



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL (SANIDAD ANIMAL)

ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE LA DICROCELIOSIS

**Memoria que para optar al grado de
Doctor en Veterinaria presenta:**

RAQUEL CAMPO SANTANA

León, 26 de Enero de 1996

Doña **M^a YOLANDA MANGA GONZÁLEZ**, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Jefe del Departamento de Sistemas de Producción y Sanidad Animal de la Estación Agrícola Experimental, CSIC, León,

CERTIFICA Que el trabajo titulado "Estudios experimentales sobre la dicroceliosis", presentado por la Licenciada en Veterinaria Doña RAQUEL CAMPO SANTANA para optar al grado de Doctor en Veterinaria, se ha realizado bajo su dirección en el Centro de Investigación anteriormente mencionado y, a su juicio, reúne las condiciones legales exigidas para la obtención de dicho grado.

Y para que conste, firma el presente certificado en León, a veintiseis de Enero de mil novecientos noventa y seis.

M^a Yolanda Manga González

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación recibida, por una parte, de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), a través del Proyecto de Investigación de referencia AGF92-0588 y, por otra, del Ministerio de Educación y Ciencia Español y "The British Council", mediante los Proyectos de Cooperación Científica Hispano-Británica números 1990 HB 171A y 1991 HB 199A.

La autora ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador que le fue concedida por CAJA ESPAÑA, en virtud del Convenio de Cooperación entre dicha entidad y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

A mis padres y hermano

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	13
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	15
1.- INTRODUCCIÓN	17
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.- Posición taxonómica de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	21
2.2.- Ciclo biológico de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	21
2.3.- Investigaciones realizadas en hospedadores definitivos infectados con <i>dicrocoelium dendriticum</i>	28
2.3.1.- Dosis infectante de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	28
2.3.2.- Ruta migratoria seguida por las metacercarias de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	37
2.3.3.- Parámetros hemáticos, bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas en la dicroceliosis	38
2.3.4.- Período de prepatencia de la dicroceliosis.....	45
2.3.5.- Huevos de <i>dicrocoelium dendriticum</i> en las heces y en la vesícula biliar. Carga parasitaria.....	48
2.3.6.- Dosis de metacercarias de <i>dicrocoelium dendriticum</i> administradas y vermes recuperados	51
2.3.7.- Estudio morfológico de los huevos y de los adultos de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	51
2.3.8.- Alteraciones morfológicas en la dicroceliosis	55
2.3.9.- Peso corporal de los animales infectados con <i>dicrocoelium dendriticum</i>	61
2.4.- Investigaciones experimentales en moluscos, primeros hospedadores intermediarios de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	61
2.5.- Investigaciones realizadas en los formicidos, segundos hospedadores intermediarios de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	66
2.6.- Estudio isoenzimático de adultos, fases larvarias y hospedadores intermediarios de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	73

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
3.1.- Técnica de isoelectroenfoque.....	76
3.1.1.- Etapas de desarrollo de la técnica.....	76
3.1.1.1.- Enzimas estudiadas.....	76
3.1.1.2.- Procesado del material.....	76
3.1.1.3.- Equipamiento.....	76
3.1.1.4.- Preparación y utilización de los geles.....	77
3.1.1.5.- Establecimiento de los modelos isoenzimáticos.....	78
3.2.- Estudio en los formícidos.....	78
3.2.1.- Recolección de las hormigas halladas en el campo en fase de tetania....	78
3.2.2.- Mantenimiento de las hormigas en el laboratorio.....	78
3.2.3.- Obtención y recuento de las metacercarias de las hormigas infectadas..	79
3.2.4.- Estudio de las metacercarias.....	80
3.2.4.1.- Morfológico.....	80
3.2.4.2.- Isoenzimático.....	80
3.3.- Estudio en el ganado ovino.....	81
3.3.1.- Manejo de los animales previo a la infección.....	81
3.3.2.- Infección experimental de los corderos.....	81
3.3.3.- Condiciones de mantenimiento y control de los animales después de la infección.....	83
3.3.4.- Toma de muestras de sangre.....	83
3.3.5.- Procesado de las muestras de sangre.....	83
3.3.5.1.- Determinación de los niveles séricos de enzimas marcadoras hepáticas y otros parámetros bioquímicos.....	83
3.3.5.2.- Estudio de parámetros hemáticos.....	84
3.3.6.- Toma de muestras de heces.....	85
3.3.7.- Realización de análisis coprológicos para la detección y posterior recuento de huevos de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	85
3.3.8.- Sacrificio y necropsia de los animales.....	86
3.3.8.1.- Estudio macroscópico.....	86
3.3.8.2.- Recuento de vermes de <i>dicrocoelium dendriticum</i> obtenidos de hígado y vesícula biliar.....	87
3.3.9.- Estudio de los adultos de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	87
3.3.9.1.- Morfológico.....	87
3.3.9.2.- Isoenzimático.....	87
3.3.10.- Estudio histopatológico.....	90
3.3.10.1.- Obtención y fijación de las muestras.....	90
3.3.10.2.- Obtención de los cortes para el estudio estructural y ultraestructural.....	90
3.3.10.3.- Técnicas de coloración.....	91
3.3.10.4.- Observaciones histológicas y ultraestructurales.....	91
3.3.10.5.- Técnicas de fotografía.....	91
3.4.- Estudio en los moluscos.....	92
3.4.1.- Seguimiento larvario de <i>dicrocoelium dendriticum</i> en ejemplares de <i>cernuella (xeromagna) cespitum arigonis</i> infectados experimental- mente.....	92
3.4.2.- Estudio isoenzimático para la caracterización de las fases larvarias del parásito y su detección en los moluscos.....	95

3.5.- Análisis estadísticos de los datos obtenidos	97
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
4.1.- Estudio en los formícidos.....	101
4.1.1.- Hormigas recolectadas y diseccionadas.....	101
4.1.2.- Morfología de las metacercarias de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	103
4.1.3.- Estudio isoenzimático de las metacercarias de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	107
4.2.- Estudio en el ganado ovino.....	111
4.2.1.- Niveles séricos de enzimas marcadoras hepáticas y otros parámetros bioquímicos en la dicroceliosis.....	111
4.2.1.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias	111
4.2.1.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias	116
4.2.1.3.- Todos los animales infectados	121
4.2.2.- Parámetros hemáticos en la dicroceliosis.....	130
4.2.2.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias	130
4.2.2.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias	136
4.2.2.3.- Todos los animales infectados	144
4.2.3.- Análisis coprológicos.....	156
4.2.3.1.- Todos los animales infectados con <i>d. Dendriticum</i>	156
4.2.3.2.- Animales infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias	159
4.2.3.3.- Todos los animales infectados: días post-infección.....	161
4.2.3.4.- Todos los animales infectados: época de sacrificio	161
4.2.4.- Vermes de <i>dicrocoelium dendriticum</i> en hígado y vesícula biliar.....	170
4.2.4.1.- Tamaño y grado de maduración de los vermes	174
4.2.4.2.- Estudio isoenzimático de los vermes	176
4.2.5.- Relación entre la eliminación de huevos de <i>dicrocoelium dendriticum</i> con las heces y la carga parasitaria.....	185
4.2.6.- Relación entre enzimas marcadoras hepáticas, parámetros hemáticos, eliminación de huevos y carga parasitaria en la dicroceliosis.....	191
4.2.7.- Valoración morfológica en la dicroceliosis.....	210
4.2.7.1.- Estudio macroscópico	210
4.2.7.1.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias.....	210
4.2.7.1.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias.....	212
4.2.7.2.- Estudio estructural.....	217
4.2.7.2.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias y sacrificados a los 2 meses post-infección.....	217
4.2.7.2.2.- Animales infectados con 1.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses post-infección.....	221
4.2.7.2.3.- Animales infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 2 meses post-infección.....	225
4.2.7.2.4.- Animales infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses post-infección.....	233
4.2.7.3.- Estudio ultraestructural	239
4.2.8.- Valoración del peso de los corderos	253
4.3.- Estudio en los moluscos	261
4.3.1.- Desarrollo larvario de <i>dicrocoelium dendriticum</i> en la especie <i>cernuella (xeromagna) cespitum arigonis</i> infectada experimentalmente.....	261

4.3.2.- Estudio isoenzimático para la caracterización de las fases larvarias del parásito y su detección en los moluscos.....	275
4.3.2.1.- Caracterización enzimática de esporocistos secundarios de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> y de moluscos hospedadores intermediarios.....	275
4.3.2.2.- Detección de <i>Dicrocoelium dendriticum</i> , en distintos días p.i., en ejemplares de <i>Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis</i> infectados experimentalmente.....	280
4.3.3.- Relación entre los modelos isoenzimáticos observados en los esporocistos, las metacercarias y los adultos de <i>dicrocoelium dendriticum</i>	285
5.- CONCLUSIONES.....	289
6.- RESUMEN.....	293
7.- SUMMARY.....	297
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	301
9.- ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y LÁMINAS	325
9.1.- Índice de cuadros	325
9.2.- Índice de figuras	328
9.3.- Índice de láminas	329

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. M^a Yolanda Manga González, directora de esta tesis, por todo lo que de ella he aprendido —no sólo de Parasitología— en estos años. Asimismo, por su constante asesoramiento y participación durante el desarrollo de las investigaciones y en la fase de elaboración, redacción y revisión de esta memoria.

A la Dra. M^a Camino González Lanza, miembro del equipo de Parasitología del CSIC (León), por su colaboración durante el desarrollo de algunas partes de este trabajo.

A la Dra. M^a del Carmen Ferreras, de la Universidad de León, por su inconmensurable ayuda al encargarse de la realización de las investigaciones histológicas y anatomopatológicas.

Al Dr. David Rollinson y a todo su equipo del "Natural History Museum" de Londres, por su colaboración en los estudios isoenzimáticos y por su hospitalidad durante nuestras estancias en Gran Bretaña.

Al Dr. Xavier Espadaler, de la Universidad de Bellaterra de Barcelona, por la determinación específica de las hormigas y por su ayuda en el descubrimiento de los primeros ejemplares en fase de tetania.

Al Dr. Javier González, de la Universidad de León, por su ayuda en la interpretación de los resultados referentes a las enzimas hepáticas, parámetros bioquímicos y hemáticos.

A los Drs. José Fernández Revuelta, del CSIC y Joaquín Uriarte, del SIA (Zaragoza), por su asesoramiento en algunos de los tratamientos estadísticos aplicados.

A Carmen Espiniella, M^a Luz Carcedo y M^a Paz del Pozo, miembros del equipo de Parasitología del CSIC, que, en numerosas ocasiones, me ayudaron en la parte técnica de este trabajo.

A todo el personal de la finca experimental del CSIC, en especial a Pedro Díez, Laudelino Pérez, Herminio Fidalgo y Avelino Merino, por su ayuda durante el manejo, la toma de muestras y el sacrificio de los corderos.

A la Dra. M^a Jesús Moro y a todo su equipo, del Servicio de Hematología del Complejo Hospitalario de León ("Virgen Blanca"), por la realización de los análisis de algunos parámetros hemáticos.

A Marisa Cordero, del CSIC, por su participación en el mecanografiado del texto y de los cuadros.

A las Dras. de la Universidad de León, Natividad Díez, por su participación en la toma de muestras de los corderos, y M^a José García, por su colaboración en las investigaciones histológicas y anatomopatológicas.

Al Dr. Antonio Ortiz, de la Universidad de Murcia, por su ayuda en la puesta a punto de la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.

A Nuria Fernández y Alicia Fernández, contratadas por el INEM, quienes colaboraron en este trabajo durante su estancia en la Estación Agrícola Experimental.

A Graciano Ramos y José Francisco González, del CSIC y al Dr. Juan Pablo Barrio, de la Universidad de León, por resolverme algunas dudas en el ordenador.

Al Prof. Quiroz, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su amistad y por los acertados consejos y palabras de ánimo que de él recibí, durante todo el tiempo que estuvo entre nosotros.

A Hilda Sandoval y Ana López, del CSIC, por su amistad y compañerismo en estos años.

A todo el personal de la Estación Agrícola Experimental (CSIC), que de una forma u otra me apoyó.

A Ignacio y a mi hermano, por su generosa ayuda en la recolección y disección de las hormigas y por su continuo apoyo y cercanía, a pesar de la distancia. Gracias a ellos esta época de mi vida ha sido más tolerable.

A mis compañeros de piso y a todos mis amigos que, por su proximidad, "han padecido" mis cambios de humor.

A mis padres quienes, aún sin entenderlo muy bien, siempre me han apoyado.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AcP: Fosfatasa ácida.

AK: Adenilato kinasa.

ALB: Albúmina.

-GPDH: -glicerofosfato deshidrogenasa.

ALP: Alkaline phosphatase.

ALT, ALAT o GPT: Alanino amino-transferasa o glutámico pirúvico transferasa.

AST, ASAT o GOT: Aspartato amino-transferasa o glutámico oxalacetato transferasa.

BIL: Bilirrubina.

CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

Ecl.: Eclosionados.

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético.

Elim.: Eliminación.

E.S.: Error estándar.

EST: Esterasa.

Exam.: Examinados.

FA: Fosfatasa alcalina.

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

GLDH: Glutamato deshidrogenasa.

GLU: Glucosa.

GPI: Glucosa fosfato isomerasa.

G6PDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

HBDH: Hidroxibutirato deshidrogenasa.

H.e.: Huevos eclosionados.

H-E: Hematoxilina-eosina.

HK: Hexokinasa.

HPG: Huevos por gramo.

Inf.: Infectados.

LAP: Leucina aminopeptidasa.

LDH: Lactato deshidrogenasa o láctico deshidrogenasa.

m: Mínimo.

M: Máximo.

MCH: Mean corpuscular haemoglobin.

MCHC: Mean corpuscular haemoglobin concentration.

MCV: Mean corpuscular volumen.

MDH: Malato deshidrogenasa.

Paras.: Parasitados.

PAS: Ácido peryódico de Schiff.

P.I.: Post-infección.

PGM: Fosfoglucomutasa.

PROT: Proteínas totales.

6PGD: 6 Fosfogluconato deshidrogenasa.

RE: Retículo endoplásmico.

REL: Retículo endoplásmico liso.

REG: Retículo endoplásmico granular.

SDH: Sorbitol deshidrogenasa.

TEMED: N, N, N', N' - Tetramethylethylenidiamin.

Test.: Testigos.

VCM: Volumen corpuscular medio.

x: Media.

1.- INTRODUCCIÓN

La dicroceliosis es una parasitosis muy frecuente en el ganado ovino y bovino de Europa, Asia y América del Norte (SOULSBY, 1968) y es *Dicrocoelium dendriticum* (RUDOLPHI, 1819) LOOSS, 1899 (Digenea) la especie responsable en nuestro país.

El ciclo vital de este parásito es extraordinariamente complejo, pues en él intervienen una amplia gama de moluscos terrestres y de hormigas que actúan como primeros y segundos hospedadores intermediarios, respectivamente (TARRY, 1969; JONLIJA *et al.*, 1972; PARASCHIVESCU, 1981a; MANGA, 1983; entre otros).

La importancia económica y sanitaria de la dicroceliosis se debe, por una parte, a las pérdidas directas ocasionadas por el decomiso de hígados alterados (DEL RIO, 1967; LUKIN, 1980; KARANFILOVSKI, 1983) y, por otra, a las indirectas causadas por los trastornos digestivos derivados de las alteraciones hepatobiliares que provocan dichos parásitos, tales como disminución del peso de los animales (BORAY, 1985), retraso en el crecimiento (HOHORST & LÄMMLER, 1962), reducción de la producción de leche (CAVANI *et al.*, 1982), entre otras. Además, hay que tener en cuenta los costes adicionales originados por la aplicación de tratamientos antihelmínticos a que deben ser sometidos los animales.

Sin embargo, todavía es escasa la información existente sobre las alteraciones patológicas provocadas por este parásito en condiciones experimentales, lo que hace difícil valorar las repercusiones económicas. En términos generales se sabe que, en los hospedadores definitivos, *D. dendriticum* produce un efecto irritativo sobre la mucosa de los grandes conductos biliares, que explicaría la proliferación e incremento en la secreción de las células glandulares, además de colangitis y colangiectasia, y en estados avanzados de la infección, cirrosis biliar y degeneración celular (DHAR & SINGH, 1963b; BOCH & SUPPERER, 1982; WOLFF *et al.*, 1984; ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991). En dichos hospedadores, este parásito causa endurecimiento del hígado (MAPES, 1951; KRULL & MAPES, 1952a), engrosamiento y dilatación de los conductos biliares (MASSOUD, 1981; CAMPO *et al.*, 1994) y moderada distensión de la vesícula biliar (DHAR & SINGH, 1963b).

Tampoco son demasiado abundantes los trabajos, en condiciones experimentales, sobre parámetros bioquímicos y hemáticos que indican alteraciones en la funcionalidad del hígado en la dicroceliosis y que ayudan a establecer un diagnóstico más preciso de la enfermedad (DEMENT'EV *et al.*, 1978; PETROV & ABALIKHIN, 1983; VASIL'EVA, 1974).

Hasta el inicio de este trabajo, no se había utilizado la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida para la caracterización de adultos y fases larvarias de *D. dendriticum*. Sin embargo, dicha técnica puede revelar una información muy precisa sobre la composición genética de los parásitos, que permitirá una identificación más certera de la especie y un conocimiento de su variación genética (ROLLINSON, 1980). Ésta puede influir en factores tan importantes como infectividad, patogenicidad y sensibilidad a las drogas de los parásitos (ROLLINSON *et al.*, 1986), cuyo conocimiento podría ayudar a establecer medidas más eficaces de control.

Por otra parte, la identificación por los métodos convencionales de las fases larvarias del parásito, halladas en los hospedadores intermediarios (principalmente moluscos) en la naturaleza, es difícil y arriesgada (MANGA, 1983). Además, su detección en los moluscos es tardía (GONZÁLEZ *et al.*, 1994; MANGA *et al.*, 1995), por lo que se hace necesario realizar estudios histológicos (ALVAREZ *et al.*, 1992) o utilizar la técnica de isoelectroenfoque anteriormente mencionada, para eliminar en lo posible los falsos negativos.

De acuerdo con la revisión realizada por CORDERO *et al.* (1994), la especie *D. dendriticum* tiene una distribución general en la Península Ibérica, y ha sido hallada en los siguientes hospedadores definitivos: asno, caballo, cabra, cabra montés (*Capra pyrenaica*), cerdo, conejo (*Oryctolagus cuniculus*), liebre (*Lepus capensis*), oveja, vaca, perro (y ¿hombre?).

Por lo que se refiere a la transmisión de dicho parásito, en nuestro país existe información sobre la prevalencia de parasitación por *D. dendriticum* en el ganado (DEL RIO, 1967; ROJO *et al.*, 1981; GARCÍA & JUSTE, 1987a, 1987b; REINA *et al.*, 1987; MANGA *et al.*, 1987, 1991a; CABANAS *et al.*, 1989; GONZÁLEZ *et al.*, 1993; FERRE, 1994; entre otros) y en los primeros y segundos hospedadores intermediarios (DEL RIO, 1967; MANGA, 1982, 1987, 1991, 1992 y otros aún inéditos; ALUNDA, 1984; ALUNDA & ROJO, 1984; CABANAS *et al.*, 1990, MANGA *et al.*, 1991b). Asimismo, se han realizado estudios sobre la supervivencia y viabilidad de los huevos de *D. dendriticum* en el medio externo (ALUNDA & ROJO, 1983) y sobre tratamientos antihelmínticos aplicados al ganado (CORDERO *et al.*, 1982; ROJO *et al.*, 1989; VEGA *et al.*, 1994; QUIROZ *et al.*, 1995).

Con la información obtenida en los últimos años por el equipo de Parasitología del CSIC se ha establecido un modelo epidemiológico de la dicroceliosis en nuestra región (MANGA *et al.*, 1991a; CABANAS, 1995). Sin embargo, para poder entender y valorar lo observado en la naturaleza y con el fin de aplicar medidas más eficaces de control de la dicroceliosis, creemos imprescindible la realización de estudios experimentales que

permitieran subsanar las lagunas que existen en el conocimiento de las relaciones parásito-hospedador.

Por ello, nos planteamos abordar los siguientes **objetivos**:

1/ Consecución de infecciones experimentales con distinta dosis de metacercarias de *D. dendriticum* en corderos, y seguimiento de la infección en los mismos hasta su sacrificio en épocas diferentes.

2/ Comparación de los niveles séricos de enzimas marcadoras hepáticas y otros parámetros bioquímicos y hemáticos en corderos infectados y testigos.

3/ Establecimiento de la relación existente entre la dosis de metacercarias de *D. dendriticum* administradas, la cinética de eliminación de huevos y la tasa de vermes recuperados en la necropsia de cada cordero. Estudio de la posible influencia de la dicroceliosis en el peso y en el estado general de los animales.

4/ Estudio histológico, al microscopio óptico y electrónico, de las posibles alteraciones en los órganos afectados por la presencia de *D. dendriticum* en los corderos.

5/ Seguimiento del desarrollo de *D. dendriticum*, en moluscos hospedadores intermediarios infectados experimentalmente con distintas dosis de huevos.

6/ Estudio de los modelos isoenzimáticos y variabilidad genética del adulto y fases larvarias de *D. dendriticum*, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. Establecimiento de los marcadores enzimáticos más adecuados para la detección del parásito en los moluscos.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Debido a la complejidad del ciclo biológico de *D. dendriticum*, una revisión exhaustiva de todos los campos que abarca sería muy extensa, por lo que en esta memoria nos centraremos, sobre todo, en aquellos aspectos más relacionados con las investigaciones que se han llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, principalmente, las concernientes al ganado ovino hospedador definitivo. Otros estudios sobre diversos aspectos del ciclo, han sido recopilados recientemente por CABANAS (1995).

2.1.- POSICIÓN TAXONÓMICA DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

El género *Dicrocoelium* Dujardin, 1845 se encuadra en la Subfamilia Dicrocoeliinae Looss, 1899, de la Familia Dicrocoeliidae Odhner, 1911. Dicha Familia, de acuerdo con LA RUE (1957) pertenece a la Superfamilia Plagiorchioidea, al Suborden Plagiorchiata, al Orden Plagiorchiida y al Superorden Epitheliocystida. No obstante, no existe un criterio unánime entre los diversos autores en cuanto a la denominación de los distintos taxones, como se pone de manifiesto en la revisión realizada por CABANAS (1995).

Las especies más importantes del género *Dicrocoelium* que parasitan rumiantes son: *D. dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899; *D. hospes* Looss, 1907 y *D. chinensis* Tang & Tang, 1978. Ha existido una polémica en cuanto a la identidad de *D. hospes*, así MACKO & PACENOVSKY (1987), basándose en la variabilidad morfológica de dicrocélidos adultos procedentes de las antiguas Checoslovaquia y Unión Soviética, concluyeron que *D. hospes* es sinónimo de *D. dendriticum*, mientras que BOURGAT *et al.* (1975), KAJUBIRI & HOHORST (1977), LUCIUS & FRANK (1978), MALEK (1980a y b), LUCIUS (1981) y FASHUYI & ADEOYE (1986), entre otros autores, consideran *D. hospes* como especie válida. Dicha especie se ha hallado en Africa y *D. chinensis* en Asia.

La descripción de *D. dendriticum* fue tardía, pues se confundió durante mucho tiempo con una forma inmadura de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, ya que ambos trematodos se encuentran con frecuencia parasitando, al mismo tiempo, el hígado de los rumiantes.

Como consecuencia de las distintas denominaciones genéricas y específicas recibidas, la sinonimia de este parásito es compleja, como puede observarse en la siguiente lista mencionada por MAPES (1951):

- Fasciola lanceolata* Rudolphi, 1803
- Distoma dendriticum* Rudolphi, 1819
- Distoma lanceolatum* (Rudolphi, 1803) Mehlis, 1825
- Distoma (Dicrocoelium) lanceolatum* (Rudolphi, 1803) Dujardin, 1845
- Distomum lanceolatum* (Rudolphi, 1803) Diesing, 1850
- Distomum dendriticum* (Rudolphi, 1819) Diesing, 1850
- Dicrocoelium lanceolatum* (Rudolphi, 1803) Weinland, 1858
- Cercaria longocaudata* Piana, 1882
- Cercaria vitrina* V. Linstow, 1887
- Distoma anciatum* Braun, 1893
- Dicrocoelium lanceatum* Stiles & Hassall, 1896
- Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899
- Distoma lanceolato* Baldi, 1900
- Distomum lanceatum* (Stiles & Hassall, 1896) Anglas & De Ribacourt, 1902
- Fasciola dendriticum* (Rudolphi, 1819) Brumpt, 1913
- Dicrocoelium macaci* Kobayashi, 1915
- Dicrocoelium vitrinus* (V. Linstow, 1887) Adam & LeLoup, 1934

MAPES (1951) señaló que RUDOLPHI describió la misma especie como *Fasciola lanceolata* y *Distoma dendriticum* en 1803 y 1819, respectivamente. El término *lanceolata* empleado por RUDOLPHI fue suprimido y sustituido por *lanceatum* por STILES & HASSALL (1896), quienes alegaron que SCHRANK (1790) había usado previamente *Fasciola lanceolata* para denominar un trematodo de *Cyprina brama*, pero ignoraron la última descripción realizada por RUDOLPHI, en 1819. DUJARDIN, en 1845, utilizó el subgénero *Dicrocoelium* y LOOSS en 1899 fue el primero que empleó el binomio *Dicrocoelium dendriticum*. Sin embargo, la designación aceptada fue *Dicrocoelium lanceatum* STILES & HASSALL (1896), hasta que ODHNER en 1901 reexaminó los especímenes estudiados en ambas ocasiones por RUDOLPHI, llegó a la conclusión de que *Distoma dendriticum* era idéntico a *Fasciola lanceolata* y que, puesto que el nombre *lanceolata* había sido invalidado por STILES & HASSALL en 1896, de acuerdo con la ley de la prioridad, *dendriticum* era la denominación específica correcta.

Posteriormente, SCHUSTER señaló que *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 aparece como el nombre válido en la "Lista oficial de nombres específicos en Zoología", mientras que *Dicrocoelium lanceatum* y *Dicrocoelium lanceolatum* se mencionan en el "Índice oficial de nombres específicos rechazados e invalidados en Zoología".

2.2.- CICLO BIOLÓGICO DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Hasta que KRULL & MAPES (1952d, 1953b) consiguieron cerrar por primera vez el complejo ciclo de *D. dendriticum*, se realizaron, durante más de un siglo, numerosos estudios tendientes a su esclarecimiento, los cuales fueron recopilados por MAPES (1951) y DEL RIO (1967).

Mediante dichas investigaciones, se llegó a conocer que los huevos estaban completamente maduros al ser puestos, pero que no eclosionaban en los conductos biliares (MOULINIÉ, 1856), ni en el agua (VON WILLEMOES-SUHM, 1871), ni en los moluscos acuáticos (LEUCKART, 1886-1901; HENKEL, 1931). Posteriormente, se encontró una cercaria de larga cola, en moluscos terrestres que habitaban en zonas enzoóticas del parásito (PIANA, 1882; VON LINSTOW, 1887; NÖLLER, 1929; VOGEL, 1929), la cual se asoció con *D. dendriticum*. Basándose en esto, y en la presencia de dos pequeñas formas con cola, halladas en una oveja muy infectada con *D. dendriticum*, se sugirió la hipótesis de que la infección del hospedador definitivo se realizaba con el agua de bebida (ZARNIK, 1910).

Después de varios intentos fallidos para infectar hospedadores definitivos dándoles a comer cercarias (NÖLLER, 1932a, 1932b) y moluscos infectados (CAMERON, 1931), se pensó en la posible existencia de un segundo hospedador intermediario o auxiliar. Sin embargo, ante el fracaso en detectar infección en larvas de mosca, nematodos parásitos y larvas de escarabajos (NEUHAUS, 1936) y en conseguir que penetraran las cercarias de larga cola en hormigas, babosas, caracoles y lombrices de tierra (NÖLLER, 1932b), se cuestionó que dicha cercaria perteneciera a *D. dendriticum*. Esta duda desapareció cuando se siguió el desarrollo completo del parásito en moluscos infectados experimentalmente y se observaron los esporocistos (de primer y segundo orden), las cercarias con morfología similar a la de *Cercaria vitrina* y la emisión por el molusco de bolas de mucus que contenían cercarias (MATTES, 1936; NEUHAUS, 1936, 1938; KRULL & MAPES, 1952a).

