTJAN.

Todas las especies de caracoles utilizadas en nuestros ensayos con *Protostrongylidae* resultaron ser hospedadores intermediarios apropiados. Ya se conocía, desde los ensayos de HOBMAIER y HOBMAIER (1929), la receptividad de *Cepea hortensis*, *Arianta arbostorum* y *Arion hortensis*. KASSAI (1957 b) cita *Eulota fruticum*. A la lista de posibles caracoles hospedadores intermediarios podemos añadir *Cepea nemoralis*, *Helicella arignonis* y *Monacha incarnata*.

## 5. CONCLUSIONES

En las condiciones en que se han llevado a cabo nuestras experiencias se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.<sup>a</sup> La emigración de las larvas III de *Müllerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* a partir de los moluscos hospedadores intermediarios solamente se verificó cuando se sumergieron en agua y, aún así, en número muy escaso. Ni la humedad relativa alta, temperaturas diversas, estímulos en la motilidad e irradiación bajo la lámpara, provocaron la salida de las larvas.

2.<sup>a</sup> En la epizootología de las *Protostrongylidosis* no parece tener importancia práctica la emigración larvaria, verificándose la infestación del hospedador definitivo por la ingestión accidental de caracoles portadores de larvas III.

3.<sup>a</sup> Las larvas de *Müllerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* han demostrado ser muy resistentes a las bajas temperaturas (noventa días a 5-8° C) y algo menos a las más altas (menos de un mes a 30° C).

4.<sup>a</sup> La irradiación con lámpara es letal a partir del segundo día y algunas lo soportan como máximo cuarenta y cuatro días, apreciándose más resistencia en las larvas jóvenes que en las formadas en el hospedador con mayor anticipación, lo que prueba la existencia de un proceso de envejecimiento en el molusco.

5.<sup>a</sup> Las larvas III de *Müllerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* son muy resistentes a la desecación completa (noventa horas), soportando la falta de humedad mejor a temperaturas bajas que a las altas.

6.<sup>a</sup> *Cepeaea nemoralis*, *Helicella arignonis* y *Monacha incarnata* han de añadirse a la lista de caracoles apropiados como hospedadores intermediarios de *M. capillaris* y *P. rufescens*.

## 6. RESUMEN

Después de revisar los antecedentes bibliográficos sobre la biología de los *Protostrongylidae* ovinos se llevaron a cabo investigaciones para determinar, si las larvas infestantes de estos nemátodos emigran de los caracoles hospedadores intermediarios, según han afirmado algunos autores.

En las condiciones de este trabajo se logró demostrar la salida de larvas infestantes de *Müllerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* del hospedador intermediario, pero su número fue sumamente pequeño, a pesar de reproducirse exactamente las condiciones experimentales señaladas como óptimas por dichos investigadores. Esto significa que la emigración larvaria a partir de los caracoles no es el principal factor epizotológico, aunque sea posible la infestación por tales larvas emigradas. No se han podido aclarar las circunstancias bajo las cuales emigran las larvas del hospedador intermediario.

Se ha demostrado la elevada resistencia de las larvas III liberadas del hospedador intermediario ante diversas temperaturas, desecación e irradiación bajo lámpara.

*Cepeaea nemoralis*, *Helicella arignonis* y *Monacha incarnata* han de añadirse a la lista de caracoles apropiados como hospedadores intermediarios de *Müllerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens*.

## RESUME

Après avoir révisé les antécédents bibliographiques sur la biologie des *Protostrongylidae* ovins, on a fait recherches pour déterminer si les larves infestantes de ces nématodes émigrant des escargots hôtes intermédiaires, comme quelques auteurs ont affirmé.

Dans les conditions de ce travail on arriva à démontrer de larves infestantes de *Müllerius capillaris* et *Protostrongylus rufescens* de l'hôte intermédiaire, mais leur nombre fut extrêmement petit malgré l'exacte reproduction des conditions expérimentales indiquées comme excellentes par les investigateurs eux-mêmes. Ceci signifie que l'émigration larvaire à partir des escargots n'est pas le facteur épizootologique principal, quoique l'infestation moyennant les susdites larves émigrées soit possible. On n'a pas pu expliquer les circonstances dans lesquelles les larves de l'hôte intermédiaire émigrant.

On a démontré la grande et forte résistance des larves III libérées de l'hôte intermédiaire à différentes températures et avec dessiccation et irradiation sous lampe.

On doit ajouter les *Cepeaea nemoralis*, les *Helicella arignonis* et les *Monacha incarnata*, à la liste d'escargots convenables comme hôtes intermédiaires des *Müllerius capillaris* et *Protostrongylus rufescens*.

## SUMMARY

After a revision of the bibliographic records on the biology of ovine *Protostrongylidae* some research works were carried out to determine whether the infesting larvae of these nematodes emigrate from the intermediate host snails as some authors have stated.

