

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE *Fasciola hepatica* L., 1758

Por Miguel A. Díez Baños y
Francisco A. Rojo Vázquez

INTRODUCCION

La gran difusión de la fasciolosis y las pérdidas que causa esta enfermedad, junto con otros factores epizootiológicos y medidas de control, han sido ampliamente revisados en nuestro Departamento por CORDERO DEL CAMPILLO (1966), MARTÍNEZ FERNÁNDEZ (1971) y ROJO VÁZQUEZ (1973). La escasez de datos experimentales españoles, especialmente en lo que se refiere a los factores que influyen sobre los huevos del trematodo eliminados al exterior por los animales parasitados, nos han inclinado a estudiar las influencias térmicas sobre la primera fase evolutiva de *Fasciola hepatica*. Para ello, hemos realizado una serie de experiencias en condiciones de laboratorio, basadas en datos reales obtenidos en la zona de León, con objeto de poder determinar las épocas favorables y desfavorables para el desarrollo del ciclo biológico y, por tanto, los posibles períodos de riesgo de infestación de los animales.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Sobre la influencia de diversos factores en el ciclo biológico del trematodo responsable de la fasciolosis, se han ocupado, entre otros, ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960), PANTELOURIS (1965) y OLLERENSHAW (1974).

Entre los diversos factores que influyen decisivamente en el desarrollo de los huevos de *F. hepatica*, está la temperatura. Parece que las temperaturas por debajo de 0°C afectan al huevo, de manera que no resiste la congelación muriendo durante la estación fría del año. A -4°C, la muerte es gradual, y a -15°C se destruyen en dos días (OLLERENSHAW, 1974; BORCHET, 1964).

Las temperaturas comprendidas entre 0°C y 10°C inhiben el desarrollo, aunque los embriones permanecen viables algún tiempo a esas temperaturas (ROWCLIFFE y OLLERENSHAW, 1960).

Superados los 10°C, los huevos evolucionan normalmente. A medida que se incrementa la temperatura, se acorta el período necesario para la eclosión de los miracidios. Parece que las temperaturas óptimas para el desarrollo están comprendidas entre los 10°C y los 30°C. No obstante, cuando las temperaturas sobrepasan poco los 10°C, los períodos se prolongan considerablemente (PANTELORIS, 1965; SOULSBY, 1968; ROWCLIFFE y OLLERENSHAW, 1960).

A medida que la temperatura se acerca a los 20°C, la eclosión de los miracidios tiene lugar mucho más rápidamente. Los resultados de diversos investigadores, indican que las temperaturas óptimas para el desarrollo están alrededor de 25-27°C (ROWCLIFFE y OLLERENSHAW, op. cit.; PANTELORIS, op. cit.).

Por encima de 30°C, el desarrollo se inhibe nuevamente, siendo la capacidad inhibitoria de las altas temperaturas tal, que llega a destruir los embriones. En este sentido, parece que a 37°C los huevos tardan en morir unos 24 días, y que a 52,5°C la destrucción es rápida. Cuando las temperaturas moderadamente elevadas actúan sobre los huevos de *F. hepatica*, y posteriormente la incubación se realiza a temperaturas consideradas como óptimas, el tiempo necesario para la eclosión está directamente relacionado con el tiempo de permanencia a las altas temperaturas (ROWCLIFFE y OLLERENSHAW, ibíd.).

MATERIAL Y METODOS

Los huevos de *F. hepatica* se recogieron en el Matadero Municipal de León y procedían de vesículas biliares ovinas, correspondientes a hígados decomisados, afectados de fasciolosis.

Después de la extracción de los huevos, se procedía al lavado por sedimentaciones sucesivas en copas cónicas, cada 10-15 minutos, finalizando el proceso cuando el sobrenadante era transparente. El último sedimento, era centrifugado durante 2 minutos a 2.000 r.p.m., quedando así los huevos completamente limpios. Cuando la cantidad de partículas groseras era grande, el lavado se filtraba a través de una malla de 150 micrones de luz, debajo de la cual iba adosada otra de 50 micrones, que retenía los huevos. Después se procedía de igual manera. A continuación, tanto en un caso como en el otro, se realizaba el recuento de los huevos y finalmente se preparaban lotes de 10.000 huevos en 10 ml de agua artesiana. Por último, los lotes pasaban a estufas graduadas a diferentes temperaturas. Los recipientes eran de color topacio para evitar el efecto de la luz sobre los huevos.