Se realizaron distintos experimentos para intentar producir la infección de los hospedadores definitivos mediante su alimentación con dichas bolas de mucus (MATTES, 1936; NEUHAUS, 1936, 1938; KRULL & MAPES, 1952b; VOGEL & FALCAO, 1954; VESELINOV, 1962), pero, a pesar de que algunos autores aseguraron haber tenido éxito en sus experimentos, todos los intentos posteriores para conseguir la infección, repitiendo dichas experiencias, fallaron. KRULL & MAPES (1952b) lograron infectar varios corderos dándoles a comer hierba verde sin lavar, recogida de un pasto que tenía probabilidades de estar contaminado, puesto que las reses, ovejas, ciervos y marmotas procedentes de la misma región albergaban un nº elevado de ejemplares de *D. dendriticum* en el hígado. Como consecuencia de los resultados conseguidos en su trabajo, los autores pensaron que el material infectante estaba asociado al pasto y sugirieron la existencia de un segundo hospedador intermediario en el ciclo de este parásito. Debido a esto, KRULL & MAPES (1952d) volvieron a buscar dicho hospedador, y fueron los primeros en descubrir que el segundo hospedador intermediario de *D. dendriticum* era una hormiga. Los autores, en su trabajo

previo (KRULL & MAPES, 1952a) sobre la emisión de bolas de mucus por moluscos infectados de la especie *Cionella lubrica* (= *Cochlicopa lubrica*), observaron que hormigas de la especie *Formica fusca* eligieron las bolas de mucus como alimento y las transportaron a su colonia. Posteriormente comprobaron, mediante la alimentación controlada de ovejas, que dicha especie de hormiga era el segundo hospedador intermediario. Además, aislaron las metacercarias enquistadas en el abdomen de las hormigas y las estudiaron morfológicamente, realizando una descripción detallada de las mismas.

KRULL & MAPES (1953b) consiguieron cerrar el ciclo de *D. dendriticum*, mediante la infección de corderos, bien con hormigas parasitadas o con metacercarias extraídas de las mismas. En una de las experiencias, alimentaron corderos de un año con distintas clases de invertebrados recolectados directamente del pasto y, al sacrificar los animales, recuperaron vermes del hígado de los corderos que recibieron hormigas, pero no del resto de los alimentados con otros invertebrados, ni de los testigos. En la otra experiencia, los autores suministraron a un cordero de un año 1986 metacercarias, extraídas de varios ejemplares de la hormiga *Formica fusca*. Cuando sacrificaron el animal a los 43 días, recuperaron 165 vermes de los conductos biliares, la mayor parte de los cuales contenían masas de huevos de color oscuro. Estos autores llegaron a establecer, que para completar el ciclo de *D. dendriticum* se requieren tres hospedadores y que, en el estado de Nueva York, el primer hospedador intermediario era el molusco *Cionella lubrica* u otros caracoles apropiados, el segundo la especie de hormiga *Formica fusca* y que los hospedadores definitivos podían ser algunas especies de mamíferos, tales como oveja, buey, ciervo, marmota o conejo.

Los primeros hallazgos de *D. dendriticum* en hormigas en Europa se deben a VOGEL & FALCAO (1954), quienes detectaron ejemplares de *Formica fusca* infectados por el parásito en la región de Florshein (Alemania). Además, dichos autores consiguieron infectar experimentalmente las especies de hormigas: *Formica fusca*, *Formica rufibarbis* var. *fuscorufibarbis* y *Formica gagates*, alimentándolas con bolas de mucus que contenían cercarias del parásito, y señalaron que el desarrollo de la metacercaria dentro de la hormiga se realiza en 38-56 días a 26 °C. Asimismo, estos autores fueron los primeros que completaron experimentalmente el ciclo biológico de *D. dendriticum* en Europa, consiguiendo infectar un conejo, dos ovejas y un ratón mediante la administración de metacercarias maduras procedentes de hormigas natural o experimentalmente infectadas.

Además de los trabajos mencionados anteriormente, se han realizado otros, que comentaremos en los apartados siguientes, tendentes a conocer: las especies que actúan como hospedadores definitivos e intermediarios en el ciclo biológico de *D. dendriticum*, el desarrollo de este Digenea en los mismos y las relaciones que se establecen entre el hospedador y el parásito.

Al tener en cuenta toda la información consultada, el desarrollo del **ciclo biológico de *D. dendriticum*** puede resumirse como sigue (Cuadro 1).

En el **hospedador definitivo**, los **adultos** de tipo distoma, que miden de 6 a 10 mm de longitud por 1,5-2,5 mm de anchura, tienen un cuerpo de color pálido, aplanado en sentido

dorso-ventral, con la máxima anchura cerca de la mitad del mismo, siendo más afilado en su parte anterior que en la posterior. El tegumento liso permite transparentarse al útero y a las vitelógenas, que son de color marrón-rojizo. Dichos adultos, que viven en los conductos biliares y vesícula biliar, después de la fecundación depositan los huevos embrionados en los conductos biliares, de los que pasan al intestino a través del conducto colédoco, para ser evacuados con las heces del hospedador.

Los **huevos**, de 36-50 x 22-40 μm de tamaño, son operculados, de pared gruesa y color marrón oscuro, con dos manchas grandes más intensas que se corresponden con las masas germinales.

La eclosión del huevo y la liberación del miracidio únicamente tiene lugar en el tubo digestivo de numerosas especies de **moluscos terrestres**, que actúan como **primeros hospedadores intermediarios**. El miracidio, de 20 por 25 μm , posee cilios en la parte anterior y una papila provista de un estilete, pero carece de manchas oculares. El miracidio libre atraviesa la pared intestinal del molusco, pierde los cilios y se asienta en los espacios interlobulares del hepatopáncreas cercanos al corazón y al riñón (ALVAREZ *et al.*, 1992). Allí se transforma en **esporocisto madre o de primer orden** que, al no poseer pared propia, toma la forma del espacio en que se aloja. A partir de las masas germinales del esporocisto madre se diferencian los **esporocistos hijos o de segundo orden**, cuyo tamaño oscila entre 140 y 4.005 μm (MANGA, 1987) de acuerdo con su grado de madurez y con la especie de molusco que lo alberga, principalmente. Los esporocistos hijos son sacciformes, poseen pared propia y tocostoma. Migran hasta asentarse en diferentes partes del hepatopáncreas del molusco y, en las infecciones intensas, pueden localizarse también en el aparato reproductor. Las masas germinales, que llenan los esporocistos hijos inmaduros, se transforman en **cercarias** de tipo Distoma y Xifidiocercaria. El cuerpo de dichas cercarias mide de 360-760 μm de longitud por 50-165 μm de anchura, y tiene en su parte anterior la ventosa oral, que incluye la boca y un estilete perforador, y en la parte central la ventosa ventral. Además, la cercaria posee una larga cola de 200 a 1.000 μm de longitud.

El período transcurrido desde la ingestión del huevo por el caracol hasta que la cercaria está madura, de 3 a 6 meses mínimo (SVADZHYAN, 1951; KRULL & MAPES, 1952c; TARRY, 1969; GONZÁLEZ *et al.*, 1994), varía principalmente con la especie de molusco y con la temperatura.

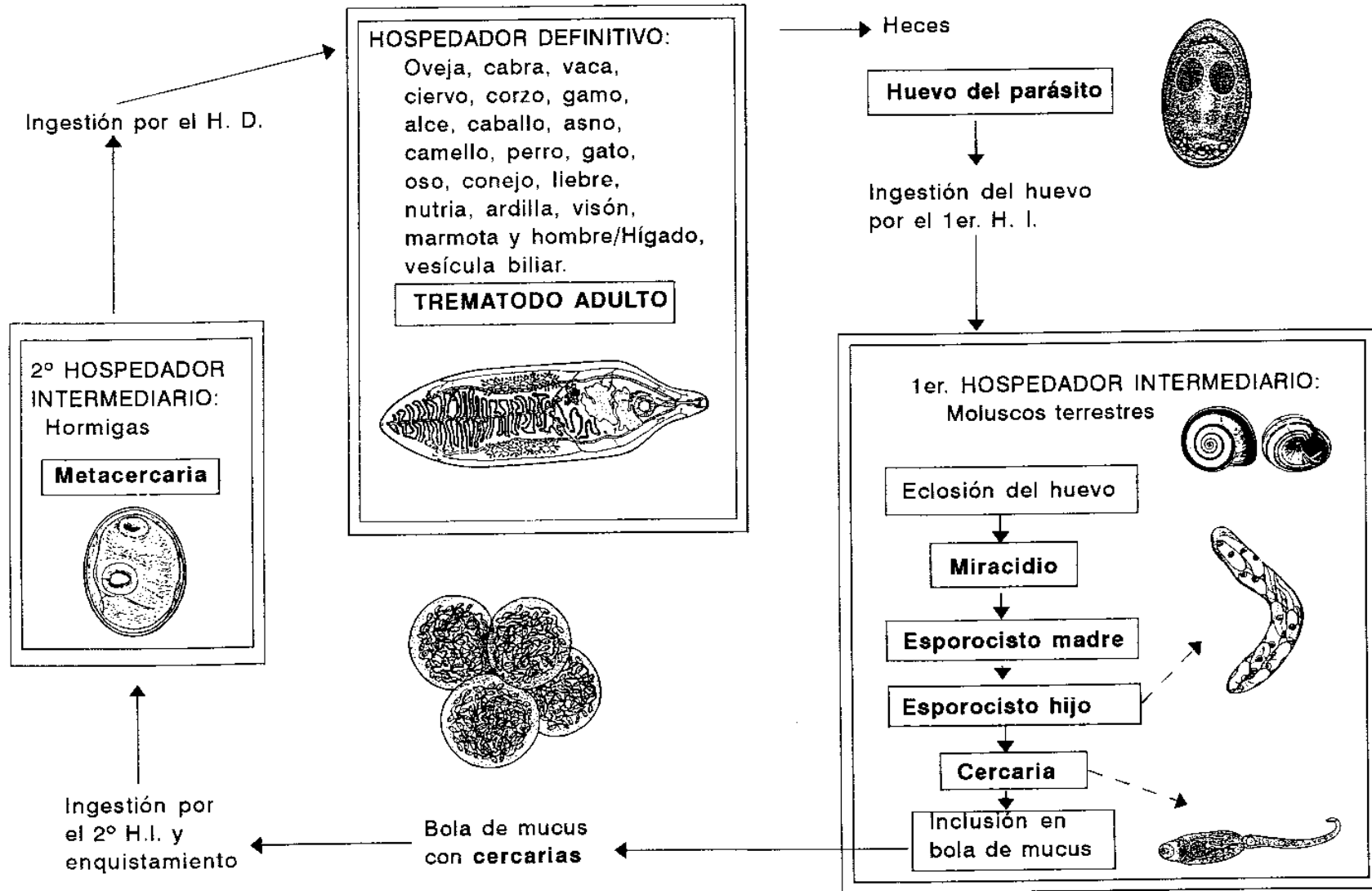
Las cercarias maduras abandonan los esporocistos por el tocostoma y se dirigen, a través del aparato circulatorio, a la cámara respiratoria del molusco, donde son recubiertas por mucus formando pequeñas esférulas de 1 a 2 mm, las cuales contienen un número generalmente elevado de cercarias (108-600, media 364, según DEL RIO, 1967).

Varias de estas esférulas (de 3 a 13, según DEL RÍO, 1967 y de 5 a 15 de acuerdo con BORCHERT, 1981) se asocian a modo de racimo y constituyen la **bola de mucus** que recién emitida tiene color blanco brillante, y puede llegar a alcanzar hasta un centímetro de diámetro y albergar de 300 a 7.800 cercarias (NEUHAUS, 1936; DEL RIO, 1967; ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991). Mediante los movimientos respiratorios del caracol, dichas bolas de

mucus son expulsadas al exterior por el pneumostoma (orificio respiratorio) y permanecen adheridas al borde del manto del molusco, hasta que son depositadas sobre las plantas u otros soportes al desplazarse el caracol. Mientras que algunos autores señalan que son la temperatura y la humedad los factores que más influyen para que se produzca la emisión de las bolas de mucus, otros consideran que la mayor influencia la ejerce la luz. El sol afecta en pocas horas el aspecto, tamaño y consistencia de las bolas de mucus y, por consiguiente, la viabilidad de las cercarias. La capacidad infectante de éstas para las hormigas se prolonga por lo menos 18 horas, si las bolas de mucus se conservan en frigorífico a 4° C y, a dicha temperatura, un número muy escaso de cercarias mantiene todavía su movilidad a las 72 horas (DEL RÍO, 1967).

Cuando las bolas de mucus, en condiciones adecuadas, son ingeridas por distintas especies de **hormigas** de la familia Formicidae, que actúan como **segundos hospedadores intermediarios**, las cercarias atraviesan el buche de las hormigas, con la ayuda del estilete, pierden la cola en las primeras horas de su ingestión y se transforman en **metacercarias**. Una de éstas (a veces 2 ó 3), llamada "larva cerebral", se aloja en el ganglio subesofágico de la hormiga y el resto de las metacercarias, con pared quística más consistente, se aloja en el abdomen o gaster, en número variable (de 1 a 580, Cuadro 7) de acuerdo con la especie de hormiga. El tamaño de las metacercarias del abdomen oscila entre 325 y 465 μm de longitud y 135 a 310 μm de anchura, y el grosor de la cubierta varía entre 10 y 40 μm . Al descender la temperatura, la metacercaria (o metacercarias) alojada en el ganglio subesofágico altera el comportamiento de la hormiga, al provocar en ella una parálisis de los músculos mandibulares (tetania), lo que hace que se fije a la hierba. Esto facilita enormemente la ingestión por el hospedador definitivo, mediante el proceso de pastoreo, de las hormigas con metacercarias. Para llegar a ser infectantes las metacercarias necesitan vivir en el interior de la hormiga aproximadamente 45 días (38-63 según KRULL & MAPES, 1952d, 1953b; 40 según HOHORST & LÄMMLER, 1962; 43 según GRIGORYAN & AKOPYAN, 1960; 45 según GROSCHAFT, 1961).

Cuando los **hospedadores definitivos** ingieren dichas hormigas infectadas, las metacercarias maduras se desenquistan en el tubo digestivo y por vía del conducto colédoco (KRULL, 1958; SVADZHYAN, 1959) y, a veces de la circulación portal (SRIVASTAVA *et al.*, 1978), llegan al hígado, situándose en los conductos biliares, donde se transforman en **vermes adultos**. Cuando éstos están maduros ponen huevos, que iniciarán su salida al medio externo con las heces del hospedador, aproximadamente a los 55 días post-infección (p.i.) (47 según SALIMOVA, 1972; de 47 a 48 según CHANDRA, 1973; de 49 a 79 de acuerdo con CAMPO *et al.*, 1993), y permitirán comenzar nuevamente el ciclo biológico de *D. dendriticum*.



Cuadro1.- Esquema del ciclo biológica de *Dicrocoelium dendriticum*. Original de Yolanda MANGA.

2.3.- INVESTIGACIONES REALIZADAS EN HOSPEDADORES DEFINITIVOS INFECTADOS CON *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Desde que Rudolphi describió por vez primera *D. dendriticum*, "distoma laceolado" o "pequeña duela del hígado", se han citado numerosas especies de mamíferos, tanto domésticos como salvajes, que actúan como hospedadores definitivos de dicho trematodo. El ganado ovino, bovino y caprino está frecuentemente infectado por este parásito, que se ha encontrado además en el ciervo, corzo, alce, venado, gamo, muflón, gamuza, gacela, búfalo, oso, cerdo, jabalí, caballo, asno, camello, dromedario, llama, perro, conejo, liebre, marmota, nutria, castor, ardilla, macaco, hombre, entre otras especies de mamíferos (MAPES, 1950; MAPES & BAKER, 1950; MAPES, 1951; DEL RIO, 1967; MALEK, 1980b). No obstante, las primeras publicaciones recopiladas por MAPES (1951) son principalmente de denuncia y aportan escasos datos adicionales.

Por otra parte, KRULL (1956) probó en el laboratorio como hospedadores definitivos de *D. dendriticum* ejemplares de ratón albino, rata, ratón silvestre, criceto, cobaya y gato. Dicho autor concluyó que el criceto dorado y el conejo eran buenos hospedadores, mientras que el cobaya era menos adecuado y el ratón albino actuaba como hospedador ocasionalmente.

2.3.1.- DOSIS INFECTANTE DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

La dosis de metacercarias utilizada en las infecciones experimentales realizadas por diversos autores ha sido variable, como puede observarse en el Cuadro 2.

Cuadro 2.- Dosis infectante de *D. dendriticum* utilizada, período de prepatencia y carga parasitaria recuperada en distintas especies de animales.

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA SACRIFICIO P.I.	VERMES RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR/ANIMAL		AUTORES
				N°	%	
GANADO OVINO						
- Cordero	70-300	—	—	—	—	DEL RÍO (1967)
	100*	47	—	—	60,6	SALIMOV (1972d, e)
	810-2.618	—	8 horas	—	—	SALIMOV (1972c)
	1.000	—	—	—	—	DEMENT'EV <i>et al.</i> (1978)
	1.200-10.000	—	60-225 días	—	—	SALIMOV & KUPRIYANOVA (1974)
	1.500	—	54 días	536	35,7	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	1.800	—	30, 60, 90 días	—	—	PETROV & ABALIKHIN (1983)
	1.968	—	43 días	165	—	KRULL & MAPES (1953b)
	2.100	47	—	—	—	SALIMOV (1972e)
	2.500	—	—	—	—	SALIMOVA & SALIMOV (1972)
	2.500	47	—	—	—	SALIMOVA (1972)
	2.600	—	—	—	—	ABALIKHIN (1982a, b)
	2.600	—	30, 60 y 90 días	—	—	PETROV & ABALIKHIN (1983)
	3.000	47	—	—	—	SALIMOV (1972d)
	3.000	—	15 días	19 y 69	0,6 y 2,3	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	3.000	—	32 días	268 y 444	8,9 y 14,8	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	3.000	—	50 días	706 y 724	23,5 y 24,1	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	3.000	—	70 días	220 y 635	7,3 y 21,2	WOLFF <i>et al.</i> (1984)

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA SACRIFICIO P.I.	VERMES RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR/ANIMAL		AUTORES
				Nº	%	
	3.000	—	90 días	1.230 y 1.946	41,0 y 64,9	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	3.000	—	54 días	1.294	43,1	WOLFF <i>et al.</i> (1984)
	5.000	—	—	—	—	SALIMOVA & SALIMOV (1972)
	5.000	47	—	—	—	SALIMOVA (1972)
	5.320	—	—	—	—	SVADZHYAN (1959)
	10.000	—	—	—	—	SALIMOVA & SALIMOV (1972)
	10.000	47	—	—	—	SALIMOVA (1972)
	10.000	48	—	—	—	CHANDRA (1973)
	10.000	—	15 días	17 y 141	—	CHANDRA (1973)
	10.000	—	30 días	134 y 1.245	—	CHANDRA (1973)
	10.000	—	45 días	668 y 1.006	—	CHANDRA (1973)
	10.000	—	60 días	1.003 y 1.620	—	CHANDRA (1973)
	10.000	—	90 días	817 y 2.911	—	CHANDRA (1973)
	18.000	—	—	—	—	DEMENT'EV <i>et al.</i> (1978)
	—	—	31-38 días	1, 2 y 8	—	KRULL & MAPES (1952b)
	—	55 y 77	—	—	—	AKBAEV (1970)
	—	47-56	—	—	33,3	MALEK (1980b)
	—	65-66	—	—	—	GRIGORYAN & AKOPYAN (1960)

- Oveja	100	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	500	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	500	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	645	—	271 días	24	4	KALKAN (1976)
	906	56	—	—	—	TARRY (1969)
	1.000	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	1.220	76	—	—	—	TARRY (1969)
	2.000	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	3.000	49-56	—	—	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	3.000	—	—	—	—	ALIEV & DEMIDOV (1971)
	3.905	—	9 meses	1.361	34,9	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	—	47	—	—	—	SALIMOV (1981)
	—	—	—	—	33,3	VOGEL & FALCAO (1954)
GANADO VACUNO						
- Ternero	100*	—	—	—	56,7	SALIMOV (1972d, e)
	500	—	—	—	56,7	SALIMOV (1972d)
	5.000	—	—	—	60,7	SALIMOV (1972a)
	5.000	—	—	—	50,1	SALIMOV (1972a)
	—	50	—	—	—	MALEK (1980b)
GANADO CAPRINO						
- Cabrito	100*	—	—	—	50	SALIMOV (1972d, e)
	1.200-10.000	—	60-225 días	—	—	SALIMOV & KUPRIYANOVA (1974)

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA SACRIFICIO P.I.	VERMES RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR/ANIMAL		AUTORES
				N°	%	
—	—	52	—	—	—	MALEK (1980b)
OTROS						
- Asno	100*	—	—	—	32,4	SALIMOV (1972d, e)
	—	54	—	—	—	MALEK (1980b)
- Cerdo	30	—	—	—	—	KARABAEV & DEMENT'EV (1966)
	—	49	—	—	—	CHANDRA (1973)
- Cobaya	54	—	290 días	0	0	KALKAN (1976)
	105	—	254 días	10	9	KALKAN (1976)
	250	—	3 días	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	400	—	3 días	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	500	—	3 días	32	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	500	—	6 días	63	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	500	—	7 días	221	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	700	—	8 horas	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	—	48	—	—	—	CHANDRA (1973)
- Conejo	11	—	33-87 días	0	—	HOHORST & LAMMLER (1962)

13	—	33-87 días	3	23,1	HOHORST & LAMMLER (1962)
20	—	33-87 días	0	—	HOHORST & LAMMLER (1962)
21	—	33-87 días	0	—	HOHORST & LAMMLER (1962)
28	—	33-87 días	0	—	HOHORST & LAMMLER (1962)
70-300	—	90 días	0	—	DEL RÍO (1967)
100	—	—	—	—	TARRY (1969)
100*	—	—	—	21,3	SALIMOV (1972d y e)
173	—	290 días	10	6	KALKAN (1976)
223	—	290 días	17	8	KALKAN (1976)
250	—	—	—	—	SVADZHYAN (1956)
1.000	49-56	—	—	—	HOHORST & LAMMLER (1962)
1.000	—	43 días	25	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
1.000	—	4 horas	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
1.000	—	44 horas	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
1.017	—	110 días	258	25,4	HOHORST & LAMMLER (1962)
1.036	—	99 días	450	43,4	HOHORST & LAMMLER (1962)
—	44, 50 y 56	—	—	15,9	MALEK (1980b)
—	—	—	—	5,2-14,2	VESELINOV (1962)
—	—	—	—	15,9	VOGEL & FALCAO (1954)
—	45	77 días	—	—	KLESOV & POPOVA (1958)
—	64-69	—	—	—	GRIGORYAN & AKOPYAN (1960)
- Criceto	10	60-69 días	6,2 (x)	62,3	HOHORST & LAMMLER (1962)

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA SACRIFICIO P.I.	VERMES RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR/ANIMAL		AUTORES
				Nº	%	
	15	48-50	—	—	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	20	—	60-69 días	9,5 (x)	47,5	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	25	48-50	105 días	17	68	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	25	—	—	—	—	KALKAN (1976)
	25	—	—	8,25 (x)	—	SCHRÖDER & GEYER (1976)
	25-300	—	—	—	—	SCHRÖDER (1980)
	30	—	—	0	—	KALKAN (1976)
	33	—	45 días	8	24	KALKAN (1976)
	35	—	—	8,25 (x)	—	SCHRÖDER & GEYER (1976)
	40	55-69	—	—	—	CAMPO <i>et al.</i> (1994)
	40	—	60-69 días	16,9 (x)	42,2	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	45	—	—	21,25 (x)	—	SCHRÖDER & GEYER (1976)
	50	48	—	—	—	TARRY (1969)
	50	—	—	—	—	SÁNCHEZ <i>et al.</i> (1994)
	50	—	22 horas	13 y 13	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	55	—	—	26,25 (x)	—	SCHRÖDER & GEYER (1976)
	64	—	225 días	11	17	KALKAN (1976)
	70	—	—	42,25	—	SCHRÖDER & GEYER (1976)
	94	48	—	—	—	TARRY (1969)
	100	48	—	—	—	TARRY (1969)
	100	—	1 hora	0	—	KRULL (1958)

	100	—	1 hora	8	—	KRULL (1958)
	100	—	22 horas	1, 2, 5 y 13	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	100-800	—	—	—	—	TSVETAeva (1975)
	120	—	22 horas	9	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	125	—	2 meses	42	—	SCHUSTER & NEUMANN (1988)
	125	—	22 horas	17	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	150	—	—	—	—	TARRY (1969)
	171	—	60 días	21	—	MANGA <i>et al.</i> (1991b)
	200	—	—	—	—	TARRY (1969)
	200	—	1,5 horas	2	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	59	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	19	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	27	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	37	—	KRULL (1958)
	200	—	24 horas	75	—	KRULL (1958)
	242	—	—	—	—	TARRY (1969)
<hr/>						
- Rata	15	—	1-58 días	1-12	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	30	—	1-58 días	0	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	135	—	1-58 días	17 y 27	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	150	—	1-58 días	21	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
<hr/>						

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA SACRIFICIO P.I.	VERMES RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR/ANIMAL		AUTORES
				Nº	%	
- Ratón	50	—	1/2 hora	0	—	KRULL (1958)
	50	—	1 hora	0	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	3	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	8	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	14	—	KRULL (1958)
	200	—	6 horas	11	—	KRULL (1958)
	200	—	17 horas	18	—	KRULL (1958)
	250	—	1 hora	6	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	275	—	30 minutos	3	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	400	—	15 minutos	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	400	—	2 horas	25	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	400	—	2_ horas	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	400	—	120 horas	36	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	450	—	18 horas	42	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	450	—	18 horas	0	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	570	—	3 horas	50	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	800	—	24 horas	136	—	SRIVASTAVA <i>et al.</i> (1978)
	—	—	—	—	31,6	MALEK (1980b)
	—	—	—	—	31,6	VOGEL & FALCAO (1954)

* Número de metacercarias/Kg de peso del animal.

La dosis óptima por animal para realizar ensayos de quimioterapia es de 25 metacercarias en el criceto, de 1.000 en el conejo y de aproximadamente 3.000 quistes en la oveja, de acuerdo con las investigaciones realizadas por HONORST & LÄMMLER (1962)

2.3.2.- RUTA MIGRATORIA SEGUIDA POR LAS METACERCARIAS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

No existe unanimidad entre los diferentes autores en cuanto a la ruta seguida por las metacercarias desde que se desenquistan en el estómago por la acción del jugo gástrico (SRIVASTAVA *et al.*, 1978), o en el intestino por la acción de la bilis (KRULL, 1958), hasta que se establecen en el sistema biliar de los diferentes hospedadores definitivos.

De acuerdo con las experiencias realizadas en criceto dorado y ratón albino por KRULL (1958), en cordero, conejo y cobaya por SVADZHYAN (1959), en criceto dorado por HOHORST & LÄMMLER (1962) y en conejo, cobaya y ratón por SRIVASTAVA *et al.* (1978), las metacercarias migran desde el intestino a los conductos biliares del hígado, a través del conducto colédoco. Sin embargo, estos autores no coinciden en el tiempo que necesitan los parásitos en este proceso. Así, según SRIVASTAVA *et al.* (op. cit.) se precisa solo media hora en el cobaya, pero hallaron metacercarias recién desenquistadas, incluso después de un mes, en el ratón. Por otra parte, KRULL (1958) señaló como mínimo una hora para que las metacercarias se establezcan en el sistema biliar del criceto y 6 para que lo hagan en el del ratón. Además, observó que a las 24 horas la mayor parte de los parásitos ya se hallaban en los conductos biliares del criceto. Los otros dos autores mencionados apuntaron que son necesarias 2 horas, mínimo, en el cobaya (SVADZHYAN, 1959) y 4 en el criceto (HOHORST & LÄMMLER, 1962), para que las metacercarias lleguen a los conductos biliares.