Under the conditions of this work the origin of infesting larvae of *Müllerius capillaris* and *Protostrongylus rufescens* from the intermediate host was shown but their number was very small though the experimental conditions considered by the workers as optimum were exactly reproduced. This means that the migration of larvae starting from snails is not the main epizootologic factor though the infestation may be possible through said emigrating larvae. We have not been able to find out the circumstances under which the larvae migrate from the intermediate host.

The great resistance of third larvae freed from the intermediate host against various temperatures, desiccation and irradiation under lamp has been shown.

*Cepeaea nemoralis*, *Helicella arignonis* and *Monacha incarnata* must be included into the list of snails adequate as intermediate hosts of *Müllerius capillaris* and *Protostrongylus rufescens*.

## 7. AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestra sincera gratitud a cuantas personas nos han ayudado en la realización de este trabajo, pero muy especialmente:

Al Prof. Dr. MIGUEL CORDERO DEL CAMPILLO por habernos sugerido el estudio de este interesante tema y por habernos dado las directrices, tanto para la investigación como para la disposición, fundamentales para llevar a cabo esta tesis.

Hemos realizado los experimentos en el «Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten der Tiere der Justus Liebig Universität» en Giessen (Alemania Occidental), donde, en todo momento, tuvimos a nuestra disposición el material y los animales de experimentación del Instituto. Por ello y por la ayuda científica presentada damos las gracias, al Prof. Dr. h. c. R. WETZEL con quien, siendo Director del Instituto, iniciamos el trabajo, y a su sucesor y actual Director del mismo Instituto, Prof. Dr. G. LAMMLER, con quien hemos llevado a cabo y terminado la mayor parte de los trabajos de experimentación que constituye esta tesis.

## 8. BIBLIOGRAFIA

DAWTJAN, E. A. (1937).—K izuchoniu biologii legonochnogo gelmintu ovets i koz *Synthetocaulus kochi* SCHULZ, ORLOW et KUTASS, 1933 (Sobre el ciclo biológico de *Synthetocaulus kochi* SCHULZ, ORLOW y KUTASS, 1933, un verme pulmonar de la oveja y de la cabra). En ruso *Rab. po gelmint.* Skrbj. 105-122.

——— (1947).—Srawnitolnaja wospriimtschiwost molluskoW k inwasirowaniu litschinkami *M. capillaris*, *C. ocreatus* i *Synthetocaulus* spp. (La relativa receptividad de los caracoles a la invasión por larvas de *M. capillaris*, *C. ocreatus* y *Synthetocaulus* spp). En ruso. *Trud. Arm. Niwi.* 5, 3-20.

——— (1949).—Cikl raswitija nematod legkich ovjec i kos Armenil (El ciclo evolutivo de los nematodos pulmonares de la oveja y de la cabra en Armenia). En ruso. *Zool. Sbornik A. N. Arm. Niwi*, 6, 185-266.

HOBMAIER, A. y HOBMAIER, M. (1929).—Über die Enwicklung des Lungenwurmes *Synthetocaulus capillaris* in Nackt-, Weg- und Schnirkelschnecken. *Münsch. tierärztl. Wsch.*, 36, 497-500.

KASSAI, T. (1957).—Schnecken als Zwischenwirte der Protostrongyliden. *Zschr. Parasitenk.* 18, 5-19.

——— (1958).—Stadies on the morfology of the adult *Cystocaulus acreatus* and its preinfective larvae. *Acta vet. hung.* 8, 349-373.

KOTLAN, A. (1960).—Helmintologie. Budapest 1960.

MARTINEZ MORALES, E. (1964).—Zur Kenntnis der Epidemiologie der Protostrongylidae. *Inaug. Diss.*, Giessen.

MATJEKIN, P. B., TURLIGINA, E. S. y SALAJEWA, N. M. (1954).—K biologii lisonok protostrongilid owtis i koz v sviazi s epizotogijiej protostrongilidozy y v Srednej Azii (Aportación sobre la biología de las larvas de protostrongylidae de la oveja y de la cabra y sobre la epizootiología de las protostrongilidosis en Asia Central). En ruso, *Zool. Zurnal.*, 33, (2), 373-394.

ROSE, J. H. (1957).—Observations on the bionomics of the freliving first stage larvae of the sheep lungworm, *Müllerius capillaris* J. *Helminthl.*, 31, 17-28.

SUPPERER, R. (1956).—Beitrag zur Kenntnis der Widerstands kraft von Lungenwurmlarven des ersten Stadiums. *Zschr. Parasitk. Berlin*, 17, 289-299.

SVARC, R. y ZMORAY, I. (1960).—Beitrag zur Kenntnis des Enthüllungs prozesses der Larven von *Müllerius capillaris*. *Helmintología*, 2, 133-39.