A intervalos de tiempo previamente establecidos para cada temperatura, se realizaban análisis con el fin de observar el grado de evolución de los

huevos. Para ello, se homogeneizaba el líquido mediante agitación y se tomaban una cantidad suficiente para llenar una celdilla de una cámara McMaster. Se exponía a la luz para facilitar la eclosión, y se hacía el recuento.

Según las características de los huevos, los dividimos en los siguientes apartados:

1. Huevos degenerados, claramente rotos o con matriz poco densa e irregularmente repartida en su interior.
2. Huevos en «mórula».
3. Huevos con miracidio en su interior, y
4. Huevos eclosionados o en vías de eclosión.

En cada celdilla se contaban aproximadamente 100 huevos y se hallaba el porcentaje correspondiente. Cuando el número de huevos eclosionados iba acercándose al 50 %, los intervalos de tiempo entre recuentos, se acortaban. Por último, cuando el porcentaje era superior al 50 %, se consideraba como día de eclosión y se anotaban los resultados.

Incubación de los huevos

1. A temperaturas constantes.

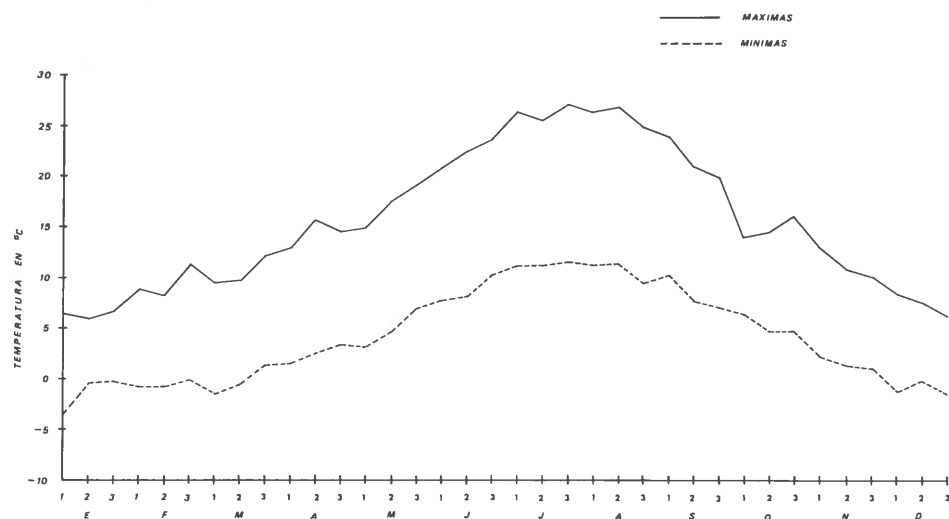
Para comprobar las temperaturas óptimas, máximas y mínimas para el desarrollo, se incubaron lotes a 10, 15, 18, 20, 25, 27, 30, 35, 37 y 40°C. Los análisis se realizaron a diferentes intervalos de tiempo, según la temperatura de incubación. Los lotes incubados a 10°C y a 15°C se examinaron cada 30 días; los incubados a 20°C se observaron cada 15 días; los dispuestos a 25°C cada 7 días; los de 27°C, cada 3 días; los de 30°C cada 2 días y por último, los incubados a 35°C, 37°C y 40°C, se observaron diariamente.

2. A diferentes temperaturas.

Con objeto de relacionar lo más estrechamente posible la realidad ambiental con las pruebas de laboratorio, se plantearon experiencias a diferentes temperaturas durante períodos determinados, sobre la base de los datos meteorológicos suministrados por el Centro de Observación de la Virgen del Camino (León). Con ellos, y confeccionando el correspondiente diagrama, observamos los meses en los que la temperatura sobrepasa los 10°C y las máximas y mínimas a lo largo de las cuatro estaciones del año. Estos datos aparecen reflejados en la Gráfica 1.