A pesar de que AYUPOV (1967) comprobó mediante ovejas fistuladas que las metacercarias de *D. dendriticum* migran, generalmente, a través de la abertura del conducto biliar común (colédoco), señaló también que, bajo circunstancias desconocidas, pueden alcanzar el hígado por vía portal.

Aunque SVADZHYAN (1959) no encontró parásitos ni en la vena porta ni en la cavidad corporal, sin embargo son varios los autores que señalan la vía portal como el camino que siguen las metacercarias en su migración hacia el hígado. En este sentido, ALIEV (1966) observó, en ovejas fistuladas entre el intestino delgado y la vesícula biliar y entre ésta y el intestino grueso, que las metacercarias no entraban en el hígado vía conducto biliar, sino que lo hacían a través de la circulación sanguínea. Una vez en el hígado, los parásitos se localizaban en los espacios intercelulares, para posteriormente entrar en los conductos biliares. Asimismo, POLOZHENTSEVA (1968) observó vermes en las venas del hígado de ovejas y corderos, lo que probaba también que *D. dendriticum* migra a través de la circulación portal. De igual forma, SALIMOV (1972c) comprobó, en corderos y conejos infectados con dosis de 810 a 2.618 metacercarias por animal, que la mayoría de las larvas desenquistadas en

el duodeno se encontraron en la luz y entre las vellosidades del primer segundo tercio del intestino delgado. Unas pocas de ellas atravesaron la pared intestinal o entraron en las venas portal y mesentérica. Ocho horas después de la infección halló gran número de larvas en el hígado y comenzó a observarlas en la vesícula biliar y, ocasionalmente, en el páncreas. Sin embargo, cuando dicho autor administró la dosis infectante directamente dentro de la cavidad peritoneal de los corderos no encontró parásitos en el hígado.

No obstante, el que las metacercarias migren a los conductos biliares en algunos hospedadores no significa que el parásito continúe su desarrollo, ya que en los ratones de pie blanco y en las ratas albinas son eliminados a los pocos días de su llegada a dichos conductos, y en los ratones albinos no alcanzan la madurez sexual (KRULL, 1956).

Una vez que *D. dendriticum* se establece en los conductos biliares de la oveja, el período de vida en la misma es, al menos, de 6 años, de acuerdo con KIRKWOOD & PEIRCE (1971).

2.3.3.- PARÁMETROS HEMÁTICOS, BIOQUÍMICOS Y ENZIMAS MARCADORAS HEPÁTICAS EN LA DICROCELIOSIS

Debido a las dificultades en la consecución de infecciones experimentales con *D. dendriticum* en los hospedadores definitivos, existen pocos datos referentes a dichos parámetros, por lo que incluiremos también los estudios efectuados en animales infectados de forma natural.

A la vista de las investigaciones experimentales realizadas con distintas dosis de metacercarias de *D. dendriticum* por diversos autores, cuyos resultados se resumen en el Cuadro 3, parece que en el ganado ovino infectado se produce un incremento en los valores de las siguientes enzimas: colinesterasa, enteroquinasa, AST, ALT y fosfatasa alcalina. Asimismo, en dichos animales aumentan las cifras de proteínas totales, globulinas, leucocitos y eosinófilos. Sin embargo, se observa una disminución en los valores de eritrocitos, hemoglobina y hematócrito, así como en los de las vitaminas A y C y en los de la reserva alcalina. Por otra parte, en la dicroceliosis aguda se incrementa la tasa microbiana de la bilis, mientras que disminuye en la crónica.

Cuadro 3.- Parámetros cuyos valores se incrementan o disminuyen en los animales infectados experimentalmente con distintas dosis de *D. dendriticum*.

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS / ANIMAL METACERCARIAS	DÍAS P.I. / FASE DE LA INFECCIÓN	VALORES PARÁMETROS		AUTORES
			INCREMENTO	DESCENSO	
GANADO OVINO					
- Cordero	200*	—	ALT	Reserva alcalina	DEMENT'EV <i>et al.</i> (1978)
			AST	Vitamina A y C	
			Colinesterasa		
1.000	—	—	ALT	Reserva alcalina	DEMENT'EV <i>et al.</i> (1978)
			AST	Vitamina A y C	
			Colinesterasa		
1.800 2.600	60/Aguda	60/Aguda	Enteroquinasa	Eritrocitos	PETROV & ABALIKHIIN (1983)
			Eosinófilos		
			Fosfatasa alcalina		
			Globulinas		
			Leucocitos		
			Proteínas totales		
			Tasa microbiana de la bilis		
1.800 2.600	60-90/Crónica	60-90/Crónica	Enteroquinasa	Eritrocitos	PETROV & ABALIKHIN (1983)
			Eosinófilos	Hemoglobina	
			Fosfatasa alcalina	Nº de microbios en	
			Globulinas	la bilis	

			Leucocitos		
			Proteínas totales		
	2.500	45	—	Vitamina A	SALIMOVA & SALIMOV (1972)
	5.000			(descenso máximo)	
	10.000				
	2.600	30	Enteroquinasa	—	ABALIKHIN (1982b)
		60	Fosfatasa alcalina		
		90			
	2.600	Aguda	Especies patógenas en la bilis, intestino delgado y colon	—	ABALIKHIN (1982b)
- Oveja	1.000-2.000	45	—	Hematócrito	VASIL'EVA (1974)
		75			
	—	Crónica	—	Vitamina A	SALIMOV & SALIMOVA (1972)
GANADO VACUNO					
- Ternero	5.000	Desde 50	Leucocitos	Eritrocitos Hemoglobina	SALIMOV (1972a)
OTROS					
- Cobaya	—	—	ATP	—	CHANDRA & POLJAKOVA-KRUSTEVA

		Fosfatasa ácida		(1974)	
HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS / ANIMAL METACERCARIAS	DÍAS P.I. / FASE DE LA INFECCIÓN	VALORES PARÁMETROS		AUTORES
			INCREMENTO	DESCENSO	
5-nucleotidasa					
- Criceto	40	84	ALT	Flujo biliar	CAMPO <i>et al.</i> (1994)
			AST	Secreción biliar de	SÁNCHEZ (1994)
			Fosfatasa alcalina	bicarbonatos	

* Por día durante 90 días.

De acuerdo con las investigaciones realizadas por los autores que se recogen en el Cuadro 4, en el ganado ovino infectado naturalmente con *D. dendriticum* se incrementan los valores de AST, ALT, proteínas totales, albúmina, globulinas, glucosa, urea, fósforo, leucocitos y eosinófilos, y disminuyen los de eritrocitos, colesterol y calcio. No obstante, según THEODORIDIS *et al.* (1991) las cifras de proteínas totales y de albúmina no se alteran y el descenso de eritrocitos no es significativo en animales con carga parasitaria inferior a 4.000 vermes.

El valor del incremento o del descenso, según los casos, de algunos parámetros alterados por *D. dendriticum* fue inferior en los animales infectados con la dosis más baja (SALIMOVA & SALIMOV, 1972; PETROV & ABALIKHIN, 1983), o con la menor carga parasitaria (RANUCCI *et al.*, 1981; THEODORIDIS *et al.*, 1991). Asimismo, los síntomas fueron más acusados en los terneros machos que en las hembras (SALIMOV, 1972a).

En ovejas (de 3 a 7 años) infectadas naturalmente con *D. dendriticum* y *Echinococcus granulosus*, RANUCCI & GROL-RANUCCI (1978) observaron un incremento en las enzimas AST, GGT, LAP y GLDH, y en los valores de las proteínas totales y gamma-globulinas, pero no en los de FA, ALT, SDH, bilirrubina o colesterol. Asimismo, KELLER (1978) señala un incremento en los valores de GGT y GLDH, en vacas parasitadas en la naturaleza con *F. hepática* y/o *D. dendriticum*.

Los estudios realizados sobre el efecto de la aplicación de diferentes antihelmínticos al ganado ovino infectado con *D. dendriticum* revelan que, a los 30 días post-tratamiento se normalizan los valores de proteínas totales, globulinas, leucocitos y eosinófilos, mientras que el nivel de hemoglobina y el nº de eritrocitos son más bajos que los de los testigos (PETROV & ABALIKHIN, 1983). Sin embargo, son necesarios 60 días post-tratamiento para la normalización de los valores del hematócrito (VASIL'EVA, 1974) y de la enteroquinasa, fosfatasa alcalina y de la microflora de la bilis, intestino delgado y colon (ABALIKHIN, 1982a, 1982b).

Cuadro 4.- Parámetros cuyos valores se incrementan o disminuyen en los animales infectados naturalmente con distinta carga parasitaria de *D. dendriticum*.

HOSPEDADOR DEFINITIVO	CARGA PARASITARIA	FASE DE LA INFECCIÓN	VALORES PARÁMETROS		AUTORES
			INCREMENTO	DESCENSO	
GANADO OVINO					
- Oveja	< 100	—	—	Eritrocitos	THEODORIDIS <i>et al.</i> (1991)
	<1.000				
	1.000-2.000				
	> 2.000				
	Decenas-1.460	—	FA, GGT, GLDH,	Albúmina	RANUCCI <i>et al.</i> (1981)
	3.400-10.200		Globulinas, AST,	Glucosa	
	11.800->40.000		ALT, LAP, LDH, SDH, Urea		
	—	—	—	Condición corporal Eritrocitos	SINCLAIR (1967)
	—	—	Eosinófilos Leucocitos	—	FAUST <i>et al.</i> (1974)
	—	—	—	Colesterol	SLESINGR (1970)

	—	Crónica	Albúmina Eosinófilos Fósforo Proteínas totales	Calcio Eritrocitos	GUNDLACH <i>et al.</i> (1982)
HOMBRE	—	—	AST, ALT	—	REINHARDT (1978)
	—	—	Eosinófilos Leucocitos	—	GIGITASHVILI (1962) (citado por VASALLO MATILLA, 1971)
	—	—	Eosinófilos	—	VERMEIL <i>et al.</i> (1964) (citado por VASALLO MATILLA, 1971)

2.3.4.- PERIODO DE PREPATENCIA DE LA DICROCELIOSIS

En los Cuadros 2 y 5 se recoge el período de prepatencia de la dicroceliosis señalado por diversos autores en condiciones experimentales.

El período necesario para que *D. dendriticum* alcance la madurez sexual no está condicionado por la edad de los hospedadores ni por el n° de vermes presentes en cada uno de ellos (TARRY, 1969; SALIMOV, 1972d; CHANDRA, 1973). Sin embargo, las diferencias en el período de prepatencia pueden ser debidas a las condiciones climáticas, resistencia individual del hospedador y diferencias genéticas derivadas de la distinta distribución geográfica del parásito (CHANDRA, 1973).

En lo que se refiere a infecciones naturales con *D. dendriticum*, el tiempo transcurrido entre la primera salida al campo de los animales y el inicio de la eliminación de huevos en las heces de los mismos varió entre 6 y 12 semanas en corderos de 2 a 3 meses y de 6 a 7 meses de edad, según AMBROSI *et al.* (1980), y entre 2 y 16 meses en corderos de 4 a 8 meses, de acuerdo con CABANAS (1995). Por otra parte, algunos autores señalaron el período de prepatencia de la dicroceliosis, sin especificar si se trataba de infecciones naturales o experimentales. Así, mencionaron períodos de 60 días en ovejas (DRABICK *et al.*, 1988), de 53 a 56 días en ganado ovino y bovino (PEGREFFI, 1957), de 10-11 semanas en rumiantes (DUNN, 1978) y de 47 a 54 días (SOULSBY, 1988).

Cuadro 5.- Huevos de *D. dendriticum* eliminados en las heces de distintos animales infectados experimentalmente, con diferentes dosis de metacercarias.

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA RECOLECCIÓN HECES (Días)	HUEVOS EN HECES	AUTORES
GANADO OVINO					
- Cordero	70-300	—	100, 105 y 115	Presencia	DEL RÍO (1967)
	2.500-1.000	47	60	Presencia	SALIMOVA (1972)
	—	65-66	—	Presencia	GRIGORYAN & AKOPYAN (1960)
- Oveja	906	56	Desde el día 56	12,7*	TARRY (1969)
	1.220	76	Desde el día 76	39*	TARRY (1969)
	3.000	49-56	96-131	15-450 hpg	HOHORST & LÄMMLER (1962)
OTROS					
- Conejo	100	—	—	0*	TARRY (1969)
	1.000	49-56	89-103	160-960 hpg	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	—	64-69	64-69	Presencia	GRIGORYAN & AKOPYAN (1960)
- Criceto	15	48-50	80	Presencia	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	15	48-50	100	Presencia	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	15	48-50	120	Presencia	HOHORST & LÄMMLER (1962)
	15	48-50	350	Presencia	HOHORST & LÄMMLER (1962)

HOSPEDADOR DEFINITIVO	DOSIS/ANIMAL METACERCARIAS	PERÍODO DE PREPATENCIA (Días)	FECHA RECOLECCIÓN HECES (Días)	HUEVOS EN HECES	AUTORES
	40	55-69	Hasta el día 84	9,79 hpg (x)	CAMPO <i>et al.</i> (1994)
	50	50	Desde el día 50	141*	TARRY (1969)
	94	56	Desde el día 56	490*	TARRY (1969)
	100	54	Desde el día 54	864*	TARRY (1969)
	114	56	Desde el día 56	276*	TARRY (1969)
	150	48	Desde el día 48	363*	TARRY (1969)
	150	48	Desde el día 48	3.581*	TARRY (1969)
	150	56	Desde el día 56	1.027*	TARRY (1969)
	200	56	Desde el día 56	912*	TARRY (1969)
	242	54	Desde el día 54	1.010*	TARRY (1969)

* Media de recuento de huevos de las 6 primeras lecturas.

2.3.5.- HUEVOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* EN LAS HECES Y EN LA VESÍCULA BILIAR. CARGA PARASITARIA

El número de huevos por gramo eliminado por los animales de distintas especies, infectados experimentalmente por diversos autores con diferentes dosis de metacercarias, se recoge en el Cuadro 5.

En los estadios tempranos de madurez, los parásitos eliminan un número reducido de huevos, que no se detectan en las heces (GRIGORYAN & AKOPYAN, 1960).

La eliminación de huevos observada "in vitro" por SRIVASTAVA (1974) en 10 ejemplares de *D. dendriticum* (de tamaño similar), recuperados a los 60 días p.i. de corderos (11.600 huevos), cerdos (10.600) y cobayas (9.000) fue inferior a la obtenida a los 90 días p.i. (13.700, 12.100 y 10.000, respectivamente). La eliminación de huevos en dichos días p.i. fue, a su vez, más baja que la obtenida en el mismo número de vermes recuperados de vacas (15.800 huevos) y conejos (16.900) infectados naturalmente.

De acuerdo con la bibliografía, la carga parasitaria en ganado ovino infectado de forma natural es muy variable, con cifras que oscilan entre los 10 vermes por animal señalados por ROJO *et al.* (1981) y por DENEV *et al.* (1970), y los 50.000 citados por MAPES (1952) y DUNN (1978) y 52.500 mencionados por ONAR (1986/1987).

Según las observaciones de PEGREFFI (1957), no existe una relación directa entre el número de parásitos hallados en el hígado de los hospedadores y la gravedad de la distomatosis hepática por *D. dendriticum*, puesto que, en ganado ovino infectado naturalmente, algunos animales mostraban una gran tolerancia a más de 1.500 vermes, mientras que otros, que albergaban muy pocos parásitos, presentaban cuadros graves.

En este sentido, WOLFF *et al.* (1984) no observaron manifestaciones clínicas en animales que, infectados con 3.000 metacercarias, contenían hasta 1.946 vermes. Sin embargo, HOHORST & LÄMMLER (1962) observaron diarrea y un claro descenso del crecimiento en corderos infectados con el mismo número de metacercarias, en los que el establecimiento de las mismas fue más bajo (34,9%).

Por otra parte, cargas parasitarias de hasta 4.000 vermes no causan pérdidas significativas en las proteínas del plasma ni en la sangre de oveja, según los resultados obtenidos por THEODORIDIS *et al.* (1991). Por el contrario, ONAR (1986/1987) observó que la presencia de unos 15.000 vermes o más por oveja produce la muerte.

De acuerdo con nuestra información, no existen estudios experimentales sobre la relación carga parasitaria / número de huevos de *D. dendriticum* eliminados por animal. Entre las escasas investigaciones realizadas sobre dicho tema en infección natural podemos citar las de CALAMEL & GIAUFFRET (1976), llevadas a cabo en 55 ovejas de diferentes rebaños. Según sus resultados, el número de huevos eliminado por los animales infectados con *D. dendriticum* se incrementó al tiempo que la carga parasitaria de los mismos. Así, la relación huevos eliminados / vermes recuperados fue: 0 hpg / 184 vermes (x 46); 50-100 / 3.291 (x 194); 100-300 / 9.290 (x 489); 300-1.000 / 10.250 (x 1.139); >1.000 / 24.850 (x 4.142). Por

otra parte, dichos autores, basándose en curvas logarítmicas que construyeron con los resultados anteriormente expuestos, establecieron 4 categorías de intensidad de parasitación que expresaron con cruces de la siguiente manera: (+), que corresponde a 30-100 hpg y 1-100 vermes (x 50), indica presencia testimonial del parásito sin incidencia patológica y económica; (++) , que se refieren a 100-300 hpg y 100-600 vermes (x 300), expresan una infección ligera y sin incidencia; (+++), que corresponden a 300-1.000 hpg y 600-2.900 vermes (x 1.500), indican una infección que aconseja decomisar el hígado (los autores denominan "infección-decomiso"), la cual, en su opinión, justifica la aplicación de un tratamiento antihelmíntico contra *D. dendriticum* y medidas profilácticas sobre el terreno; (++++), que equivalen a >1.000 hpg y >2.900 vermes, revelan la existencia de una infección clínica que puede llegar a producir caquexia y la muerte en algunos animales (los autores denominan "infección-enfermedad").

ROJO *et al.* (1981) estudiaron la relación entre la eliminación de huevos de *D. dendriticum* en las heces y la carga parasitaria, en 108 ovejas de más de un año infectadas naturalmente y pertenecientes a un rebaño de 600 animales. Los autores realizaron entre 5 y 12 (x 7,6) tomas de muestras de heces a lo largo de 58 días, para efectuar el recuento de huevos, y sacrificaron los animales entre el día 37 (después del primer muestreo) y el día 58, para conocer la carga parasitaria. De acuerdo con sus resultados, la relación huevos eliminados / vermes recuperados fue: 80,4 hpg / 10-1.000 vermes; 170 / 1.000-3.000; 286,5 / 3.000-5.000; 363,5 / 5.000-10.000. Estos autores consideran que la presencia de 1.000 ejemplares de *D. dendriticum* o menos no tiene significación clínica ni repercusiones económicas, que las infecciones producidas por 1.000-3.000 helmintos tienen influencia sobre el rendimiento en la producción animal y, por consiguiente, una significación económica, y que cuando la carga parasitaria sobrepasa los 5.000 vermes se debe considerar clínicamente importante la infección por *D. dendriticum*. Asimismo, los autores señalan que se puede estimar la carga parasitaria, mediante una ecuación logarítmica, teniendo en cuenta los análisis de las heces.

Seguidamente, vamos a comentar los resultados obtenidos sobre la relación número de huevos por gramo eliminados en las heces / carga parasitaria en animales infectados naturalmente que, a su vez, fueron utilizados como testigos en trabajos sobre tratamientos antihelmínticos, realizados por diversos autores.

En este sentido, CORDERO *et al.* (1982) realizaron estudios coprológicos, durante 40 días previos al sacrificio, en 56 animales agrupados en 5 lotes de ovejas mantenidas en pastoreo. Del recuento de huevos por gramo, efectuado en muestras de heces tomadas de cada animal entre 12 y 14 veces, así como del de vermes recuperados al sacrificio, obtuvieron las siguientes relaciones entre el valor medio de hpg / rango y media de parásitos: 33-397 (x hpg) / 3-4.240 vermes (x 1.481); 78-312 / 650-8.310 (x 2.580); 102-650 / 870-10.240 (x 4.231); 88-743 / 200-11.500 (x 3.643); 131-3.732 / 2.440-24.240 (x 7.441).

Asimismo, SANZ *et al.* (1987) llevaron a cabo un estudio en 10 ovejas de 4 a 6 años de edad infectadas naturalmente con *D. dendriticum*. De acuerdo con los estudios

coprológicos realizados para cada animal, sobre 6 muestras tomadas en un período de 17 días previos al sacrificio, así como con la carga parasitaria, la relación huevos por gramo / vermes recuperados en cada oveja fue: 833 hpg / 160 vermes; 116 / 237; 583 / 557; 116 / 615; 466 / 1.041; 583 / 1.149; 433 / 1.205; 2.150 / 1.359; 833 / 1.773; 1.200 / 3.567. Al considerar los datos en conjunto, el número de hpg osciló entre 116 y 2.150 (x 731) y el de vermes entre 160 y 3.567 (x 1.166).

CALAMEL *et al.* (1979) realizaron estudios coprológicos, a lo largo de un período de 16 semanas previo al sacrificio, en 16 ovejas y 19 corderos infectados con *D. dendriticum* de forma natural. Para ello, tomaron de cada animal entre 2 y 9 muestras de heces y recuperaron los vermes al sacrificio. Así, la relación huevos por gramo / vermes recuperados por animal fue en las ovejas: 296,4 hpg / 325 vermes; 667,4 / 1.146; 2.756 / 1.430; 596 / 1.570; 56 / 1.630; 1.806 / 3.575; 969,8 / 4.528; 1.403,2 / 7.700; y en los corderos: 146,8 hpg / 76 vermes; 122 / 87; 139 / 194; 508,5 / 251; 96 / 373; 243,4 / 404; 277,1 / 425; 439,8 / 491; 325,2 / 492; 384,6 / 581; 145 / 641; 290 / 679; 404,5 / 829; 755,6 / 1.005; 750,75 / 1.146; 251 / 1.211; 777,1 / 1.354; 441,6 / 2.013.

JOLIVET *et al.* (1974) llevaron a cabo un estudio coprológico en 5 ovejas infectadas naturalmente con *D. dendriticum*, sobre 5 muestras de heces tomadas individualmente durante los 11 días previos al sacrificio. Al comparar los resultados de dichos análisis y los del recuento de vermes recuperados al sacrificio de cada animal, obtuvieron las siguientes relaciones: 93 hpg / 600 vermes; 122 / 720; 205,4 / 800; 411 / 2.110; 329 / 3.550.

MACCHIONI *et al.* (1978) realizaron el recuento de huevos de *D. dendriticum* en 3 a 6 muestras de heces de cada una de 8 ovejas de 4 a 6 años de edad infectadas naturalmente. Efectuaron la toma de dichas muestras durante los 22 días previos al sacrificio de los animales, momento éste en el que contaron los vermes recuperados. La relación hpg / vermes hallados en cada oveja fue: 220,8 hpg / 706 vermes; 1.041,6 / 1.087; 875 / 1.206; 1.683,3 / 1.343; 915 / 1.502; 683,3 / 1.918; 1.625 / 1.971; 2.055 / 3.005.

Por otra parte, AMBROSI (1991), en un trabajo de revisión, señaló que la correspondencia entre el número medio de hpg de *D. dendriticum* en las heces de ovejas y el número medio de vermes en dichos animales podría ser la siguiente: a) alrededor de 10 hpg / 50 a 60 helmintos adultos y fértiles; b) 80-90 hpg / 200-250 vermes; c) 150 hpg / 1.000 parásitos; d) 200-250 hpg / 1.500-2.500 vermes; e) 300-600 hpg / 3.500-4.500 helmintos; f) 700-1.000 hpg / 6.000-8.000 vermes; g) 1.000-1.500 hpg / 10.000-20.000 parásitos. Además, dicho autor consideró que la infección de los tipos "a" y "b" es difusa, la de los "c" y "d" es moderada, la de los "e" y "f" causa alteraciones metabólicas significativas, y la del tipo "g" provoca alteraciones productivas además de las metabólicas.

En los estudios realizados por KOPP (1975) en 65 ovejas infectadas naturalmente con *D. dendriticum*, la media de 275 (0-3.812) huevos por 5 gramos de heces se correspondió con la de 26.984 (0-383.000) huevos en la vesícula biliar.

2.3.6.- DOSIS DE METACERCARIAS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* ADMINISTRADAS Y VERMES RECUPERADOS

En el Cuadro 2, se recoge la información dada por algunos autores sobre la dosis de metacercarias utilizada en la infección de distintas especies de hospedadores y sobre los vermes recuperados de los mismos en diversas épocas de sacrificio.

De acuerdo con la revisión realizada por nosotros, el porcentaje de vermes recuperados por los distintos autores, sobre la dosis administrada, ha oscilado desde 0,6% en corderos sacrificados a los 15 días p.i. (WOLFF *et al.*, 1984) a 68% en cricetos (HOHORST & LÄMMLER, 1962).

Al tener en cuenta el sexo del hospedador, SCHRÖDER & GEYER (1976) observaron un 12,2% más de evolución de las metacercarias de *D. dendriticum* en las hembras de cricetos que en los machos.

La carga parasitaria recuperada en las infecciones experimentales con *D. dendriticum* puede oscilar, debido a la duración de la infección y a la metodología utilizada en la extracción de los vermes (WOLFF *et al.*, 1984).

Además, de acuerdo con HOHORST & LÄMMLER (1962) una parte no despreciable de los quistes o de las larvas ya libres, que atraviesan con rapidez el intestino delgado, son expulsadas de nuevo con las heces.

Según MALEK (1980b) sólo se desarrolla un pequeño número de metacercarias hasta el estado adulto pero, debido al carácter acumulativo de la infección con *D. dendriticum*, los hospedadores llegan a albergar numerosos vermes maduros que contribuyen a incrementar el número de huevos eliminados con las heces y, por tanto, aseguran el mantenimiento del ciclo biológico.

2.3.7.- ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS HUEVOS Y DE LOS ADULTOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

De acuerdo con la información de los autores que se recogen en el Cuadro 6, el tamaño del huevo y del adulto de *D. dendriticum*, procedentes de distintas especies de hospedadores, es variable.

Cuadro 6.- Tamaño de adultos y huevos de *D. dendriticum* procedentes de distintas especies de hospedadores.

HOSPEDADOR DEFINITIVO	TIPO DE INFECCIÓN	TAMAÑO ADULTO Longitud/Anchura (mm)	TAMAÑO HUEVO Longitud/Anchura (μm)	AUTORES
GANADO OVINO				
- Cordero	Experimental	3/—	—	PARASCHIVESCU (1981b)
		7-8/—	—	PARASCHIVESCU (1981b)
- Oveja	Natural	1*-11,5/—	—	FROMUNDA <i>et al.</i> (1973)
	—	< 10/—	45/30	URQUHART <i>et al.</i> (1987)
GANADO VACUNO				
- Ternero	Experimental	4-8,2/1-1,8	—	SALIMOV (1972b)
	Experimental	6-10,5/1-2,1	—	SALIMOV (1972b)
- Vaca	—	6-9/—	—	LEWIS (1974)
OTROS				
- Cobaya	Experimental	7,5/—	—	KRULL (1956)
- Conejo	Experimental	11/—	—	KRULL & MAPES (1953a)
	Experimental	13/—	—	KRULL (1956)

HOSPEDADOR DEFINITIVO	TIPO DE INFECCIÓN	TAMAÑO ADULTO Longitud/Anchura (mm)	TAMAÑO HUEVO Longitud/Anchura (μm)	AUTORES
- Criceto	Experimental	8,5/—	—	KRULL (1956)
- Liebre	Natural	4-9/1-2	35-40/25	FRIGATO (1961)
- Ratón	Experimental	3,5/—	—	KRULL (1956)
HOMBRE	Natural	3,8/—	42/24	ROCHE (1948)
	Natural	—	35-40/25-30	VASALLO MATILLA (1971)
	Natural	—	25/25	DESOWITZ (1980)
DESCONOCIDO	—	3,2-4,1/—	—	ROMIG <i>et al.</i> (1980)
	—	4-12/1,5-2,5	—	RANQUINI (1946)
	—	5-12/1-2,5	35-45/22-30	ROSICKY & GROSCHAFT (1982)
	—	5-15/1,5-2,5	38-45/22-30	FAUST <i>et al.</i> (1974)
	—	6-10/1,5-2,5	36-45/22-30	OLSEN (1977)
	—	6-10/1,5-2,5	36-45/20-30	SOULSBY (1988)
	—	6-10/—	25/40	MEHLHORN & WALLDORF (1988)
	—	8-12/—	38-45/22-30	BORCHERT (1964)
	—	8-12/2-2,5	38-45/25-30	MARCHAND (1966)
	—	8-14/2-2,5	36-45/22-30	MALEK (1980b)

—	8-10/1,5-2,5	—	BENGTSSON <i>et al.</i> (1968)
—	8-12/1,5-2,5	38-45/22-30	BORCHERT (1981)
—	10/2-3	38-45/25-30	MARCHAND (1975)
—	15/2,5	38-45 (x 41)/22-30 (x 26)	ODENING (1969)
—	—	40/—	AMBROSI (1991)
—	—	45-50/30-40	ALUNDA (1984)

* Fase juvenil de *D. dendriticum*.

