

**BRONCONEUMONIAS VERMINOSAS OVINAS EN LEON,  
CON ESPECIAL ATENCION AL CICLO BIOLOGICO DE  
*Neostrongylus linearis* (MAROTEL, 1913) GEBAUER (1932)\***

Por Francisco Antonio Rojo Vázquez

INDICE

1. INTRODUCCION.—2. REVISION BIBLIOGRAFICA.—2.1. Morfología, hospedadores definitivos y distribución geográfica.—2.2. Ciclo biológico.—2.2.1. Larvas I y hospedadores intermedios.—2.2.2. Evolución en los moluscos.—2.3. Metódica de la infestación experimental en los moluscos.—2.4. Metódica de la infestación de los hospedadores definitivos.—INVESTIGACIONES PERSONALES.—3. MATERIALES Y METODOS.—3.1. Recogida de material de matadero.—3.2. Recogida de material de ovinos vivos.—3.3. Moluscos hospedadores intermedios.—3.3.1. Recogida de campo.—3.3.2. Selección de hospedadores intermedios y mantenimiento en moluscarios.—3.4. Infestaciones experimentales.—3.4.1. De caracoles.—3.4.2. De ovinos.—3.4.3. Estudio de vermes adultos.—4. RESULTADOS Y DISCUSION.—4.1. Frecuencia de la infestación por «estróngilos» pulmonares en la región.—4.2. Comportamiento de los moluscos infestados.—4.3. Evolución de *N. linearis* en los moluscos hospedadores intermedios.—4.4. Infestación experimental de ovinos.—5. CONCLUSIONES.—6. RESUMEN.—7. AGRADECIMIENTOS.—8. BIBLIOGRAFIA.—9. CUADROS E ILUSTRACIONES.

1. INTRODUCCION

Las atenciones dedicadas a la explotación de ovinos, han aumentado en los últimos años en España, no sólo por la rentabilidad de estos animales, sino también porque las características geográficas y la estructura agraria de algunas zonas de nuestro país, concretamente las dos submesetas y demás regiones áridas, hacen imprescindible, o al menos conveniente, la presencia de ovejas para el aprovechamiento de productos agrícolas que, de otra forma, se perderían. Tal es el caso de los pastos de montes, rastrojeras, baldíos, restos de cosechas de leguminosas, etc.

\* Para la realización del presente trabajo se han aplicado fondos procedentes del Plan para la Formación de Personal Investigador, del que ha sido becario el interesado durante los cursos 1969-70, 1970-71 y 1971-72.

Sobre los rebaños de ovinos actúan intensamente y con frecuencia poco deseable, determinadas enfermedades parasitarias, entre las que destacan las llamadas «bronconeumonías verminosas», cuya significación es considerable desde el punto de vista clínico y económico. Los perjuicios que pueden causar estos procesos, tienen una doble vertiente: por una parte, pueden dar lugar a muertes, sobre todo en los animales jóvenes, en los que la mortalidad es posible que oscile entre 3-15%; por otra, se producen pérdidas, mucho más importantes, por mermas en la producción (carne, leche, lana, etc.) y por decomisos en el matadero.

Por exigencias biológicas de los nemátodos responsables, estas parasitosis son frecuentes en los animales mantenidos en pastoreo. En la cría intensiva en régimen de estabulación, como está desarrollándose en ciertas zonas del país (Aragón, Cataluña, la Mancha, etc.) pueden desaparecer algunas de las nematodosis de ciclo biológico indirecto.

El establecimiento de las medidas profilácticas y de lucha para el control de estas parasitosis exige el conocimiento exacto de los ciclos de las especies responsables y, por lo tanto, de los hospedadores intermediarios, en su caso, cronología y demás detalles de las relaciones «nemátodo/molusco», los modos de infestación de los ovinos, etc.

A este respecto, existen todavía ciertas cuestiones sin aclarar, en cuanto a algunos agentes etiológicos que requieren hospedadores intermediarios, los ciclos biológicos en ellos, la dinámica estacional, etc. De un modo particular, cabe llamar la atención sobre la escasa información científica de que disponemos en nuestro país sobre los Protostrongylinos y, en especial, sobre *Neostrongylus linearis* (MAROTEL, 1913) GEBAUER, 1932. No obstante, algunos aspectos de estas parasitosis ovinas han sido investigados en el Departamento de Patología Infectiosa y Parasitaria de la Facultad de Veterinaria de León, en particular los problemas etiológicos y epizootiológicos de las protostrongilinosis (RAMÍREZ, 1967; MARTÍNEZ MORALES, 1967).

RAMÍREZ FERNÁNDEZ (1967) denunció por primera vez en la Península Ibérica la presencia de *N. linearis*, hallando un solo ejemplar macho, en una oveja procedente de los puertos de Murias de Paredes (León). En cambio, señala que encontró con frecuencia, larvas I en las deyecciones. En Portugal, SILVA LEITAO (1963) no recoge este verme en su mapa parasitario de la nación vecina. No existe, según nuestras referencias, ninguna publicación ibérica posterior a la citada de RAMÍREZ.

*N. linearis*, cuya morfología se conoce bien en su estado adulto y en la fase larvaria I, ha sido muy poco estudiado en todo el mundo. MÜLLER (1934) ha sido el único investigador que ha intentado determinar su evolución en diversos moluscos pulmonados terrestres. Sin embargo, en la infestación experimental de ovejas y conejos con presuntas larvas III, no logró resultados positivos, de forma que hay que poner en duda que fueran tales larvas de III estadio, o que fueran de *N. linearis*.

A la vista de esta situación, hemos emprendido la tarea de estudiar algunos hospedadores intermediarios del nemátodo, la evolución de los distintos estadios en

los mismos, la comprobación de la capacidad infestante de las larvas obtenidas y el período de prepatencia en la oveja.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. MORFOLOGÍA, HOSPEDADORES DEFINITIVOS Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Neostrongylus linearis* (MAROTEL, 1913) GEBAUER, 1932 (sinonimia: *Synthetocaulus linearis* MAROTEL, 1913; *Protostrongylus linearis* (MAROTEL, 1913) BAYLIS, 1929; *Neometastrongylus buechii* (KREIS, 1944) es parásito del parénquima pulmonar, bronquiolos y bronquios pequeños de las siguientes especies:

*Ovis aries* (oveja) (MAROTEL, 1913).

*Capra (Tursus) caucasica cylindricornis* (= *Capra servetzovi*) (cabra montés caucásica) (SRKJABIN et al. 1961).

*Capra aegagrus ibex ibex* L. (cabra montés alpina), (COUTURIER, 1962).

*Rupicapra rupicapra* (gamuza, rebecho o sarrio) (GEBAUER, 1932).

*R. r. caucasica* (rebecho del Cáucaso) (GEBAUER, 1932).

Nos limitaremos a reseñar brevemente las principales características morfológicas de los adultos de *N. linearis*, descritas por ROSE, MICHEL y HARRIS (1957), dado que pueden consultarse en cualquier manual, aparte de que no constituyen el motivo de este trabajo.

Los adultos son vermes de características similares a *Müllerius capillaris* (MÜLLER, 1889) CAMERON, 1927. Los machos miden 5,5—6,0 mm. de longitud  $\times$  0,022-0,028 mm. de anchura. Tienen una bolsa copuladora bien definida y dos largas espiráulas, delgadas y muy características, de desigual longitud (320-360, 160-170 micras). Tanto las cruras del gubernáculo, como el telámon aparecen fácilmente visibles. Las hembras son algo mayores: miden 13-16 mm. de longitud y 0,03-0,035 mm. de anchura. Se parecen mucho a las de *M. capillaris*, hasta el punto de que, en ausencia de machos, pueden confundirse fácilmente con ellas. No obstante, un examen cuidadoso del extremo posterior revela la presencia de una expansión cuticular alrededor de la vulva, que sirve para la identificación (ROSE, MICHEL y HARRIS, 1957).

En cuanto a su distribución geográfica, los diferentes trabajos publicados hasta el momento, la circunscriben al continente europeo (región paleártica), siendo principalmente los países del Centro de Europa los que destacan por el mayor número de datos aportados sobre la incidencia de *N. linearis* en los hospedadores definitivos.

En casi todas las ocasiones, la prevalencia de este nemátodo es muy baja, comparada con la del resto de los Protostrongylinae. Así NÜRNBERG (1961), encuentra un 2% de infestaciones por *N. linearis*. POHL (1960), halla una media de 18,2%, para los diversos mataderos alemanes, señalando su presencia en el sur de este país, mientras que KASSAI (1957a) en Hungría, obtiene un porcentaje de 10,0%. La cifra más baja la señala KERSTEN (1961), estudiando éste y otros pequeños nemátodos pulmonares encontrados en ovejas en Baviera. De 500 muestras fecales procedentes de 40 rebaños, halló larvas en 240, encontrando para *N. linearis* un 0,8%. Sin embargo, KOTRLY (1958), encuentra un 53% en *Rupicapra rupicapra* en Checoslovaquia. También FAVATI (1958), en Italia, demuestra que la incidencia en ese país es alta, superando incluso los datos aportados por KOTRLY (1958), pues obtiene la cifra de 66,4%.

SUMNALIEV (1966), sin citar porcentajes, encuentra los siguientes Protostrongylinos por orden de frecuencia:

*N. linearis*.

*M. capillaris*.

*C. ocreatus*.

*Protostrongylus* spp.

y señala que las infestaciones más frecuentes se producen por 1 ó 2 especies; más raras son las de 3 especies y excepcionales las de 4.

Aunque en algunos países no existen datos sobre la prevalencia del parásito, son bastantes las denuncias o citas realizadas que demuestran la presencia de *N. linearis* en distintos puntos geográficos de la tierra. Así, pues, *N. linearis* ha sido descrito en:

Alemania: (POHL, 1960; NÜRNBERG, 1961; KERSTEN, 1961).

Austria: (GEBAUER, 1931).

Bulgaria: (SUMNALIEV, 1966; DASKALOV *et al.*, 1961).

Checoslovaquia: (KOTRYL, 1958).

España: (RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 1967).

Francia: (MARTEL, 1913).

Hungría: (KASSAI, 1957a; KASSAI y HOLLO, 1957).

Inglaterra: (ROSE, MICHEL y HARRISS, 1957).

Italia: (FAVATI, 1958).

Países mediterráneos de Asia Menor: (GERICHTER, 1951).

Polonia: (ZIELINSKI, 1958).

Suiza: (COUTURIER, 1962).

URSS (Crimea y Caucasia): (SKRJABIN *et al.*, 1961; LEVINE, 1968).

Yugoslavia: (ROSE, 1961).

## 2.2. CICLO BIOLÓGICO

### 2.2.1. Larvas I y hospedadores intermedios

El desarrollo embrionario no se conoce adecuadamente, pero es posible que sea semejante al de otros *Protostrongylinae*. BABÓS (1961) afirma que las larvas I de *Protostrongylus tauricus* abandonan activamente los alvéolos debido a la lentitud y baja energía del aire que llega a los alvéolos. Permanecen tanto en los alvéolos como en los nódulos de cría durante unos días; probablemente el tiempo necesario para alcanzar el estado de madurez para resistir las condiciones ambientales.

Las larvas I de *N. linearis* pasan del árbol respiratorio al digestivo por deglución y salen al exterior con las deyecciones. Miden 0,3-0,35 mm. de longitud. Su esófago es filariforme y ocupa más de la mitad del cuerpo. El intestino es granuloso y el poro excretor está situado a unos 0,1 mm. del extremo anterior del cuerpo y termina debajo del anillo nervioso. El ano está a unos 0,02 mm. del extremo posterior. La punta de la cola es puntiaguda y en el borde dorsal lleva una pequeña espina. En el medio de la punta de la cola hay un pliegue cuticular que forma a modo de un anillo caudal que, en situación dorsal y ventral muestra pequeñas espinas (MÜLLER, *ibid.*). Según este mismo autor, las larvas I en los pulmones miden 0,27-0,28 mm. KASSAI y HOLLO (1958) señalan una longitud para las larvas I de 0,3-0,4 mm. y GEBAUER (1932), de 0,24 mm. En el medio ambiente, no prosiguen su desarrollo en libertad y parece que pueden vivir bastante tiempo, pues en heces húmedas, a la temperatura de laboratorio, han permanecido vivas más de 28 días (MÜLLER, *ibid.*). A partir de la salida de las larvas al exterior, la supervivencia de las mismas depende de las condiciones climatológicas y del encuentro con los hospedadores intermedios. El desarrollo ulterior se afirma que tiene lugar en moluscos gasterópodos terrestres.

La invasión de un hospedador intermedio adecuado está condicionada por las circunstancias ecológicas que permiten la existencia de moluscos y su supervivencia. También juega un importante papel la vitalidad de las larvas, hasta que puedan establecer contacto con aquellos. Por otra parte, la mucosidad segregada por los caracoles, ejerce un estímulo quimiotáctico positivo (RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 1967).

Las especies de moluscos más pequeñas responden mejor a la infestación que las de gran tamaño, y, dentro de aquéllas, se comportan más adecuadamente los caracoles jóvenes que los más desarrollados, siendo óptimos los que tienen 2-3-4 meses de edad.

La penetración percutánea de la larva I se realiza en 10-15 segundos y tiene lugar por los surcos del pie, viéndose favorecida por la mucosidad. La temperatura óptima para que esto ocurra oscila entre 15-30°C y la humedad relativa debe de ser del 70 %. Una vez penetradas las larvas, se localizan en los espacios intermedios de la trama reticular del tejido conjuntivo y de las fibrillas musculares, bajo las células glandulares subepiteliales y bajo el manto (BORCHERT, 1964).

Tanto en una parte como en otra del pie, se encuentran larvas, aunque algunos autores señalan una mayor incidencia en la anterior. Otros opinan que es en las partes posteriores donde con mayor frecuencia se localizan (JOYEUX y GAUD, 1946).

El contacto con los hospedadores intermedios se establece cuando éstos se acercan a las deyecciones en cuyo interior se encuentran sobreviviendo las larvas, pues se ha comprobado que no tienden a trepar por las hierbas, como hacen las larvas de otros nemátodos, sino que permanecen en las heces (ROSE, 1957b). KASSAI (1958) ha demostrado que, en condiciones desfavorables, las larvas de *Protostrongylinae* buscan el refugio en el interior de las cagarrutas y que ni aun cuando la humedad relativa es superior al 90 %, las abandonan. Sin embargo, MAPES y BAKER (1950) afirman que la lluvia favorece el desprendimiento de las larvas a partir de las deyecciones.

Según MÜLLER (*ibid.*), actúan como hospedadores intermedios en el ciclo biológico de *N. linearis*, las siguientes especies:

*Deroceras (Agricolimax) agreste* L., 1758.

*Arion subfuscus* DRAPARNAUD, 1805.

*Arion hortensis* DE FERUSSAC, 1819.

*Fructicicola striolata* C. PFEIFFER, 1829.

*Cepea nemoralis* L., 1758.

*Cepea hortensis* MÜLLER, 1774.

*Arianta arbustorum* L., 1758.

*Helix pomatia* L., 1758.

KASSAI (1957b), señala como hospedadores intermedios de *C. ocreatus*, *M. capillaris* y *Protostyngylus* spp., que son vermes afines, las siguientes:

*Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844.

*Abida frumentum* DRAPARNAUD, 1801.

*Theba carthusiana* MÜLLER, 1774.

*Cepea vindobonensis* C. PFEIFFER (sic).

*Zebrina detrita* MÜLLER, 1774.

*Helix pomatia* L., 1758.

En Bulgaria, SUMNALIEV (1966), cita como hospedador obligado para *N. linearis*, *Helicella obvia* (ZIEGLER) HARTMANN, 1844; y como hospedador subobligado, *Zebrina detrita* MÜLLER, 1774. Sin embargo, no aporta pruebas experimentales.

En España TARAZONA VILAS (1955) ha comprobado en la provincia de Huesca, como hospedadores intermedios de diversos *Protostrongylinae*,

*Helicella (Cernuella) variabilis* var. *suberis* BOURGUIGNAT, 1885.

*Candidula rugosuscula* MICHAUD, 1831.

*Helicella ericetorum* MÜLLER, 1774.

*Hygromia cinctella* DRAPARNAUD, 1801.

*Eobania vermiculata* MÜLLER, 1774.

*Euparypha pisana* MÜLLER, 1774.

y SIMÓN VICENTE (1961) en la provincia de Salamanca señaló.

*Monacha carthusiana* MÜLLER, 1774.