Los experimentos planteados fueron los siguientes:

- 2.1. Cuatro lotes de 3 frascos cada uno, a 4-5°C. El primer lote permaneció un mes a esa temperatura, al cabo del cual un frasco pasó a 15°C, otro a 20°C y otro a 27°C. El segundo, tercero y cuarto lotes, permanecieron 2, 3 y 4 meses respectivamente a 4-5°C, pasando al cabo de ese tiempo a las temperaturas citadas.
- 2.2. Un lote de 7 frascos a -15°C. Cada día, durante 7 consecutivos,



Gráfica 1.-Temperaturas medias durante 1971-75 en León.

cada frasco pasaba a 27°C, de manera que el primer trasco permaneció un día en el congelador, el segundo 2, y así sucesivamente.

- 2.3. Finalmente, se dispuso un lote de 7 frascos a 35°C, y como en el caso anterior, diariamente se traspasaba cada frasco a una estufa graduada a 27°C.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos aparecen expresados en las Gráficas 2, 3 y 4, y en los Cuadros I, II y III.

1. Desarrollo a temperaturas constantes.

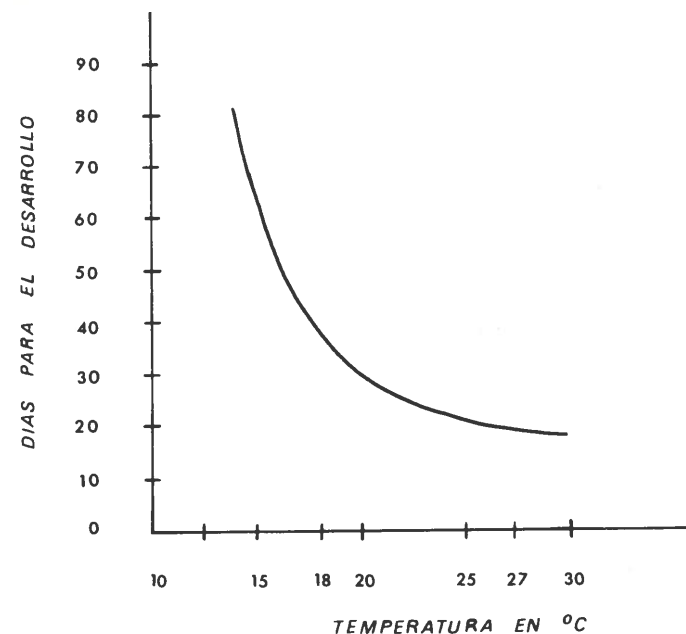
A 10°C los huevos no se desarrollaron. Sin embargo, a temperaturas superiores a 10°C, los huevos comenzaron su evolución. A 15°C tardaron 56 días en eclosionar. Cuando la incubación se realizó a 18°C, el período fue de 50 días.

Estos períodos se acortaron sensiblemente cuando los huevos se incubaron a 20°C ya que a los 27 días el 50 % de los huevos había eclosionado.

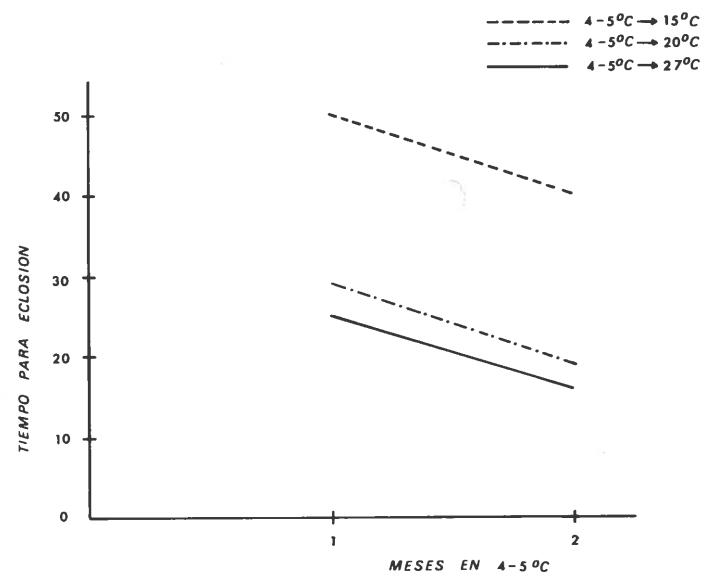
Sólo se necesitaron 17 días, cuando los lotes se incubaron a 25°C. Sin embargo, a 27°C nuevamente el tiempo se alargó, necesitándose 22 días para que los huevos eclosionaran.