Según KRULL (1956), el tamaño de los vermes está en relación directa con el de la especie de hospedador, por lo que el máximo se alcanza, frecuentemente, en el buey. Además, dentro del ganado vacuno los vermes de *D. dendriticum* son más grandes en los machos que en las hembras y contienen mayor número de huevos, de acuerdo con los estudios experimentales realizados por SALIMOV (1972b). Sin embargo, según SALIMOV & KUPRIYANOVA (1974) los vermes procedentes de cabras infectadas experimentalmente con *D. dendriticum* son más pequeños, menos consistentes y de fertilidad más baja que los procedentes de ovejas infectadas experimentalmente; además, la posición de los testículos es ligeramente diferente.

KRULL (1956) consideró que un verme de *D. dendriticum* está maduro cuando en el útero se observan los primeros huevos de tamaño natural, aunque el color de los mismos puede variar de marrón claro a oscuro. No obstante, señaló que los vermes con huevos oscuros son los más maduros y los de mayor tamaño. Además, deben transcurrir, como mínimo, 2 meses p.i. para que los vermes alcancen el tamaño máximo. WOLFF *et al.* (1984) observaron huevos maduros en vermes recuperados de corderos a los 50 días de su infección experimental.

2.3.8.- ALTERACIONES MORFOPATOLÓGICAS EN LA DICROCELIOSIS

- Lesiones macroscópicas

Las alteraciones macroscópicas inducidas, tanto en infecciones naturales como experimentales, por *D. dendriticum* se han centrado en el hígado, vías biliares extrahepáticas y vesícula biliar, localizaciones habituales de este parásito en el hospedador definitivo.

En ovejas, tras la infección natural con este trematodo, MAPES (1951) y KRULL & MAPES (1952a) ya describieron hígados más endurecidos de lo normal, con cicatrices y unos conductos biliares extrahepáticos distendidos por la presencia de parásitos y moco en su interior. En esta época, PEGREFFI (1957) señaló, además, un aumento de volumen del hígado, que mostraba un color blanquecino externamente junto a pequeñas áreas de color violeta. Otros autores, como MARCHAND (1966), comprobaron no sólo una mayor dureza de este órgano, sino la transformación de sus conductos biliares en cordones fibrosos. Más recientemente, DUNN (1978) observó, en infecciones graves, engrosamiento de los conductos biliares y una superficie hepática irregular. CHENG (1978) y BORCHERT (1981) destacaron, asimismo, la aspereza al tacto y la presencia de focos gris-blanquecinos en este órgano, coincidiendo con una parasitación muy intensa. Este último autor comprobó también dilatación de 2-3 mm en los conductos biliares, en la cara visceral hepática. Igualmente, MASSOUD (1981) describió diferentes hallazgos macroscópicos en la dicroceliosis ovina, adquirida de forma natural, tales como induración y presencia de cicatrices hepáticas,

engrosamiento y dilatación de los conductos biliares, que en algunas áreas incluso aparecían saculados, y distensión de la vesícula biliar.

Por lo que se refiere a las infecciones experimentales con *D. dendriticum* en el ganado ovino, concretamente con 1.000 y 3.000 metacercarias, se ha señalado únicamente la existencia de un hígado agrandado, de bordes redondeados, ligeramente marrón y una vesícula biliar distendida que contenía, frecuentemente, bilis translúcida (ALIEV, 1968). Alteraciones similares se observaron en corderos (DENEV *et al.*, 1973; ABALIKHIN, 1982a). Otros autores (WOLFF *et al.*, 1984) comprobaron un engrosamiento de los conductos biliares principales y aumento de secreción de aspecto mucoso, en ovejas infectadas en condiciones naturales y experimentales con *D. dendriticum*.

En otros animales, tales como la vaca y la cabra, y siempre en infecciones naturales con este trematodo, se observó ligera induración hepática, discreto engrosamiento de los conductos biliares y moderada distensión de la vesícula biliar, en los estados iniciales de la infección (DHAR & SINGH, 1963b). Sin embargo, en una fase crónica, estos mismos autores han observado un progresivo endurecimiento del hígado, así como un engrosamiento, dilatación y aspecto tortuoso de las vías biliares y, finalmente, una considerable dilatación de la vesícula biliar, conteniendo gran número de parásitos y abundante bilis verdosa. También en la cabra, SOMVANSI *et al.* (1992), además de señalar un ligero endurecimiento y atrofia del hígado, destacaron una dilatación de la vesícula biliar por la presencia de abundante bilis acuosa. En la marmota, MAPES (1950) observó alteraciones macroscópicas similares a las descritas para la especie ovina, concretamente un hígado endurecido y con cicatrices. En la cabra, SOMVANSI & KOUL (1989) destacaron únicamente un ligero aumento de la consistencia hepática.

Por último, queremos indicar que en el hombre se han descrito nódulos necróticos en el hígado, relacionados con infecciones parasitarias, sobre todo subcapsulares pero también localizados en el seno del parénquima, de 0,3 a 2,5 cm, delimitados por una cápsula blanquecina, los cuales contenían un material sólido amarillento (TSUI *et al.*, 1992; NAKASHIMA *et al.*, 1994).

- Lesiones microscópicas

- Fase aguda

En etapas tempranas de la infección natural con *D. dendriticum* en el ganado ovino se han descrito cambios histopatológicos en los grandes conductos biliares, que se traducen en proliferación glandular, discreto engrosamiento de la túnica fibrosa externa e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y fagocitos mononucleares (MAPES, 1951; KRULL & MAPES, 1952a). Estos autores destacaron, además, una proliferación de fibroblastos en las áreas porta, aspecto igualmente señalado por SOULSBY (1965) (citado por SINCLAIR, 1967).

Aunque los infiltrados de linfocitos en los conductos biliares de gran calibre son un hallazgo característico durante el periodo de migración del parásito, también se han destacado otras alteraciones, principalmente de los vasos sanguíneos (distensión de la luz, descamación y proliferación del endotelio) y de las células hepáticas (pícnosis, aspecto reticulado del citoplasma, presencia de pigmento biliar), todas ellas observadas en infecciones experimentales con 1.000 metacercarias de *D. dendriticum* (ALIEV, 1968).

Estudios posteriores han confirmado que durante esta fase aguda de la infección son las vías biliares las más afectadas (POLJAKOVA-KRUSTEVA *et al.*, 1974), debido a la presencia de una inflamación catarral, así como de una discreta proliferación epitelial de estas estructuras ductales (CHENG, 1978; MALEK, 1980b; DRABICK *et al.*, 1988).

Atendiendo a la probable existencia de dos rutas migratorias, seguidas por las metacercarias en el hospedador definitivo, ROSICKY & GROSCHAFT (1982) establecieron diferentes lesiones en la fase inicial de la dicroceliosis. Así, cuando la migración se efectúa a través del conducto colédoco, existe ectasia, atrofia y degeneración de este conducto, que evolucionan a una inflamación catarral del mismo. Por vía portal, las alteraciones son mínimas en el epitelio intestinal. Otros autores han comprobado además, en ovejas infectadas experimentalmente, ectasia de los vasos periportales, descamación y proliferación de su endotelio (ALIEV, 1966).

Asimismo, en relación con esta vía portal, se ha descrito que existe una migración de vermes jóvenes desde los vasos de los espacios porta, primero al tejido conjuntivo y luego al parénquima, donde acuden gran número de histiocitos y eosinófilos (BREZA & SVARC, 1968, citado por ROSICKY & GROSCHAFT, 1982).

Autores como DHAR & SINGH (1963b) destacaron en la vaca y en la cabra, un moderado incremento del tejido conjuntivo e hiperplasia del epitelio en los conductos biliares, así como escasos o nulos cambios regresivos en las células hepáticas, aumento del tejido conjuntivo periportal e infiltración celular en los espacios porta.

En otras especies animales, como la cabra salvaje japonesa (*Capricornis crispus*), *D. dendriticum* también lesiona los conductos biliares, provocando una hiperplasia epitelial de los mismos, así como una infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (NAKAMURA *et al.*, 1984).

Finalmente, en la dicroceliosis ovina se han descrito alteraciones de los ganglios linfáticos, tales como linfadenitis y perilinfadenitis (ALIEV, 1966; STEELE, 1982).

- Fase crónica

En infecciones prolongadas por *D. dendriticum* en el ganado ovino (dicroceliosis crónica) se produce una colangitis crónica en los conductos biliares de mayor calibre (MAPES, 1951; MARCHAND, 1966; CHENG, 1978; BORCHERT, 1981). Además de esta inflamación se han descrito otras alteraciones en estos conductos, tales como fibrosis (LAPAGE, 1982), soluciones de continuidad en la pared (PEGREFFI, 1957), dilatación

(CHENG, 1978; BORCHERT, 1981) y proliferación papilar de su mucosa (SOULSBY, 1965, citado por SINCLAIR, 1967; MASSOUD, 1981; WOLFF *et al.* 1984).

En las células hepáticas se han observado cambios degenerativos y necrosis, con sustitución del área afectada por tejido fibroso (MARCHAND, 1966; PRICE & CHILD, 1971; MASSOUD, 1981). Por el contrario, hay autores que consideran que el parénquima hepático no está afectado (BORCHERT, 1981). Asimismo, se ha asociado esta infección con una cantidad considerable de células cebadas, principalmente en la adventicia de los vasos (MARCHAND, 1966).

Otro aspecto destacado de la dicroceliosis crónica es la proliferación de fibras colágenas y, más tarde, de fibras elásticas en el estroma hepático (CHENG, 1978; BORCHERT, 1981). Esta fibrosis no sólo se comprueba en las áreas porta, sino que se extiende entre los lobulillos hepáticos (fibrosis interlobulillar) (DUNN, 1978; MASSOUD, 1981, WOLFF *et al.*, 1984). En los primeros trabajos sobre esta parasitosis, se describieron alteraciones irreversibles de la arquitectura normal del hígado, concretamente, cirrosis (MAPES, 1951; KRULL & MAPES, 1952a; SOULSBY, 1965, citado por SINCLAIR, 1967). Con posterioridad, otros investigadores coincidieron en señalar un incremento de tejido conectivo fibroso, el cual delimitaba áreas nodulares de hiperplasia o regeneración, típicas de una cirrosis biliar (BOCH & SUPPERER, 1982). Sin embargo, DRABICK *et al.* (1988) consideran que en la dicroceliosis crónica se produce una fibrosis peribiliar, pero no una verdadera cirrosis.

La infección natural con *D. dendriticum* en la vaca y en la cabra también provoca colangitis crónica, colangiectasia, engrosamiento de la cápsula hepática y dilatación venosa. Sin embargo, en la vaca sólo se ha comprobado hiperplasia conjuntiva portal y peribiliar, mientras que en la cabra se ha observado cirrosis, fundamentalmente biliar y portal, aunque también perilobulillar y pericelular (DHAR & SINGH, 1963b). En cabras, RAHKO (1972a) destacó la presencia de infiltrados inflamatorios, alteraciones degenerativas en los hepatocitos, engrosamiento de las paredes de las venas y, ocasionalmente, la presencia de granulomas, provistos de macrófagos y células gigantes multinucleadas. Asimismo, este autor observó un incremento en el grosor de la cápsula hepática, moderada proliferación del epitelio de los conductos biliares y engrosamiento conjuntivo de su pared. Investigaciones más recientes, en esta misma especie, han confirmado no sólo hiperplasia glandular, infiltración de leucocitos y fibrosis en los conductos biliares, sino también dilatación de los sinusoides hepáticos (SOMVANSHI *et al.*, 1992).

Las lesiones microscópicas descritas en marmota por MAPES (1950), son semejantes a las observadas por este autor en ganado ovino, tales como hiperplasia del epitelio biliar, incremento del tejido conjuntivo periportal, presencia de infiltrados inflamatorios y cirrosis perilobulillar.

En cobaya, este trematodo lesiona preferentemente el sistema biliar, comprobándose una angiocolitisseudopapilar en los conductos medianos y grandes, así como proliferación biliar en las áreas porta (BONO, 1958).

Cuando se utilizó el criceto como animal de experimentación, además de hiperplasia biliar y cirrosis portal, se observaron granulomas de cuerpo extraño que contenían células gigantes multinucleadas, organizadas alrededor de los huevos del parásito, en el parénquima hepático (PRUNESCU *et al.*, 1979). En investigaciones posteriores, también en esta especie, se ha señalado ectasia sinusoidal, discretos infiltrados portales de células mononucleadas, colangitis e hiperplasia papilar del epitelio y presencia de infiltrados inflamatorios en la vesícula biliar (SÁNCHEZ, 1994).

En cuanto a las infecciones por *D. dendriticum* en la especie humana, aunque son escasas, se ha descrito una moderada fibrosis portal (ROCHE, 1948), una colangitis crónica e incluso alteraciones nerviosas, debidas a la llegada del parásito o sus huevos por vía sanguínea al cerebro (SIGUIER *et al.*, 1952, citado por MALEK, 1980).

Finalmente es interesante señalar que, según SOULSBY (1988), en la dicroceliosis crónica se produce una cirrosis generalizada. Para este autor la fibrosis se inicia en los espacios porta y más tarde se extiende de forma interlobulillar y perilobulillar, provocando por último un cuadro semejante a una cirrosis portal.

- Estudios histoquímicos

En el ganado ovino únicamente se ha comprobado una mayor secreción, no sólo en la luz de los grandes conductos biliares, sino también dentro de los propios acinos glandulares, lo que provoca su distensión. Además, dicha secreción contenía células epiteliales descamadas (MAPES, 1951).

Investigaciones posteriores llevadas a cabo en el ganado caprino por RAHKO (1972b), confirmaron una mayor actividad secretora de mucosustancias (sialomucinas) por parte de las células caliciformes y de las glándulas simples, localizadas en la mucosa de dichos conductos. Este autor, en 1970, valoró igualmente las propiedades histoquímicas de los leucocitos globulares, presentes en relación con los conductos biliares hiperplásicos, comparándolas con las de las células cebadas, de localización subepitelial, en la vaca.

En los hepatocitos, tanto de la vaca (DHAR & SINGH, 1963a) como de la cabra (RAHKO, 1972a) se ha constatado una clara depleción de glucógeno y por el contrario, un alto contenido en lípidos (grasas neutras). Este incremento lipídico dentro de las células parenquimatosas también ha sido destacado por PRUNESCU *et al.* (1979), en el criceto.

Asimismo se ha comprobado, en la dicroceliosis caprina, la existencia de depósitos de lipofucsina y hemosiderina alrededor de las venas centrolobulillares y de los conductos biliares parasitados (DHAR & SINGH, 1963a), además de un incremento en el número de células cebadas en el estroma hepático (RAHKO, 1972c).

- Patogenia

En el hospedador definitivo, tras la migración, *D. dendriticum* se localiza en los conductos biliares y vesícula biliar, donde este parásito se alimenta de bilis, moco y células biliares descamadas (ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991).

Para algunos investigadores, la intensidad y la duración de la infección determinan el alcance de las lesiones orgánicas (MALEK, 1980b; BORCHERT, 1981); para otros, la gravedad y extensión del cuadro lesional se incrementa sólo con la duración de la infección (SOULSBY, 1965, citado por SINCLAIR, 1967); finalmente, hay autores que consideran que la gravedad de las lesiones morfológicas dependen más del número de parásitos que del tiempo de duración de la parasitosis (MARCHAND, 1966; PRUNESCU *et al.*, 1979). Estas alteraciones afectan sobre todo al sistema biliar, siendo mínimas por el contrario en el parénquima hepático (DUNN, 1978; LAPAGE, 1982).

En la patogenia de la dicroceliosis, parecen estar involucrados diversos factores. Así, se ha sugerido que existe una acción mecánica, que provocaría la obstrucción de los pequeños conductos biliares, a los cuales *D. dendriticum* tiene acceso, dado su reducido tamaño y plasticidad (DHAR & SINGH, 1963b; POLJAKOVA-KRUSTEVA *et al.*, 1974; BOCH & SUPPERER, 1982; WOLFF *et al.*, 1984; ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991).

Asimismo, se produce un efecto irritativo sobre la mucosa de los grandes conductos biliares, que explicaría la proliferación e incremento en la secreción de las células glandulares, además de la colangitis y colangiectasia y en estados avanzados de la infección, la cirrosis biliar y degeneración celular (DHAR & SINGH, 1963b; BOCH & SUPPERER, 1982, WOLFF *et al.*, 1984; ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991). Algunos autores, como DHAR & SINGH (1963b) y RAHKO (1972a), sugirieron que las ventosas del parásito serían, en cierta medida, las responsables de las erosiones y alteraciones mecánicas observadas en la mucosa de dichos conductos.

Aunque en un principio se pensó que este parásito podría secretar una sustancia tóxica, capaz de iniciar el proceso patológico (MAPES, 1951), posteriormente se consideró más probable que esta acción tóxica de *D. dendriticum* se debía, sobre todo, a los efectos de sus productos metabólicos que, desde la bilis, alcanzarían el torrente sanguíneo, provocando una intoxicación (KRULL & MAPES, 1952b; DHAR & SINGH, 1963b; STEELE, 1982; ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991). Este hecho ha sido confirmado experimentalmente en el criceto dorado (KAJUBIRI, 1982).

También se ha señalado una acción antigénica, dada la presencia de anticuerpos fijadores de complemento, una acción inoculadora, sobre todo de gérmenes anaerobios tipo *Clostridium* y, finalmente, una acción cancerígena, por proliferación del epitelio en los conductos biliares (ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991).

2.3.9.- PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES INFECTADOS CON *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

De acuerdo con las observaciones de ROSEF *et al.* (1985), los corderos infectados en la naturaleza con *D. dendriticum*, tenían pesos corporales inferiores a los no infectados. Asimismo, SINCLAIR (1967) señaló una pérdida de condición corporal en animales infectados con *Dicrocoelium*. No obstante, es muy difícil evaluar la disminución de peso en los animales naturalmente parasitados por *D. dendriticum*, ya que, con frecuencia, también lo están por *F. hepatica* y/o por otros parásitos.

Por otra parte, son escasos los trabajos experimentales realizados sobre este tema. Según SALIMOVA (1972), la pérdida de peso de los corderos infectados experimentalmente con 2.500, 5.000 y 10.000 metacercarias de *D. dendriticum* fue más acusada, hasta que los parásitos alcanzaron la madurez sexual. No obstante, aunque todos los corderos mostraron signos clínicos de dicroceliosis grave, la mayor pérdida de peso se registró en los animales que recibieron 5.000 metacercarias. De igual forma, HOHORST & LÄMMLER (1962) observaron retraso en el crecimiento de corderos infectados experimentalmente con una dosis de alrededor de 3.000 metacercarias.

En cricetos infectados con 40 metacercarias de *D. dendriticum* y sacrificados a los 80 días p.i., SÁNCHEZ (1994) observó un incremento del peso más lento que en los testigos.

2.4.- INVESTIGACIONES EXPERIMENTALES EN MOLUSCOS, PRIMEROS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Han sido numerosas las especies de moluscos que se han citado como hospedadores intermediarios, experimentales y naturales, de *D. dendriticum*, de acuerdo con las revisiones realizadas por MANGA (1983) y CABANAS (1995). No obstante, en este apartado incluiremos únicamente investigaciones efectuadas por diversos autores, para seguir el desarrollo de *D. dendriticum* en moluscos infectados de forma experimental.

Como se comentó al describir el ciclo biológico de *D. dendriticum*, los huevos están completamente maduros al ser eliminados por el hospedador definitivo, pero no eclosionan en agua (VON WILLEMOES-SUHM, 1871), ni en moluscos acuáticos (LEUCKART, 1886-1901; HENKEL, 1931). La eclosión del huevo y la liberación del miracidio sólo tiene lugar en el tubo digestivo de moluscos terrestres adecuados, de la clase Gastropoda, subclase Pulmonata, orden Stylommatophora, que actúan como primeros hospedadores intermediarios. Dicha eclosión parece producirse gracias a diversos estímulos físico-químicos del intestino, bajo pH y condiciones reductoras (TIMON-DAVID, 1965; RACTLIFFE, 1968; MITTERER, 1975), y no tiene lugar si el molusco está en letargo (PAVLOV, 1941). Aunque son numerosos los autores que han conseguido la eclosión de los huevos de *D. dendriticum* en distintas especies de moluscos, sin embargo, no siempre fueron capaces de observar las fases

larvarias cuando los sacrificaron. Esto último pudo ser debido a que las especies de moluscos no eran las adecuadas, o a que el sacrificio de los mismos se realizó antes de que el parásito se hiciera visible mediante las técnicas empleadas.

De acuerdo con nuestra información, los primeros trabajos experimentales en los que se observó la eclosión del huevo de *D. dendriticum* en moluscos terrestres fueron realizados por NÖLLER & KORKHAUS (1929) (citado por MAPES, 1951) en *Helicella obvia*, *Helicella ericetorum* (= *Helicella itala*), *Zebrina detrita* y *Agriolimax agrestis*, pero el resultado parasitológico fue negativo, al diseccionar los moluscos a los 35 días p.i. Sin embargo, NÖLLER (1932a) obtuvo esporocistos, aunque no cercarias, en la especie *Zebrina detrita* sacrificada a los 50 días p.i. y no pudo observar el parásito a los 39 días p.i. en babosas.

No obstante, fueron las investigaciones realizadas por MATTES (1936) en *Helicella ericetorum*, *Helicella candidula* y *Zebrina detrita* las que permitieron conocer en detalle las distintas fases de desarrollo del parásito en el molusco, esto es, esporocisto de primer orden, esporocisto de segundo orden y cercaria. Esta última fase, obtenida por dicho autor, fue similar a la *Cercaria vitrina* descrita por V. LINSTOW (1887), que procedía de *Zebrina detrita* infectada naturalmente. NEUHAUS (1936, 1938), utilizando las mismas especies de moluscos que MATTES (op. cit.), consiguió seguir el desarrollo larvario de *D. dendriticum* hasta observar la migración de las cercarias a la cámara respiratoria del molusco, en la que se acumulaban en bolas de mucus, que eran expulsadas al exterior mediante los movimientos respiratorios del caracol.

Dichos trabajos de MATTES y de NEUHAUS, realizados en Alemania, fueron corroborados en Estados Unidos por MAPES (1951) y KRULL & MAPES (1952a, 1952c) en *Cionella lubrica* (= *Cochlicopa lubrica*).

Además de estas investigaciones, se han realizado diversos trabajos experimentales con el fin de ampliar la nómina de moluscos que actúan como hospedadores intermediarios en dichas condiciones. Asimismo, se han efectuado estudios sobre: porcentaje de eclosión de huevos en el caracol, porcentaje de moluscos en los que se establece la infección, tiempo necesario para que el parásito alcance las distintas fases larvarias, estado del molusco (actividad, edad, nutrición) y condiciones ambientales (temperatura, humedad) que influyen en que el desarrollo del parásito tenga lugar y en que se acelere o retarde, así como factores que favorecen la expulsión de las bolas de mucus. Seguidamente comentaremos algunos de dichos trabajos.

PAVLOV (1941) demostró que el huevo de *D. dendriticum* eclosiona en el intestino del caracol *Helicella obvia*.

MAPES (1951) intentó infectar con dicho parásito moluscos de las especies: *Cionella lubrica*, *Oxychilus cellarius*, *Zonitoides nitidus*, *Deroceras reticulatum*, *Arion subfuscus*, *Pupilla muscorum*, *Arion circumscriptus* y *Anguispira alternata*. Aunque detectó huevos eclosionados en todas ellas, sin embargo la disección de los moluscos únicamente reveló infección en *Cionella lubrica*, entre los días 80 y 282 p.i. Por otra parte, KRULL & MAPES

(1952a) estudiaron 121 bolas de mucus emitidas, en condiciones de laboratorio, por varios ejemplares infectados de *Cionella lubrica* recolectados en la naturaleza. Realizaron un estudio exhaustivo de las mismas y las compararon con las emitidas por otras especies de moluscos de Europa. Además, dichos autores (1952b) investigaron el desarrollo de *D. dendriticum* en ejemplares de la misma especie de molusco infectados natural y experimentalmente. Bajo estas últimas condiciones, precisaron que los esporocistos no producen cercarias hasta transcurridos tres ó más meses.

SVADZHYAN (1954) estudió los factores que influyen en la expulsión de las cercarias por el caracol, y señaló que una humedad de 67-100% y temperatura entre 3,5-18°C favorecen dicha expulsión.

Por otro lado, GRIGORYAN *et al.* (1956) comprobaron que el desarrollo del huevo de *D. dendriticum* en *Helicella derbentina*, *Helicella crenimargo* y *Zebrina hohenackeri* requiere 5,5 a 6 meses y que la cercaria emitida por el molusco muere en dos días en diversos medios externos.

TIMON-DAVID (1965) consiguió la infección experimental de *Helicella (Helicopsis) arenosa* con *D. dendriticum*. El desarrollo del parásito fue lento, ya que necesitó 123 días para la observación de los esporocistos con masas germinales y cercarias jóvenes y 186 días para la de las cercarias de cola bien desarrollada.

VERSHININ (1957a) estudió la receptividad experimental a *D. dendriticum* de 11 especies de caracoles y 3 de babosas, pero sólo obtuvo infección en ejemplares de las especies *Fruticicola fruticum* y *Cochlicopa lubrica*, en los que observó cercarias a los 5-5,5 meses p.i. El mismo autor, en otro trabajo publicado en 1957b, consiguió infectar el 50% y el 65% de dos grupos de moluscos de *Fruticicola fruticum*, de 20 especímenes cada uno, utilizando para ello huevos de *D. dendriticum* procedentes de heces de oveja, los cuales habían permanecido 11 meses en el suelo de la región de Kaluga (Rusia).

KOTLAN (1960) sugirió que los moluscos pueden dividirse en tres grupos, de acuerdo con su receptividad para el desarrollo del ciclo de *D. dendriticum*. El primer grupo, que denominó "hospedadores obligados", incluye las poblaciones de moluscos que presentan una infección del 100% y producen más de 200 cercarias por caracol, las cuales necesitan entre 105 y 138 días para madurar. En el segundo grupo de moluscos, que consideró como "hospedadores facultativos", sólo el 5% de los especímenes permite el desarrollo de los estadios larvarios del parásito y alberga entre 1 y 200 cercarias por caracol, las cuales requieren para madurar entre 138 y 210 días. El tercer grupo se refiere a moluscos que no sirven como hospedadores intermediarios.

DEL RIO (1967) infectó experimentalmente, con huevos de *D. dendriticum*, 6 especies de moluscos terrestres y encontró, a los 90 días p.i., esporocistos en *Cionella lubrica* (= *Cochlicopa lubrica*), *Helicella (Helicella) ericetorum* (= *Helicella itala*), *Theba carthusiana* (= *Monacha carthusiana*). Debido a que las tres primeras especies albergaban esporocistos más desarrollados y en mayor número, el autor sugirió que podrían ser más adecuadas como hospedadores intermediarios.