*Cochlicella ventricosa* DRAPARNAUD, 1801.

*Helicella (Xeromagna) arigonis* ROSSMÄSSLER, 1854.

*Helicella (Cernuella) variabilis* DRAPARNAUD, 1801.

Concretamente en León, RAMÍREZ FERNÁNDEZ (1967), ha empleado las siguientes especies trabajando con *Protostrongylus* spp. y *C. ocreatus*:

*Helicella ericetorum* MÜLLER, 1774.

*Helicella variabilis* DRAPARNAUD, 1801.

*Helicella arigonis* ROSSMÄSSLER, 1854.

*Helicella apicina* DE LAMARCK, 1822.

*Cochlicella acuta* MÜLLER, 1774.

*Cochlicella ventricosa* DRAPARNAUD, 1801.

*Chondrina avenacea* BRUGUIERE, 1792.

*Chondrina (Jaminea)* sp.

*Cepea nemoralis* L., 1758.

*Helix (Cryptomphalus) aspersa* MÜLLER, 1774.

*Theba carthusiana* MÜLLER, 1774.

*Vitrina* spp. DRAPARNAUD, 1801.

Aunque algunas de estas especies citadas últimamente como hospedadores intermedios de diversos *Protostrongylinae*, es posible que actúen también del mismo modo en el ciclo biológico de *N. linearis*, únicamente está demostrada la intervención de los moluscos citados por MÜLLER (*ibid.*), con las limitaciones ya mencionadas.

## 2.2.2. Evolución en los moluscos

Según MÜLLER (*ibid.*), las larvas I penetradas en el hospedador intermedio, en los primeros días se modifican poco. Posteriormente, van aumentando en longitud y grosor.

La primera muda tiene lugar entre el 6.<sup>o</sup> y 8.<sup>o</sup> día post-infestación. Después de ésta, las larvas conservan la cutícula anterior muy pegada al cuerpo, mientras que en los extremos céfálico y caudal forma a modo de un capuchón. El extremo posterior también muestra en este estadio evolutivo las espinas caudales, aunque algo más reducidas de tamaño.

La larva prosigue su crecimiento y su intestino se hace más neto; entre la primera cutícula larvaria y la larva, reaparece un capuchón céfálico y pronto también se observa otro caudal. Estas transformaciones coinciden con la segunda muda, que tiene lugar entre los días 10.<sup>o</sup> y 14.<sup>o</sup> post-infestación.

Opina MÜLLER (*ibid.*), que en la naturaleza este período será más largo, ya que no es probable que los moluscos se encuentren a una temperatura regular de 20°C.

Después de realizada la segunda muda, aparece la larva III, es decir, la fase infestante. Las larvas III, medidas sin sus protecciones cuticulares, alcanzan un tamaño de 0,5-0,55 mm. aproximadamente. El esófago tiene una longitud aproximada de 0,2 mm. y el anillo nervioso se encuentra situado a nivel del poro excretor. A 0,035 mm. aproximadamente del extremo posterior, se encuentra el ano. La larva III, recubierta por las dos cutículas anteriores muestra claramente tanto el poro excretor como el orificio anal. No obstante, las cutículas se rompen fácilmente al manipular los caracoles, de tal manera que es muy difícil lograr una larva con sus vainas completas.

Las larvas III ingeridas junto con el molusco por el hospedador definitivo, son liberadas por la acción de los jugos digestivos y realizan una serie de emigraciones hasta su localización definitiva en el pulmón. No se conocen las vías de migración seguidas.

MÜLLER (*ibid.*) realizó una infestación experimental en conejos y ovejas, empleando caracoles portadores de 100 larvas III aproximadamente cada uno. Los resultados que obtuvo fueron negativos. He aquí sus palabras:

«Das gefütterte Schaf zeigt ebenfalls keine Krankheitserscheinungen. Im Kote, der regelmäßig untersucht wurde, konnten trotz Anreicherung keine Larven von *Neostongylus linearis* nachgewiesen werden.

Den Entwicklungskreislauf von *Neostongylus linearis* konnte ich nicht bis zu Ende führen, da mir die geeigneten Versuchstiere (Gemse) fehlten und die Fütterungsversuche an Kaninchen und Schaf missglückten.

MÜLLER (1934) fracasó, pues, en la infestación experimental del conejo y de la oveja. Habiendo partido de vermes procedentes del rebeco, consideró que su fallo se debía a no haber dispuesto de los hospedadores adecuados. Hoy, sin embargo, sabemos que la oveja sí lo es, y, por lo tanto, o bien atribuimos el fracaso al método de infestación de este animal, o bien tenemos que estimar que sus pretendidas larvas III no lo eran (acaso larvas II) o ni siquiera eran de *Neostongylus linearis*.

En cambio, se ha demostrado que era correcta su conclusión de que las larvas de *N. linearis* demandan un molusco hospedador intermedio y que no prosiguen su desarrollo en libertad.

## 2.3. METÓDICA DE LA INFESTACIÓN EXPERIMENTAL EN LOS MOLUSCOS

MÜLLER (1934), obtuvo buenos resultados manteniendo los caracoles a la temperatura de laboratorio sobre deyecciones humedecidas; la alimentación se llevó a cabo sin dificultades y consiguió resultados positivos. Sin embargo, KASSAI (1957b), procede de la siguiente manera:

Extracción de las larvas por el método de BAERMANN-WETZEL.

Concentración del líquido obtenido.

Extensión de las larvas extraídas, con un poco de agua, sobre el fondo de una placa de Petri.

## Colocación del molusco sobre las larvas.

La prueba debe realizarse a temperatura ambiente comprendida entre 20 y 25°C.

No poner gran cantidad de líquido en la placa, sino el suficiente para que esté húmeda. El autor señala como período de permanencia de los caracoles en las placas, de 1,5 a 20 horas, al cabo de las cuales la invasión es completa.

BABÓS (1961) emplea el método de BRACHILAEMES, que consiste en colocar el material infestante sobre el caracol en posición invertida y mantenerlo de esta forma hasta la penetración total de las larvas.

Para realizar el estudio de las formas larvarias presentes en los hospedadores intermedios, el sacrificio de los mismos puede hacerse de distintas formas. En primer lugar, puede realizarse la anestesia de los caracoles, siguiendo dos métodos, según los fines propuestos. El primero de ellos, consiste en introducir los caracoles en un recipiente con agua a 70°C durante un minuto, al cabo del cual se rompe la cáscara y se extrae el pie, cara y tentáculos.

La segunda forma de anestesia, es la descrita por JOOSE y LEVER (1959) (citado por SAINT-GUILLART, 1968). Esta consiste en someter a los moluscos previamente a una solución de Nembutal (pentobarbital sódico) al 0,08 % durante una hora. A continuación, se tienen, también una hora en una solución de Nembutal al 0,08 % y MS-222 al 0,3 %. El autor señala excelentes resultados siguiendo este método.

Para conseguir el estiramiento completo del pie, cara, etc., WRIGHT (1957), señala varias formas:

- Inmersión del caracol en agua a 40°C hasta que muera.
- Inmersión en agua hervida y enfriada sin que haya aire en el recipiente.

Este autor señala que también puede utilizarse la narcosis del caracol, mediante adición del reactivo apropiado. Se introduce el caracol en un recipiente con agua y cristales de mentol o con solución de mentol.

Según WRIGHT (1957), los moluscos interesantes desde el punto de vista «médico», requieren 10-12 horas para la narcosis completa. A continuación se introducen en alcohol de 70 o en alcohol formalina (4 partes de alcohol al 80 % y una parte de formalina: solución de formaldehido al 40 %), más una parte de agua. Cualquiera que sea el método de fijación empleado, con o sin narcosis, el volumen del fijador debe ser, por lo menos, 3 veces el volumen del molusco a fijar.

La disección de los moluscos depende, según KASSAI (1957b), del tamaño de los mismos. En los caracoles grandes, se rompe la cáscara con los dedos o con pinzas, dejando al descubierto el cuerpo, que se coloca en un portaobjetos o en una placa de Petri. Se deslacerá lo más posible en todas las direcciones, dejándolo extendido sobre el vidrio y observándolo al estereomicroscopio. Si se quiere, se añaden unas gotas de S. F. o agua corriente y se cubre con otro portaobjetos.

Las especies pequeñas, se colocan entre dos portaobjetos y por compresión se rompe su cáscara fina, observando después, también al estereomicroscopio.

## 2.4. METÓDICA DE LA INFESTACIÓN DE LOS HOSPEDADORES DEFINITIVOS

KOPYRIN *et al.* (1966), utilizando caracoles infestados con larvas de *M. capillaris*, los administran con la comida. También en infestaciones de mamíferos, con larvas de *Crenosoma striatum*, LÄMMLER y SAUPE (1968) señalan tres formas diferentes:

- Larvas separadas por digestión.
- Administración del pie deslacerado.
- Por la fuerza: en suspensión (larvas digeridas) en cápsulas de gelatina.

Por su parte, ROSE (1958), infesta también ovinos administrando babosas a la fuerza.

## INVESTIGACIONES PERSONALES

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. RECOGIDA DE MATERIAL DE MATADERO

Se estudiaron los pulmones de 137 ovejas sacrificadas en el matadero municipal de León, entre los meses de julio de 1970 y diciembre de 1972, ambos inclusive. Los datos relativos a edad, raza, sexo, régimen de explotación y procedencia de los animales se anotaron individualmente en fichas como las utilizadas por RAMÍREZ (1967), habituales en el Departamento. Las zonas de procedencia de las ovejas no siempre pudieron precisarse, por lo que, en ocasiones, solamente conocimos la comarca (p.e., Los Oteros, Tierra de Campos, etc.).

A partir de los nódulos larvarios, convenientemente troceados, se obtuvieron larvas I, mediante el método de BAERMANN-WETZEL. La identificación de las larvas, para seleccionar las de *N. linearis*, se realizó al microscopio, estudiando las características de la cola.

#### 3.2. RECOGIDA DE MATERIAL DE OVINOS VIVOS

Gracias a las fichas de matadero, fue posible localizar varias zonas donde abundaban los animales parasitados. Independientemente, se realizaron análisis coprológicos de diversos rebaños, en pleno pastoreo, y se solicitaron también muestras fecales a colegas de diversas provincias.

Las muestras tomadas de rebaños de los que desconocíamos antecedentes eran de 20 gr aproximadamente, de una mezcla de diversos animales. Cuando se identificó la presencia de *N. linearis*, se procedió a la recogida de muestras individuales (10-15 gr), a fin de buscar una infestación abundante y, a ser posible, pura. En total se hicieron 132 análisis.

En resumen, las localidades de procedencia de los animales y las pruebas realizadas en ellos, se recogen en el cuadro I.

Entre todos los rebaños analizados, solamente en uno, de Villacete (León), localizamos un animal con infestación por *N. linearis*, como única nematodosis pulmonar. Era una oveja de raza churra, de 2 años de edad y 40 kg de peso, que también eliminaba muy escasos oocistos de *Eimeria* spp., huevos de *Strongyloides papillosus* y de *Trichostrongylidae*. A fin de confirmar la ausencia de otros parásitos por nemátodos broncopulmonares, la sometimos a observación, practicando cinco análisis coprológicos (Baermann-Wetzel) consecutivos, con resultados negativos los días 6, 13, 26, 30 de marzo y 1 de abril de 1971. En vista de ello adquirimos el animal, para evitar que se infestara con otros *Protostyngylinae* en sus salidas al campo.

El animal donante de larvas I se alojó en la Facultad de Veterinaria en completo aislamiento, alternativamente en un box, o en una jaula metabólica. Pero

siempre estuvo aislado, sin posibilidades de sufrir contagios, observándose desde el día de su compra (abril de 1971) hasta el final de las experiencias (diciembre de 1972) las más escrupulosas precauciones higiénicas.

Como alimento se empleó heno de alfalfa a lo largo de todo el experimento, excepto los seis últimos meses, en que se complementó con un pienso concentrado comercial (fabricado por UVESA), a base de maíz amarillo, cebada, avena, subproductos de molinería, alfalfa deshidratada, harinas de linaza, soja, cacahuet y huesos, más carbonato de cal y corrector vitamínico-mineral. La fórmula del preparado era la siguiente:

Humedad .....	9,6 %
Proteína bruta .....	16,0 %
Grasa bruta .....	2,5 %
Fibra bruta .....	12,6 %
T. D. N. .....	62 %
T. D. N./Proteína .....	4 %
Calcio .....	1,1 %
Fósforo .....	0,9 %
Fósforo asimilable .....	0,5 %
Cloruro sódico .....	0,5 %

A partes iguales con este pienso, se mezclaba cebada en grano.

A fin de evitar posibles deficiencias, a los 7 meses de adquirido el animal se le administró una ampolla de 4 c.c. de VETERINVIT A + D<sub>3</sub> (Vitamina A, 250.000 U. I., Vitamina D<sub>3</sub>, 500.000 U. I.).

Las heces se recogieron diariamente del recto (cuando se alojó en un box), o bien del fondo de la jaula metabólica, convenientemente separadas de la orina.

Se colocaban en el dispositivo de BAERMANN-WETZEL hacia las 6,00-8,00 p.m. y a la mañana siguiente (9,00-10,00 a.m.) se realizaba la colecta de larvas I: 10 ml del líquido del fondo se centrifugaban durante 3-5 minutos a 1.500 r.p.m., decantando y lavando con agua de la traída (15-18°C) tres veces. Finalmente, se eliminaba el líquido sobrenadante y se restituía agua hasta un volumen de 5 ml. Previa homogeneización, se procedía al análisis cuantitativo y cualitativo.

Para el recuento de larvas empleamos la cámara McMASTER. Para la determinación cualitativa inmovilizamos las larvas mezclando una gota del material problema con otra de lugol (I, 1 g; IK, 2 g; agua destilada, 300 ml), o bien calentando el portaobjetos hasta matar las larvas y facilitar el estudio de la extremidad caudal, previa colocación de un portaobjetos.

#### 3.3. MOLUSCOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

##### 3.3.1. Recogida de campo

Teniendo en cuenta que los hospedadores intermedios de los *Protostyngylinae* son moluscos gasterópodos terrestres, se recogieron inicialmente caracoles de

estas características, con objeto de comprobar su posible intervención en el ciclo biológico de *N. linearis*.

Los caracoles se recogían a primeras horas de la mañana entre las 9 y 11 a.m., aunque en ocasiones, debido a la distancia entre los lugares de recogida y el laboratorio, la hora no era tan propicia.

Los moluscos se pusieron en frascos de plástico, realizando inicialmente una selección previa para separar las posibles especies distintas. Los recipientes se rotularon con la fecha, lugar de procedencia y otros datos complementarios de posible utilidad en la identificación (características de emplazamiento, etc.). La toma de muestras se realizó en las localidades que a continuación se señalan:

#### LEON

Crémenes.

León ciudad: Carretera de Circunvalación. Jardín de Antibióticos, S. A. Jardín de la Facultad de Veterinaria. Trobajo del Cerecedo (TILSA). Puente Villarente. Santas Martas. Vega de Infanzones. Villanueva del Arbol. Villaturiel.

#### OVIEDO

Rodiles, Playa de.

#### SANTANDER

Reinosa.

#### VALLADOLID

Medina de Rioseco.

Las especies recogidas fueron las siguientes:

*Helicella (Cernuella) variabilis*

*Helicella (Xerocincta) neglecta*

*Helicella apicina*

*Cepaea nemoralis*

*Helix (Cryptomphalus) aspersa*

*Euparypha pisana*

*Cochlicella* sp.

*Zebrina detrita*

#### 3.3.2. Selección de hospedadores intermediarios y mantenimiento en moluscarios

Para asegurar la supervivencia de los caracoles en el laboratorio en las mejores condiciones, se tomaron porciones de césped con tierra adaptados a las medidas de los cajones de madera en los cuales se implantaría el moluscario. Los ca-

jones medían 50 × 30 × 25 cm aproximadamente, cerrados en su parte superior por mallas de hierro galvanizado o plástico, con el fin de evitar la huida de los caracoles. Como alimento, aparte de la propia hierba del césped, se les suministró lechuga fresca, que se troceaba en el momento de administrarla. La cantidad de alimento dependía, naturalmente, del número de moluscos que en ese momento se encontraban en el moluscario. Para evitar la putrefacción de los restos de comida no ingeridos por los caracoles, dos veces por semana se realizaba una limpieza completa, se añadía una pequeña cantidad del agua para mantener la humedad de la tierra y, asimismo, se procedía al recuento de los caracoles, anotando las bajas. Además, al principio se ensayó un tipo de alimentación basado en el método de STANDEN, aunque rápidamente se abandonó por ser poco práctico y poco aceptado por los moluscos.