A 30°C, el período necesario para la eclosión se acortó de nuevo y fue igual al requerido a la temperatura de 25°C; es decir, 17 días.

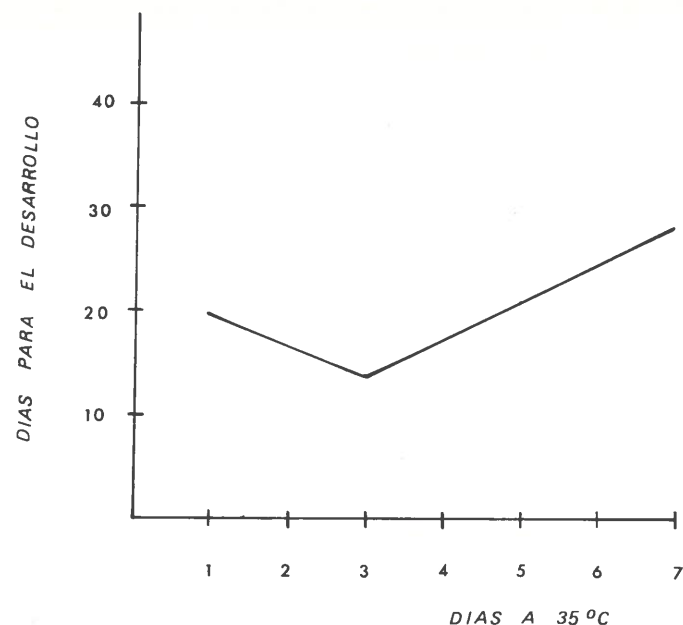
Por último, la incubación por encima de 30°C inhibió el desarrollo, ya que a 35, 37 y 40°C, ni siquiera se llegaron a formar los miracidios.



Gráfica 2.-Efecto de la temperatura sobre la duración del desarrollo.



Gráfica 3.-Efecto de la incubación a 4-5°C durante 1-2 meses, sobre el desarrollo (incubación posterior a 15, 20 y 27°C).



Gráfica 4.-Efecto de la incubación a 35°C y posteriormente a 27°C, sobre el desarrollo.

CUADRO I

Tiempo necesario para la eclosión, previa incubación a temperaturas constantes.

Temperatura °C	Tiempo en días
10	no hubo eclosión
15	56
18	50
20	27
25	17
27	22
30	17.5
35	no hubo eclosión
37	idem
40	idem

CUADRO II

Tiempo necesario para la eclosión previa incubación a temperaturas bajas (incubación posterior a 15, 20 y 27°C).

1.º Tratamiento tem / días	2.º Tratamiento	Tiempo en días
4-5°C / 30	15°C	50
idem	20°C	29
idem	27°C	25
4-5°C / 60	15°C	40
idem	20°C	19
idem	27°C	16

CUADRO III

Efecto de una temperatura inhibitoria durante 1-7 días sobre el desarrollo (incubación posterior a 27°C).

1º Tratamiento temp / días	2.º Tratamiento	Tiempo en días
35°C / 1	27°C	20
35°C / 2	idem	16
35°C / 3	idem	14
35°C / 4	idem	17
35°C / 5	idem	21
35°C / 6	idem	24
35°C / 7	idem	30

2. Desarrollo a temperaturas variables.

2.1. Incubación a 4-5°C durante 1-4 meses y posteriormente a 15°C, 20°C y 27°C.

Los huevos incubados durante 1 mes a 4-5°C y posteriormente a 15°C, tardaron 50 días en eclosionar. Sin embargo, cuando después de un mes de incubación a aquella temperatura pasaron a 20°C, el período fue más corto (29 días). Por último, al pasarlos a 27°C después de 30 días a 4-5°C se necesitaron 25 días para la eclosión.