RACTLIFFE (1968) infectó, durante 24 horas, ejemplares de *Helicella* sp. con huevos de *Dicrocoelium lanceolatum* (= *D. dendriticum*) procedentes de vesícula biliar de ganado bovino, ovino y caprino, con el fin de estudiar la eclosión de los huevos *in vivo*. Para ello sacrificó los moluscos cada 10 minutos durante una hora, a las 5 y a las 24 horas y examinó el intestino. De esta forma observó un 20% de eclosión a los 20 minutos, llegando a alcanzar el 70% a los 40 minutos, porcentaje que se mantuvo prácticamente constante hasta las 24 horas de iniciado el experimento. Además, realizó estudios *in vitro* para conocer los factores que afectan a la eclosión.

TARRY (1969) administró huevos de *D. dendriticum*, procedentes de las heces y de la vesícula biliar de ovejas, a ejemplares de las especies de moluscos *Helicella itala*, *Cochlicella acuta*, *Cionella lubrica*, *Monacha carthusiana* y *Oxychilus cellarius*. Aunque observó hasta un 11% de huevos eclosionados en las heces de *Helicella itala*, sin embargo no se estableció la infección.

KALKAN (1971) probó en el laboratorio 15 especies de Helicidae, 8 de las cuales, que pertenecían a los géneros *Helicella*, *Helicopsis*, *Monacha*, *Trochoidea*, *Cernuella* y *Cochlicella*, habían sido encontradas albergando el parásito en la naturaleza. Observó huevos eclosionados de *D. dendriticum* en las heces de todas ellas, pero no pudo detectar esporocistos reconocibles, puesto que los moluscos murieron dentro de los primeros 10 días p.i.

De acuerdo con TVERDOKHLEBOV (1973), *D. dendriticum* alcanza la fase de cercaria en 87 días (a 25°C) en *Bradybaena fruticum* y *Euomphalia strigella*; en 65 días (a 30°C) en *Zebrina hohenackeri*; en 70 días (a 30°C) en *B. fruticum* y *E. strigella* y en 85 días (a 30°C) en *Cochlicopa lubrica*.

CHITIASHVILI *et al.* (1977) realizaron infecciones experimentales con *D. dendriticum* en *Helicella derbentina*, *Stenomphalia ravergeri*, *Helicella schelkovnicovi* y *Zebrina hohenackeri*. En dichas especies, y en condiciones de laboratorio, detectaron esporocistos de primer orden a los 64-74 días p.i., esporocistos de segundo orden con cercarias maduras en su interior entre los 84 y 151 días, y expulsión de bolas de mucus a los 450 días p.i.

ALUNDA & MANGA (1982) probaron la receptividad de *Helicella zaratei*, *Helicella bierzona* y *Helicella ordunensis* frente a *D. dendriticum*. Los porcentajes de huevos eclosionados encontrados en las heces de dichas especies fueron 86,49%, 80,20% y 82,21%, respectivamente, mientras que los de los moluscos que albergaban esporocistos a los 60 días p.i. fueron 80%, 80% y 75%.

ALUNDA & ROJO (1982) estudiaron la receptividad a *D. dendriticum* de ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* procedentes de cinco poblaciones de la cuenca del Duero. En dichas poblaciones, el porcentaje de eclosión de los huevos osciló entre 74,72% y 91,46%; el de moluscos con huevos eclosionados entre 95,45% y 100% y el de moluscos parasitados, a los 55-60 días p.i., entre 36,36% y 77,27%.

ALUNDA (1984) probó experimentalmente las 23 especies de Helicidae que habían sido citadas por MANGA (1983) en la provincia de León. Observó eclosión de los huevos de

Dicrocoelium dendriticum en todas, excepto en *Hygromia (Pyrenaearia) cantabrica covadonga*, con valores que oscilaron entre 31% y 83,7%. Sacrificó los moluscos probados a los 100 días p.i., a excepción de los ejemplares de *Helicella bierzona*, *Helicella ordunensis* y *Helicella zaratei*, que los mató a los 60 días p.i. Únicamente señaló desarrollo del parásito en las tres especies de *Helicella* anteriormente mencionadas y en *Candidula intersecta*, *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, *Helicella corderoi*, *Helicella jamuzensis* y *Monacha cartusiana*. Esta misma información obtenida por ALUNDA fue también publicada por ALUNDA & ROJO (1984). Además, ALUNDA (1984) estudió el poder infectante de los huevos de *D. dendriticum* en ejemplares de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, después de 15 meses de haber mantenido en condiciones controladas de campo las heces de ovejas infectadas naturalmente. El autor no pudo establecer una relación lineal simple entre la edad de los huevos y el porcentaje de infección de los moluscos a los 100 días p.i. Estos resultados habían sido ya publicados en 1983 por ALUNDA & ROJO.

Según SIDDIKOV (1986) los huevos de *D. dendriticum*, ingeridos previamente por coleópteros, consiguieron proseguir su desarrollo en el molusco *Helicella candaharica*.

BADIE & RONDELAUD (1990) estudiaron el desarrollo larvario de *D. dendriticum* en adultos de *Cochlicopa lubrica* infectados experimentalmente con huevos de *D. dendriticum* durante 60 horas a 20°C. Al diseccionar dichos moluscos cada 14 días, hasta el día 126 p.i., observamos por vez primera esporocistos madre el día 14, esporocistos hijos el día 56 y cercarias el día 70 p.i. BADIE *et al.* (1992) realizaron estudios histopatológicos para conocer las alteraciones producidas por *D. dendriticum* en distintos órganos de ejemplares de *Cochlicopa lubrica*, sacrificados con igual periodicidad que en el trabajo anterior. De esta forma observaron una necrosis epitelial de desarrollo lento en la glándula de la albúmina, la glándula digestiva y la gónada, seguida, entre los días 70 y 98 p.i., por una reconstitución con hiperplasia celular en las tres glándulas y, en el día 126, por una nueva fase de necrosis únicamente en la glándula digestiva. Al mismo tiempo se producen en el riñón dos ciclos de necrosis y reconstitución. Aunque los autores hallaron frecuentemente esporocistos de segundo orden rodeados de granulomas fibro-amebocíticos en los espacios intertubulares de la glándula digestiva, sin embargo, dichos esporocistos continuaron normalmente su desarrollo hasta la madurez.

ALVAREZ *et al.* (1992) siguieron, mediante técnicas histológicas, la localización y el desarrollo de *D. dendriticum* en moluscos de la especie *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados experimentalmente y sacrificados entre el día 0 y el día 131 p.i. Los moluscos se mantuvieron en el laboratorio a 20°C de temperatura y 40% de humedad relativa. En estas condiciones observaron, en el primer día p.i., acúmulos celulares parasitarios libres y redondeados localizados en el espacio periintestinal del molusco, en la zona en la que coinciden el corazón-riñón, el hepatopáncreas y el intestino. En el día 21 p.i. detectaron pequeños acúmulos celulares, con núcleos grandes y nucleolos evidentes y alguna célula en división, localizados en las zonas de contacto de varios lóbulos hepatopancreáticos. En el día 42 p.i., en localización similar, observaron acúmulos sin pared, con dos tipos de células y una

matriz extracelular (posibles esporocistos primarios). A partir de esta época y hasta el día 113 p.i. el parásito prosiguió su desarrollo hacia esporocistos de segundo orden, con pared propia, que migran a otras partes del hepatopáncreas.

GÓMEZ *et al.* (en prensa) detectaron, por métodos histológicos, la presencia de *D. dendriticum* en ejemplares de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y *Cerņuella (Cerņuella) virgata* infectados experimentalmente y mantenidos en el laboratorio, a 20°C de temperatura y 40% de humedad relativa, hasta su sacrificio a los 90 días p.i. Hallaron esporocistos secundarios de *D. dendriticum* en el 100% de los ejemplares de la primera especie de molusco y sólo en el 40% de los de la segunda. Además, el grado de desarrollo de los esporocistos fue mayor en *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* que en *Cerņuella (Cerņuella) virgata*. Por otra parte, mediante microscopía fotónica estudiaron las alteraciones histopatológicas producidas por *D. dendriticum* en la glándula digestiva y en la gónada de ambas especies de moluscos. Entre dichas alteraciones destacan las infiltraciones hemocíticas que pueden llegar a encapsular al parásito, una vacuolización de las células digestivas y un aumento de lipofuscinas en las células excretoras. Además, en el caso de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* se produjo una casi total castración parasitaria de tipo químico.

MANGA *et al.* (1995) estudiaron el desarrollo larvario de *D. dendriticum* en 24 lotes de moluscos de la especie *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados mensualmente en el laboratorio, entre Octubre de 1992 y Octubre de 1994, y mantenidos en condiciones controladas de campo en la finca experimental del CSIC (Grulleros, León). Al sacrificar los moluscos, de forma periódica, desde el segundo mes p.i. observaron que el lapso de tiempo mínimo para detectar el parásito, al estéreomicroscopio, fue de 2 meses p.i. y correspondió a los experimentos iniciados en Junio y Julio, mientras que el máximo fue de 9 meses en el de Octubre. Para la observación de los esporocistos de segundo orden con cercarias bien desarrolladas (pero no maduras) fue necesario, por lo menos, un período de 6 meses. Este tipo de esporocistos se encontró únicamente en aquellos experimentos en los que la infección de los moluscos se efectuó en meses de primavera.

2.5.- INVESTIGACIONES REALIZADAS EN LOS FORMÍCIDOS, SEGUNDOS HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Como ya comentamos en el apartado 2.2., referente al ciclo biológico de *D. dendriticum*, fueron KRULL & MAPES (1952d) los primeros que encontraron metacercarias de dicho digenea en hormigas (*Formica fusca*), y los que posteriormente, en 1953b, consiguieron cerrar por vez primera el ciclo de *D. dendriticum* administrando, hormigas parasitadas o metacercarias extraídas de las mismas, a corderos libres de infección.

Desde entonces, han sido numerosos los autores (recopilados por CABANAS, 1995) que han abordado investigaciones para conocer, entre otros aspectos, las especies de hormigas

que actúan como segundos hospedadores intermediarios de *D. dendriticum* en la naturaleza y en condiciones experimentales; la prevalencia de parasitación; la época de riesgo para la infección de los hospedadores definitivos; y el comportamiento de las hormigas parasitadas; entre otros aspectos. En el cuadro 7 se recoge información, dada por diversos autores, sobre el número de metacercarias de *D. dendriticum* por hormiga, extraídas de diferentes especies de Formicidae infectadas natural o experimentalmente, así como sobre el tamaño de las mismas.

Según dichos autores, la variabilidad en el número de metacercarias por hormiga puede deberse: a la época del año, pues es más elevado en verano (PARASCHIVESCU *et al.*, 1975); a la diferente afinidad de las especies de hormigas por las bolas de mucus (LOOS-FRANK, 1976); al tipo de vegetación y de especie de hormiga (PARASCHIVESCU, 1978); al tamaño del abdomen de los distintos formícidos, ya que es mayor en los que poseen un abdomen grande (KALKAN, 1976); y a la longitud de la hormiga (SCHÜSTER, 1991, quien además señaló que no influye la especie de hormiga ni la época de recogida).

Las cercarias recién ingeridas por las hormigas atraviesan el buche, en el que dejan cicatrices, y se dirigen al cerebro y al abdomen. Sin embargo, según PEGREFFI (1957) también se han hallado metacercarias en las traqueas y en los músculos de dichos formícidos. KALKAN (1976) observó correlación entre el número de cicatrices en el buche y el de metacercarias en la cavidad abdominal. No obstante, parece que la presencia de un número elevado de metacercarias en el abdomen produce escasos efectos nocivos (SRIVASTAVA, 1975).

Según CARNEY (1969) son una, dos o tres las cercarias de *D. dendriticum* sin cola que atraviesan el buche, llegan al hemocele y se dirigen al ganglio subesofágico, donde se enquistan. Sin embargo, para ANOKHIN (1966) y ROMIG *et al.* (1980) es una larva la que se localiza en la parte ventral del ganglio subesofágico de la hormiga, cerca del nervio mandibular. ANOKHIN (1966) encontró dicha metacercaria, enrollada en un quiste de pared delgada, alojada en una depresión de la parte anterior del ganglio subesofágico, entre las terminaciones nerviosas que se dirigen a diversas partes de la boca (mandíbulas, maxilares y labios).

Por otra parte, se han llevado a cabo investigaciones sobre el tiempo necesario para que las metacercarias, una vez ingeridas por las hormigas, se transformen en infectantes para el hospedador definitivo. Se han mencionado distintos períodos en diferentes especies de hormigas y temperaturas: 38-63 días en *Formica fusca* (KRULL & MAPES, 1952d, 1953b); 38-56 días a 26° C en *Formica fusca*, *Formica rufibarbis* var. *fuscorufibarbis* y *Formica gagates* (VOGEL & FALCAO, 1954); 43 días en *Formica rufibarbis* (GRIGORYAN & AKOPYAN, 1960); 35-38 días a 28-32° C, 40-62 días a 19-20,5° C en *Formica rufibarbis* y *Proformica nasuta* (SVADZHYAN, 1960); 45 días en *Formica sanguinea* (GROSCHAFT, 1961); 40 días o menos a temperatura de 25° C (TIMON-DAVID, 1962); 40 días en *Formica rufibarbis* (HOHORST & LÄMMLER, 1962).

El tamaño de las metacercarias enquistadas señalado por diversos autores (Cuadro 7) varía, en longitud, entre 148 μm (FROMUNDA *et al.*, 1965) y 758 μm (PARASCHIVESCU, 1981b) y, en anchura, entre 91 μm (FROMUNDA *et al.*, 1973) y 288 μm (KALKAN, 1976).

La morfología de la pared quística y los mecanismos de desenquistamiento de las metacercarias de *D. dendriticum* fueron estudiadas por TVERDOKHLEBOV (1984), quien observó 4 capas en la pared de los quistes de dicho parásito: una fibrosa externa (0,42 micras), una hialina (26,66 micras), una fibrosa interna (0,46 micras) y una membrana lipoproteica interna, que rodea inmediatamente a la larva.

Las metacercarias desenquistadas tienen forma alargada con unas dimensiones de 426 μm de longitud x 80 μm de anchura (KLESOV & POPOVA, 1959), de 540-635 x 6-8 μm (MALEK, 1980b) y de 758 x 151 μm (FROMUNDA *et al.*, 1973).

Cuadro 7.-Número de metacercarias de *D. dendriticum* enquistadas por hormiga (en orden ascendente) y tamaño de las mismas, procedentes de distintas especies de Formicidae.

ESPECIE DE HORMIGA	INFECCIÓN / DESARROLLO	METACERCARIAS				AUTORES
		Nº / hormiga	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Grosor pared (µm)	
<i>Formica glebaria</i> *	Natural/—	1-5	148-306	96-204	—	FROMUNDA <i>et al.</i> (1965)
<i>Formica nigricans</i>						
<i>Formica polycтена</i>	Natural/—	1 - < 20	—	—	—	SPINDLER <i>et al.</i> (1986)
<i>Formica sanguinea</i>	Natural/Inicial	1-21	—	—	—	BRANGHAM (1960)
<i>Formica rufibarbis</i>	Natural/—	1-67 (x 22)	371-424 (x 404)	260-310 (x 288)	19-37 (x 25)	DEL RÍO (1967)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/Inicial		—	—	—	
<i>Formica sanguinea</i>	Natural/Inicial		380-430 (x 408)	267-310 (x 288)	19-38 (x 24)	
<i>Formica rufibarbis</i>	Natural/Intermedio	1-117	368-448	288-336	80-96	KALKAN (1976)
<i>Formica nigricans</i>	Natural/Intermedio	1-186 (x 97,52)	—	—	—	CABANAS (1995)
<i>Formica nigricans</i>	Natural/—	1-186	—	—	—	MANGA <i>et al.</i> (1991a)
<i>Formica lugubris</i>	Natural/—	1-212	—	—	—	JONLIJA <i>et al.</i> (1972)
<i>Formica polycтена</i>	Natural/—	1-212	—	—	—	JONLIJA <i>et al.</i> (1973)
<i>Formica pratensis</i> **	Experimental/—	1-351 (x 121)	280-320 (x 298)	150-210 (x 181)	15-22 (x 19)	DEL RÍO (1967)
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	1-580	325-465	—	10-40	MALEK (1980b)
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	1-580	—	—	—	DENEV <i>et al.</i> (1970)
<i>Formica pratensis</i> **						
<i>Formica cunicularia</i>	Natural/—	2-56	—	—	—	MANGA <i>et al.</i> (1991a)
<i>Formica sanguinea</i>	Natural/Final	2-63	—	—	—	

ESPECIE DE HORMIGA	INFECCIÓN / DESARROLLO	METACERCARIAS				AUTORES
		Nº / hormiga	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Grosor pared (µm)	
<i>Formica rufibarbis</i>	Natural/—	2-127 (x 38)	—	—	—	SCHUSTER (1991)
<i>Formica cunicularia</i>	Natural	2-300	—	—	—	BADIE <i>et al.</i> (1973)
<i>Formica nigricans</i>						
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	2-313 (x 76)	—	—	—	SCHUSTER (1991)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/Intermedio	5-9	758	151	—	PARASCHIVESCU (1981b)
<i>Cataglyphus bicolor</i> ***	Natural/—	5-155	420-440	280-330	20	ANGELOVSKI & ILIEV (1975)
—	Natural/Incial	5-165	174-220	90-167	5,4	PARASCHIVESCU <i>et al.</i> (1975)
—	Natural/Intermedio		250-301	168-210	—	
---	Natural/Final		480-572	160-320	—	
<i>Formica fusca</i>	Natural/Final	6-85	—	—	—	SVADZHYAN (1956)
<i>Formica rufibarbis</i>	Natural/—		—	—	—	
<i>Proformica nasuta</i>	Natural/—					
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	6-103	325-465	—	10-40	MAPES (1951); KRULL & MAPES (1952d)
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	6-128	—	—	—	KRULL & MAPES (1953a)
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	7-185	—	—	—	ILIEV & ANGELOVSKI (1981)
<i>Formica rufibarbis</i>						
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	8-174	—	—	—	GRUS (1970)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	11-173	—	—	—	PARASCHIVESCU (1976)
<i>Formica cunicularia</i>						

<i>Formica (Serviformica)</i> <i>rufibarbis</i> var. <i>clarorufibarbis</i>	Natural/—	16 (x)	—	—	—	TOHMÉ & TOHMÉ (1977)
<i>Formica fusca</i> <i>Formica gagates</i> <i>Formica rufibarbis</i> var. <i>fuscorufibarbis</i>	Experimental/—	18-75	—	—	—	VOGEL & FALCAO (1954)
<i>Formica rufibarbis</i>	Experimental/—	24-300	—	—	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
<i>Formica rufibarbis</i>	Natural/—	38-107	—	—	—	MANGA <i>et al.</i> (1991a)
<i>Formica fusca</i>	Natural/Intermedio	31-37	456	232	—	KRULL & MAPES (1953b)
<i>Formica cunicularia</i> <i>Formica rufibarbis</i>	Natural/—	48-60	—	—	—	HOHORST & LÄMMLER (1962)
<i>Formica rufibarbis</i> <i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	55	—	—	—	VUJIC (1972)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	70-80 (x)	—	—	—	DEMENT'EV & KARABAEV (1968)
<i>Formica polycтена</i> <i>Formica cunicularia</i> <i>Formica pratensis</i>	Natural/— Experimental/— Experimental/—	Pocas-> 100	—	—	—	LOOS-FRANK (1978)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	100	—	—	—	PARASCHIVESCU & RAICEV (1980)
---	---	128	465	325	16-23	BORCHERT (1981)
---	---	128	—	—	—	SOULSBY (1988)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—	176-443	—	—	—	SRIVASTAVA (1975)
<i>Formica cunicularia</i> <i>Formica nigricans</i>	Natural/—	200	—	—	—	BADIE (1979)

ESPECIE DE HORMIGA	INFECCIÓN / DESARROLLO	METACERCARIAS				AUTORES
		Nº / hormiga	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Grosor pared (µm)	
---	—	200-300	—	—	—	TIMON-DAVID (1962)
<i>Formica fusca</i>	Experimental/—	220	—	—	—	TARRY (1969)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/Inicial	251	242-264	171-316	—	KLESOV & POPOVA (1956)
	Natural/Final		379	292	—	
<i>Formica cunicularia</i>	Natural/—	> 300	—	—	—	HOHORST (1962)
<i>Formica fusca glebaria</i> ****	Natural/—	> 300	—	—	—	GROSCHAFT (1961)
<i>Formica pratensis</i> **	Natural/—					
<i>Formica sanguinea</i>	Natural y experimental/—					
<i>Formica fusca</i>	Natural/—	> 300	540-635	—	6-8	KRULL & MAPES (1953b)
<i>Formica cunicularia</i>	Natural/Inicial	—	172-223	91-96	5,4	FROMUNDA <i>et al.</i> (1973)
	Natural/Intermedio		249-303	169-214	---	
	Natural/Final		481-579	260-311	---	
---	—	—	228-440	192-328	10-40	ROSICKY & GROSCHAFT (1982)
---	Natural/Inicial	—	243-400 (x365)	200-270(x 250)	16-23 (x 20)	ODENING (1969)
<i>Formica fusca</i>	—	—	295-300	230-240	11-12	MARCHAND (1966)
---	Natural/—	—	325-450	---	---	EUZEBY (1958)
---	—	—	500-1.000	---	---	BENGTSSON <i>et al.</i> (1968)

De acuerdo con BERNARD (1968): * Sinónimo de *Formica rufibarbis*; ** Sinónimo de *Formica nigricans*; *** Sinónimo de *Cataglyphis bicolor*; **** Sinónimo de *Formica cunicularia*.

2.6.- ESTUDIO ISOENZIMÁTICO DE ADULTOS, FASES LARVARIAS Y HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

El que el control de la dicroceliosis no sea satisfactorio (ECKERT & HERTZBERG, 1994), podría deberse, entre otras razones, a la posible variabilidad genética del parásito, ya que muchos helmintos que son morfológicamente similares muestran marcadas diferencias en factores epidemiológicamente significativos, tales como, infectividad, patogenicidad, inmunogenicidad y sensibilidad a las drogas (ROLLINSON *et al.*, 1986).

Desde hace años se están llevando a cabo con éxito las técnicas de electroforesis de enzimas, tanto para determinar las relaciones entre varias especies de parásitos y sus hospedadores, como para conocer la variabilidad genética dentro de cada especie (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1985). Además, dichas técnicas proporcionan caracteres diagnósticos apropiados para la identificación de especies (AVISE, 1974; AYALA, 1975; FERGUSON, 1980; OXFORD & ROLLINSON, 1983; SELANDER & KAUFMAN, 1975; MANGA & ROLLINSON, 1986) e, incluso, de cepas de un mismo parásito (LEÓN *et al.*, 1986). Los estudios isoenzimáticos, realizados con la ayuda de la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, pueden revelar una información muy precisa sobre la composición genética de los animales, y aunque la expresión isoenzimática puede estar influida por factores externos, siempre hay un número suficiente de isoenzimas estables para su análisis y comparación. Además, la identificación de sus bandas de actividad es también precisa, mientras que la interpretación de los caracteres morfológicos puede ser a menudo muy subjetiva (ROLLINSON, 1980). Por otra parte, los modelos isoenzimáticos de las distintas fases del ciclo vital de un animal pueden diferenciarse entre sí (FERGUSON, 1980). Según ROSS *et al.* (1987), parece existir una correlación entre el genotipo del parásito, obtenido mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida, y la especie de hospedador definitivo.

De acuerdo con nuestra información, no se ha utilizado la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida para la caracterización del adulto y de las distintas fases de *D. dendriticum*. Sin embargo, LEÓN *et al.* (1986, 1988, 1989), con la ayuda de la técnica de electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida, estudiaron la actividad de diversas enzimas en muestras de vermes adultos de *D. dendriticum*, procedentes de distintos hospedadores. En el primer trabajo LEÓN *et al.* observaron, mediante el examen densitométrico, que el patrón enzimático de LDH (5 bandas de actividad) en *D. dendriticum*, recolectado de *Bos taurus* y de *Ovis aries*, era igual en ambos hospedadores, pero distinto del de *Capra hircus*. Dichos autores, en su publicación de 1988, detectaron patrones enzimáticos de MDH (2 bandas de actividad) muy similares en *D. dendriticum* de *Capra hircus* y de *Ovis aries*. Además, observaron una situación semejante cuando estudiaron la enzima málica.

LEÓN *et al.* (1989) hallaron las mismas bandas de actividad de AcP (3 bandas), al analizar especímenes de adultos de *D. dendriticum* procedentes de *Capra hircus* y de *Ovis*

aries. Además, observaron 4 bandas isoenzimáticas de actividad esterasa en parásitos recogidos de *Capra hircus* y 3 en los de *Ovis aries*.

La identificación por métodos convencionales de las fases larvarias de los parásitos, halladas en moluscos recolectados en la naturaleza, es muy difícil y arriesgada, principalmente cuando no es posible proseguir y completar el ciclo biológico. Por esto, en los últimos años se han utilizado las técnicas de isoelectroenfoque para identificar algunas especies de parásitos y de sus moluscos hospedadores intermediarios, estudiar su variabilidad genética y determinar las interrelaciones entre ellas (ROSS, 1977; WRIGHT *et al.* 1979a; ROLLINSON & SOUTHGATE, 1985; SOUTHGATE *et al.*, 1985b; DE BONT *et al.*, 1991).

Según nuestra información, no se han realizado trabajos, utilizando tales técnicas isoenzimáticas, para caracterizar los estadios larvarios de *D. dendriticum* y detectarlos en los moluscos y hormigas.

No obstante, los estudios histoquímicos de ZDARSKA & PANIN (1977) revelaron que en los esporocistos de *D. dendriticum* existía actividad de la fosfatasa ácida, en el extremo en que se sitúa el tocostoma. Asimismo, detectaron fosfatasa ácida y esterasa no específica en las células de las glándulas cistógenas de las cercarias, y colinesterasa en el ganglio cerebral y en los cordones nerviosos de las mismas.

Por otra parte, MANGA & ROLLINSON (1986) utilizaron la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida para la identificación de siete especies de *Helicella* (Mollusca, Stylommatophora) de la provincia de León, cinco de las cuales fueron halladas por MANGA (1992) albergando *D. dendriticum* en la naturaleza. Mediante dicha técnica MANGA & ROLLINSON estudiaron la actividad de las enzimas MDH, GPI, PGM, AcP y HBDH, en extracto de hepatopáncreas de las distintas especies de moluscos. De acuerdo con estos autores, las enzimas tipo identificadas para MDH y GPI permiten diferenciar las especies de *Helicella* de la provincia de León, incluso las dos más relacionadas desde el punto de vista morfológico (*Helicella jamuzensis* y *Helicella zaratei*).

La actividad detectada para cada una de las enzimas fue la siguiente: MDH, 5 tipos enzimáticos, cada uno constituido por, al menos, 3 bandas situadas en un pH de 5 a 8; GPI, más polimórfica, 7 tipos enzimáticos con 2 a 3 bandas principales, en un pH de 5,5 a 8,5; PGM, 2 a 4 bandas de actividad situadas en un rango de pH de 5,5 a 7,0; AcP, una banda difusa entre 4,5 y 5,5 de pH; y HBDH, bandas de actividad débiles situadas entre 4 y 6 de pH.

TEGELSTRÖM *et al.* (1983) estudiaron, mediante isoelectroenfoque, las proteínas de las especies de hormigas *Formica rufa*, *Formica polyctena* y *Formica pratensis* (= *Formica nigricans*), en homogeneizado de cabeza y tórax. Estas especies han sido citadas como segundos hospedadores intermediarios de *D. dendriticum* por diversos autores, que se recogen en el Cuadro 7 y en la revisión realizada por CABANAS (1995). Los estudios de TEGELSTRÖM *et al.* (1983) revelaron la presencia de alrededor de 68 bandas de proteínas generales y 18 de estererasas no específicas. Los autores no observaron diferencias en las proteínas generales y en las estererasas no específicas entre las tres especies de hormigas.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- TÉCNICA DE ISOELECTROENFOQUE

Para evitar repeticiones, a continuación describimos, de forma conjunta, la técnica de isoelectroenfoque utilizada en la caracterización de los esporocistos de *D. dendriticum* procedentes de los moluscos, primeros hospedadores intermediarios, de las metacercarias extraídas de las hormigas y de los adultos obtenidos del hígado del ganado ovino. Asimismo, se estudió el hepatopáncreas de algunos moluscos libres de infección y el de otros que contenían esporocistos de *D. dendriticum*.