Con el fin de comprobar que se encontraban libres de larvas de nemátodos, a pesar de hacer la recogida en lugares donde las posibilidades de infestación eran mínimas, sacrificamos y examinamos muestras de cada partida de moluscos.

Alojados de esta forma y a temperaturas normales de laboratorio que oscilaban entre 18 y 22°C, los moluscos vivieron perfectamente y se reprodujeron con facilidad, especialmente las *Helicella* spp.

#### 3.4. INFESTACIONES EXPERIMENTALES

##### 3.4.1. De caracoles

Las larvas I pueden obtenerse a partir de las deyecciones, o bien de trozos de pulmón parasitado; en uno y otro caso, siguiendo la técnica de BAERMANN-WETZEL. Según NÜRNBERG (1961), no se obtienen buenos resultados con las larvas directamente tomadas del pulmón. BABÓS (1961) señala también que con larvas I obtenidas de material fecal se logra un 28 % más de larvas III, que cuando se emplean larvas de origen pulmonar. Parece ser que las larvas fecales están plenamente desarrolladas, mientras que parte de las alojadas en el pulmón todavía no han completado el desarrollo embrionario. De ahí que las larvas I recientemente eclosionadas en los alvéolos pulmonares no estén en condiciones de invadir los moluscos hospedadores intermediarios, sino al cabo de haber pasado un período en los pulmones.

Comenzamos realizando infestaciones de tanteo: una con larvas I extraídas de los pulmones, siguiendo el método de KASSAI (1957b); otra con el mismo método y larvas procedentes de las heces; una tercera con idéntico material fecal, pero inyectando las larvas directamente en el pie, mediante jeringuilla y aguja; y, por último, una cuarta siguiendo la técnica de MÜLLER (1934). A la vista de los resultados conseguidos, se optó por emplear siempre larvas I aisladas de las heces y realizar la infestación por el método de KASSAI (1957b).

En la generalidad de los experimentos, las larvas I se obtenían el mismo día de la infestación de los moluscos, salvo que no se dispusiera de suficiente número de

ellas, en cuyo caso se reunían todas las recogidas en cuatro días. La conservación en este período se hacía en placas de Petri u otros recipientes similares, en agua de la traída, a 4-5°C en frigorífico. Nunca se emplearon larvas de más de 4 días de edad (desde la eliminación fecal). La dosis infestante por caracol osciló entre 34 y 1.300 larvas I, dado que, según GERICHTER (1948), las infestaciones con elevado número de larvas no dañan al caracol y que los moluscos infestados y los testigos tienen la misma tasa de mortalidad. ROSE (1957) también ha observado que las larvas de *M. capillaris* pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el caracol sin producirle daños, lo que también corroboró PAVLOV (1937), al hallar moluscos parasitados por *M. capillaris* en pastos búlgaros que no habían recibido la visita de las ovejas desde hacía dos años. Idéntico parecer expresan JOYEUX y GAUD (1946) para otros vermes pulmonares.

El número de caracoles infestados por cada lote osciló entre 5 y 238. Naturalmente, se dispusieron lotes de caracoles testigos, en número similar o superior al de los experimentales. Los caracoles de cada lote se marcaron individualmente, con rotuladores de diversos colores y con variados signos, lo que permitió obtener muchos datos a escala individual.

La edad de los moluscos se anotó en los criados en el laboratorio, mientras que en los recogidos en el campo se calculó teniendo en cuenta como indicador el tamaño de los mismos, comparado con el de los obtenidos en nuestro moluscario. El crecimiento de los caracoles tiene lugar en fases, cada una de ellas caracterizada por una tasa constante o crecimiento regular en progresión geométrica, en función del tiempo. GRASSÉ (1968) ha estudiado el proceso en *Helix pomatia*.

Así, pues, los moluscos pequeños (*Helicella* spp.) que presentaban un tamaño comprendido entre 4-5-6-7 mm Ø, se consideraban de 3-4 meses. Los de más edad (entre 6 meses y 1 año), alcanzaban tamaños de 10-15 mm Ø o más. Aunque las grandes especies sólo se utilizaron en cantidades importantes en pocas infestaciones, conviene señalar que se trataba de ejemplares de 5-7 meses, con tamaños de 2-3 cm.

El número de larvas que habían penetrado en el pie del caracol se obtuvo por diferencia entre las puestas en la placa y las recuperadas posteriormente en el líquido de las mismas. Para este tipo de recuentos, hemos preparado un dispositivo sencillo. En una placa de plexiglás de 75 × 75 × 5 mm, se grabó en el centro un cuadrado de 24 mm de lado, dividido en 36 cuadraditos. Sobre esta placa se pegó otra de las mismas dimensiones, en la que previamente se había vaciado en el centro un cuadrado de 24 mm de lado, coincidiendo exactamente sobre el grabado en la placa inferior. De este modo, dispusimos de una celdilla de 24 × 24 × 5 mm, con fondo de cuadrícula, que permitía fácilmente los recuentos (FAVATI, com. personal).

Los datos relativos a cada infestación, (núm. y especie de moluscos, dosis infestante, método de infestación, número y porcentaje de larvas penetradas y período de sacrificio) aparecen en los cuadros II al X.

Para detectar la presencia de larvas dentro de los moluscos, se procedió al sacrificio de los mismos. De todos los métodos para el sacrificio, reseñados en el capítulo de REVISIÓN BIBLIOGRAFICA, hemos empleado los siguientes:

Comenzamos sacrificando algunos moluscos por la técnica descrita por JOOSE y LEVER (*ibid.*), con anestesia de los moluscos con Nembutal y MS-222. Sin embargo, en posteriores sacrificios, debido a los buenos resultados obtenidos sumergiendo el caracol en agua hervida o destilada durante 10-12 horas aproximadamente, proseguimos este método que, a la vez de ser más barato es menos complicado.

Una vez sacrificados los moluscos, seleccionábamos el pie (incluyendo la cara y los tentáculos) y los examinábamos en placas compresoras de las utilizadas en triquineloscopía; o bien, después de cortar el pie con tijeras y en trocitos pequeños, se realizaba la digestión artificial en el siguiente medio:

Pepsina seca 1 : 100 .....	0,5 g
CIH (concentrado) .....	0,7 ml
Agua destilada .....	100 ml

El pie troceado se colocaba en un vaso de precipitados que contenía la solución digestiva artificial. A continuación se disponía de una bomba de aire para agitar el líquido durante el tiempo de digestión. Finalmente, se colocaba todo en la estufa a 37°C durante una hora. No obstante, a la media hora de iniciada la digestión, se observaba el contenido para ver el estado de la misma. En caso satisfactorio, se filtraba el líquido para eliminar las partículas groseras, se lavaba por centrifugación y se concentraba a 1 ml o menos. Los trozos retenidos en la filtración se observaban entre placas compresoras o entre dos portaobjetos. La digestión se interrumpía añadiendo a los 100 ml de sol. digestiva, 3 ml de formalina al 10 %. Con este procedimiento, a veces se obtenían larvas atacadas por el jugo, en pequeña cantidad siempre. En la mayoría de las ocasiones, estaban inactivas o muertas.

Por esta razón, procedimos a ensayar un sistema de digestión-dislaceración rápida, con el que obtuvimos excelentes resultados: las larvas aparecían totalmente activas. La técnica se realizó de la siguiente forma:

1. Homogeneización del troceado de pie del caracol en sol. digestiva y en turmix, durante 30-60 segundos.
2. Filtrado a través de colador de cocina.
3. Concentración y lavado en agua de traída por centrifugación.

Cuando todavía aparecían trozos de pie del caracol, se examinaron entre placas para ver si en su interior había alguna larva. En los casos positivos, al número de larvas obtenido por digestión, o digestión-dislaceración, se sumaron las larvas presentes en los trozos no digeridos. Paralelamente se comprobó el estado de desarrollo larvario.

### 3.4.2. De ovinos.

Para comprobar el poder infestante de las larvas III obtenidas en los caracoles experimentalmente infestados y confirmar que correspondían a *N. linearis*, se adquirieron 10 corderos, cuyas características se recogen en el cuadro XI.

Desde el día de su compra (19-julio-1972) hasta el momento de la infestación experimental (9-agosto-1972), se mantuvieron aislados y sometidos a control coprológico (10 análisis con técnicas de flotación, sedimentación y BAERMANN-WETZEL), para excluir la existencia de infestación por *Protostrongylinae*. Efectivamente, todos los animales estaban exentos de estos parásitos. En cambio, eliminaban algunos huevos de *Trichostrongylidae* (< 100 h/g), *Strongyloides* sp. (< 100 h/g) y *Trichuris* sp. (solamente los corderos 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, < 20 h/g). También se hallaron ooquistes de *Eimeria* spp. (< 140 ooquistes/g), por lo que se trataron los animales con solución de sulfametazina sódica al 20 % por vía oral, a la dosis de 1 g/10 kg de peso, durante tres días consecutivos, comprobando efectos favorables.

Los animales se dividieron en dos lotes de 5, uno para ser infestado y otro para mantenerlo como testigo. Los animales a infestar se alojaron en jaulas metabólicas, a fin de garantizar un control individual de sus deyecciones totales. Los cinco testigos se mantuvieron en reclusión en una plaza común, tomándose del recto las deyecciones, para comprobar su estado.

La alimentación fue idéntica a la suministrada a la oveja donante de larvas I de *N. linearis*, (véase 3.2.).

Los caracoles que proporcionaron las larvas III eran 99 *Helicella (Xerocincta) neglecta*, de la 8.<sup>a</sup> infestación (cuadro IX), a los 82 días de realizada ésta. Este plazo se consideró conveniente, dado que GERICHTER (1948) señaló que los caracoles infestados 12-17 meses antes retienen su grado de infestación y HALMILTON, (1969) también ha probado que las larvas de *Aelurostrongylus abstrusus* obtenidas de caracoles infestados de 3 a 24 meses antes son activas y que incluso las recuperadas al cabo de 1-2 años siguen siendo capaces de infestar al gato. En nuestra experiencia, como más adelante veremos, se comprobó que este plazo no es inconveniente.

Para calcular la dosis infestante se eligieron seis caracoles al azar, determinándose el promedio de larvas III por unidad, que arrojó la cifra de 35.

Los cinco corderos experimentales recibieron el siguiente número de larvas III.

Cordero n. <sup>o</sup>	N.º de caracoles	Total de larvas III
1	20	700
2	20	700
4	20	700
5	19	665
10	20	700

Pensando realizar la infestación de la forma más parecida a como ocurre en la naturaleza (MARTÍNEZ MORALES, 1964, 1967) y considerando los métodos seguidos por ROSE (1958), KOPYRIN y col. (1966) y LÄMMELER y SAUPE (1968), procedimos del modo siguiente:

Los 20 caracoles (19 para el cordero número 5) se colocaban en un vaso de precipitados de 250 ml y se machacaban y trituraban hasta reducirlos a una papailla homogénea. A continuación añadímos una pequeña cantidad de harina de alfalfa, para formar un bolo, que administrábamos individualmente a *fortiori*. A continuación se les daba otro bolo semejante, de harina de alfalfa, sin larvas, para arrastrar hacia la panza los restos que hubieran podido quedar en el tracto bucofaríngeo.

Inmediatamente después de la operación, cada cordero pasó a una jaula metabólica.

A partir de este momento, se realizaron análisis individuales de heces encaminados a determinar el posible tránsito de larvas que no hubieran proseguido su evolución intraorgánica. Las investigaciones se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, sobre el total de la eliminación fecal de cada cordero, con arreglo al siguiente método:

1. Homogeneización fecal con turmix (en agua de la traída).
2. Filtraciones sucesivas a través de:
  - 1.<sup>a</sup> malla de 3 mm de luz.
  - 2.<sup>a</sup> malla de 1 mm de luz.
  - 3.<sup>a</sup> malla de 300 micras de luz.
  - 4.<sup>a</sup> malla de 150 micras de luz.
  - 5.<sup>a</sup> malla de 60 micras de luz.
3. Recogida del sedimento y paso a copas de vidrio, para sedimentación. Posteriormente, 3 lavados, con eliminación del sobrenadante.
4. Adición de sulfato de cinc al 32 %, para flotación de las larvas III presentes.
5. Recogida del sobrenadante, centrifugación a 2.500 r.p.m. durante cinco minutos.
6. Observación del sedimento al microscopio.

A partir de la primera semana post-infestación se realizaron análisis reuniendo las heces de dos días. Se siguió el método BAERMANN-WETZEL, de migración larvaria.

Desde el día 25 se inició el estudio diario, para determinar el momento de aparición de las larvas I de *N. linearis* y, por tanto, comprobación del período de prepatencia. A las 6,00-7,00 p.m. se recogía toda la eliminación fecal, en el fondo de la jaula metabólica y se practicaba el método BAERMANN-WETZEL, tomando la muestra para investigación microscópica a las 9,00-10,00 horas del día siguiente.

Paralelamente, se investigó el lote testigo, para confirmar la ausencia de infestación espontánea por *Protostrongylinae*.

### 3.4.3. Estudio de vermes adultos.

Una vez comprobado el éxito de la infestación experimental, se decidió el sacrificio del cordero núm. 1 a los 103 días post-infestación, a fin de recoger adultos de *N. linearis* y comprobar las lesiones macroscópicas del pulmón. Se realizó la necropsia siguiendo la metódica de DOBBERSTEIN (1957).

La búsqueda de parásitos pulmonares se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de EUZEBY (1958). Se extrajeron las zonas macroscópicamente afectadas y se fueron abriendo los bronquios más finos. El trabajo se realizó bajo esteró-microscopio ZEISS II, con ayuda de agujas de disección. Cada ejemplar adulto extraído se depositaba en un pocillo de histología con solución salina fisiológica a 37°C. En microscopio invertido LEITZ se examinaba el material y se separaban machos y hembras, para realizar el montaje definitivo.

Los vermes se montaron en lactofenol-azul de algodón y/o en lactofenol-azul de anilina, con lo cual se podían estudiar las estructuras características específicas. Cuando los bordes del cubreobjeto estaban secos se procedían a lacarlos, para obtener preparaciones permanentes.

Dado que las características morfológicas de machos y hembras de *N. linearis* son peculiares, la identificación resultó fácil.

Las fotomicrografías se toman con microscopio LEITZ-ORTHOLUX, y cámara automática ORTHOMAT, sobre película Panatomic-X Kodak.

Las mediciones y dibujos se llevaron a cabo mediante una integración de los datos obtenidos en cámara clara, fotomicrografía y fotomicroproyección.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. FRECUENCIA DE LA INFESTACIÓN POR «ESTRÓNGILOS» PULMONARES EN LA REGIÓN

Las investigaciones llevadas a cabo sobre los pulmones de 137 ovejas parasitadas, dieron los resultados que aparecen en el cuadro XII, en el cual, al hacer referencia a la asociación de dos o más especies, se ha establecido un orden de mayor a menor abundancia de helmintos, aunque sin cuantificar exactamente la proporción.

Respecto a los 132 análisis coprológicos, resultaron positivos para larvas de estos nemátodos el 72,0 % de ellos. La distribución de las infestaciones puras, dobles, triples y cuádruples, se indica en el cuadro XIII.

En principio, hemos de manifestar que la fiabilidad de los datos de matadero es superior a la que merecen los análisis fecales, puesto que en el primer caso la cuidadosa disección del árbol bronquial y parénquima pulmonar permite descubrir los vermes adultos, las larvas y aun los huevos recién puestos, mientras que en la coprología solamente son accesibles las larvas, y el análisis recoge únicamente sobre

una fracción de heces, colectada en un preciso momento del día. Por otro lado, con estas limitaciones, debe de entenderse también que la infestación señalada como pura o mixta se refiere en concreto al resultado del análisis realizado en una ocasión y no prejuzga que fuera igual en otras fechas. En otro sentido, para calcular la frecuencia de unas y otras infestaciones, también resulta superior la encuesta de matadero, ya que, según se indica en el apartado 3.2, una vez localizado un foco de infestación por *N. linearis*, se repitieron análisis a fin de elegir animales que pudieran proporcionar infestaciones puras.