Al mantener a 4-5°C durante dos meses e incubar después a 15, 20 y 27°C, los huevos se desarrollaron más rápidamente que en el experimento anterior. Así, al pasar a 15°C después de 2 meses a 4-5°C, la eclosión tuvo lugar a los 40 días, que bajaron a 19 al incubarlos a 20°C y a 16 días cuando la incubación se realizó a 27°C.

Los lotes que permanecieron 3 y 4 meses a 4-5°C estaban prácticamente degenerados. No obstante, a fin de comprobar su posible viabilidad, fueron incubados normalmente, colocándolos a las temperaturas ya previstas. A pesar de ello, no se observó desarrollo alguno.

2.2. Incubación a 35°C durante 1-7 días y posteriormente a 27°C.

Hasta los primeros cuatro días, cuanto más tiempo permanecieron a 35°C y posteriormente eran incubados a 27°C, el período de eclosión se fue acortando. En efecto, los huevos que se mantuvieron 1 día a 35°C tardaron 20 en eclosionar al colocarlos a 27°C. Cuando estuvieron 2 y 3 días a 35°C, la eclosión tuvo lugar a los 16 y 14 días respectivamente cuando se colocaron a 27°C. Sin embargo, como ya hemos señalado, al someterlos 4, 5, 6 y 7 días a 35°C e incubarlos después a 27°C, tardaron en eclosionar 17, 21, 24 y 30 días respectivamente.

2.3. Incubación a -15°C durante 1-7 días y posteriormente a 27°C.

Todos los huevos incubados a temperaturas de congelación aparecieron completamente destruidos, sin que se observara desarrollo alguno al pasarlos a 27°C.

DISCUSION

Los resultados que hemos obtenido concuerdan en algunos aspectos con los señalados por diferentes autores. Como hacen constar ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960), la temperatura influye sobre el desarrollo de los huevos de *F. hepatica* de dos formas: inhibiéndolo y permitiéndolo. Según los autores británicos, las temperaturas que permiten el desarrollo están comprendidas entre 10°C y 30°C. Nosotros hemos obtenido resultados semejantes (Cuadro I).

Cuando los huevos se incuban a temperaturas superiores a 10°C, los períodos de tiempo para que se produzca la eclosión no son, sin embargo, los mismos que los que señalan los mencionados investigadores, que han estudiado el efecto a temperaturas semejantes a las nuestras. En sus experiencias la eclosión se produce a los 40 días cuando los huevos se incuban a 15°C; en 27 días a 18°C; en 20 días a 20°C; en 11 días a 25°C y en 10 días a 27°C. En nuestro trabajo, los períodos son más largos: 56, 50, 27, 17 y 22 días respectivamente, y concuerdan, en cierta media, con los plazos que apunta SOULSBY (op. cit.). Asimismo, los resultados de JEPPE (1933) cit. por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (op. cit.), son más parecidos a los nuestros, ya que en sus experiencias los huevos necesitan entre 45 y 50 días para eclosionar a 16°C, y entre 15 y 21 días cuando la incubación tiene lugar a 25°C. También los plazos que indica PANTELOURIS (ibíd.), y los nuestros concuerdan.

Si bien se considera como temperatura óptima la de 27°C (ROWCLIFFE y OLLERENSHAW, op. cit.), nuestros resultados se acercan más a las investigaciones de THOMAS (1883) cit., por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (ibíd.), quien señala como temperaturas óptimas las comprendidas entre 23 y 26°C. Según nuestras experiencias, la temperatura idónea es de 25°C (Cuadro I), pues a pesar de que también a 30°C el período fue casi idéntico, el porcentaje de huevos degenerados fue mayor a esta última temperatura.