3.1.1.- ETAPAS DE DESARROLLO DE LA TÉCNICA

3.1.1.1.- Enzimas estudiadas

Se estudió la actividad de las siguientes enzimas: lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), glucosa fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1), fosfatasa ácida (AcP, EC 3.1.3.2), -glicerofosfato deshidrogenasa (-GPDH, EC 1.1.1.8), hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH, EC 1.1.1.30) y malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37).

3.1.1.2.- Procesado del material

Parte de las muestras biológicas se conservaron en nitrógeno líquido hasta su estudio, momento en que se dejaban descongelar para realizar la homogeneización; el resto se procesaron inmediatamente después de su obtención. La homogeneización se efectuó de acuerdo con las pautas descritas por MANGA & ROLLINSON (1986). Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 9.375 g y a 4°, pero durante 30 minutos, las del hepatopáncreas de los moluscos, y sólo por espacio de 5 minutos las de los adultos y fases larvarias (esporocistos y metacercarias) del parásito. Para ello, se utilizó una ultracentrífuga refrigerada Beckman.

3.1.1.3.- Equipamiento

La técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida se ha realizado en un sistema LKB Multiphor 2117, compuesto por un equipo refrigerador Multitemp II Thermostatic Circulator 2198, una cubeta Multiphor 2117 y una fuente de alimentación Power Supply 2197.

3.1.1.4.- Preparación y utilización de los geles

El molde del gel se conseguía superponiendo dos cristales, el superior de 250 mm (longitud) x 125 mm (anchura) x 3 mm (grosor) y el inferior de 260 mm x 125 mm x 1 mm. Para preparar un gel de 0,7 mm de grosor se colocaba entre ambos cristales y adherido al superior un separador de dicho grosor.

A 50 mm de uno de los bordes del cristal inferior se trazaba en el mismo una muesca, en sentido transversal, que permitía, después de corridas las muestras en el gel, separar con facilidad dicho pedazo de vidrio, en el que previamente se había depositado la muestra de hemoglobina.

Los cristales utilizados como soporte de los geles se trataron, por una parte, con Silane A 174 y acetona y, por la otra, con Repel-Silane, según el método descrito por ORTIZ (1990).

Para la realización de los geles se utilizaron las siguientes sustancias: Acrilamida y bis-acrilamida, TEMED, persulfato amónico y anfólicas de diferentes rangos de pH. Se siguió el protocolo especificado en LKB 2117 Multiphor Electrophoresis System Laboratory Manual (ANÓNIMO, 1986).

Con el fin de conocer el gradiente de pH en el que se detectaba actividad para cada una de las enzimas estudiadas en nuestras muestras, se usaron geles con los siguientes gradientes de pH: 3,5-9,5; 4-6; 4-7,5; 5-7 y 5-8. A la vista de los resultados obtenidos, se decidió estudiar la actividad de LDH, GPI y PGM en geles de pH 5-8 y la de AcP en geles de pH 4-6. La actividad de -GPDH, HBDH y MDH, se siguió siempre en geles con un rango de pH 3,5-9,5.

Una vez preparado el gel se conservaba a 4°C hasta su uso uno o dos días después. El gel se liberaba del molde introduciendo una pequeña espátula entre ambos cristales y haciéndola girar suavemente.

Para iniciar la técnica, se colocaba el cristal que soporta el gel sobre la placa de la cubeta previamente refrigerada a 3°C. Entre ambos, se vertía agua destilada que ayudaba a situar correctamente el cristal del gel y a la conducción de la corriente.

La preparación de las soluciones electrolíticas (hidróxido sódico 1M para el ánodo y ácido fosfórico 1M en el cátodo) se hizo de acuerdo con lo descrito en LKB 2117 Multiphor Electrophoresis System Laboratory Manual (ANÓNIMO, 1986). La colocación sobre el gel

de las tiras de papel impregnadas con dichas soluciones se realizó siguiendo lo señalado por ORTIZ (1990).

La técnica de isoelectroenfoque y el revelado de las isoenzimas se efectuaron de acuerdo con el protocolo descrito por WRIGHT & ROLLINSON (1979) y DE BONT *et al.* (1994).

3.1.1.5.- Establecimiento de los modelos isoenzimáticos

Para la evaluación de la actividad enzimática en los geles se tuvo en cuenta el método seguido por ROSS (1976).

Los modelos isoenzimáticos del parásito adulto, de los esporocistos procedentes de los moluscos y de las metacercarias albergadas por las hormigas, se realizaron con todas las bandas de actividad observadas. No obstante, dentro de ellas se establecieron 3 categorías: fuertes (■), débiles (▣) y muy débiles (□).

Para cada enzima estudiada, se calculó la frecuencia (expresada en porcentaje) con que se observó cada tipo enzimático, en los adultos de *D. dendriticum*.

3.2.- ESTUDIO EN LOS FORMÍCIDOS

3.2.1.- RECOLECCIÓN DE LAS HORMIGAS HALLADAS EN EL CAMPO EN FASE DE TETANIA

Todas las hormigas utilizadas en la infección de los corderos pertenecían a la especie *Formica rufibarbis* Fabricius, 1794 (Formicidae, Formicinae) y procedían de una zona cercana a León, en la que, con anterioridad, ya habíamos detectado la infección por *D. dendriticum* en los moluscos, primeros hospedadores intermediarios, y en el ganado ovino, hospedador definitivo.

La recogida de las hormigas en tetania se efectuó desde Mayo a Octubre, primordialmente a primeras horas de la mañana y, algunas veces, por la tarde. En el momento de la recolección se controló la temperatura ambiental a ras de suelo y la humedad relativa. Las hormigas recogidas en fase de tetania se trasladaron al laboratorio en frascos de polietileno debidamente rotulados con el lugar y la fecha de recogida.

3.2.2.- MANTENIMIENTO DE LAS HORMIGAS EN EL LABORATORIO

Una vez en el laboratorio, las hormigas se colocaron en hormigueros artificiales contruidos con cajas de polietileno de 2 tamaños: el grande de 23 x 16,5 x 6,5 cm y el pequeño de 15 x 11,5 x 6,5 cm. La parte inferior de una de las paredes laterales de cada caja

se perforó para acoplar un tubo de 25 cm de largo y 1,5 cm de diámetro, abierto por ambos extremos. En el extremo libre de dicho tubo se introdujo otro de centrífuga lleno de agua, la cual se retenía con un tapón de algodón situado en la unión de los dos tubos. Mediante este dispositivo y un algodón humedecido que se colocaba en el centro de la caja se mantenía un ambiente húmedo en el hormiguero. Además, la prolongación lateral de cada caja se cubrió con un capuchón de papel opaco, que permitía a las hormigas refugiarse en la oscuridad, simulando lo que ocurre en los hormigueros en la naturaleza.

Por otra parte, en el fondo de cada caja se mantuvieron, continuamente, pequeñas placas llenas de miel diluida en agua, que servía como alimento.

Las hormigas se tuvieron en estas condiciones hasta el día en que se infectaban los hospedadores definitivos.

3.2.3.- OBTENCIÓN Y RECUENTO DE LAS METACERCARIAS DE LAS HORMIGAS INFECTADAS

De las 1.273 hormigas recolectadas en el campo, en fase de tetania, 814 fueron diseccionadas para la obtención de las metacercarias necesarias para la infección de los hospedadores definitivos. El resto del material, tanto de metacercarias como de hormigas, se introdujo en nitrógeno líquido para la realización posterior de estudios isoenzimáticos, o en alcohol de 70° para efectuar estudios morfológicos. No obstante, unos pocos ejemplares se mantuvieron vivos en hormigueros artificiales, con el fin de conocer la longevidad de los mismos.

Previo a la disección, las hormigas, introducidas en un contenedor de cristal, se anestesiaban con éter impregnado en algodón y sólo en 18 especímenes se midió la longitud con un calibrador. Seguidamente se separaba la cabeza y el abdomen de cada ejemplar, con ayuda de unas pinzas, para su estudio helmintológico.

Las fotografías de las hormigas en tetania fueron tomadas en el laboratorio, con un equipo Photoautomat MPS 45 acoplado a un estéreomicroscopio WILD (M 400).

El abdomen de cada hormiga, colocado en una placa de Petri con suero fisiológico, se abrió con la ayuda de dos agujas enmangadas muy finas y cortas, bajo estéreomicroscopio. A continuación, se procedió al recuento de las metacercarias, una vez liberadas del abdomen.

Se realizó la disección, en fresco, del cerebro de algunas hormigas halladas en fase de tetania, y que también contenían metacercarias de *D. dendriticum* en el abdomen, con el fin de conocer el número de parásitos "larvas cerebrales" y la situación de los mismos en el ganglio subesofágico.

Asimismo, se observaron las cicatrices producidas por las cercarias al atravesar la pared del buche en su ida hacia la cabeza.

3.2.4.- ESTUDIO DE LAS METACERCARIAS

3.2.4.1.- Morfológico

En 25 metacercarias enquistadas extraídas del abdomen se midió la longitud y la anchura máxima corporal, y el grosor de la pared del quiste. Además, se efectuaron las mismas medidas, a excepción de la del grosor de la pared del quiste, en 25 metacercarias desenquistadas en agua destilada y fijadas posteriormente en alcohol. Dichos estudios se llevaron a cabo con la ayuda de un ocular micrométrico incorporado a un microscopio Leitz Dialux 20. Las fotografías se realizaron con cámara Photoautomat MPS 45 acoplada al microscopio anteriormente mencionado y, en ocasiones, al estéreomicroscopio Wild (M 400).

3.2.4.2.- Isoenzimático

Para caracterizar las metacercarias de *D. dendriticum* mediante la técnica de isoelectroenfoque descrita en el apartado 3.1., se analizó la actividad enzimática de LDH, GPI, PGM y AcP en 1.608 metacercarias, estudiadas en grupos de 15 a 185, procedentes de cada uno de los 33 ejemplares de *Formica rufibarbis* diseccionado (Cuadro 8). Para cada enzima se establecieron los correspondientes modelos isoenzimáticos.

H O R M I G A S		NÚMERO METACERCARIAS DE <i>D. DENDRITICUM</i> ANALIZADAS PARA			
PROCEDENCIA*	NÚMERO EXAMINADO	LDH	GPI	PGM	AcP
Grulleros	13	574	574	424	574
San Cipriano del Condado	11	552	552	552	552
Valencia de Don Juan	1	23	23	23	23
Villafale	8	459	349	459	459

* Provincia de León.

Cuadro 8.- Metacercarias de *D. dendriticum* estudiadas para cada sistema enzimático.

3.3.- ESTUDIO EN EL GANADO OVINO

3.3.1.- MANEJO DE LOS ANIMALES PREVIO A LA INFECCIÓN

Los corderos utilizados en las investigaciones eran de raza Churra y procedían del rebaño de la Estación Agrícola Experimental (CSIC, León). Los animales se pesaron el día del nacimiento y se identificaron mediante un crotal en la oreja. Dichos corderos se alimentaron con leche materna hasta su separación de las madres a los 3 meses, edad en que se castraron y se eliminó el rabo, para mayor comodidad durante la recogida de heces. Inmediatamente se trasladaron a otra dependencia en la que permanecieron aislados el resto del experimento. No obstante, para asegurar la ausencia de posibles parásitos antes de su infección experimental, se trataron en dos ocasiones (una a los 2,5 meses de edad y otra a los 3,5 meses) con Albendazol (Veterin-Betazol) por vía oral, a razón de 4 ml/10Kg, dosis recomendada contra *D.dendriticum*, por los fabricantes del producto. El estado de los animales seleccionados para la realización de las investigaciones era satisfactorio, sin síntomas patológicos evidentes.

3.3.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LOS CORDEROS

En este estudio se utilizaron 32 corderos de 4 meses de edad, 24 de los cuales se infectaron con metacercarias de *D. dendriticum* procedentes del abdomen de hormigas halladas en el campo en fase de tetania, y 8 se mantuvieron como testigos. Las metacercarias, una vez liberadas del abdomen en suero fisiológico, se agrupaban de acuerdo con la dosis a probar y se introducían, mediante un capilar, en varias cápsulas de gelatina de unos 0,67 ml de volumen, las cuales, a su vez, se incluían en otras de aproximadamente 0,96 ml que, por mantenerse rígidas durante más tiempo, facilitaban la administración oral de las metacercarias a los corderos con una pistola dosificadora.

De acuerdo con la dosis que recibieron los animales infectados y la época de sacrificio de éstos y de los testigos, se establecieron los siguientes grupos y subgrupos (Cuadro 9):

Grupo 1: 12 corderos infectados con 1000 metacercarias.

Subgrupo 1: 6 corderos sacrificados a los 2 meses.

Subgrupo 2: 6 corderos sacrificados a los 6 meses .

Grupo 2: 12 corderos infectados con 3000 metacercarias.

Subgrupo 1: 6 corderos sacrificados a los 2 meses.

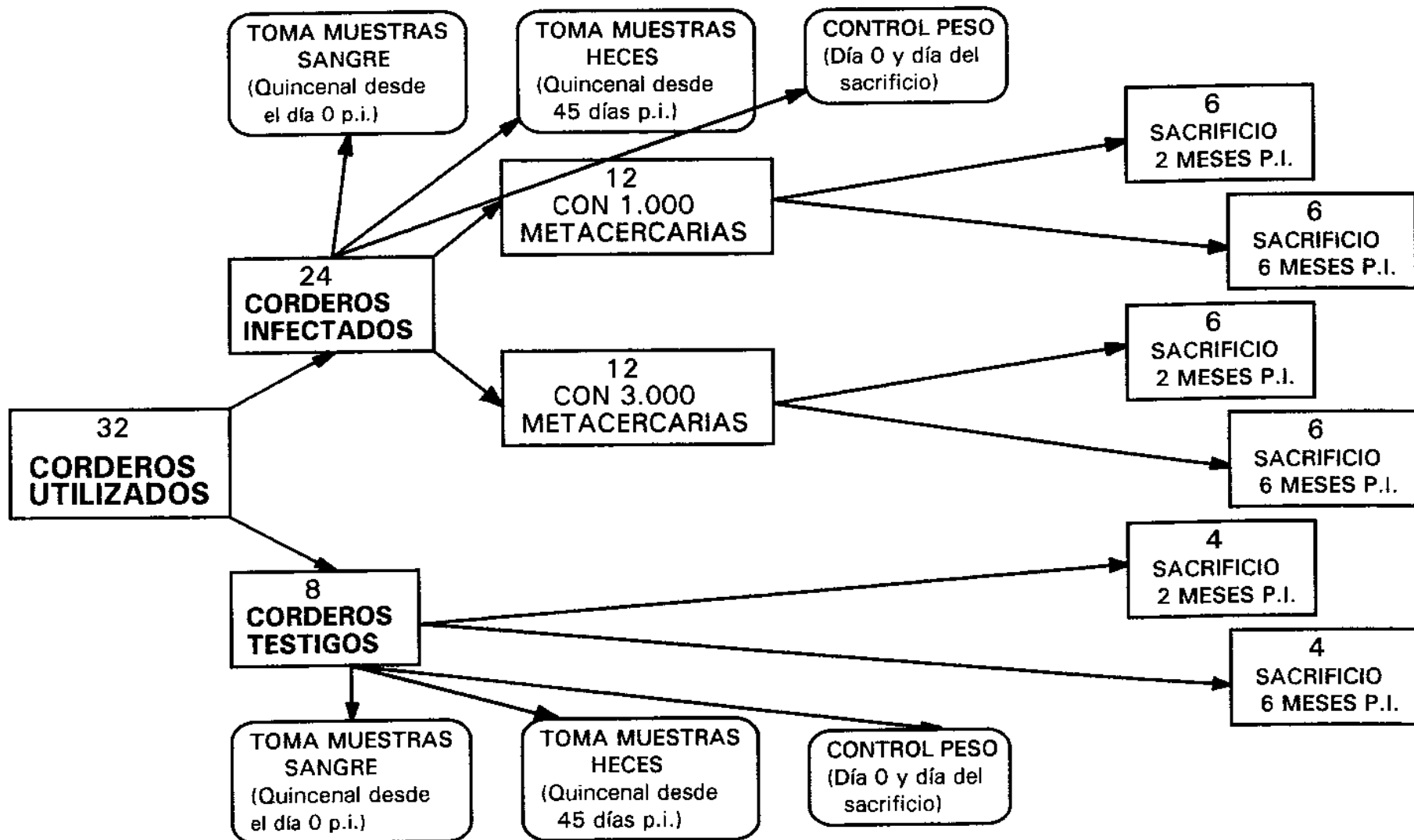
Subgrupo 2: 6 corderos sacrificados a los 6 meses.

Grupo 3: 8 corderos testigos sin infectar.

Subgrupo 1: 4 corderos sacrificados a los 2 meses.

Subgrupo 2: 4 corderos sacrificados a los 6 meses.

Además de éstos se infectaron otros 2 corderos, uno recibió un total de 519 metacercarias, administradas en 2 ocasiones con un intervalo de 3 meses, y el otro 3.772 metacercarias, suministradas intermitentemente durante más de un año. Dichos animales sirvieron como donantes de los huevos de *D. dendriticum* utilizados en la infección experimental de moluscos.



Cuadro 9.- Esquema de los experimentos realizados en los corderos infectados con *Dicrocoelium dendriticum* y en los testigos.

3.3.3.- CONDICIONES DE MANTENIMIENTO Y CONTROL DE LOS ANIMALES DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

Los corderos se mantuvieron en régimen de estabulación, en un local con una zona cubierta y con otra al aire libre (pero sin tener acceso al pasto), y fueron alimentados a base de cereales (cebada y avena) y forraje (alfalfa seca y paja de cereales).

Se realizaron controles del peso de los animales infectados y testigos (Cuadro 9), para observar las posibles variaciones del mismo. Se pesaron el día cero post-infección (p.i.) y el día del sacrificio de los mismos, es decir, a los 2 ó 6 meses p.i., según los casos.

Asimismo se exploraron los animales infectados y testigos a lo largo de toda la experiencia, con el fin de detectar síntomas clínicos aparentes.

3.3.4.- TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras se extrajeron de los animales infectados y testigos por la mañana y quincenalmente desde el día 0 p.i. hasta el sacrificio de los mismos (Cuadro 9).

Mediante venopunción en la yugular, con agujas estériles de 0,9 mm de diámetro y 25 mm de longitud, se tomaron dos muestras de sangre: una en un tubo estéril de 10 ml de capacidad y la otra en uno de 5 ml que contenía anticoagulante (EDTA dipotásico).

3.3.5.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Una parte de las muestras de sangre se dejaron coagular durante dos horas a temperatura ambiente, transcurrido dicho tiempo se centrifugaron durante 15 minutos a 500 g para la obtención de las correspondientes muestras de suero. Éstas se conservaron en alícuotas de 400 microlitros en el congelador a -84°C hasta su procesamiento posterior. Dichas muestras sirvieron para realizar el análisis de las enzimas marcadoras hepáticas y otros parámetros bioquímicos. Las muestras de sangre sin coagular se utilizaron inmediatamente para el análisis de los parámetros hemáticos.

3.3.5.1.- Determinación de los niveles séricos de enzimas marcadoras hepáticas y otros parámetros bioquímicos

A partir de las muestras de suero se determinaron los parámetros bioquímicos y enzimas séricas que se citan a continuación.

Parámetros bioquímicos

- Proteínas totales (PROT) (g / dl).
- Albúmina (ALB) (g / dl).
- Bilirrubina total (BIL) (mg / dl).
- Glucosa (GLU) (mg / dl).

Enzimas séricas

- Aspartato amino-transferasa (ASAT ó AST) ó glutámico oxalacetato transferasa (GOT) (UI / L).
- Alanino amino-transferasa (ALAT ó ALT) ó glutámico pirúvico transferasa (GPT) (UI/L).
- Fosfatasa alcalina (FA) (UI / L).
- Láctico deshidrogenasa (LDH) (UI / L).
- Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) (UI / L).

La determinación de todos estos parámetros se realizó únicamente en muestras tomadas cada 30 días. Éstas se depositaban sobre tiras reactivas y se analizaban mediante un autoanalizador de química seca marca Spotchem, modelo SP-4410.

La variación en los valores de cada parámetro en los corderos infectados, con respecto a los de los testigos, tanto cuando se consideraron los infectados en conjunto, como separados por dosis, se calculó por la fórmula: $(x \text{ infectados} - x \text{ testigos}) 100 \div x \text{ testigos}$. De igual forma, la variación de los valores de cada parámetro en los animales infectados con 3.000 metacercarias con respecto a los de los infectados con 1.000, se calculó por la fórmula: $(x \text{ infectados con 3.000 metacercarias} - x \text{ infectados con 1.000 metacercarias}) 100 \div x \text{ infectados con 1.000 metacercarias}$.

3.3.5.2.- Estudio de parámetros hemáticos

A partir de la sangre sin coagular se realizó la valoración de los siguientes parámetros:

Eritrocitos ($x 10^6$) / mm^3

Leucocitos ($x 10^3$) / mm^3

Hematócrito (%)

Hemoglobina (g / dl)

Índices eritrocíticos

- Volumen corpuscular medio (VCM) (fl)
- Hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg)
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (g / dl)

Fórmula leucocitaria

- Linfocitos (%) (por mm^3)
- Monocitos (%) (por mm^3)
- Neutrófilos (%) (por mm^3)
- Eosinófilos (%) (por mm^3)

El recuento de eritrocitos y leucocitos en cada muestra de sangre se hizo al microscopio óptico utilizando la cámara de Thoma, previa dilución en solución fisiológica al 9 % para el

recuento de los hematíes, y en el reactivo de Turk para el de los leucocitos. Dichas diluciones se realizaron en pipetas cuentaglóbulos.

Para la determinación del hematócrito, la sangre, depositada en un capilar de microhematócrito, se centrifugó en una centrífuga Haemofuge A marca Heraeus Sepatech durante 15 minutos a 8.750 g. Seguidamente, se realizó la lectura con la correspondiente escala.

La medición de la concentración de hemoglobina se llevó a cabo con la ayuda de un contador celular Coulter Plus VI electronics, por el personal del Servicio de Hematología del Complejo Hospitalario de León ("Virgen Blanca").

El volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{VCM} = [\text{Hematocrito (\%)}] 10 \div \text{Eritrocitos (en millones / mm}^3\text{)}$$

$$\text{HCM} = [\text{Hemoglobina (g/dl)}] 10 \div \text{Eritrocitos (en millones / mm}^3\text{)}$$

$$\text{CHCM} = [\text{Hemoglobina (g/dl)}] 100 \div \text{Hematocrito (\%)}$$

La fórmula leucocitaria se determinó al microscopio óptico sobre frotis de sangre teñidos mediante la técnica de May-Grunwald-Giemsa. Dicho estudio también se realizó en el Complejo Hospitalario.

La variación de los valores de cada parámetro estudiado en los corderos, se calculó de la forma descrita en el apartado 3.3.5.1.

3.3.6.- TOMA DE MUESTRAS DE HECES

Las heces se extrajeron directamente del recto de cada animal. A pesar de que los corderos se mantuvieron aislados y habían sido tratados con antihelmínticos, como se especificó anteriormente, se tomaron muestras de heces de todos ellos el día 0 p.i., para corroborar la ausencia de huevos de *D. dendriticum*. La recogida de las muestras de heces se reanudó, a primeras horas de la mañana, al mes y medio p.i. y se continuó dos veces por semana hasta el día en que eliminaron huevos por primera vez. A partir de esta fecha, se tomaron muestras quincenalmente (Cuadro 9) en las primeras horas de la mañana y últimas de la tarde hasta el final de la experiencia, con el fin de seguir las posibles variaciones en la eliminación a lo largo del día.

3.3.7.- REALIZACIÓN DE ANÁLISIS COPROLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN Y POSTERIOR RECuento DE HUEVOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

De cada muestra de heces se procesaron 3 gramos, por el método de sedimentación, y el recuento de huevos por gramo (hpg) se realizó, por duplicado, al microscopio óptico en cámaras Mc Master.

Además, se estudió el tamaño de los huevos de *D. dendriticum* en 25 ejemplares obtenidos de los corderos infectados experimentalmente. Para ello, se midió el diámetro mayor y menor de los mismos, con la ayuda de un ocular micrométrico incorporado a un microscopio Leitz Dialux 20. Las fotografías se realizaron con cámara Photoautomat MPS 45 acoplada al microscopio anteriormente mencionado.

3.3.8.- SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES

Una vez aplicada una dosis letal de barbitúrico (tiopental sódico), por vía intravenosa, el sacrificio se llevó a cabo por exanguinación seguido de una necropsia reglada, aunque únicamente describiremos la extracción del hígado, vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos, objeto de nuestro estudio.

Tras la inspección externa del animal, se colocó en decúbito dorsal y se efectuó una incisión longitudinal en la piel, a lo largo de la línea media ventral desde el borde inferior de la mandíbula hasta la región del periné, respetando el pene y el escroto.

A continuación, se desprendió la piel y se seccionaron los músculos pectorales, entre la extremidad anterior y el tórax, y los músculos mediales de la extremidad posterior, desarticulando la cadera.

Una vez desollado el animal y comprobado el aspecto del tejido conjuntivo subcutáneo y de los ganglios superficiales, se abrió la cavidad abdominal, mediante una incisión a lo largo de la línea blanca, desde la apófisis xifoides del esternón hasta la sínfisis pelviana. Además, practicamos un corte que bordeaba el límite de la última costilla.

En la inspección de la cavidad abdominal se observó su contenido, la posición e interrelaciones de los diferentes órganos, así como la superficie del diafragma y su relación con el hígado. Además, se verificó si los conductos biliares extrahepáticos eran o no permeables, presionando ligeramente la vesícula biliar y observando si pasaba bilis al duodeno. A continuación, se procedió a la evisceración, realizando primeramente una doble ligadura en el cardias y en el recto y desprendiendo con cuidado el tracto digestivo (preestómago, abomaso e intestino). Para extraer el hígado, junto con la vesícula biliar y los ganglios linfáticos hepáticos, seccionamos las inserciones de los ligamentos que lo relacionan con otros órganos abdominales.

3.3.8.1.- Estudio macroscópico

En el examen macroscópico del hígado se valoró su color, tamaño, forma de los lóbulos y sus bordes, consistencia, aspecto de la superficie externa y de corte y, asimismo, el hilio hepático (vena porta, arteria hepática y conducto hepático).

En la vesícula biliar apreciamos externamente su volumen y realizamos una incisión desde el fondo de saco ciego, siguiendo el conducto cístico hasta su conexión con el conducto biliar común. A continuación, analizamos su contenido y el aspecto de su mucosa.

Además, se examinaron los ganglios linfáticos hepáticos, teniendo en cuenta su tamaño, consistencia, superficie de corte y cambios de coloración.

3.3.8.2.- Recuento de vermes de *Dicrocoelium dendriticum* obtenidos de hígado y vesícula biliar

El hígado extraído de cada cordero se diseccionó para la obtención y recuento de los vermes alojados en los conductos biliares. Asimismo, se extrajeron los vermes de la vesícula de cada cordero para su recuento, y se observó la presencia de huevos en el líquido biliar.

Parte de los vermes recolectados de cada cordero se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesado, horas antes de la realización de la técnica de isoelectroenfoco descrita en el apartado 3.1. El resto de los parásitos se fijaron en alcohol y una muestra representativa de los procedentes de cada cordero se montó en preparaciones permanentes, para realizar estudios morfológicos.

3.3.9.- ESTUDIO DE LOS ADULTOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Además de los vermes recuperados de los corderos infectados experimentalmente, se obtuvieron adultos de hígado de animales infectados de forma natural, procedentes de distintas razas y lugares de España. Los estudios morfológicos e isoenzimáticos se realizaron sobre muestras representativas de todo el material obtenido.

3.3.9.1.- Morfológico

Se examinaron, en preparaciones permanentes, 13 ejemplares procedentes de corderos sacrificados a los 2 meses p.i. y 66 de los sacrificados a los 6. En dichos vermes se estudió su tamaño (longitud y anchura) y el grado de maduración de los huevos que contenían, considerando maduros a los de color oscuro e inmaduros a los de color claro. De esta forma se establecieron 3 categorías dentro de los parásitos estudiados, expresadas en porcentaje: 1^a/ vermes con predominio de huevos inmaduros, 2^a/ vermes con igual proporción de huevos inmaduros y maduros y 3^a/ vermes con predominio de huevos maduros.