Con estas salvedades, es evidente que en la región predominan los parasitismos por Protostrongylinae, sobre las infestaciones por *Dictyocaulus filaria*, confirmado la afirmación de RAMÍREZ (1967), pero mayor diferencia aún que la observada por él. Estos resultados están relacionados con el ciclo biológico de los nemátodos y los sistemas de explotación de la oveja en la zona. La especie ovina en la cuenca del Duero se mantiene en condiciones de pastoreo marginal, utilizando zonas áridas y, por ello mismo, grandes extensiones de terreno. En tales condiciones, el parasitismo por *D. filaria* no es muy probable y sí, en cambio, lo es la invasión por diversos Protostrongylinae, cuyos hospedadores intermedios abundan en colinas, montes y linderos de las tierras de secano, en áreas de escasa pluviosidad en la época de verano-otoño, aunque en la zona montañosa, la media anual sea elevada (la mayor proporción en forma de nieve).

El orden de frecuencia expresado en porcentajes acumulativos (infestaciones puras y mixtas) se ofrece en el cuadro XIV.

Destaca claramente *M. capillaris*, tanto en las infestaciones puras como en las mixtas. La situación de *C. ocreatus* difiere según los datos de matadero y los coprológicos. La interpretación es sencilla si se recuerda que las larvas de esta especie pueden permanecer en fase de letargo o reposo en el tejido pulmonar durante largos períodos. De este modo, la investigación necrópsica permite demostrarlas, mientras que pueden estar ausentes de las deyecciones. En cuanto a *N. linearis* la frecuencia del hallazgo, dentro de las zonas estudiadas, es muy superior a cuanto cabría esperar de la ausencia de publicaciones nacionales sobre este nemátilo. Por la experiencia que hemos recogido en zonas de la cuenca del Duero, podemos estimar que no pocas veces se identifican inadecuadamente sus larvas, confundiéndolas con las otras especies más afines de Protostrongylinae (*Cystocaulus ocreatus* y *Müllerius capillaris*). Esto por lo que respecta al análisis fecal. En cuanto al estudio en los pulmones, la situación profunda en el parénquima o en los bronquiolos de menor calibre, hace que pase desapercibida la presencia de los propios vermes adultos.

Comparando estos datos con otros relativos a países europeos, apreciamos una concordancia bastante estrecha con las observaciones del centro y sur de Alemania, sobre todo en las zonas montañosas, en las que *M. capillaris* y *C. ocreatus* son las predominantes, junto con *Protostrongylus* spp. (KERSTEN, 1961; NÜRNBERG, 1961). Incluso en el occidente germano la situación es parecida (POHL, 1960).

Respecto a *N. linearis*, el porcentaje de positividades en material de matadero ocupa una posición intermedia entre el primer puesto señalado por SUMNALIEV (1966) para Bulgaria y las altas cifras que halla FAVATI (1958) en Italia (66,4 %) de un lado y las escasas de KERSTEN (1961) que señala el 0,8 %. El 18,2 % apreciado por POHL (1960) como media para todos los mataderos alemanes es relativamente así al resultado de nuestras observaciones.

#### 4.2. COMPORTAMIENTO DE LOS MOLUSCOS INFESTADOS

El período de máxima actividad de los moluscos terrestres estudiados coincidió con las estaciones de primavera, verano y comienzos del otoño. Al iniciarse las temperaturas frías en la segunda mitad del otoño, la mayor parte de los *Helicidae*, formaron un episagma y permanecieron en reposo hasta la primavera siguiente. No obstante, no todos los ejemplares siguieron estrictamente esta norma, pues muchos de ellos permanecieron activos durante el invierno, acaso porque la temperatura media del moluscario se mantuvo en torno a 18°C.

En cuanto al comportamiento comparado de los caracoles infestados y testigos, la observación de los resultados incluidos en los cuadros II al XIV sugiere algunas conclusiones. En la primera infestación (cuadro II), se observó la muerte de un *H. (X.) neglecta* del lote uno, en el que habían penetrado 90 larvas. En el lote dos murieron los 3 ejemplares de *Zebrina* sp., parasitados por 18, 4 y 24 larvas respectivamente.

En la segunda experiencia (cuadro III), solamente murió un ejemplar de *H. (X.) neglecta*, que no estaba parasitado. En cambio, soportaron fuertes infestaciones otros especímenes de la misma y de otras especies, sin inconvenientes.

En las experiencias tercera, cuarta y quinta (cuadros IV, V y VI), la mortalidad fue nula.

En la sexta experiencia (cuadro VII), sucumbió un ejemplar juvenil de *H. (X.) neglecta*, sobreviviendo otros individuos de características similares, incluso con infestaciones superiores.

En la experiencia séptima (cuadro VIII), murieron en el plazo de 23 días 16 caracoles, 14 de ellos en las primeras 24 horas post-infestación y los dos siguientes en la primera semana: un *H. (X.) neglecta* con 268 larvas y un *Cepaea nemoralis* con 132 larvas.

En la octava experiencia (cuadro IX), murieron 4 adultos y 2 jóvenes en las primeras 24 horas, 2 jóvenes más antes del día 25 p.i. y 45 adultos y 33 jóvenes entre los días 26 y 82 p.i.

Por último, en la novena infestación (cuadro X), no hubo mortalidad.

Como observación complementaria general, podemos señalar que algunos de los moluscos parasitados no realizaron puesta de huevos, ni siquiera en la época apropiada.

A la vista de los datos que anteceden, nos inclinamos a aceptar la opinión de

GERICHTER (1948) y otros autores, para quienes la presencia de larvas de *Protostomylinae* en el pie de los caracoles no tiene una significación patogénica muy acusada.

#### 4.3. EVOLUCIÓN DE *N. linearis* EN LOS MOLUSCOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS

Como puede apreciarse en los cuadros II al XIV, los porcentajes de penetración de larvas I de *N. linearis* son sumamente variables, incluso dentro de una misma especie y con idéntica técnica. Naturalmente, estos datos han de tomarse como aproximados, ya que es posible la pérdida de algunas larvas que queden adheridas al instrumental empleado, como ya ha indicado BABÓS (1961).

Estudiando solamente los ejemplares infestados por el método de KASSAI, puede considerarse que la receptividad de los caracoles varía dentro de una misma especie en relación con la edad, siendo más fácilmente invadidos los individuos jóvenes que los adultos. Esta observación ha sido particularmente evidente en *Helicella (X.) neglecta*, pero también se ha apreciado en las demás especies (cuadro XV) aunque el número de ejemplares jóvenes sólo fue válido para aquélla.

El sacrificio seriado de los caracoles infestados, a partir del 6.º día y hasta el 25 p.i., ha permitido seguir la cronología de la evolución larvaria de *N. linearis*. La técnica de dislaceración-digestión ha resultado muy adecuada para obtener larvas vivas y poder realizar satisfactoriamente su estudio morfológico.

A la temperatura de 18°C en que mantuvimos los moluscos, la primera muda se completó en un plazo mínimo de 10 días en el pie de *H. (X.) neglecta* y *H. (C.) variabilis*. En cambio, en *Cepaea nemoralis* el plazo fue de 13-14 días y en *Helix (C.) aspersa* de 13 a 15 días.

La segunda muda se completó en un mínimo de 14 días en *H. (X.) neglecta* y *H. (C.) variabilis*, en tanto que en *C. nemoralis* fue de 18-21 y en *H. (C.) aspersa* de 19 días.

Las características de las diversas fases larvarias son las siguientes:

##### LARVA I

Longitud total .....	290-320	micras
Longitud del esófago .....	140-156	»
Distancia anillo nervioso-extremo anterior .....	80	»
Distancia poro excretor-extremo anterior .....	100	»
Distancia ano-extremo posterior .....	20	»
Distancia primordio genital-extremo posterior .....	100-120	»

##### LARVA II

Longitud total con la vaina .....	360-380	»
Longitud de la larva .....	320	»
Longitud del esófago .....	140	»

Distancia anillo nervioso-extremo anterior .....	80	»
Distancia poro excretor-extremo anterior .....	90-100	»
Distancia ano-extremo posterior .....	20	»
Distancia primordio genital-extremo posterior .....	100	»

### LARVA III

Longitud total con las vainas .....	540-552	»
Longitud de la larva .....	500	»
Longitud del esófago .....	100	»
Distancia anillo nervioso-extremo anterior .....	70	»
Distancia anillo nervioso-extremo anterior vaina II .....	80	»
Distancia anillo nervioso-extremo anterior vaina I .....	100	»
Distancia poro excretor-extremo anterior .....	80	»
Distancia poro excretor-extremo anterior vaina II .....	90-100	»
Distancia poro excretor-extremo anterior vaina I .....	120	»
Distancia ano-extremo posterior .....	20-30	»
Distancia primordio genital-extremo posterior .....	190	»

Hay que destacar que la larva II se halla recubierta por la cutícula de la larva I que está muy estrechamente adosada y que, al pasar a larva III, después de la segunda muda, persisten los exuvios de los dos estadios anteriores, de tal manera que la larva infestante se halla sólidamente protegida: como mínimo, permanecieron viables 82 días. En ningún caso, las vainas protectoras toman las características de tono oscuro y estriación transversal descritas por RAMÍREZ (1967) y otros, para *Protostrongylus* spp. Una nota morfológicamente interesante es que las típicas espinas caudales que permiten la diferenciación de la larva I, persisten en la vaina de este estadio, pero no se replican en las larvas II ni III. En las láminas y foto-micrografías que se acompañan pueden observarse otros detalles morfológicos.

Nuestros datos concuerdan, en general, con los de MÜLLER (1934), en lo que se refiere a la descripción morfológica de los estadios larvarios y a las características de las vainas que recubren a la larva III. En cambio, los plazos que señala para la primera muda (6-8 días) y para la segunda (10-14) son más breves que los observados en nuestra experiencia, posiblemente por haber trabajado a una temperatura superior (20°C).

Respecto a la receptividad de los diversos caracoles, llegamos a la conclusión de que es máxima en los Helicidae de pequeño tamaño, sobre todo *Helicella* spp., no sólo porque en ellos los plazos de formación de las larvas II y III son más breves que en *Cepaea* spp. y *Helix* spp., sino también porque en ellos la mortalidad de las larvas es mucho menor. En *Cepaea* spp. y *Helix* spp. es frecuente observar larvas I penetradas en el pie que no prosiguen su evolución, cosa que nunca hemos apreciado en *Helicella* spp. En conclusión, *Helicella* (X.) *neglecta* y *Helicella* (C.)

*variabilis* pueden considerarse como hospedadores obligados de *N. linearis* y *Helix* (C.) *aspera* y *Cepaea nemoralis* como subobligados en el sentido que dan DAVTIAN (1945) y KASSAI (1957b) a estos vocablos.

### 4.4. INFESTACIÓN EXPERIMENTAL DE OVINOS

Los análisis coprológicos, sobre el total de la eliminación fecal, llevados a cabo a las 24, 48, 72 y 96 horas p.i. en los corderos experimentales, a fin de conocer el posible tránsito intestinal de larvas III de *N. linearis* resultaron negativos. Igualmente fueron negativos los de los corderos testigos.

La investigación realizada a partir de la primera semana p.i., reuniendo las deyecciones de dos días, para cada animal, permitió comprobar la eliminación de una larva III de *N. linearis*, muerta, por el cordero número 4. En días sucesivos, ni este animal, ni ninguno de los restantes eliminó más.

A la vista de estos hechos, se dedujo que prácticamente la totalidad de las larvas III viables había iniciado la emigración hacia los pulmones.

El día 60º p.i. el cordero n.º 1 eliminó las primeras larvas I de *N. linearis*. En la primera semana, la cuantía fue muy baja, pues solamente se recogió una larva en cada uno de los tres primeros días de análisis. El incremento del número de larvas fue muy irregular y la cifra máxima observada fue de 266 larvas (día 99 p.i.).

El segundo cordero que eliminó larvas I fue el n.º 5, en el día 66º p.i. Como en el caso anterior, fueron muy escasas las larvas halladas y el máximo no llegó a alcanzar la cuantía del caso anterior, pues solamente alcanzó 45 larvas (día 126 p.i.).

Los corderos núms. 2, 4 y 10 eliminaron las primeras larvas en los días 84-85º (análisis de la mezcla de heces de ambos días).

Ninguno de los corderos testigos eliminó larvas de *N. linearis*.

En primer lugar, se demuestra que el período de prepatencia es bastante variable, puesto que, en idénticas condiciones experimentales ha oscilado entre 60 días (cordero n.º 1), 66 (cordero n.º 5) y 84-85 (corderos núms. 2, 4 y 10).

Otros autores, señalan distintos plazos referentes a infestaciones con diversos *Protostrongylinae*. KOPYRIN *et al.* (1966), encuentran plazos de 75 y 86 días para el período de prepatencia de *M. capillaris* en infestaciones experimentales, dependiendo de la dosis administrada (105 y 87 larvas, respectivamente). ROSE (1959), señala un plazo de seis semanas como período de prepatencia en infestaciones experimentales con el mismo parásito.

Para otros *Metastrongyloidea*, los plazos son más cortos, según demostraron LÄMMLER y SAUPE (1968) en infestaciones con larvas de *Crenosoma striatum* realizadas en erizos. El período señalado por estos autores es de 13, 21 y 22 días.

El ritmo de eliminación larvaria ha sido muy irregular, ya que algunas investigaciones coprológicas resultaron negativas, en pleno período de patencia en los corderos 2, 4, 5 y 10.

La duración de la patencia, en el momento de redactar estas líneas persiste en los corderos, lo que supone ocho meses aproximadamente, en ausencia de reinfección. La propia oveja donante del material infestante, adquirida en abril de 1971, continúa eliminando activamente larvas al cabo de dos años. Esto supone que, *N. linearis* es un verme relativamente longevo, que se encuentra en el árbol respiratorio en condiciones tales que, o no incitan una respuesta inmunitaria muy dinámica, o que dispone de mecanismos de defensa eficaces.

Las irregularidades en la eliminación de las larvas se explican considerando la localización profunda de los vermes en el parénquima, así como por el posible ritmo discontinuo de reproducción de las propias hembras. Es muy probable que las larvas I de *N. linearis* requieran un período de maduración en los pulmones, en armonía con los resultados de las experiencias de NURNBERG (1961), corroboradas en cierta medida por BABÓS (1961), para *Protostrongylus tauricus*.

La necropsia del cordero n.º 1, proporcionó las siguientes observaciones:

#### CAVIDAD ABDOMINAL

Contenido: líquido seroso (aproximadamente 500 ml).

Panza: E. interno: papilas hipertróficas.

Intestino: I. grueso (examen interno): contenido mucoso.

Hígado: examen externo: petequias en la cara anterior del lóbulo medio.

Bazo: examen externo: color pálido; atrófico.

Vejiga de la orina: examen externo: vejiga muy dilatada, con hemorragias puntiformes, difusas.

Examen interno: a la sección del órgano, da salida a unos 300 ml aproximadamente de orina de aspecto hemorrágico; en la mucosa, intensas hemorragias difusas.

#### CAVIDAD TORÁCICA

*Pulmón derecho*.—En el *lobus cranialis*, extendiéndose desde la *pars cranialis* hacia atrás, a lo largo del *margo dorsalis*, una zona enfisematoso que, al corte, rezuma líquido seroso, espumoso. Los alvéolos pulmonares aparecen considerablemente distendidos.

En el *lobus caudalis* tres nódulos; dos de ellos de 1 cm de diámetro, situados en la *facies costalis*, cerca del borde diafragmático. Otro, de mayor tamaño, localizado en el ángulo basal del *lobus caudalis*, que se extiende hacia la *facies diaphragmatica*. Unos y otros tienen brillo nacarado, color grisáceo-claro, consistencia firme y sobresalen ligeramente sobre la superficie pleural. Al corte, muestran superficie rugosa, de tonos blanquecino-grisáceos, consistencia compacta, con desaparición de la estructura pulmonar.

*Pulmón izquierdo*.—En el *lobus caudalis, facies costalis*, particularmente hacia el ángulo basal, a uno y otro lado del *margo dorsalis*, aparecen seis nódulos, de forma irregularmente redondeada y tamaño en torno a 1 cm de diámetro. En la zona del *margo basalis*, un grupo de tres nódulos. Las características de estas formaciones son similares a las del pulmón derecho.

Es de destacar que la superficie de los nódulos y los bordes de los mismos, conservan, al menos en parte, los septos interlobulillares, de manera que la imagen recuerda un mosaico.