De todas formas, existen muchos factores que influyen además de la

temperatura y la humedad. En este sentido, parece que el desarrollo de los huevos se ve influido por el tipo de agua en que se encuentran (BORCHERT, 1964). Esta puede ser una de las causas de la prolongación de los períodos de eclosión que hemos obtenido en nuestro trabajo, en comparación con los datos de ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (ibíd.), pues nosotros hemos utilizado agua artesiana, mientras que ellos utilizaron agua de grifo.

Exceptuando la experiencia realizada a 27°C, observamos que, a medida que aumenta la temperatura disminuye el tiempo necesario para la eclosión. Cuando la temperatura es superior a 30°C, el desarrollo se inhibe gradualmente. Cuando hemos incubado a 35°C, de 1-7 días y más tarde a 27°C, hemos observado, que el tiempo necesario para la eclosión está directamente relacionado con el de permanencia a la primera temperatura, lo que indica el poder inhibitorio de las temperaturas altas. Estas mismas observaciones hacen constar ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (op. cit.). No obstante, este último fenómeno sólo se comprobó a partir del tercer día de tratamiento a 35°C, lo que demuestra que los 3 primeros días de incubación no afectan a la viabilidad de los huevos.

Aunque por debajo de 10°C se inhibe la evolución, cuando se incuban los huevos después de haber permanecido a 4-5°C, a temperaturas no inhibitorias, el desarrollo prosigue, como indica también SOULSBY (1965). En nuestro trabajo, los períodos incluso se acortaron en relación con los obtenidos a temperaturas constantes (Cuadro I).

Finalmente, los experimentos a temperaturas inferiores a 0°C (-15°C) durante cortos períodos de tiempo, demuestran que la congelación aunque sea muy corta afecta de manera decisiva a la vitalidad del embrión (Cuadro III). OLLERENSHAW (1974) también señala el efecto negativo de la congelación.

Nuestros resultados demuestran que, durante los meses de invierno, en los que la temperatura no sobrepasa los 10°C, los huevos no tienen posibilidad de desarrollo y la mayoría mueren, ya que son lavados por la lluvia y el viento actúa desecándolos. Estos meses, en los alrededores de León son noviembre, diciembre, enero y febrero, durante los cuales la máxima no sobrepasa nunca los 10°C y la mínima está por debajo de 0°C (entre 0°C y -5°C) (Gráfica 1). Por esta razón, durante la estación invernal no se puede producir la infestación de los hospedadores intermediarios, rompiéndose el ciclo de *F. hepatica*. En cierta medida, podemos concluir con ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (ibíd.) que los dos factores necesarios para la evolución de los huevos del trematodo son antagónicos, pues durante el invierno, con suficiente humedad, las temperaturas son inhibitorias; por otra parte, en el verano, aunque la temperatura permite el desarrollo, la falta de humedad actúa de inhibitorio.

Sin embargo, los meses que comprenden las estaciones de primavera y otoño ofrecen una combinación casi óptima para que el ciclo biológico continúe. Así, durante marzo y abril, los huevos pueden desarrollarse, aunque lentamente, eclosionando aproximadamente en junio e infestando los miraci-

dios a los moluscos, en los que el desarrollo se prolonga prácticamente hasta septiembre, que es cuando se eliminan las cercarias. Durante mayo y octubre, la evolución tarda en concluir 40 días, de manera que, en el primer caso se produce la eclosión entre junio y julio, transcurriendo la segunda parte de forma idéntica al caso anterior. Cuando los huevos son eliminados en octubre, ocurre la eclosión de algunos (la mayoría mueren) entre noviembre y diciembre, época desfavorable tanto para la vida del miracidio como para la del hospedador intermediario. Por ello, el ciclo no continúa.

Los huevos de *F. hepatica* eliminados en junio y septiembre siguen un desarrollo semejante a los anteriores. En junio, la temperatura permite que la evolución se complete en un mes aproximadamente, infestándose los caracoles que eliminan las cercarias en septiembre. En septiembre, también las condiciones térmicas permiten la eclosión de los miracidios en un plazo de 30 días y, por tanto, o no se produce la infestación de los caracoles por empezar estos la invernación, o si aquella ocurre, las cercarias no se eliminarán hasta el año siguiente (aproximadamente en marzo).