3.3.9.2.- Isoenzimático

Con el fin de caracterizar los adultos de *D. dendriticum* recuperados del hígado y de la vesícula biliar de ganado ovino, estudiar la posible variabilidad genética de los mismos y establecer los modelos isoenzimáticos analizamos, mediante la técnica de isoelectroenfoco (descrita en el apartado 3.1.), un total de 2.846 ejemplares de *D. dendriticum*. Dicho material se obtuvo de ganado ovino infectado natural o experimentalmente, cuyo número y procedencia se muestran en el Cuadro 10, en el que también se recoge el número de

individuos examinados para cada sistema enzimático. En dicho Cuadro se incluyen los parásitos examinados conjuntamente (de 10 a 100) y de forma individual. Los primeros solo se utilizaron para la determinación previa del rango de pH más adecuado del gel a usar en el análisis de cada una de las enzimas, mientras que en los segundos ya se estudió la variabilidad genética en geles con el gradiente de pH así elegido.

Con la ayuda de dicha técnica se siguió la actividad de las enzimas LDH, GPI, PGM, AcP, -GPDH, HBDH y MDH en los parásitos procedentes de ganado ovino infectado en la naturaleza. Sin embargo, los vermes recuperados de los animales infectados experimentalmente se analizaron solo para LDH y GPI.

Para cada tipo enzimático se calcularon la frecuencia parcial y total, expresadas en porcentaje, y el índice de frecuencia corregida (frecuencia parcial ÷ frecuencia total) con respecto, por una parte, a la localidad de procedencia del hospedador y, por otra, a la raza del mismo. Para la interpretación de los valores de este índice tuvimos en cuenta lo siguiente: valores menores a 0,8 indican una relación de rechazo, valores entre 0,8 y 1,2 denotan una relación incipiente y valores superiores a 1,2 evidencian una relación positiva.

GANADO OVINO			Nº ADULTOS DE <i>D. DENDRITICUM</i> ANALIZADOS PARA						
TIPO DE INFECCIÓN	PROCEDENCIA	Nº ANIMALES PARASITADOS	LDH	GPI	PGM	AcP	-GPDH	HBDH	MDH
NATURAL	Ambasaguas de Curueño*	3	8	8	5	—	—	—	—
	Matadeón de los Oteros*	1	75	75	100	—	—	100	100
	Benavente**	8	138	58	183	113	—	—	5
	León*	7	46	75	41	32	4	11	416
	Oteruelo de la Vega*	2	—	15	—	—	—	—	—
	Palazuelo de Torío*	2	—	11	2	2	—	—	—
	Redipollos*	1	26	24	4	4	—	—	—
	Ribaseca*	1	3	6	—	3	—	—	—
	Santa Olaja de la Ribera*	11	54	39	19	6	4	—	—
	Toledo***	2	85	9	41	43	—	—	—
EXPERIMENTAL	Centro Experimental del CSIC*	22	429	424	—	—	—	—	—

*Provincia de León; ** Provincia de Zamora; ***Provincia de Toledo.

Cuadro 10.- Ejemplares adultos de *D. dendriticum* estudiados para cada sistema enzimático.

3.3.10.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

3.3.10.1.- Obtención y fijación de las muestras

Para el estudio histopatológico, se tomaron muestras representativas de los diferentes lóbulos hepáticos, de conductos biliares extrahepáticos, de vesícula biliar y de ganglios linfáticos hepáticos.

En los estudios de microscopía óptica, las muestras se introdujeron en una solución fijadora de formol tamponado, al 4% para el hígado y vías biliares extrahepáticas y al 10% para la vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos. Asimismo, para los estudios histoquímicos, se recogieron pequeñas porciones de hígado, que se introdujeron en tubos eppendorf a los que se había añadido previamente una base de "Tissue-tek 4583 O.C.T. Compound", y se congelaron en nitrógeno líquido, para conservarlas posteriormente a -70°C .

Para la observación de los órganos citados en cortes semifinos y ultrafinos, se tallaron pequeños bloques de los mismos. Estas muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato Sörensen 0,1M de pH 7,4-7,6, durante media hora a 4°C , realizando posteriormente tres lavados de 30 minutos cada uno, con solución tampón y una post-fijación en tetróxido de osmio al 1%, en tampón fosfato Sörensen durante una hora, a la misma temperatura.

3.3.10.2.- Obtención de los cortes para el estudio estructural y ultraestructural

Las muestras, una vez fijadas con las soluciones de formol, se lavaron y se procedió posteriormente a su deshidratación e inclusión en parafina "Gurr", con punto de fusión de $56-57^{\circ}\text{C}$, en un "histokinette" (Autotechnicon Duo, modelo 2A).

Para la obtención de los cortes, utilizamos un microtomo de rotación 1512 (Leitz), con adaptador para cassetes y cuchillas recambiables, obteniéndose cortes seriados de $4\ \mu\text{m}$ de grosor. Dichos cortes se adherían a portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma Chemical, Co).

Los cortes sobre tejido fresco congelado, se realizaron en un criostato (Kryostat 1720, Leitz), de hoja fija, obteniéndose secciones de 7 a $10\ \mu\text{m}$ de espesor, a -20°C .

Las muestras fijadas en tetróxido de osmio se lavaron en tampón fosfato Sörensen y posteriormente, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes. A continuación se incluyeron en resina "Epon 812", siguiendo la mezcla estándar para dureza media.

Para la realización de los cortes semifinos y ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo LKB V. Las cuchillas de vidrio de 45° , fueron confeccionadas en un "Knifemarker" (LKB) y los bloques se tallaron en un aparato tallador (Reichert-Jung TM 60).

Los cortes semifinos de $0,5-1\ \mu\text{m}$ de espesor se depositaron sobre gotas de agua bidestilada, colocadas en un portaobjetos y se extendieron con la ayuda de una platina caliente (90°C). Los cortes ultrafinos, de aproximadamente $70\ \text{nm}$ (interferencia plateada-dorada), se

montaron sobre rejillas de cobre de 150 mesh, o bien 100 mesh con película soporte de formvar al 0,025%.

3.3.10.3.- Técnicas de coloración

Para la microscopía óptica, las tinciones empleadas fueron las siguientes:

- Azán Mallory-Heidenhain
- Hematoxilina-eosina (H-E)
- Tricrómico de Masson-Goldner
- Plata-metenamina de Gomori
- Ácido peryódico de Schiff (PAS)
- PAS-azul alcian
- Sudán negro B

Los cortes semifinos fueron teñidos en caliente con una solución acuosa de azul de toluidina al 1%. Para los cortes ultrafinos se realizó una doble tinción positiva con acetato de uranilo y citrato de plomo.

3.3.10.4.- Observaciones histológicas y ultraestructurales

En los estudios de microscopía óptica, se utilizó un microscopio "Diaplan" (Leitz). Los estudios ultraestructurales se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión "JEOL, 100 CX", del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de León.

3.3.10.5.- Técnicas de fotografía

Las macrofotografías se hicieron con cámara "Pentax Super A" y película "Ektachrome profesional" 160 S. Para las microfotografías utilizamos una cámara "Wild MPS" 51 S, sobre microscopio "Diaplan" (Leitz), con película "Kodakcolor VR", de 100 S, para campo claro. Las ultramicrofotografías se realizaron con una película "Kodak Imagecapture AHU microfilm 5460".

3.4.-ESTUDIO EN LOS MOLUSCOS

3.4.1.- SEGUIMIENTO LARVARIO DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* EN EJEMPLARES DE *CERNUELLA (XEROMAGNA) CESPITUM ARIGONIS* INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Elegimos *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Schmidt, 1853) (Mollusca: Stylommatophora) para realizar este estudio, por ser una de las especies de moluscos más importantes en la epidemiología de la dicroceliosis, ya que, además de actuar como primer hospedador intermediario de *D. dendriticum* en la naturaleza (MANGA, 1992), es abundante y está ampliamente distribuida en la provincia de León (MANGA, 1983).

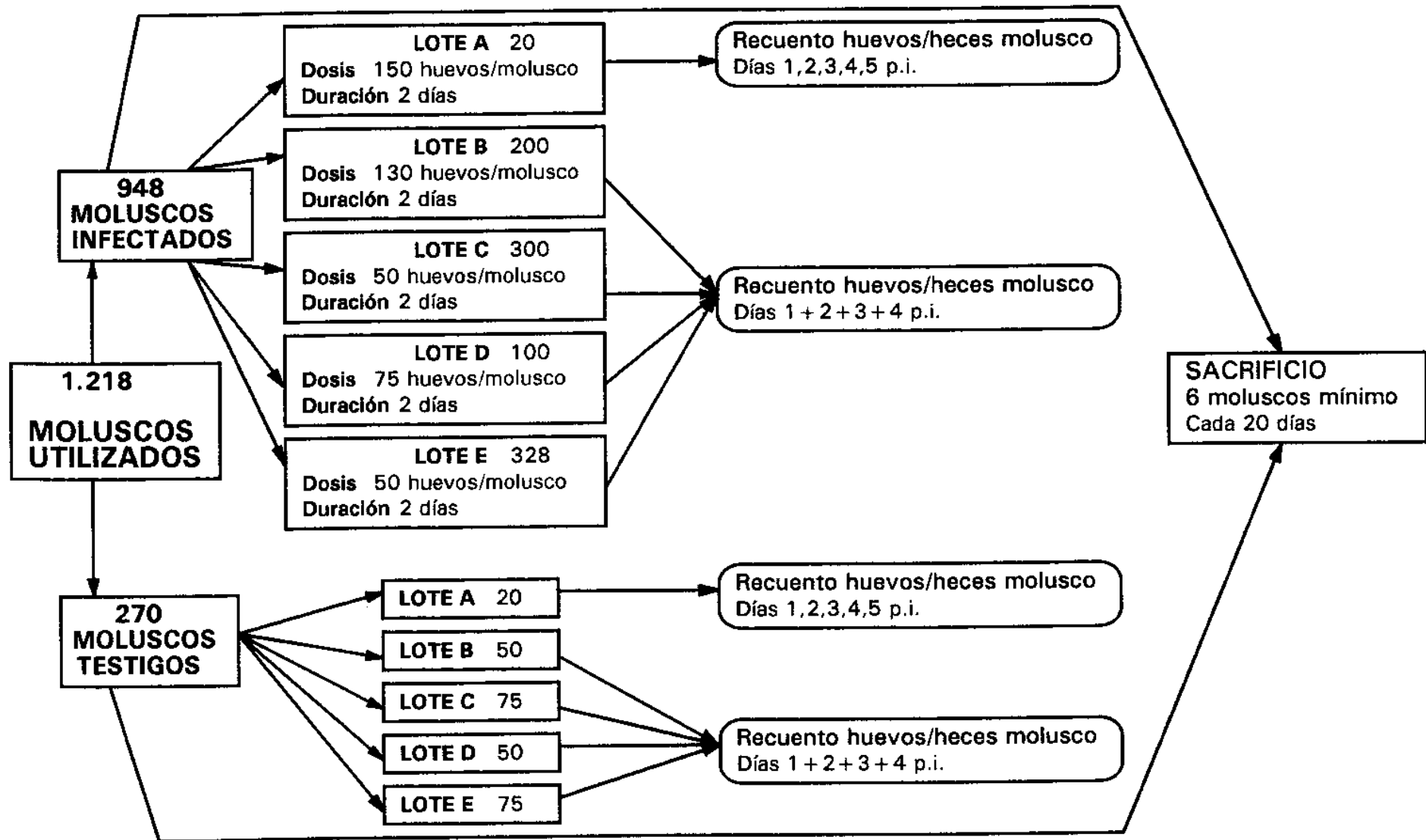
La recogida de los moluscos utilizados en las infecciones experimentales con *D. dendriticum* se efectuó, primordialmente, por la mañana y en lugares no frecuentados por ganado. Los caracoles se trasladaron al laboratorio en frascos de polietileno rotulados con el lugar y la fecha de la recogida.

La ausencia de infección por *D. dendriticum* se confirmó mediante el estudio helmintológico de un 10% de los ejemplares recogidos en cada muestreo.

Previo ayuno de 4 días se probaron, con distintas dosis de huevos de *D. dendriticum* procedentes de ganado ovino, 948 ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* distribuidos en 5 lotes (Cuadros 11 y 12).

M O L U S C O S			HUEVOS DE <i>D. DENDRITICUM</i>	
Lote	Probados	Testigos	Dosis/molusco	Procedencia
A	20	20	150	Heces
B	200	50	130	Heces
C	300	75	50	Heces
D	100	50	75	Ves. biliar
E	328	75	50	Ves. biliar

Cuadro 11.- Algunas características de la infección de los moluscos con huevos de *D. dendriticum*.



Cuadro 12.- Esquema de las investigaciones realizadas en el molusco *Cernuella (Xeromagna) cespitum arizonis* con *Dicrocoelium dendriticum*.

Para realizar la infección, los caracoles se mantuvieron durante 2 días, de manera individual, en placas de Petri en cuyo fondo se había depositado la correspondiente dosis de huevos, sobre una pequeña porción de papel de filtro (Cuadros 11 y 12). Transcurrido dicho tiempo, los moluscos infectados y los testigos de cada lote fueron depositados en sendas cajas de plástico, mantenidas en cámara de simulación ambiental a 20°C, 50% de humedad relativa y 7 horas de luz por día, y fueron alimentados con lechuga "ad libitum".

En el caso del lote A, las heces de cada molusco se recolectaron individualmente durante cada uno de los 5 primeros días de la experiencia, es decir, los dos días en que los moluscos estuvieron en contacto con el material contaminado con huevos del parásito, y los tres siguientes a la retirada del mismo.

En los lotes B, C y E se recogió el total de las heces eliminadas por cada caracol, de una sola vez, al finalizar el 4º día, fecha a partir de la cual cesaba la eliminación de huevos eclosionados, de acuerdo con los resultados obtenidos en la experiencia del lote A.

La totalidad de las heces eliminadas por los moluscos de los lotes A, B, C y E, se examinaron individualmente para la realización, mediante el microscopio óptico, del recuento de huevos eclosionados y no eclosionados de *D. dendriticum*. Debido a que el método seguido para dicho recuento requiere mucho tiempo, las heces de los moluscos del lote D se procesaron mediante la técnica de sedimentación y Mc Master, con el fin de abreviar el proceso. Sin embargo, a nuestro juicio, la técnica no fue apropiada por lo que los resultados obtenidos no se incluirán.

Para detectar el parásito en los moluscos mediante el estéreomicroscopio y poder seguir el desarrollo larvario del mismo al microscopio, se sacrificaron un número mínimo de 6 moluscos cada 20 días. En cada animal, una vez extraído de la concha, se realizó un estudio helmintológico.

Debido a la disposición e imbricación de los esporocistos de *D. dendriticum*, lo que dificulta su separación y extracción completa de los mismos del hepatopáncreas del molusco, no se realizó su recuento, por lo que la intensidad de la infección tuvo que ser estimada en base a la mayor o menor extensión del hepatopáncreas invadido por los esporocistos. De esta manera, establecimos las siguientes categorías de intensidad de la infección: 1/ cuando solo porciones puntuales del hepatopáncreas estaban invadidas por esporocistos; 2/ cuando los esporocistos, en fase de migración, habían colonizado ya parte del hepatopáncreas, pero todavía se apreciaban algunas zonas libres de parásitos; 3/ cuando los esporocistos habían invadido todo el hepatopáncreas (a veces también el aparato genital).

De cada uno de los moluscos infectados se estudió "in vivo", al microscopio, el grado de desarrollo de los esporocistos, sobre una muestra representativa de los mismos. De esta forma, establecimos 3 categorías: 1/ esporocistos con masas germinales indiferenciadas; 2/ esporocistos con masas germinales comenzando a diferenciarse o con cercarias inmaduras; 3/ esporocistos con cercarias desarrolladas, pero no maduras.

3.4.2.- ESTUDIO ISOENZIMÁTICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES LARVIARIAS DEL PARÁSITO Y SU DETECCIÓN EN LOS MOLUSCOS

La identificación de las fases larvianas del parásito halladas en moluscos infectados naturalmente, es difícil y arriesgada por los métodos convencionales. Además, de acuerdo con los estudios sobre el desarrollo larviano de *D. dendriticum* en *Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis* descritos en el apartado anterior, los esporocistos de *D. dendriticum* no fueron visibles al estereomicroscopio hasta 2 meses después de la infección de los moluscos. El mismo período fue requerido en las experiencias realizadas en condiciones controladas de campo durante el verano, pero en la época fría se necesitaron varios meses más para la observación de los esporocistos en los moluscos (MANGA *et al.*, 1995). De lo anterior se deduce, que los datos de prevalencia de la infección de los moluscos por *D. dendriticum* obtenidos, utilizando dichas técnicas, pueden no ser muy fiables.

Por todo lo expuesto, creímos conveniente iniciar estudios isoenzimáticos en moluscos infectados natural y experimentalmente y en testigos, mediante isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, con el fin de: 1/ aplicar una técnica más precisa para la caracterización e identificación de las fases larvianas de *D. dendriticum* halladas en los moluscos, que permitiría un diagnóstico más adecuado, y 2/ establecer los marcadores enzimáticos idóneos para la detección del parásito desde los primeros días p.i.

Los estudios isoenzimáticos se realizaron en moluscos infectados experimentalmente [*Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis*], en moluscos infectados en la naturaleza [*Helicella (Helicella) itala* (Linnaeus, 1758) y *Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis*] y en caracoles que actuaban como testigos.

Para caracterizar y establecer los modelos isoenzimáticos de las fases larvianas de *D. dendriticum* halladas en moluscos analizamos, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, un número variable (de acuerdo con la intensidad de la infección) de esporocistos secundarios procedentes, por una parte, de 5 ejemplares del lote B de *Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados experimentalmente con *D. dendriticum* (Cuadro 13) y, por otra, de 6 especímenes de la misma especie de molusco y de 16 de *Helicella (Helicella) itala* hallados con infección en la naturaleza (Cuadro 13). Además, analizamos parte del hepatopáncreas de todos los moluscos anteriormente mencionados con esporocistos del parásito en su interior. Asimismo, estudiamos el hepatopáncreas de 43 ejemplares de *Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y de 13 de *Helicella (Helicella) itala* (Cuadro 13), en los que previamente no habíamos detectado infección al estereomicroscopio, y el pie de los mismos, órgano en el que no se asientan los esporocistos de *D. dendriticum*, para corroborar la ausencia de parasitación.

M O L U S C O S E S T U D I A D O S									
ESPECIE	PROCEDENCIA *	Nº EXAM.	Nº EXAMINADO PARA						
			LDH	GPI	PGM	AcP	-GPDH	HBDH	MDH
<i>Helicella (Helicella) itala</i> Infectados naturalmente	Mellanzos	9	6	5	5	3	1	1	4
	Castrillo del Porma	2	2	2	—	—	—	—	2
	Valencia de Don Juan	1	1	1	1	1	—	—	—
	Redipollos	4	2	2	2	—	2	—	—
<i>Helicella (Helicella) itala</i> Testigos	Mellanzos	5	2	2	1	1	—	2	2
	Peña Castillo	8	2	1	1	—	2	1	6
<i>Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis</i> Infectados experimentalmente	Onzonilla	3	2	3	1	1	—	—	—
<i>Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis</i> Infectados naturalmente	Valencia de Don Juan	4	2	2	2	1	2	—	—
	Grulleros	1	1	1	—	—	—	—	—
	Mansilla de las Mulas	1	1	1	1	1	1	—	—
<i>Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis</i> Testigos	Valencia de Don Juan	5	2	4	2	1	1	1	2
	Onzonilla	2	2	2	1	—	1	1	2
	Grulleros	36	36	11	—	—	—	—	—

* Provincia de León.

Cuadro 13.- Ejemplares de moluscos infectados con *D. dendriticum* y testigos estudiados para cada sistema enzimático.

Todo el material estudiado se conservó en nitrógeno líquido hasta la realización de la técnica de isoelectroenfoque, descrita en el apartado 3.1., mediante la cual se siguió la actividad, tanto del parásito como de los moluscos, de las siguientes enzimas: LDH, GPI, PGM, AcP, -GPDH, HBDH y MDH.

Por otra parte se analizó, en fresco y de forma individualizada, el hepatopáncreas de 100 ejemplares de *Ceratomyxa (Xeromyxa) cespitum arigonis* del lote C, que se correspondían con aquellos en los que previamente habíamos observado huevos eclosionados del parásito (entre 1 y 8, media $3,07 \pm 0,19$) en las heces. Asimismo, se analizaron 20 testigos. Con este estudio, pretendíamos detectar en los moluscos las primeras fases larvianas del parásito y establecer cuáles eran las enzimas más adecuadas para dicho cometido. No obstante, debido a que los reactivos necesarios para la realización de la técnica de isoelectroenfoque son costosos, y ante la duda de que en los primeros días p.i. no fuera posible detectar dichas fases, decidimos iniciar el sacrificio y el estudio individualizado de los moluscos a los 15 días p.i. y continuar quincenalmente hasta el día 130 p.i.

Se sacrificaron 10 ejemplares de *Ceratomyxa (Xeromyxa) cespitum arigonis* infectados y 2 testigos, cada vez, los cuales se procesaron de manera individual inmediatamente antes de realizar el análisis enzimático. Éste se efectuó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.

El volumen de sobrenadante obtenido después de macerar y centrifugar el hepatopáncreas de cada individuo sirvió para estudiar la actividad de LDH, GPI, PGM y AcP. En algunas ocasiones dicho volumen solo fue suficiente para estudiar dos enzimas, eligiendo en esos casos las dos primeras, por ser los marcadores enzimáticos más adecuados de acuerdo con nuestras experiencias previas realizadas con adultos y con esporocistos de *D. dendriticum*.

El mismo gel, dividido a la mitad, sirvió para examinar la actividad de 2 de dichos sistemas enzimáticos al mismo tiempo. Como patrón de comparación se colocó en cada gel una muestra de esporocistos secundarios aislados de moluscos infectados y 4 muestras de adultos de *D. dendriticum* (2 procedentes de ganado ovino y 2 de ganado vacuno). Las muestras patrón estaban conservadas en nitrógeno líquido.

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS OBTENIDOS

Los análisis estadísticos se realizaron en un ordenador IBM, mediante la hoja de cálculo LOTUS y los programas estadísticos STATGRAPHICS y STATISTIC.

Antes de realizar los correspondientes análisis estadísticos, se comprobó si los datos seguían una distribución normal, es decir, si el cociente entre la varianza y la media era ≤ 1 . En el caso de que dicho valor fuera > 1 la distribución era binomial negativa, lo que exigió la normalización de los datos (x) mediante la transformación logarítmica de los mismos $\ln(x)$. Cuando algún dato de la serie a analizar era cero, se sustituía x por $x+1$ en todos ellos.

Peso corporal de los animales

Se utilizó la prueba "t" de Student para confirmar que, en el día 0 p.i., no se detectaban diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los corderos infectados y el de los testigos.

Además, se aplicó la "t" de Student (para muestras apareadas) para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en el peso de cada cordero entre el día 0 y 60 p.i., y entre el día 0 y 180 p.i., en los distintos grupos de animales mencionados en el apartado 3.3.1.

Niveles séricos de enzimas marcadoras hepáticas, parámetros bioquímicos y hemáticos

Se utilizó la prueba "t" de Student para detectar posibles diferencias estadísticamente significativas en los valores de dichas variables entre los distintos grupos de corderos, de acuerdo con los días p.i. y la época de sacrificio.

Asimismo, se realizó el análisis de varianza de una vía para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de dichas variables dentro de cada grupo de corderos, de acuerdo con los días p.i. En los casos en que dichas diferencias fueron significativas, las comparaciones entre pares de valores medios se llevaron a cabo utilizando el test de la mínima diferencia significativa (LSD).

Estudios coprológicos

Se aplicó la prueba "t" de Student con el fin de detectar posibles diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg eliminado por los corderos, de acuerdo con los 2 grupos de animales infectados y la época de sacrificio.

Además, se utilizó el test "t" de Student (para muestras apareadas) para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg eliminado en la mañana y en la tarde, por cada uno de los corderos infectados y por el total de ellos.

Por otra parte, se realizó el análisis de varianza de una vía y el test LSD para detectar posibles diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en el número de hpg eliminado en la mañana y/o en la tarde por los distintos grupos de corderos. Asimismo, mediante el análisis de varianza multifactorial y el test LSD se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg, en función de los factores: días p.i. y momento de recogida de las heces o días p.i. y dosis probada.

Vermes de *Dicrocoelium dendriticum* obtenidos de hígado y vesícula biliar

Se aplicó la prueba "t" de Student para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en el número de vermes, entre los corderos de los distintos grupos y entre los sacrificados de cada uno de ellos en las distintas épocas.

La misma prueba se utilizó para comparar los valores de longitud y anchura de los vermes recuperados de los corderos sacrificados a los 2 y a los 6 meses p.i.

Relación entre eliminación de huevos de *Dicrocoelium dendriticum* con las heces y carga parasitaria

Se aplicó la prueba "t" de Student (para muestras apareadas) con el fin de detectar posibles diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg eliminado, en la mañana y en la tarde, por cada uno de los grupos de corderos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

Por otra parte, se realizó el análisis de varianza de una vía y el test LSD para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg eliminado, en la mañana y en la tarde, por los grupos de corderos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

Se calculó el coeficiente de correlación para establecer el grado de dependencia entre el número de hpg eliminado en las heces y el de vermes recuperado (del hígado y la vesícula) de cada cordero.

Relación entre enzimas marcadoras hepáticas, parámetros bioquímicos y hemáticos, eliminación de huevos y carga parasitaria

Se realizó el análisis de varianza de una vía y el test LSD con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de las enzimas hepáticas y parámetros bioquímicos y hemáticos, entre los grupos de corderos con distinta carga parasitaria.

Seguimiento larvario de *Dicrocoelium dendriticum* en ejemplares de *Ceratomyxa (Xeromyxa) cespitum arigonis* infectados experimentalmente

La prueba de ji-cuadrado se utilizó para detectar las posibles diferencias estadísticamente significativas, entre los distintos lotes de moluscos probados, en el porcentaje de moluscos: 1/ con huevos eclosionados en las heces y 2/ con fases larvarias visibles al estereomicroscopio. Cuando dichas diferencias fueron significativas se aplicaron las tablas de contingencia de 2 x 2 para comparar por pares los lotes de moluscos estudiados.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- ESTUDIO EN LOS FORMÍCIDOS

4.1.1.- HORMIGAS RECOLECTADAS Y DISECCIONADAS

Observamos hormigas de la especie *Formica rufibarbis* activas entre Marzo y Noviembre, aunque dicho período podría ser más amplio. No obstante, sólo encontramos y recolectamos hormigas en fase de tetania desde Mayo a Octubre, en plantas de la especie *Medicago sativa* Linnaeus, 1753, principalmente. La temperatura en el momento de la recogida de las hormigas osciló entre 16 y 28°C y la humedad relativa entre 64 y 77%.

Se recolectaron 1273 ejemplares de hormigas que, de acuerdo con la determinación realizada por el Dr. Espadaler, pertenecían a la especie *Formica rufibarbis* Fabricius, 1794 (Formicidae, Formicinae) (Fig. 1 de Lámina I). La longitud de dichas hormigas, basada en las medidas realizadas en 25 ejemplares, osciló entre 4,2 y 5,7 mm, media $4,95 \pm 0,10$. Se realizó la disección de 814 individuos para la obtención de las 48.000 metacercarias de *D. dendriticum* (Fig. 2 de Lámina I) que se utilizaron en la infección de los corderos con las dosis de 1.000 y 3.000 (Cuadro 14). El resto de las hormigas recolectadas se diseccionaron, para conseguir las metacercarias que sirvieron de base en los estudios morfológicos e isoenzimáticos, excepto unas pocas que se mantuvieron vivas en el laboratorio en hormigueros artificiales, algunas de las cuales sobrevivieron hasta 6 1/2 meses (desde finales de Agosto de 1992 a mediados de Marzo del año siguiente).