La investigación parasitaria de las zonas nodulares, permitió demostrar la presencia de *N. linearis* adultos, junto con gran número de huevos en distintos estadios de desarrollo y larvas I. En realidad, corresponden a los «nódulos de cría» descritos para otros *Protostrongylinae*. En cambio, no se hallaron en este cordero, los «nódulos verminosos» característicos de *Cystocaulus ocreatus*, posiblemente porque su aparición requiere más tiempo, lo que habrá de investigarse.

Abriendo el árbol bronquial hasta sus ramificaciones más finas, con ayuda de agujas de disección y de un estereomicroscopio, se recuperaron ejemplares adultos de *N. linearis*, los cuales, una vez realizadas las preparaciones correspondientes, a base de lactofenol-azul de algodón y lactofenol-Giemsa, se estudiaron morfológicamente. Sus características, tanto para los machos como para las hembras, se comparan con los datos de otros autores en el cuadro n.º XVII.

No se examinaron todos los nódulos presentes en los pulmones, ya que el pulmón derecho, a excepción de una pequeña zona del lóbulo diafragmático, se destinó a estudios histológicos, que se publicarán independientemente.

La pequeña zona citada del pulmón derecho y todo el izquierdo, se estudiaron convenientemente, extrayendo vermes adultos, a los que pertenecen las fotografías que ilustran el trabajo.

Los resultados de la investigación coprológica, positivos para *N. linearis*, quedan así confirmados con la demostración de machos y hembras del nemátodo en el pulmón más huevos y larvas I, lo que certifica el éxito de la infestación experimental.

#### 5. CONCLUSIONES

1. Los agentes de las bronconeumonías verminosas en la región leonesa, según se deduce del estudio de los pulmones parasitados de 137 ovejas y de 132 análisis coprológicos practicados en diversos rebaños son, por orden de importancia:

*Müllerius capillaris*

*Cystocaulus ocreatus*

*Protostrongylus* spp.

*Neostrongylus linearis*

*Dictyocaulus filaria*

2. Segundo el método de investigación utilizado (necropsia o coprología); las

infestaciones puras supusieron, respectivamente el 52,3 y el 46,3 %; las dobles el 39,2 y el 33,7 %; las triples el 7,1 y el 17,9 %; y las cuádruples el 1,4 y el 2,1 %.

3. *Neostrongylus linearis* se halló en el 23,0 % de los pulmones parasitados y en el 22,1 % de las muestras fecales estudiadas. Estos datos nos hacen suponer que está más difundido de lo que se piensa y que, probablemente, no se diagnostica adecuadamente.

4. En condiciones experimentales, las larvas I de *Neostrongylus linearis* invaden el pie de las siguientes especies de *Helicidae* (Mollusca):

*Helicella (Xerocincta) neglecta*

*Helicella (Cernuella) variabilis*

*Helicella (Helicella) apicina*

*Cepaea nemoralis*

*Helix (Cryptomphalus) aspersa*

*Zebrina* spp.

La invasión del nemátodo no tiene efectos morbígenos notables, aunque se apreció la anulación de la puesta en los moluscos.

5. A la temperatura de 18°C, *Neostrongylus linearis* invade el pie de *Helicella (X.) neglecta* y *H. (C.) variabilis* realizando la primera muda a los 10 días y la segunda a los 14. En *Helix (C.) aspersa* y en *Cepaea nemoralis* la primera ecdisis tiene lugar a los 13-15 días y la segunda al cabo de 18-21 post-infestación.

En consecuencia, se consideran las dos primeras especies hospedadoras intermedias obligadas de *N. linearis* y las dos últimas subobligadas.

6. Las larvas II y III de *N. linearis* conservan los exuvios de la fase anterior, de tal manera que el estadio infestante aparece cubierto por dos vainas.

7. El período de prepatencia de *N. linearis* varió entre 60 días (mínimo) y 85 (máximo).

8. La eliminación fecal de larvas I tiene carácter discontinuo y, como mínimo, se prolonga durante dos años.

## 6. RESUMEN

Ante el interés de las bronconeumonías verminosas ovinas y en particular las provocadas por *Protostrongylinae*, que son las más frecuentes en la región leonesa, se han estudiado los diversos agentes, centrándose particularmente la investigación sobre *Neostrongylus linearis*. A este fin, se revisa la bibliografía mundial relativa a este nemátodo (morfología, hospedadores definitivos, distribución geográfica, ciclo biológico, hospedadores intermedios, metodica de la infestación experimental de los moluscos y de los hospedadores definitivos).

Las investigaciones personales se inician con el estudio de pulmones parasitados y con análisis fecales, en búsqueda de material infestante puro, para los estudios experimentales. Se consigue una oveja con infestación simple por *N. linearis*, que se mantiene en estabulación como donante de larvas I.

Ejemplares de *Helicella (Xerocincta) neglecta*, *Helicella (Cernuella) variabilis*, *Helicella (Helicella) apicina*, *Cepaea nemoralis*, *Helix (Cryptomphalus) aspersa* y *Zebrina* spp. (Mollusca) se infestan siguiendo el método de KASSAI. Mediante sacrificios seriados de los caracoles infestados y examen del pie con la técnica de dislaceración-digestión en jugo gástrico artificial, se estudia la evolución del nemátodo.

Las larvas se desarrollaron óptimamente en *Helicella (Xerocincta) neglecta* y *Helicella (C.) variabilis*, en cuyos moluscos alcanzaron el estadio II en 10 días y el III en 14. También resultaron adecuadas *Helix (Cryptomphalus) aspersa* y *Cepaea nemoralis*, pero la evolución fue más lenta: 13-15 días para la larva II y 18-21 para la larva III.

La larva III, presente en el pie de los caracoles, conserva los exuvios de los estadios anteriores, de manera que está protegida por dos vainas.

Se infestaron cinco corderos (con otros cinco como testigos) con larvas III obtenidas en los moluscos citados. El período de prepatencia varió entre 60 (mínimo) y 85 (máximo) días. La eliminación fecal de las larvas I tiene carácter discontinuo y, como mínimo, se prolonga durante dos años. Uno de los corderos se sacrificó, recogiendo abundantes ejemplares de *Neostrongylus linearis* (machos, hembras y larvas I) en sus pulmones.

## RESUME

Etant donné l'intérêt des broncho-pneumonies vermineuses ovines et en particulier celles provoquées par les *Protostrongylinae* qui sont les plus fréquentes dans la région de León, on a étudié les divers agents de ces maladies, en centrant la recherche particulièrement sur le *Neostrongylus linearis*. A cette fin on a révisé la bibliographie mondiale relative à ce nématode (morphologie, hôtes définitifs, distribution géographique, cycle biologique, hôtes intermédiaires, méthode de l'infestation expérimentale des mollusques et des hôtes définitifs).

Les investigations personnelles commencent avec l'étude des poumons parasités et avec des analyses fécales, cherchant du matériel infestant pur pour les études expérimentales. On prend une brebis ayant une seule infestation par le *N. linearis* que l'on garde dans une étable comme donneuse de larves I.

On infeste quelques *Helicella (Xerocincta) neglecta*, *Helicella (Cernuella) variabilis*, *Helicella (Helicella) apicina*, *Cepaea nemoralis*, *Helix (Cryptomphalus) aspersa*, et *Zebrina* spp. *Mollusca* selon la méthode de KASSAI. On étudie l'évolution ou développement du nématode au moyen de sacrifices, en série, des escargots infestés et de l'examen du pied avec la technique de dislaceration digestion dans du jus gastrique artificiel.

Les larves se développeront parfaitement dans l'*Helicella (Xerocincta) neglecta* et l'*Helicella (C) variabilis*, atteignant le stade II en 10 jours et le stade III en 14 jours dans leurs mollusques. L'*Helix (Cryptomphalus) aspersa* et le *Cepaea nemoralis*

*ralis* furent aussi appropriées, mais le développement des larves fut plus lent: 13 à 15 jours pour la larve II et 18 à 21 jours pour la larve III.

La larve III qui se trouve dans le pied des escargots conserve les exuvies des stades antérieurs de manière qu'elle est protégée par deux gaines.

On a infesté aussi cinq agneaux (et cinq autres comme témoins) avec des larves III obtenues dans les mollusques ci-dessus indiqués. La période prépatente varia entre 60 (minimum) et 85 (maximum) jours. L'élimination fécale des larves I a un caractère discontinu et elle se prolonge au moins pendant deux ans. L'un des agneaux fut sacrifié et l'on recueillit un grand nombre de *Neostrongylus linearis* (mâles, femelles, et larves I) dans ses poumons.

## SUMMARY

Ovine verminous bronchopneumonias and specially those caused by *Protostronylinae*, which are the most frequent in the province of León, being of great interest, we have studied the various agents causing the said diseases, the research work being specially directed to *Neostrongylus linearis*. For this purpose we have examined the world bibliography concerning this nematode (morphology, definitive hosts, geographic distribution, biological cycle, intermediate hosts, experimental infection method in molluscs and in definitive hosts).

The personal research starts by studying the parasited lungs and by carrying out fecal analyses in search of some pure infecting material for experimental study.

A sheep having a single infection by *N. linearis* is used for the experiment. It is previously kept into a stable as a donor of larvae I.

Some *Helicella (Xerocincta) neglecta*, *Helicella (Cernuella) variabilis*, *Helicella (Helicella) apicina*, *Cepaea nemoralis*, *Helix (Cryptomphalus) aspersa*, and *Zebrina* spp. (Mollusca) are infected in accordance with the method of KASSAI. Sacrificing, in series, the infected snails and examining their foot by the dislaceration—digestion technique on artificial gastric juice, we have studied the nematode development or growth.

Larvae developed perfectly into *Helicella (Xerocincta) neglecta* and *Helicella (Cernuella) variabilis* in whose molluscs they had attained the stade II in 10 days and the stade III in 14 days. *Helix (Cryptomphalus) aspersa* and *Cepaea nemoralis* resulted to be appropriate too, but the development was slower: 13 to 15 days for larva II and 18 to 21 days for larva III.

Larva III present in the foot of snails maintains the exuvies of previous stades so that it is protected by two hulls.

Five lambs (and five other control lambs) were infected with larvae III found into the above mentioned molluscs. The prepatent period varied between 60 (as minimum) and 85 (as maximum) days. The fecal elimination of larvae I has a discontinuous characteristic and it is extended at least for two years. One of the

lambs was slaughtered and a great number of *Neostrongylus linearis* (male, female, and larvae I) were collected in its lungs.

## 7. AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de este trabajo hemos recibido numerosas colaboraciones, que agradecemos profundamente. De un modo especial, expresamos nuestro reconocimiento al Prof. Dr. M. CORDEIRO DEL CAMPILLO, que nos proporcionó el tema, dirigió el trabajo y revisó críticamente el original. Y al Prof. Dr. A. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, que nos ayudó a poner a punto las técnicas. Y al Prof. Dr. E. ZORITA TOMILLO y sus colaboradores, por las facilidades otorgadas para el alojamiento de los corderos experimentales.

Igualmente nos han auxiliado en sus específicas competencias, el Dr. A. ESCUDERO DÍEZ, los doctorandos del Departamento Y. MANCA, R. MARCOS, M. ALLER y J. ROJO, así como los veterinarios titulares del Matadero Municipal de León y la Sra. M. J. CORDERO DEL CAMPILLO.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- BABÓS, S. (1961): Zur Kenntnis der *Protostrostrongylinen* der Leporiden, unter besonderer Brücksichtigung der in Ungarn vorkommenden *Protostrongylus*-Arten. *Helminthologia*, 3: 13-37.
- BAYLIS, H. A. (1929): *Manual of Helminthology, medical and veterinary*. W. Wood and Co. London.
- BORCHENT, A. (1964): *Parasitología veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- COUTURIER, M. A. J. (1962): *Le bouquetin des Alpes «Capra aegagrus ibex ibex»*. L. Grenoble. Francia.
- DASKALOV, P. V. et al. (1961): Sur les nematodes pulmonaires des moutons en Bulgarie. *Izvest. Tsentr. khelminth. lab.*, 6: 59-67.
- DAVTIAN, E. A. (1945): Srawnitelnaja wospriimtschostj molluskow k inwazirovaniu litschinkami nematod wozb. legotschnich gelmintozow owec i koz. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 80.
- DOBBERSTEIN, J. (1957): *Richtlinien für die Sektion der Haustiere*. Paul Parey. Berlin.
- EUZEBY, J. (1958): *Diagnostic expérimental des helminthoses animales*. Vigot Frères, Editeurs. París.
- (1961): *Les maladies vermineuses des animaux domestiques. I. Maladies dues aux Nemathelminthes*. Vigot Frères, Editeurs. París.
- FAVATI, V. (1958): Sulla diffusione delle strongilosi degli ovini in Toscana. *Att. Soc. Ital. Sci. Vet.*, 12: 445-447.
- FORRESTER, D. J., FORRESTER, G. M. y SENCER, C. M. (1966): A contribution toward a bibliography on the lung nematodes of mammals. *J. Helminth. (Suppl.)*, 40: 1-122.
- GEBAUER, O. (1931): *Wiener tierärztl. Monatsch.* 18: 630, cit. por EUZEBY, J. (1961).
- (1932): Zur Kenntnis der Parasitenfauna der Gemse. *Z. Parasitenk.*, 4: 147-219.
- GERICHTER, Ch. B. (1948): Observations on the life history of lung nematodes using snails as intermediate host. *Am. J. Vet. Res.*, 9: 109-112.
- (1951): Studies on the lung nematodes of sheep and goats in the Levant. *Parasitology*, 41: 166-183.
- GRASSÉ, P. P. (1968): *Traité de Zoologie, Anatomie, Systematique, Biologie. V. Mollusques gastéropodes et scaphopodes*. (fascicule III). Masson et Cie Editeurs. París.
- HAMILTON, J. M. (1969): On the migration, distribution, longevity and pathogenicity of larvae of *Acturostrongylus abstrusus* in the snail, *Helix aspersa*. *J. Helminth.*, 43: 319-325.
- JOYEUX, C. y GAUD, J. (1946): Recherches helminthologiques marocaines. Etude sur la pneumonie vermineuse. *Arch. Inst. Pasteur Maroc.*, 3: 383-461.
- KASSAI, T. (1957a): Über die geographische Verbreitung der *Protostrongylidose* des Schafes. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 7: 165-173.
- (1957b): Schnecken als Zwischenwirte der *Protostrongyliden*. *Z. Parasitenk.*, 18: 5-19.
- (1958): Vizsgálatok a juhok gócos tüdőfertőzéséről. *Magy. állorv. lap.*, 7: 125-127.
- y HOLLÓ, F. (1958): Klick urováni larev I stadia plinich cervu prezvykavc. *Cesk. Parasit.*, 2: 95-99.
- KERSTEN, W. (1961): Ein Beitrag zum Vorkommen und zur Diagnostik der kleinen Lungenwürmer des Schafes. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 68: 494-497.