Durante los meses más calurosos del año, la falta de humedad no favorece la evolución a pesar de las altas temperaturas; en caso favorable, en julio los huevos se desarrollan en 20 días estando en condiciones de infestar a las limneas en agosto y eliminándose las primeras cercarias entre septiembre y octubre. Por último, los años muy húmedos durante el verano, pueden permitir que durante el mes de agosto los huevos evolucionen, aunque las probabilidades de que los miracidios infesten a los caracoles son muy escasas.

Por todo ello, teniendo en cuenta la climatología de la zona de León, prácticamente la única posibilidad de infestación de los hospedadores definitivos es el otoño, concretamente entre los meses de septiembre y octubre, aunque ocasionalmente también a primeros de noviembre. Parecidas circunstancias han sido señaladas para otros países por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (ibíd.) y BORCHERT (ibíd.), entre otros.

RESUMEN

Con objeto de comprobar el efecto de la temperatura, en condiciones de laboratorio, sobre el desarrollo de los huevos de *F. hepatica*, se estudian diferentes temperaturas constantes y variables, durante períodos determinados. Por debajo de 10°C no hay desarrollo y por encima de 30°C tampoco. A medida que aumenta la temperatura el desarrollo se acorta, hasta un cierto límite (30°C). Los resultados obtenidos se discuten con los de otros investigadores, y se intentan aplicar a las circunstancias reales de la zona de León.

RÉSUMÉ

Pour déterminer l'effet de la température, dans les conditions de laboratoire, sous le développement des oeufs de *F. hepatica*, on a étudié différentes températures constantes et variables, pendant quelques périodes. Au dessous de 10°C et par dessus de 30°C il n'y a pas développement. Généralement, quand la température augmente le développement est plus bref, jusqu'à 30°C. Les résultats sont discutés avec les travaux d'autres auteurs et on essaye d'appliquer à les conditions réelles de la zone de León.

SUMMARY

The effect of temperature on the development of the eggs of *F. hepatica* has been studied under controlled conditions. The experiments were carried out at different constant and variable temperatures. The eggs do not develop when put between 0°C and 10°C. Temperatures above 30°C inhibit the development, too. In general the higher the temperature the shorter the time taken for the eggs to reach the hatching stage. The results are discussed and the authors attempt to apply them to the climatic feature in the León área.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer al Prof. Dr. M. Cordero del Campillo, jefe del Departamento de Patología Infecciosa y Parasitaria; a don Pablo Díez Baños, profesor Ayudante del mismo Departamento; al señor Magaz, jefe de la Oficina Meteorológica de la Virgen del Camino (León), y a los señores veterinarios del Matadero Municipal de León, su inestimable colaboración.

BIBLIOGRAFIA

- BORCHERT, A. (1964).—*Parasitología veterinaria*. Ed. Acribía, Zaragoza.
 CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1966).—*Avigán*, **165**: 7.
 JEPPI, M. W. (1933).—*Nature*, London, **132**: 171. Cit. por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960).
 MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. (1971).—Separata de la revista *Granja*, pp: 45-73.
 OLLERENSHAW, C. B. (1974).—*Symp. Br. Soc. Parasit.*, **12**: 33.
 PANTELOURIS, E. M. (1965).—*The common liver fluke Fasciola hepatica* L. Pergamon Press, Oxford.
 ROJO VÁZQUEZ, F. A. (1973).—*Col. Of. Vet. León, II Jor. periód. Est. Vet.*: 9.
 ROWCLIFFE, S. A. y OLLERENSHAW, C. B. (1960).—*Ann. Trop. Med. & Parasit.*, **54**: 172.
 SOULSBY, E. J. (1965).—*Textbook of Veterinary clinical Parasitology*. Blackwell Scientific Pub., Oxford.
 SOULSBY, E. J. (1968).—*Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated Animals*. Baillière, Tindall & Cassell, London.
 THOMAS, A. (1883).—*Quart. J. Micr. Sci.*, **23**: 99. Cit. por ROWCLIFFE y OLLERENSHAW (1960).