- KOPYRIN, A. V., DOBRIKOV, D. M. y BURIKOVA, In. V. (1966): Epizootiology of Mülleriasis of sheep. En Petrov, A. M. *Contributions to Helminthology*. Israel Prog. Sci. Transl., Jerusalem.
- KOTHLY, A. (1958): Plinic Helmintofauna Spárkáte Zvere V CSR. *Cesk. Parasit.* I, 5: 101-110.
- KREIS, H. A. (1944): Beiträge zur Kenntnis parasitischer Nematoden. *Rev. Suisse Zool.*, 51: 227-252.
- LÄMMLER, G. y SAUPE, E. (1968): Infektionsversuche mit dem Lungenwurm des Igels, *Crenosoma striatum* (Zeder, 1800). *Z. f. Parasitenk.*, 3: 87-100.
- LEVINE, N. D. (1968): *Nematode parasites of domestic animals and of man*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minn.
- MAROTEL, G. (1913): Nouvel agent de la pneumonie vermineuse chez le mouton. *Bull. Soc. Vét. et Soc. méd. vét. Lyon et Sud. Est.*, 16: 42-46.
- MARTÍNEZ MORALES, E. (1964): *Zur Kenntnis der Epidemiologie der Protostrongyliden*. Inaugural-Dissertation. Giessen.
- (1967): Sobre algunos factores de la infestación ovina con Protostrongylidos. *An. Fac. Vet. León*, 13: 109-134.
- MAPES, C. R. y BAKER, D. W. (1950): Studies on the Protostrongylinae lungworms of sheep. *J. Am. Vet. Ass.*, 116: 133-135.
- MÜLLER, F. R. (1934): Ein Beitrag zur Entwicklung des Lungenwurmes *Neostrongylus linearis* (Marotel, 1913). *Sitzungsber. Ges. Naturf. Fr. Berlin Pt.* 2: 158-161.
- NÜRNBERG, H. (1961): *Dictyocaulus und Protostrongylidenbefall bei Schafen*. Inaugural-Dissertation. Berlin.
- PAVLOV, P. (1937): Recherches experimentales sur le cycle évolutif de *Synthetocaulus capillaris*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 15: 500-503.
- POHL, R. (1960): *Der Protostrongylidenbefall bei Schaf und Hase in Westdeutschland*. Vet Med. Diss. Hannover.
- RAMÍREZ FERNÁNDEZ, A. P. (1967): Epizootiología de las bronconeumonías verminosas ovinas en León. *An. Fac. Vet. León*, 13: 135-210.
- ROSE, J. H. (1957): Observations on the larval stages of *Müllerius capillaris* within the intermediate hosts *Agriolimax agrestis* and *A. reticulatus*. *J. Helminth.*, 31: 1-16.
- (1957b): Observations on the bionomics of the freelifing first larvae of the sheep lung-worm *Muellerius capillaris*. *J. Helminth.*, 31: 17-28.
- (1958): Site of development of the lungworm *Muellerius capillaris* in experimentally infected lambs. *J. Comp. Path.*, 68: 359-362.
- (1959): Experimental infection of lambs with *Muellerius capillaris*. *J. Comp. Path. Therap.*, 69: 414-422.
- (1961): Three lungworms recently recorded from British sheep. *Res. Vet. Sci.*, 2: 253-258.
- MICHEL, J. H. y HARRISS, S. T. (1957): Lungworms of British sheep. *Vet. Rec.*, 69: 461.
- SAINT-GUILLART, M. (1968): Etude histologique des premiers stades évolutifs de *F. hepatica* L. *Acta Pat. Antwerp.*, 46: 77-132.
- SILVA LEITAO, J. L. da (1963): *Parasitas dos animais domésticos em Portugal Metropolitano*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- SIMÓN VICENTE, F. (1961): Estudios sobre vermes parásitos pulmonares de óvidos y cápridos. *An. Inst. Invest. Vet. Madrid*, 9: 101-139.
- SKRJABIN, K. I., SHIKHOBALOVA, N. P., SCHULZ, R. S., POPOVA, T. I., BOEV, S. N. y DELYAMURE, S. L. (1961): *Key to Parasitic Nematodes. III Strongylata*. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem.
- SUMNALIEV, P. (1966): On the infestation of *Helicella obvia* (Hartman, 1840) and *Zebrina detrita* (Müller, 1774) in the Sofia district with Protostrongylid larvae. *Bull. Central Helminth. Lab. KH*, 11: 111-117.
- SOLTYS, A. (1964): Snails as intermediate hosts of nematodes of the family Protostrongylidae in sheep of the Lublin Palatinate. *Acta Parasit. Pol.*, 12: 234-237.
- TARAZONA VILAS, J. M. (1955): Estudios sobre ciclos evolutivos y la terapéutica de las estromgirosis pulmonares ovinas. *Supl. Cient. Cons. Gen. Col. Vet. España*, 9: 271-301 y 345-362.
- WRIGHT, H. (1957): *A guide to molluscan anatomy for parasitologists in Africa*. British Museum (Natural History). London.
- ZIELINSKI, Z. (1958): Nowy dla Polski gatunek niciencia plucnego owiec. *Wiad. parazytol.*, 4: 473-475.

CUADRO I  
Localidades de procedencia de las ovejas estudiadas en el Matadero Municipal de León, o investigadas coprológicamente (*N. linearis*)

Provincia y localidad	Matadero (M) o Coprología (C)	+ ó —	Datos de coprología			
			Número animales rebaño	Número muestras	Observ.	
<b>CACERES</b>						
Alía	M	C	—	1.200	7	
Provincia <sup>1</sup>	C	—	100	2	mezcla fd.	
<b>LEON</b>						
Barrillos Curueño	M	—				
Carvajal Legua	M	+				
Grajalejo Campos	M	+				
Grisuelos Páramo	M	—				
Isoba	C	—	200	4	fd.	
Lorenzana	C	—	80	1	fd.	
Los Oteros <sup>1</sup>	M	—				
Mansilla Mulas	M	—				
Marne	M	C	—	100	14	indiv.
Matallana Valmadrigal	M	—				
Puente-Castro	M	+				
Puente-Villarente	M	C	+	100	30	fd.
Riaño	M	—				
Ribaseca (CSIC)	C	—	100	16	fd.	
Sahagún Campos	M	+				
S.º M.º del Condado	M	C	—	50	1	mezcla
S.º M.º del Páramo	M	C	—	60	2	fd.
Santas Martas	M	C	—	100	8	fd.
Tierra de Campos <sup>1</sup>	M	+				
Tolibia de Abajo	C	—	60	1	mezcla	
Tolibia de Arriba	C	—	80	1	fd.	
Valdeón <sup>1</sup>	C	—	60	1	fd.	
Valdevimbre	C	—	70	1	fd.	
Villablino	M	+				
Villacete	C	+	80	41	indiv.	
<b>PALENCIA</b>						
Abastillas	C	—	180	1	mezcla	
<b>VALLADOLID</b>						
Medina del Campo	M	+				
Valdestillas	C	—	130	1	fd.	
<b>ZAMORA</b>						
Benavente	M	+				
<b>TOTALES</b>						
	137	132		132		

<sup>1</sup> Sin precisar localidad

— Positivo

— Negativo

**CUADRO II**  
Primera experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infest. por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p.i. y observaciones
<b>LOTE 1: 7 moluscos</b>				
1 <i>Cepaea nemoralis</i>	133,8	77	57,8	14 p.i.
2 fd.	fd.	25	18,7	13 p.i.
3 fd.	fd.	72	54,1	14 p.i.
4 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	83	62,4	7 p.i.
5 fd.	fd.	1	0,7	12 p.i.
6 <i>H. (X.) neglecta</i>	fd.	90	67,6	muerto espont.
7 fd.	fd.	32	24,0	6 p.i.
<b>LOTE 2: 8 moluscos</b>				
1 <i>Zebrina</i> sp.	33,4	18	54,0	muerto espont.
2 fd.	fd.	4	12,1	fd.
3 fd.	fd.	24	72,7	fd.
4 <i>C. nemoralis</i>	fd.	4	12,1	15 p.i.
5 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	14	42,4	14 p.i.
6 fd.	fd.	17	51,5	17 p.i.
7 <i>H. (X.) neglecta</i>	fd.	14	42,4	7 p.i.
8 <i>H. (C.) aspersa</i>	fd.	24	72,7	16 p.i.

14. caracoles testigos, con representación de todas las especies

Fecha ..... 3-II-1971  
Tiempo de exposición ..... 5 horas  
Método ..... KASSAI.

**CUADRO III**

Segunda experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p.i. y observaciones
<b>LOTE 1: 4 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) aspersa</i>	150	66	44	6 p.i.
2 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	100	66,6	12 p.i.
3 <i>H. (X.) neglecta</i>	fd.	88	58,6	14 p.i.
4 fd. fd. jr.	fd.	68	45,3	12 p.i.
<b>LOTE 2: 10 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) aspersa</i>	500 ca.*			6 p.i.
2 fd. fd.	fd.			8 p.i.
3 fd. fd.	fd.			12 p.i.
4 fd. fd.	fd.			12 p.i.
5 fd. fd.	fd.			16 p.i.
6 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.			8 p.i.
7 fd. fd.	fd.			12 p.i.
8 fd. fd.	fd.			15 p.i.
9 <i>H. (X.) neglecta</i>	fd.			12 p.i.
10 fd. fd.	fd.			15 p.i.
* 40 g. de heces en total.				
<b>LOTE 3: 17 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) aspersa</i>	61			6 p.i.
2 fd. fd.	fd.			7 p.i.
3 fd. fd.	fd.			7 p.i.
4 fd. fd.	fd.			11 p.i.
5 fd. fd.	fd.			11 p.i.
6 fd. fd.	fd.			11 p.i.
7 fd. fd.	fd.			12 p.i.
8 fd. fd.	fd.			14 p.i.
9 fd. fd.	fd.			18 p.i.
10 fd. fd.	fd.			16 p.i.
11 fd. fd.	fd.			19 p.i.
12 <i>H. (C.) aspersa</i>	61			20 p.i.
13 fd. fd.	fd.			20 p.i.
14 fd. fd.	fd.			20 p.i.
15 fd. fd.	fd.			20 p.i.
16 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.			8 p.i.
17 fd. fd.	fd.			19 p.i.
<b>LOTE 4: 10 moluscos</b>				
1 <i>H. (X.) neglecta</i>	90	10	11	10 p.i.
2 fd. fd.	fd.	58	64,4	20 p.i.
3 fd. fd.	fd.	81	90	20 p.i.
4 fd. fd.	fd.	0	0	muerto espont.
5 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	69	76	10 p.i.
6 fd. fd.	fd.	77	85,5	11 p.i.
7 fd. fd.	fd.	48	53,3	17 p.i.
8 <i>Cepaea nemoralis</i>	fd.			17 p.i.
9 <i>H. (C.) aspersa</i>	fd.	84	93,3	18 p.i.
10 <i>Helicella apicina</i>	fd.	84	93,3	18 p.i.

CUADRO III (cont.)

138 caracoles testigos, con representación de todas las especies.

Fecha ..... 21, 22 y 23 - IV - 1971  
 Método .....  
 Lote 1 ..... KASSAI  
 Lote 2 ..... MULLER  
 Lote 3 ..... Inyección  
 Lote 4 ..... KASSAI

CUADRO IV  
Tercera experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p.i. y observaciones
1 <i>Cepaea nemoralis</i> ,	133	84	63,1	6 p.i.
2 fd. fd.	fd.	25	18,7	7 p.i.
3 fd. fd.	fd.	45	33,8	9 p.i.
4 fd.	fd.	70	52,6	10 p.i.
5 fd. fd.	fd.	0	0	13 p.i.
6 fd. fd.	fd.	41	30,8	13 p.i.
7 fd. fd.	fd.	74	55,6	16 p.i.
8 fd. fd.	fd.	68	51,1	16 p.i.
9 fd. fd.	fd.	70	52,6	18 p.i.
10 fd. fd.	fd.	96	72,1	19 p.i.
11 fd. fd.	fd.	38	28,5	22 p.i.
12 fd. fd.	fd.	35	26,3	22 p.i.
13 <i>H. (C.) aspersa</i>	fd.	0	0	7 p.i.
14 fd. fd.	fd.	33	24,8	11 p.i.
15 fd. fd.	fd.	45	33,8	14 p.i.
16 fd. fd.	fd.	89	66,9	17 p.i.
17 fd. fd.	fd.	77	57,8	19 p.i.
18 fd. fd.	fd.	69	51,8	23 p.i.
19 <i>H. (X.) neglecta</i>	fd.	92	69,1	8 p.i.
20 fd. fd.	fd.	115	86,4	11 p.i.
21 fd. fd.	fd.	81	60,9	14 p.i.
22 fd. fd.	fd.	39	29,3	17 p.i.
23 fd. fd.	fd.	8	6	20 p.i.
24 fd. fd.	fd.	43	32,3	24 p.i.
25 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	82	61,6	9 p.i.
26 fd. fd.	fd.	99	74,4	12 p.i.
27 fd. fd.	fd.	37	27,8	15 p.i.
28 fd. fd.	fd.	70	52,6	18 p.i.
29 fd. fd.	fd.	49	36,8	21 p.i.
30 fd. fd.	fd.	11	8,2	25 p.i.

965 caracoles testigos, con representación de todas las especies

Fecha ..... 25 - IV - 1971  
 Tiempo de exposición ..... 6 horas  
 Método ..... KASSAI

CUADRO V

Cuarta experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	Larvas penet.	%	Sacrificio p.i. y observaciones
1 <i>H. (X.) neglecta</i>	300	108	36	7 p.i.
2 fd. fd.	fd.	130	43	17 p.i.
3 <i>Cepaea nemoralis</i>	fd.	250	83	13 p.i.
4 fd. fd.	fd.	222	74	21 p.i.
5 <i>H. (C.) variabilis</i>	fd.	133	44	9 p.i.
6 <i>H. (C.) aspersa</i>	fd.	220	73	15 p.i.

1300 caracoles testigos, con representación de todas las especies

Fecha ..... 21 - VII - 1971  
 Tiempo de exposición ..... 39 horas  
 Método ..... KASSAI

**CUADRO VI**  
Quinta experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p.i. y observaciones
<b>LOTE 1: 3 moluscos</b>				
1 <i>H. (X.) neglecta</i>	2440*	2150*	88,1	8 p.i.
2 id. id.	id.	2150	88,1	14 p.i.
3 id. id.	id.	2150	88,1	18 p.i.
<b>LOTE 2: 4 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) variabilis</i>	2440*	1973*	80,8	6 p.i.
2 id. id.	id.	1973	80,8	12 p.i.
3 id. id.	id.	1973	80,8	16 p.i.
4 id. id.	id.	1973	80,8	20 p.i.
<b>LOTE 3: 5 moluscos</b>				
1 <i>Cepaea nemoralis</i>	295*	231*	78,3	8 p.i.
2 id. id.	id.	231	78,3	14 p.i.
3 id. id.	id.	231	78,3	18 p.i.
4 id. id.	id.	231	78,3	21 p.i.
5 id. id.	id.	231	78,3	21 p.i.
<b>LOTE 4: 4 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) aspersa</i>	295*	238*	80,6	6 p.i.
2 id. id.	id.	238	80,6	12 p.i.
3 id. id.	id.	238	80,6	16 p.i.
4 id. id.	id.	238	80,6	20 p.i.

1.000 caracoles testigos, con representación de todas las especies.

Fecha ..... 22 - VII - 1971  
 Tiempo de exposición ..... 23 horas  
 Método ..... KASSAI

\* Cantidad media de larvas por molusco.

**CUADRO VII**  
Sexta experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p. i. y observaciones
<b>LOTE 1: 6 moluscos</b>				
1 <i>H. (C.) aspersa</i> jr.	166	150	93,6	
2 id. id. jr.	id.	150	93,6	
3 <i>C. nemoralis</i> jr.	id.	150	93,6	
4 id. id. jr.	id.	150	93,6	
5 <i>H. (X.) neglecta</i> jr.	id.	150	93,6	
6 <i>H. (C.) variabilis</i> jr.	id.	150	93,6	muerto espont.
<b>LOTE 2: 3 moluscos</b>				
1 <i>H. (X.) neglecta</i>	1.333	1.256	94,2	
2 <i>H. (C.) variabilis</i>	id.	1.256	94,2	
3 <i>C. nemoralis</i>	id.	1.256	94,2	

200 caracoles testigos, con representación de todas las especies.

Fecha ..... 30 - VII - 1971  
 Tiempo de exposición ..... 3 horas  
 Método ..... KASSAI

CUADRO VIII

## Séptima experiencia de infestación de moluscos (\*)

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p. i. y observaciones
<b>LOTE 1: 17 moluscos</b>				
<i>H. (C.) aspersa</i>	274	máx. 263 med. 173 mín. 55	95,9 58,9 20	entre el 6 p.i. y el 21 p.i.
<b>LOTE 2: 17 moluscos</b>				
<i>Cepaea nemoralis</i>	274	máx. 246 med. 185 mín. 39	89,7 59,7 14,2	entre el 6 p.i. y el 21 p.i.
<b>LOTE 3: 9 moluscos</b>				
<i>H. (X.) neglecta</i>	274	máx. 259 med. 215 mín. 191	94,5 78,4 69,5	entre el 6 p.i. y el 20 p.i.
<b>LOTE 4: 17 moluscos</b>				
<i>H. (C.) variabilis</i>	274	máx. 194 med. 168 mín. 137	70,8 61,2 50	entre el 9 p.i. y el 17 p.i.
<b>100 caracoles testigos, con representación de todas las especies</b>				

Fecha ..... 15-I-1972  
 Tiempo de exposición ..... 5 horas  
 Método ..... KASSAI

(\*) Se resumen los datos correspondientes a cada especie de molusco.

## BAJAS:

*H. (C.) aspersa*: 3 ejemplares antes de 24 horas.  
*C. nemoralis*: 1 con 132 larvas penetradas (48,1%) (1.<sup>a</sup> semana).  
*C. nemoralis*: 6 ejemplares antes de 24 horas.  
*H. (X.) neglecta*: 1 con 268 larvas penetradas (95,9%) (1.<sup>a</sup> semana).  
*H. (X.) neglecta*: 3 ejemplares antes de 24 horas.  
*H. (C.) variabilis*: 2 ejemplares antes de 24 horas.  
 TOTAL: 16 caracoles.

CUADRO IX

## Octava experiencia de infestación de moluscos (\*)

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p. i. y observaciones
<b>LOTE 1: 84 moluscos</b>				
<i>H. (X.) neglecta</i>	205	máx. 205 med. 124 mín. 15	100 69 7	más de 82 días p.i. (1)
<b>LOTE 2: 154 moluscos</b>				
<i>H. (X.) neglecta jr.</i>	205	máx. 205 med. 175 mín. 86	100 85,5 42	21 caracoles sacrificados entre 6 y 25 p.i. El resto, más de 82 p.i. (1)

215 caracoles testigos, pertenecientes a la misma sp. empleada

Fecha ..... 19-V-1972  
 Tiempo de exposición ..... 6 horas  
 Método ..... KASSAI

(\*) Se resumen los datos correspondientes a los grupos de edades de los moluscos.

(1) Utilizados para infestar experimentalmente corderos, a excepción de los muertos espontáneamente

## BAJAS:

*H. (X.) neglecta*: 4 adultos y 2 jóvenes antes de 24 horas.  
*H. (X.) neglecta*: 2 jóvenes antes del día 25 p.i.  
*H. (X.) neglecta*: 74 (41 adultos y 33 jóvenes) entre los días 26 a 82 p.i.

TOTAL: 86 caracoles.

**CUADRO X**  
Novena experiencia de infestación de moluscos

N.º de orden y sp. de moluscos	Dosis infestante por molusco	LARVAS penet.	%	Sacrificio p. i. y observaciones
1 <i>H. (X.) neglecta</i> jr	50	13	26	6 p.i.
2 fd. fd. jr	50	23	46	7 p.i.
3 fd. fd. jr	50	11	22	8 p.i.
4 fd. fd. jr	50	32	64	9 p.i.
5 fd. fd. jr	50	48	96	10 p.i.
6 fd. fd. jr	50	47	94	11 p.i.
7 fd. fd. jr	50	48	96	12 p.i.
8 fd. fd. jr	50	46	92	13 p.i.
9 fd. fd. jr	50	28	56	14 p.i.
10 fd. fd. jr	50	45	90	15 p.i.
11 fd. fd. jr	50	39	78	16 p.i.
12 fd. fd. jr	50	40	80	17 p.i.
13 fd. fd. jr	50	37	74	18 p.i.
14 fd. fd. jr	50	42	84	19 p.i.
15 fd. fd. jr	50	43	86	20 p.i.
16 fd. fd. jr	50	41	82	21 p.i.
17 fd. fd. jr	50	44	88	22 p.i.
18 fd. fd. jr	50	25	50	23 p.i.
19 fd. fd. jr	50	30	60	24 p.i.
20 fd. fd. jr	50	47	94	25 p.i.

163 caracoles testigos, pertenecientes a la especie empleada.

Fecha ..... 10-VI-1972  
Tiempo de exposición ..... 5 horas  
Método ..... KASSAI

**CUADRO XI**  
Características de los corderos experimentales

N.º	Raza	Edad	Sexo	Peso medio	Procedencia	Observaciones
1	Churra	3 meses	macho	15 Kg	Riosequino (León)	Había pastado
2	»	2,5 »	»	17,5 »	Santovenia del Monte (León)	No había pastado
3	Merina	2,5 »	»	15 »	Olleros de Alba (León)	No había pastado
4	Churra	3 »	»	15 »	Riosequino (León)	No había pastado
5	»	3 »	»	15 »	»	Había pastado
6	»	3 »	»	14 »	»	»
7	»	3 »	»	15 »	»	»
8	»	3,5 »	»	16 »	»	»
9	»	2 »	»	13 »	»	»
10	»	3,5 »	»	15,5 »	»	»

CUADRO XII

Resultados de las investigaciones en pulmones parasitados de 137 ovejas

## INFESTACIONES PURAS

<i>Müllerius capillaris</i>	24,7 %
<i>Cystocaulus ocreatus</i>	16,1 %
<i>Protostrongylus</i> spp.	5,7 %
<i>Neostrongylus linearis</i>	5,1 %
<i>Dictyocaulus filaria</i>	0,7 %
	52,3 %

## INFESTACIONES DOBLES

<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i>	16,1 %
<i>M. capillaris</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	8,0 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>N. linearis</i>	6,5 %
<i>M. capillaris</i> + <i>N. linearis</i>	5,1 %
<i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	2,1 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	0,7 %
<i>M. capillaris</i> + <i>D. filaria</i>	0,7 %
	39,2 %

## INFESTACIONES TRIPLES

<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	4,3 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>N. linearis</i> + <i>M. capillari</i>	1,4 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	0,7 %
<i>M. capillaris</i> + <i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	0,7 %
	7,1 %

## INFESTACIONES CUADRUPLES

<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i> + <i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	1,4 %	1,4 %
--	-------	-------

CUADRO XIII

Resultados de la investigación coprológica de «estrongilos» pulmonares en 132 análisis

## INFESTACIONES PURAS

<i>Müllerius capillaris</i>	26,3 %
<i>Protostrongylus</i> spp.	7,4 %
<i>Neostrongylus linearis</i>	6,3 %
<i>Dictyocaulus filaria</i>	4,2 %
<i>Cystocaulus ocreatus</i>	2,1 %
	46,3 %

## INFESTACIONES DOBLES

<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i>	13,7 %
<i>M. capillaris</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	8,4 %
<i>M. capillaris</i> + <i>N. linearis</i>	5,3 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	4,2 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>D. filaria</i>	1,1 %
<i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	1,0 %
	33,7 %

## INFESTACIONES TRIPLES

<i>C. ocreatus</i> + <i>M. capillaris</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	8,4 %
<i>C. ocreatus</i> + <i>M. capillaris</i> + <i>N. linearis</i>	4,2 %
<i>M. capillaris</i> + <i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	3,2 %
<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i> + <i>D. filaria</i>	1,1 %
<i>M. capillaris</i> + <i>Protostrongylus</i> spp. + <i>D. filaria</i>	1,0 %
	17,9 %

## INFESTACIONES CUADRUPLES

<i>M. capillaris</i> + <i>C. ocreatus</i> + <i>N. linearis</i> + <i>Protostrongylus</i> spp.	2,1 %	2,1 %
--	-------	-------

CUADRO XIV

Frecuencia de los diversos «estrongilos» pulmonares en la zona estudiada

Especies	Frecuencia de la infestación (en porcentajes acumulativos)	
	Matadero	Coprología
<i>Müllerius capillaris</i>	62,4 %	73,7 %
<i>Cystocaulus ocreatus</i>	47,2 %	36,9 %
<i>Protostrongylus</i> spp.	23,6 %	35,7 %
<i>Neostrongylus linearis</i>	23,0 %	22,1 %
<i>Dictyocaulus filaria</i>	1,4 %	7,4 %

CUADRO XV

Receptividad de los moluscos infestados con larvas I de *N. linearis*,  
por el método de KASSAI

Especies	N.º de ejemplares		% de larvas I penetradas	
	Adultos	Jóvenes	Adultos	Jóvenes
<i>H. (X.) neglecta</i>	124	168	68,2	84,0
<i>H. (C.) variabilis</i>	39	1	58,5	93,6
<i>H. (C.) aspersa</i>	32	2	61,6	93,6
<i>C. nemoralis</i>	40	4	57,5	93,6

CUADRO XVI

Resultados de los análisis coprológicos en los corderos  
experimentalmente infestados

Día p.i.	CORDEROS N.º				
	1 (*)	2	4	5	10
	N.º larvas	N.º larvas	N.º larvas	N.º larvas	N.º larvas
60	1	—	—	—	—
61	1	—	—	—	—
63	1	—	—	—	—
64-65	2	—	—	—	—
66	5	—	—	1	—
67-68	31	—	—	—	—
69	16	—	—	3	—
70	3	—	—	1	—
71	14	—	—	—	—
72	20	—	—	—	—
73	15	—	—	—	—
74-75	+	—	—	—	—
76	+	—	—	—	—
77	15	—	—	—	—
78	40	—	—	—	—
79	132	—	—	—	—
80	138	—	—	1	—
81-82	71	—	—	—	—
83	32	—	—	—	—
84-85	55	2	3	2	6
86	13	—	—	—	—
87	10	—	—	—	—
88-89	8	—	—	—	—
90	4	—	—	—	—
91	10	—	—	—	—
92	73	—	—	2	—
93	54	—	—	2	—
94	90	—	—	—	2
95-96	85	—	—	—	—
97	70	—	—	1	—
98	6	—	—	1	4

CUADRO XVI (cont.)

Día p.i.	1 (*)	2	4	5	10
	N.º larvas				
99	266	21	24	+	+
100	128	—	—	13	—
101	35	—	—	+	—
103 (*)	214	—	—	10	—
104	—	—	—	1	+
105	—	—	—	8	—
106	+	—	—	—	—
107	—	—	—	1	—
108	—	—	—	1	—
110	—	—	—	2	—
111	—	—	—	5	—
112	—	—	—	5	—
114	—	—	—	3	—
118	—	—	—	1	—
119	—	—	4	—	—
120	—	—	—	1	—
122	—	—	—	7	—
125	—	—	—	11	—
126	—	—	—	45	—
131 (**)	—	—	—	16	—

(+): Análisis cualitativo exclusivamente.

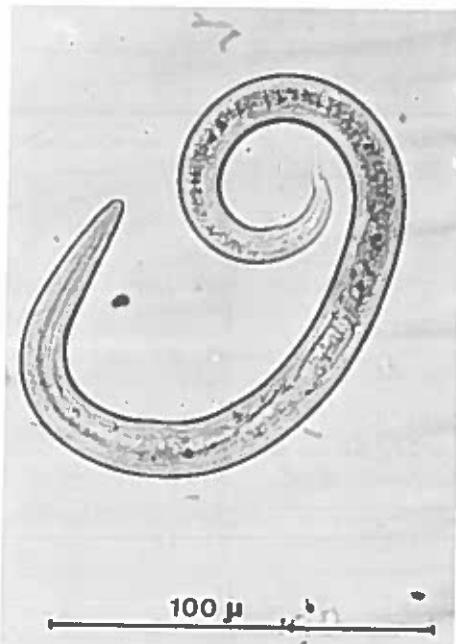
(\*): Sacrificado el 103º p.i.

(\*\*): Fin de la observación diaria. A los 8 meses todavía proseguía la eliminación.

—: Resultados coprológicos negativos.

CUADRO XVII  
Comparación de algunos datos métricos de *N. linearis*

Sexo	característica	ROSE y col. (1957)	ROSE (1961)	Observación personal
Macho	Longitud	5,5-6 mm	8 mm	5,7-9,5 mm
	Longitud del esófago	—	—	140-200 $\mu$
	Distancia poro excretor-extremo anterior	—	—	100-120 $\mu$
	Longitud de las espículas	360 $\mu$ 160-170 $\mu$	260 $\mu$ 120 $\mu$	330-380 $\mu$ 200 $\mu$
Hembra	Longitud	13-16 mm	14 mm	16,8-17,2 mm
	Distancia vulva-extremo posterior	—	90-150 $\mu$	170-200 $\mu$
	Distancia ano-extremo posterior	—	—	25-33 $\mu$



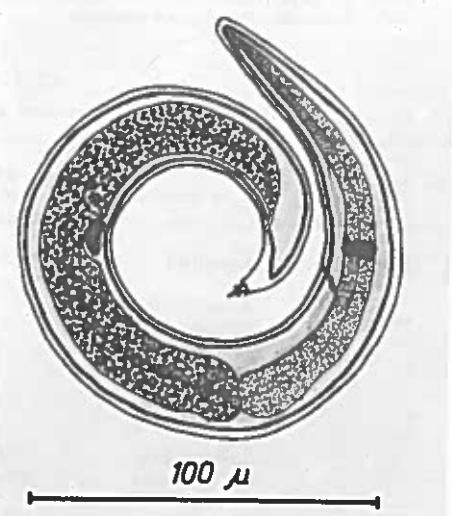
1. Fotomicrografía de la Larva I.



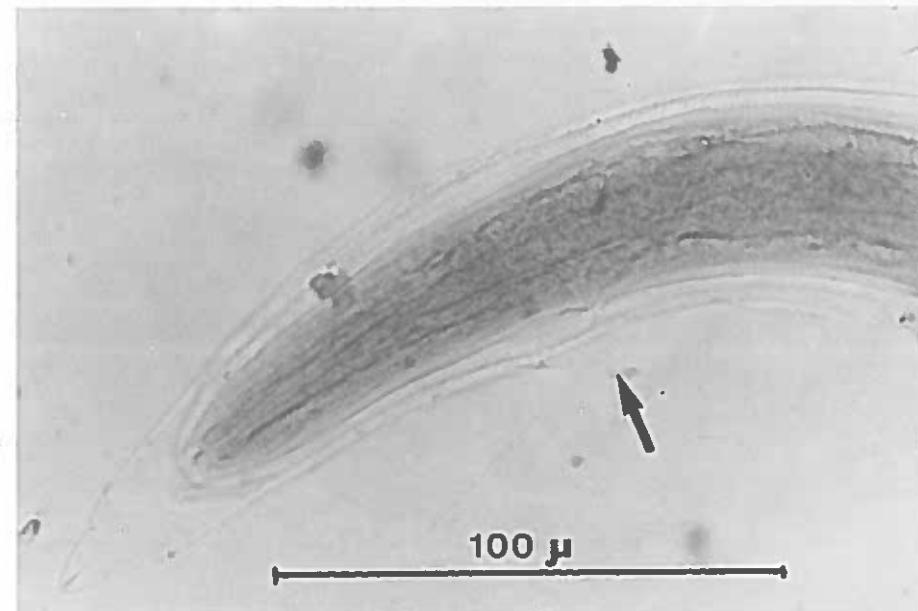
2. Dibujo de la Larva I, destacando su anatomía.



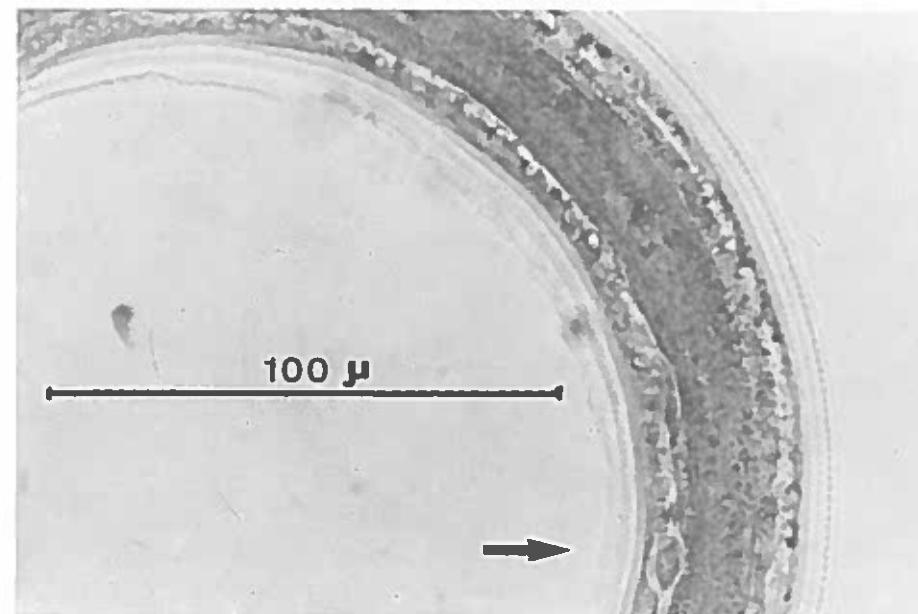
3. Fotomicrografía de la Larva II.



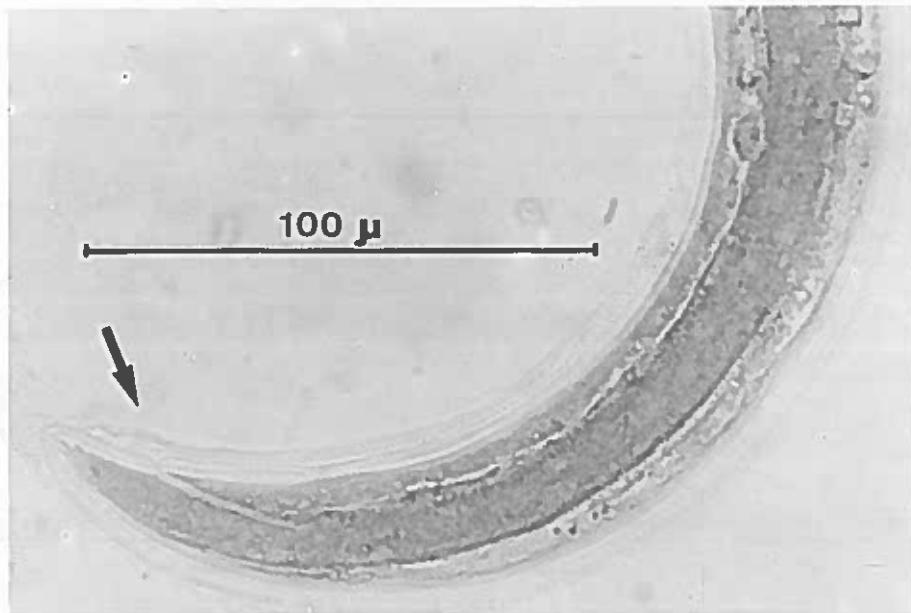
4. Dibujo de la Larva II, destacando su anatomía.



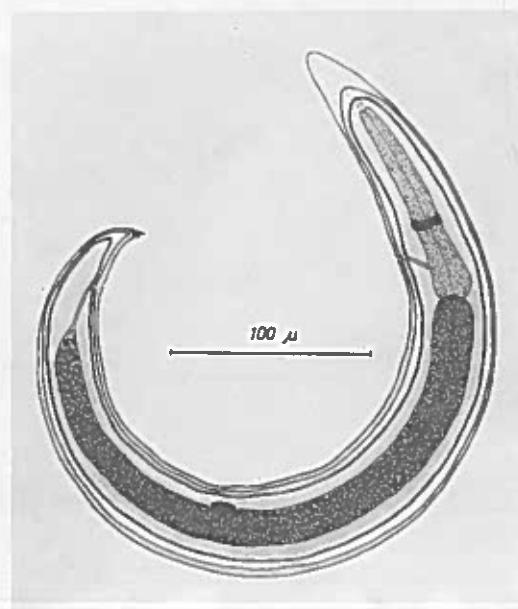
5. Fotomicrografía del extremo céfálico de la Larva III. La flecha señala el poro excretor.



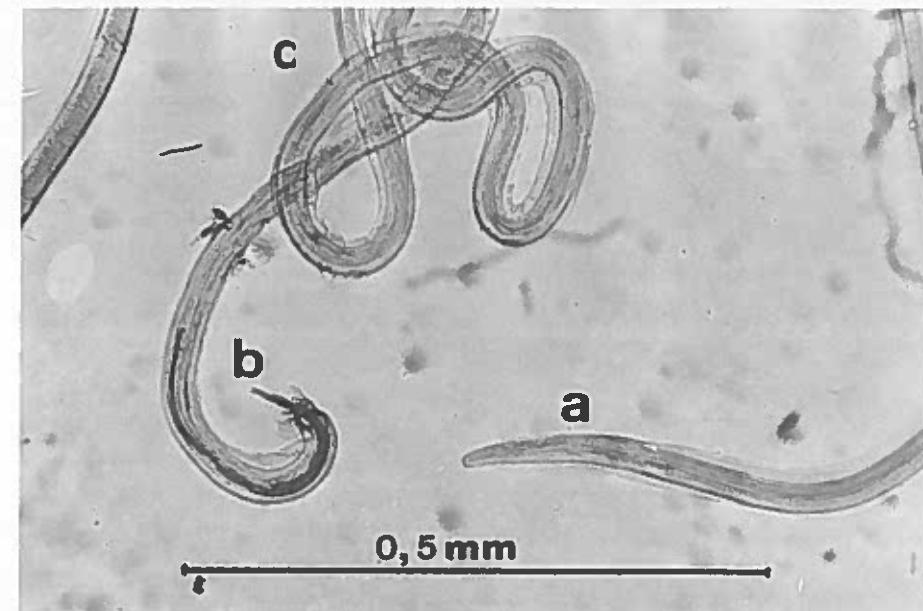
6. Fotomicrografía de la región central de la Larva III. La flecha señala el primordio genital.



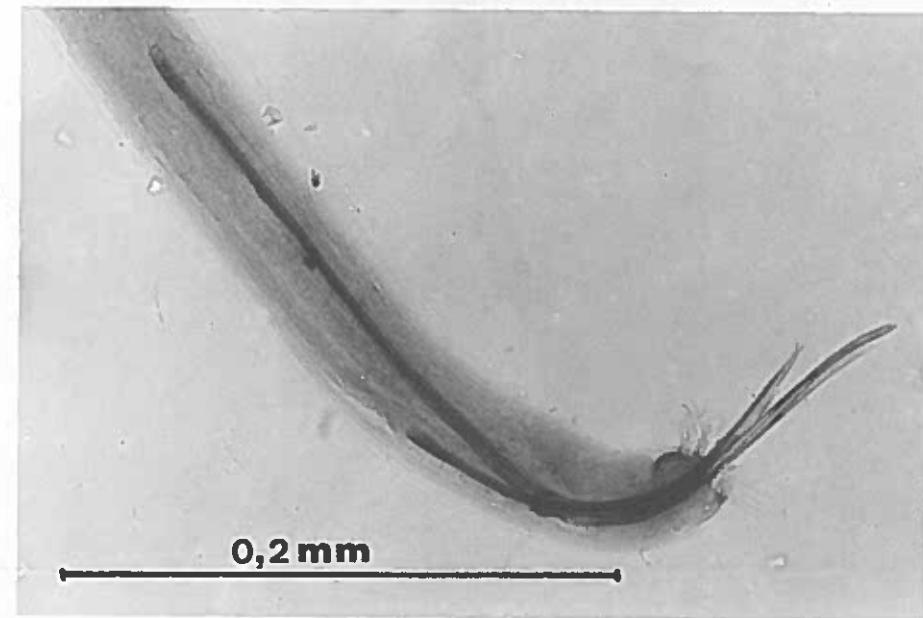
7. Fotomicrografía del extremo caudal de la Larva III. La flecha señala el ano.



8. Dibujo de la Larva III, destacando su anatomía.



9. Macho de *N. linearis*. Se observan los extremos cefálico (a) y caudal (b), y la zona media (c).



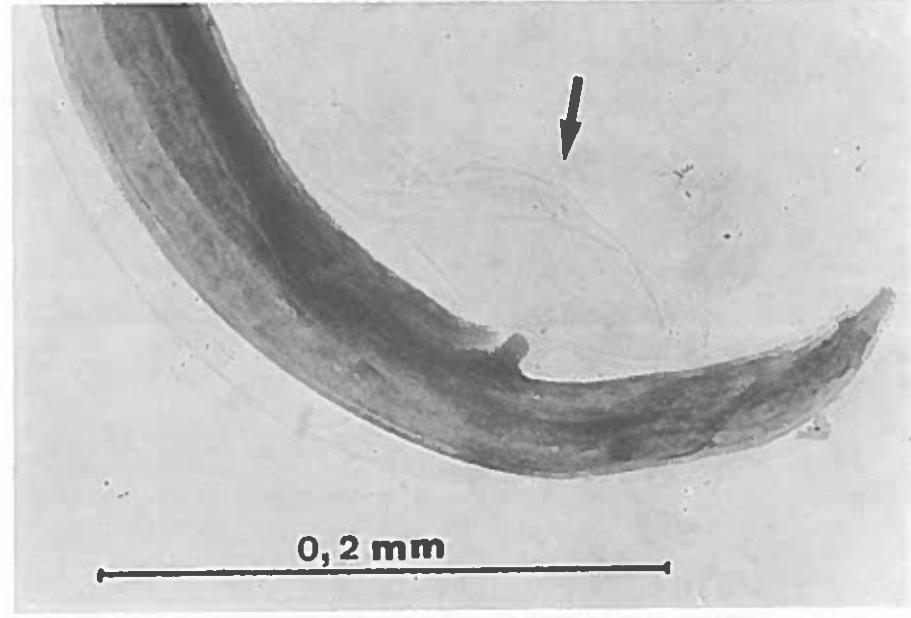
10. Macho de *N. linearis*. Extremo caudal, mostrando las espículas.



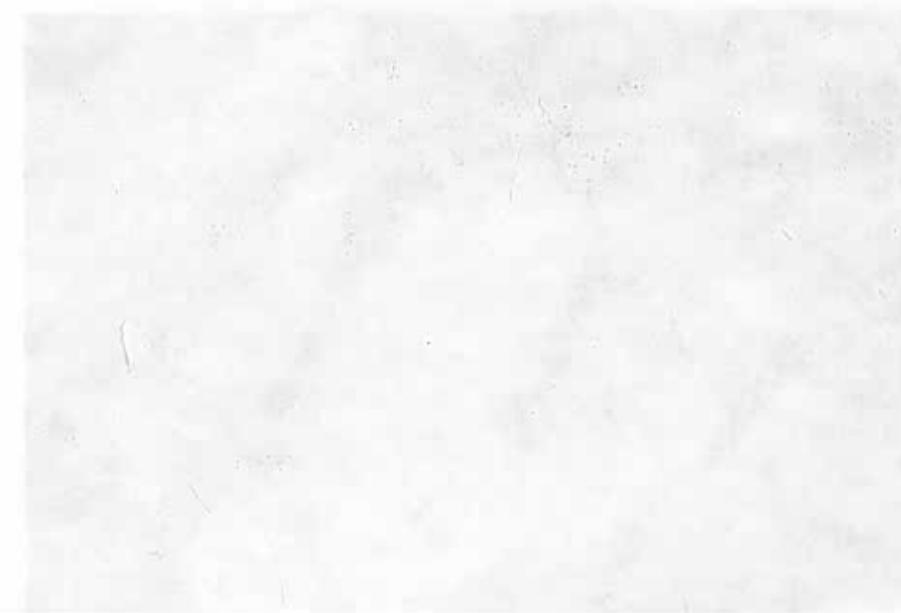
11. Macho de *N. linearis*. Extremo caudal, mostrando las espículas y la bolsa. (Con-  
traste de fases).

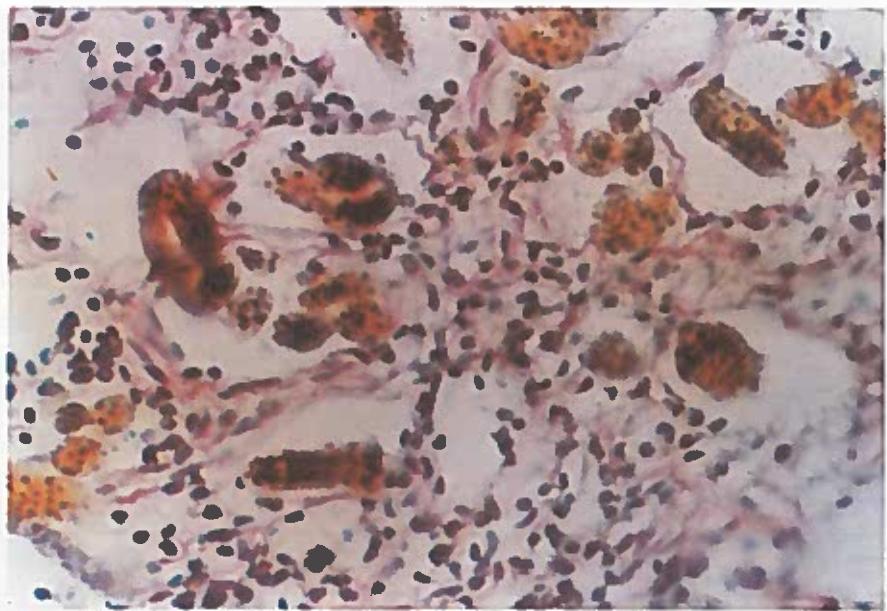


12. Hembra de *N. linearis*. Extremo caudal,  
mostrando la proctiger (flecha).

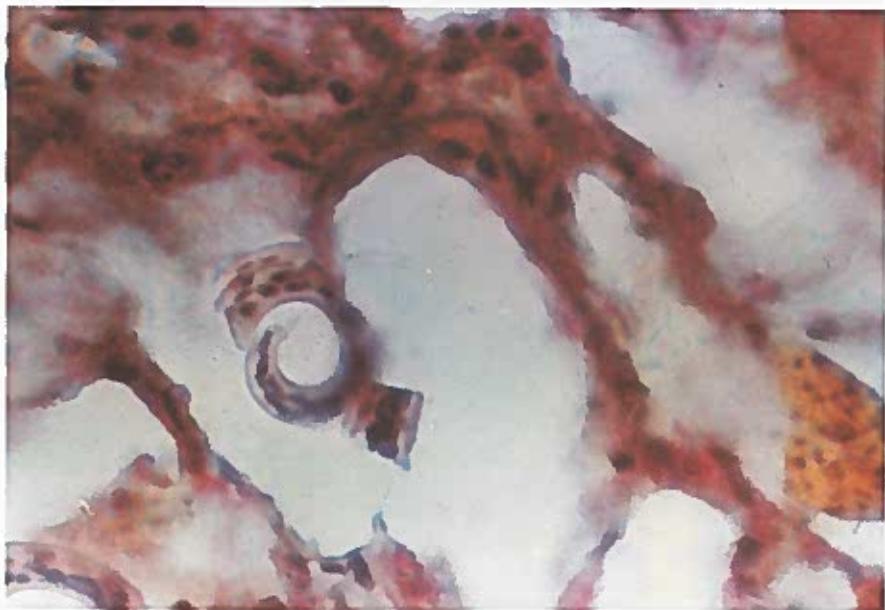


13. Hembra de *N. linearis*. Detalle de la proctiger (flecha).

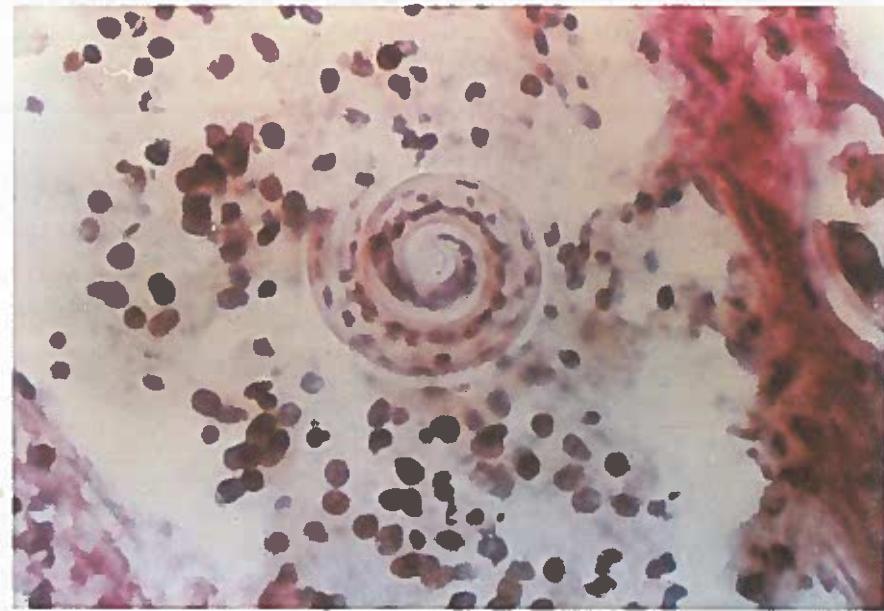




14. Corte de pulmón parasitado por *N. linearis* (tinción Van Gieson) 600X  
«Nódulos de cría», con huevos y larvas alojados en el interior de los alvéolos. Los tabiques interalveolares aparecen engrosados.



15. Corte de pulmón parasitado por *N. linearis* (tinción Van Gieson) 600 X.  
Larva I libre en el interior de un alvéolo.



16. Corte de pulmón parasitado por *N. linearis* (tinción Van Gieson) 600 X  
Larva I libre en el interior de un bronquiolo respiratorio, rodeada de células epiteliales desquamadas.



17. Corte de pulmón parasitado por *N. linearis* (tinción Van Gieson) 600 X  
Macho localizado en un alvéolo. El tabique interalveolar aparece engrosado, con gran cantidad de células mesenquimales (macrófagos, linfocitos y algún eosinófilo).