El nº de metacercarias albergadas en el abdomen (o gaster) de cada hormiga varió entre 1 y 240, media $59,85 \pm 1,51$. Únicamente encontramos una larva por hormiga en la parte ventral del ganglio subesofágico. Observamos cicatrices en el buche de las hormigas parasitadas, pero no realizamos su recuento.

N° HORMIGAS / CORDERO	
DOSIS 1000	DOSIS 3000
12	39
15	41
15	41
16	47
18	46
18	48
18	50
19	50
20	53
21	54
22	61
23	66
x= 18,16 ± 0,84	x= 49,66 ± 2,22

Cuadro 14.- Hormigas diseccionadas para la obtención de las metacercarias utilizadas en la infección de cada uno de los corderos.

DISCUSIÓN

Los ejemplares de *Formica rufibarbis* medidos por nosotros tenían una longitud ligeramente inferior a los estudiados por SCHUSTER (1991) de la misma especie.

La época en que vimos especímenes de *Formica rufibarbis* activos (Marzo-Noviembre) coincide, en general, con la señalada por BADIE (1978) para *Formica cunicularia* y *Formica nigricans* en Francia. Por otra parte, nosotros recogimos hormigas en fase de tetania desde Mayo a Octubre, mientras que dicho autor las observó entre Marzo y Noviembre y CHITIASHVILI (1982) las vio entre Abril y Junio en los valles montañosos de la República de Georgia.

El largo período de supervivencia de las hormigas parasitadas en el laboratorio (hasta 61/2 meses) concuerda con lo señalado por TARRY (1969), para quien las metacercarias pueden permanecer en el abdomen de la hormiga durante un año o más sin afectar su supervivencia y, de este modo, el parásito pasa el invierno y hace que los pastos vuelvan a ser infectantes en primavera. Sin embargo, según DEMENT'EV (1979) ninguna de las hormigas recolectadas en la fase de tetania sobrevivió los 25 días.

El valor medio de metacercarias por hormiga obtenido por nosotros se incluye, en términos generales, en el rango señalado por los diversos autores que se recogen en el Cuadro 7, aunque fue inferior a los valores del rango mencionado por GROSCHAFT (1961), TIMON-DAVID (1962), HOHORST (1962) y SRIVASTAVA (1975) y superior a los de

BRANGHAM (1960), FROMUNDA *et al.* (1965), VUJIC (1972), TOHMÉ & TOHMÉ (1977), PARASCHIVESCU (1981b), SPINDLER *et al.* (1986) y MANGA *et al.* (1991a).

Nosotros sólo encontramos una larva de *D. dendriticum* en la parte ventral del ganglio subesofágico de la hormiga, al igual que ANOKHIN (1966) y ROMIG *et al.* (1980). Sin embargo, CARNEY (1969) observó que 1, 2 ó 3 cercarias sin cola atravesaron la pared del buche hacia el hemocele, y siguieron su camino hasta el ganglio subesofágico donde se enquistaron.

4.1.2- MORFOLOGÍA DE LAS METACERCARIAS DE *DICROCOELIUM* *DENDRITICUM*

De acuerdo con las medidas realizadas en 25 metacercarias enquistadas (Cuadro 15) extraídas del abdomen de varios ejemplares de *Formica rufibarbis*, la longitud de las metacercarias varió entre 336 y 460,8 μm , media $380,16 \pm 7,15$ y su anchura, entre 240 y 368,8 μm , media $283,16 \pm 7,15$. Por otra parte, el grosor de la pared del quiste osciló entre 9,6 y 24 μm , media $17,08 \pm 0,61$.

La longitud de las metacercarias desenquistadas en agua destilada varió entre 412,80 y 624,00 μm , media $510,33 \pm 9,36$ y su anchura entre 115,20 y 201,60 μm , media $161,66 \pm 4,40$.



Figura 1.- Ejemplar de *Formica rufibarbis*, 2º hospedador intermediario de *Dicrocoelium dendriticum*, en fase de tetania.

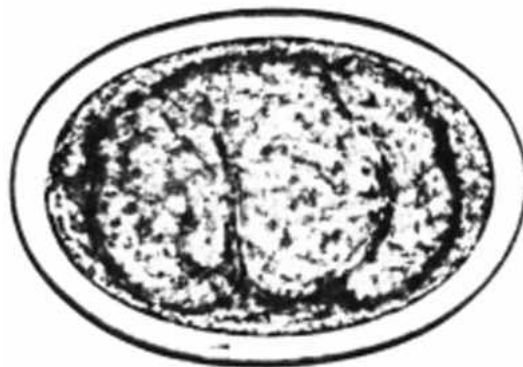


Figura 2.- Metacercaria de *Dicrocoelium dendriticum*. Barra = 0,1 mm.

LONGITUD (μm)			ANCHURA (μm)		
Pared externa	Pared interna	Pared externa/Pared interna	Pared externa	Pared interna	Pared externa/Pared interna
374,4	355,2	1,05	268,8	249,6	1,07
364,8	350,4	1,04	259,2	244,8	1,05
355,2	336,0	1,05	259,2	240,0	1,08
336,0	316,8	1,06	240,0	220,8	1,08
345,6	326,4	1,05	249,6	230,4	1,08
340,8	316,8	1,07	249,6	225,6	1,10
374,4	355,2	1,05	268,8	249,6	1,07
403,2	388,8	1,03	297,6	283,2	1,05
393,6	379,2	1,03	316,8	302,4	1,04
403,2	384,0	1,05	297,6	278,4	1,06
374,4	360,0	1,04	268,8	254,4	1,05
412,8	398,4	1,03	307,2	292,8	1,04
422,4	403,2	1,04	302,4	283,2	1,06
460,8	451,2	1,02	336,0	326,4	1,02

441,6	427,2	1,03	364,8	350,4	1,04
364,8	350,4	1,04	244,8	230,4	1,06
379,2	360,0	1,05	288,0	268,8	1,07
374,4	360,0	1,04	259,2	244,8	1,05
384,0	369,6	1,03	297,6	283,2	1,05
336,0	316,8	1,06	240,0	220,8	1,08
374,4	355,2	1,05	278,4	259,2	1,07
403,2	388,8	1,03	307,2	292,8	1,04
364,8	345,6	1,05	268,8	249,6	1,07
374,4	355,2	1,05	268,8	249,6	1,07
345,6	326,4	1,05	240,0	220,8	1,08
$x = 380,16 \pm 7,15$	$x = 363,07 \pm 6,63$		$x = 283,16 \pm 7,15$	$x = 262,08 \pm 6,61$	

Cuadro 15.- Tamaño de 25 metacercarias enquistadas de *D. dendriticum* procedentes de *Formica rufibarbis*.

DISCUSIÓN

Al comparar el tamaño de las metacercarias enquistadas de *D. dendriticum* procedentes de nuestras hormigas, con el dado por diversos autores que se recogen en el Cuadro 7, el valor medio de la longitud obtenido por nosotros fue, en general, inferior al rango señalado por dichos autores. No obstante, en algunos casos estaba incluido en el rango mencionado por MAPES (1951), KRULL & MAPES (1952e, 1953b), EUZEBY (1958), DEL RIO (1967), ODENING (1969), MALEK (1980b) y ROSICKY & GROSCHAFT (1982) y, en otros, fue superior a los valores citados por KLESOV & POPOVA (1959), FROMUNDA *et al.* (1965, 1973), MARCHAND (1966) y PARASCHIVESCU *et al.* (1975).

En lo que a la anchura se refiere, el valor medio obtenido por nosotros fue normalmente más elevado que el superior del rango mencionado por los autores citados en el Cuadro 7. Sin embargo, a veces estuvo por debajo de los valores señalados por KALKAN (1976) y BORCHERT (1981) y, en ocasiones, se situó dentro del rango mencionado por KLESOV & POPOVA (1959), DEL RIO (1967), FROMUNDA *et al.* (1973), ANGELOVSKI & ILIEV (1975), PARASCHIVESCU *et al.* (1975) y ROSICKY & GROSCHAFT (1982).

En cuanto al grosor de la pared del quiste, el valor medio hallado por nosotros se situó dentro del rango señalado por los autores que se citan en el Cuadro 7, excepto cuando lo comparamos con los de ANGELOVSKI & ILIEV (1975), KALKAN (1976) y DEL RIO (1967), que fueron más elevados, y con los de KRULL & MAPES (1953b), MARCHAND (1966), FROMUNDA *et al.* (1973) y PARASCHIVESCU *et al.* (1975), que fueron inferiores.

En lo que al tamaño de las metacercarias desenquistadas se refiere, la longitud media encontrada por nosotros (510,33 μm) fue similar (426 μm) a la hallada por KLESOV & POPOVA (1959), muy inferior (758 μm) a la observada por FROMUNDA *et al.* (1973) y se situó por debajo del rango (540-635 μm) señalado por MALEK (1980b). Sin embargo, el valor medio de la anchura fue superior al citado por dichos autores.

4.1.3.- ESTUDIO ISOENZIMÁTICO DE LAS METACERCARIAS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*

Para interpretar los resultados obtenidos en el análisis, mediante isoelectroenfoque, de las metacercarias de *D. dendriticum* procedentes de *Formica rufibarbis*, se consideraron todas las bandas de actividad enzimática observadas, pero diferenciándolas en: fuertes (■), débiles (▣) y muy débiles (□).

La actividad de **LDH** en las 1.608 metacercarias de *D. dendriticum* analizadas se observó en un rango de pH de 6,40 a 7,13. Se encontraron 4 tipos enzimáticos (Fig. 1 y Fig. 1 de Lámina II) designados como LDH-I, LDH-II, LDH-III y LDH-IV.

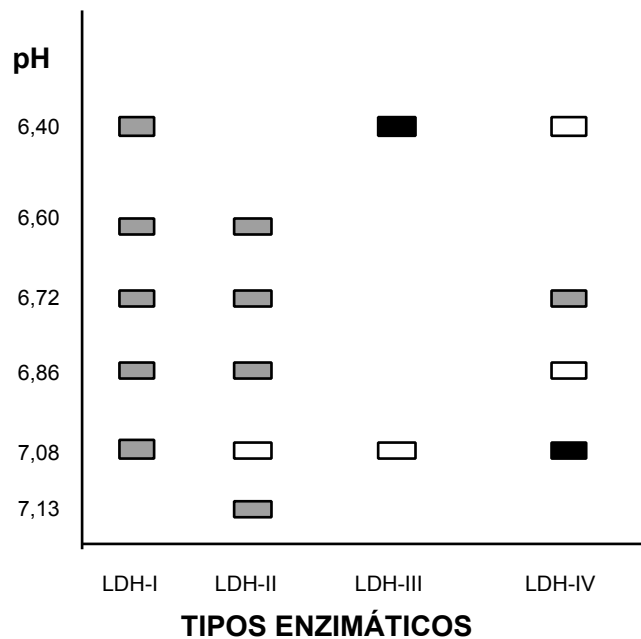


Figura 1.- Diagrama de los tipos enzimáticos de LDH encontrados en las metacercarias de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (□) y muy débiles (□).

Al estudiar la actividad de **GPI** en 924 metacercarias de *D. dendriticum*, se hallaron 4 tipos enzimáticos designados como: GPI-I, GPI-II, GPI-III y GPI-IV. Las bandas de actividad se situaron en un rango de pH entre 6,27 y 6,83 (Fig. 2 y Fig. 1 de Lámina II).

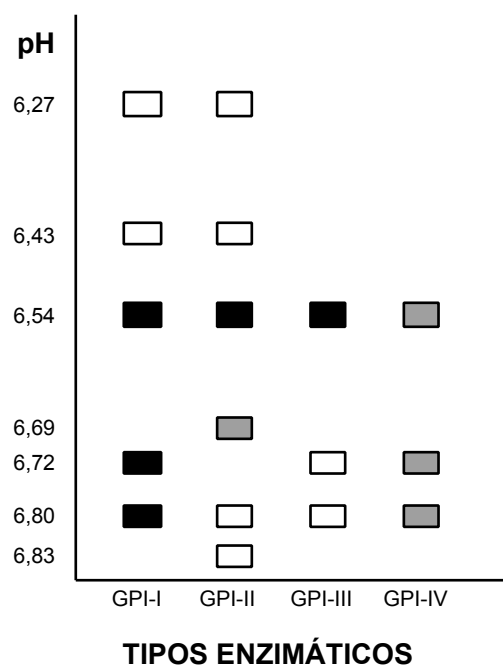


Figura 2.- Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI encontrados en las metacercarias de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (□) y muy débiles (□).

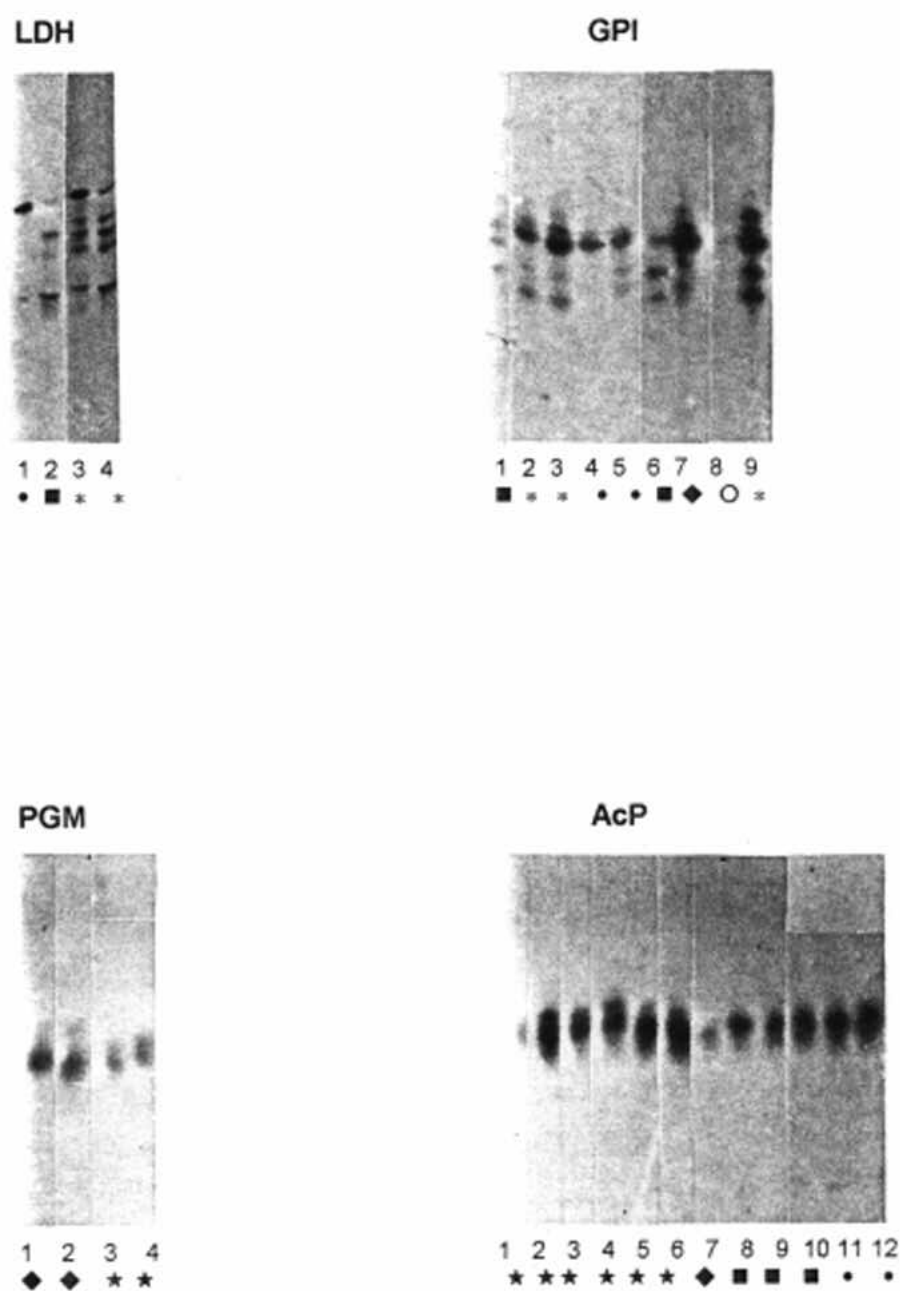


Figura 1.- Ejemplos de patrones enzimáticos obtenidos en las metacercarias de *D. dendriticum*. Cada número corresponde a una muestra con varias metacercarias. **LDH**: • LDH-III; ■ LDH-IV; LDH-I / **GPI**: ■ GPI-IV; GPI-I; • GPI-III; ◆ GPI-II; ○ GPI-V / **PGM**: ◆ PGM-II; ★ PGM-I / **AcP**: ★ AcP-I; ◆ AcP-II; ■ AcP-III; • AcP-IV

La actividad de **PGM**, al analizar 1.458 metacercarias de *D. dendriticum*, se detectó en un rango de pH de 6,20 a 6,60 (Fig. 3 y Fig. 1 de Lámina II). Se observaron dos modelos enzimáticos: PGM-I y PGM-II.

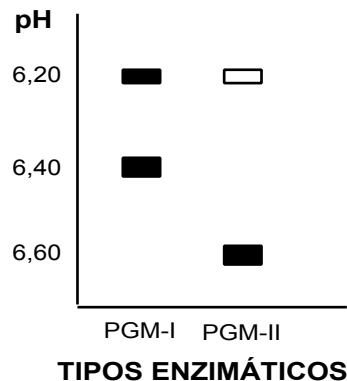


Figura 3.- Diagrama de los tipos enzimáticos de PGM encontrados en las metacercarias de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), y muy débiles (□).

Al examinar 1.608 metacercarias de *D. dendriticum*, se detectó actividad de **AcP** (Fig. 4 y Fig. 1 de Lámina II) entre pH de 5,86 y 5,92. Aunque las bandas observadas son difusas, se podrían identificar 4 modelos enzimáticos: AcP-I, AcP-II, AcP-III y AcP-IV.

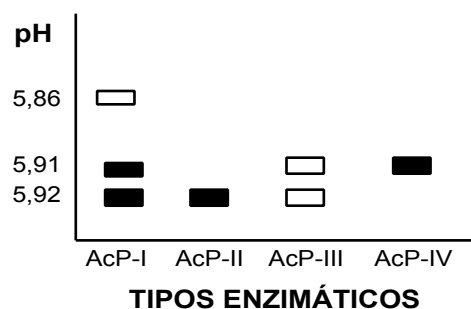


Figura 4.- Diagrama de los tipos enzimáticos de AcP encontrados en las metacercarias de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), y muy débiles (□).

En general, en los sistemas enzimáticos estudiados se observaron diferentes modelos en metacercarias extraídas de la misma hormiga, de hormigas procedentes de distintas localidades y, a veces, de las recolectadas en el mismo lugar.

A nuestro juicio, los mejores sistemas enzimáticos para la caracterización de las metacercarias de *D. dendriticum*, procedentes de ejemplares de *Formica rufibarbis*, fueron LDH, GPI y PGM.

Según nuestra información, no se han realizado trabajos, utilizando esta técnica, para caracterizar los estadios larvarios de *D. dendriticum* en las hormigas, por lo que no podremos discutir los resultados anteriormente expuestos. No obstante, en el apartado 4.3.3. compararemos los datos obtenidos por nosotros en los análisis enzimáticos de las metacercarias, esporocistos y adultos de *D. dendriticum*.

4.2.- ESTUDIO EN EL GANADO OVINO

4.2.1.- NIVELES SÉRICOS DE ENZIMAS MARCADORAS HEPÁTICAS Y OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA DICROCELIOSIS

4.2.1.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias

En el Cuadro 16 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos y las enzimas marcadoras hepáticas obtenidos en los animales infectados y en los testigos.

PARÁMETROS SÉRICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
			DOSIS 1.000	
	x ± E. S.	Rango	x ± E. S.	Rango
PROT (g/dl)	7,82 ± 0,09	6,40 - 9,50	7,75 ± 0,09	6,10 - 9,30
ALB (g/dl)	3,41 ± 0,04	2,70 - 4,10	3,57 ± 0,03	2,80 - 4,10
BIL (mg/dl)	0,28 ± 0,01	0,20 - 0,50	0,32 ± 0,01	0,20 - 0,90
GLU (mg/dl)	52,48 ± 1,62	20,00 - 82,00	53,98 ± 1,56	27,00 - 89,00
AST (UI/L)	100,70 ± 3,05	67,00 - 152,00	99,50 ± 4,44	63,00 - 307,00
ALT (UI/L)	16,14 ± 0,67	10,00 - 31,00	15,14 ± 0,67	10,00 - 37,00
LDH (UI/L)	760,44 ± 25,59	352,00 - 1122,00	811,01 ± 24,47	341,00 - 1466,00
FA (UI/L)	276,14 ± 23,06	90,00 - 814,00	267,91 ± 15,39	93,00 - 687,00
GGT (UI/L)	93,58 ± 2,38	65,00 - 152,00	101,66 ± 2,49	80,00 - 162,00

Cuadro 16.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias.

Los valores de los parámetros obtenidos en los animales infectados fueron superiores a los de los testigos, excepto en proteínas totales, AST, ALT y FA.

De acuerdo con los resultados que se muestran en el Cuadro 17, los valores de proteínas totales, albúmina, bilirrubina y glucosa de los corderos infectados con 1.000 metacercarias fueron superiores a los de los testigos en todos los días p.i. en que se realizaron los análisis, excepto en los días 0, 120, 150 y 180 p.i. en el caso de proteínas totales, y 90 y 150 p.i. en el de glucosa.

En el Cuadro 18 se resumen las cifras de todas las enzimas analizadas, en los distintos días p.i., en los corderos infectados con 1.000 metacercarias y en los testigos. Los valores medios de AST de los animales infectados fueron superiores a los de los testigos en los días

30, 60 y 180 p.i., mientras que los de ALT sólo lo fueron en los animales infectados a los 60 días p.i. Las cifras medias de LDH fueron superiores en los animales infectados en todos los días p.i., excepto en los días 30, 120 y 150. Sin embargo, los de FA fueron más elevados únicamente en los días 0, 120 y 180 p.i. De igual modo, los valores medios de GGT de los animales infectados fueron superiores a los de los testigos, a lo largo de toda la experiencia.

Mediante la prueba "t" de Student, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de todos los parámetros anteriormente mencionados, obtenidos en los animales infectados y testigos el día 0 p.i.

Cuando se aplicó la "t" de Student, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de AST ($t = 2,32$; $p = 0,05$; g.l. = 12) y ALT ($t = 3,15$; $p = 0,01$; g.l. = 12) a los 60 días p.i., y en los de albúmina a los 180 días p.i. ($t = 2,51$; $p = 0,05$; g.l. = 10), entre los de los corderos infectados y testigos.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en los valores de proteínas totales ($F = 4,96$; $p = 0,001$; g.l. = 6 y 50), albúmina ($F = 4,56$; $p = 0,001$; g.l. = 6 y 50) y LDH ($F = 2,61$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 50) de los animales infectados. Mediante el test LSD se calculó la mínima diferencia significativa entre los pares de valores medios de cada uno de los parámetros mencionados. Los resultados de dicho test se resumen en los Cuadros 19-21.

DÍAS	PROT (g/dl)		ALB (g/dl)		BIL (mg/dl)		GLU (mg/dl)	
	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000
0	8,12 ± 0,30	7,60 ± 0,13	3,20 ± 0,08	3,38 ± 0,06	0,32 ± 0,03	0,37 ± 0,05	48,00 ± 2,76	50,72 ± 3,19
30	7,71 ± 0,30	7,75 ± 0,12	3,18 ± 0,12	3,37 ± 0,09	0,24 ± 0,02	0,30 ± 0,02	52,28 ± 7,11	54,00 ± 3,83
60	7,78 ± 0,15	8,35 ± 0,18	3,48 ± 0,12	3,63 ± 0,08	0,31 ± 0,03	0,34 ± 0,01	48,28 ± 3,13	50,54 ± 3,59
90	7,90 ± 0,17	8,33 ± 0,11	3,52 ± 0,15	3,66 ± 0,11	0,28 ± 0,02	0,35 ± 0,06	56,57 ± 2,96	53,83 ± 4,88
120	7,58 ± 0,37	7,38 ± 0,31	3,58 ± 0,11	3,58 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,02	49,60 ± 9,02	58,33 ± 8,08
150	7,82 ± 0,18	7,41 ± 0,39	3,74 ± 0,14	3,78 ± 0,07	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,03	58,00 ± 3,03	57,66 ± 1,68
180	8,26 ± 0,48	7,08 ± 0,25	3,56 ± 0,06	3,86 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,02	50,60 ± 4,73	58,33 ± 3,23

Cuadro 17.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DÍAS	AST (UI/L)		ALT (UI/L)		LDH (UI/L)		FA (UI/L)		GGT (UI/L)		
	P.I.	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000
0		115,00 ± 7,60	97,63 ± 7,29	19,42 ± 2,51	15,81 ± 2,08	840,57 ± 47,52	925,00 ± 42,39	211,42 ± 37,47	231,54 ± 27,34	91,57 ± 5,42	112,63 ± 9,25
30		108,28 ± 7,52	110,36 ± 12,26	16,71 ± 2,26	15,36 ± 0,91	797,28 ± 69,25	792,54 ± 28,46	294,00 ± 41,69	256,09 ± 28,30	86,71 ± 5,80	101,18 ± 3,73
60		88,42 ± 8,27	107,54 ± 7,07	11,85 ± 0,73	16,36 ± 1,96	728,00 ± 73,56	819,90 ± 29,92	264,57 ± 71,73	231,90 ± 27,48	92,00 ± 5,98	105,18 ± 5,93
90		107,00 ± 9,95	99,66 ± 7,74	17,14 ± 1,20	16,66 ± 2,06	870,28 ± 88,10	913,00 ± 68,22	323,57 ± 87,43	265,33 ± 33,78	92,00 ± 5,08	99,33 ± 4,36
120		99,60 ± 7,69	84,16 ± 5,01	17,80 ± 1,98	13,50 ± 0,80	738,00 ± 70,70	718,66 ± 75,86	365,00 ± 87,36	372,66 ± 72,01	86,60 ± 6,46	92,50 ± 3,52
150		101,80 ± 13,45	78,00 ± 6,17	17,80 ± 2,08	12,33 ± 0,95	733,20 ± 75,31	679,00 ± 97,18	346,20 ± 81,37	306,33 ± 64,26	93,80 ± 6,15	94,00 ± 3,47
180		101,40 ± 5,93	105,00 ± 28,95	17,00 ± 1,14	14,16 ± 2,34	674,80 ± 91,98	742,00 ± 133,69	238,60 ± 69,97	281,66 ± 52,63	89,00 ± 6,41	95,16 ± 6,16

Cuadro 18.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DÍAS P.I.	0	30	60	90	120	150	180
0			*	**			
30			**				**
60	**	**			*	*	*
90	**				*	*	*

* p 0,01; ** p 0,05

Cuadro 19.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **proteínas totales**, obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias.

DÍAS P.I.	60	90	150	180
0	**	**	*	*
30	**	**	*	*

* p 0,01; ** p 0,05

Cuadro 20.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **albúmina**, obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias.

DÍAS P. I.	120	150	180
0	**	*	**
60		**	
90		**	

* p 0,01; ** p 0,05

Cuadro 21.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **LDH**, obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias.

4.2.1.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias

En el Cuadro 22 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos y las enzimas marcadoras hepáticas obtenidos en los animales infectados y en los testigos.

PARÁMETROS SÉRICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
	DOSIS 3.000			
	x ± E. S.	Rango	x ± E. S.	Rango
PROT (g/dl)	7,82 ± 0,09	6,40 - 9,50	7,71 ± 0,07	5,90 - 8,80
ALB (g/dl)	3,41 ± 0,04	2,70 - 4,10	3,45 ± 0,05	2,30 - 4,30
BIL (mg/dl)	0,28 ± 0,01	0,20 - 0,50	0,29 ± 0,01	0,20 - 0,60
GLU (mg/dl)	52,48 ± 1,62	20,00 - 82,00	50,75 ± 1,80	20,00 - 81,00
AST (UI/L)	100,70 ± 3,05	67,00 - 152,00	138,65 ± 8,86	69,00 - 322,00
ALT (UI/L)	16,14 ± 0,67	10,00 - 31,00	23,80 ± 1,85	10,00 - 80,00
LDH (UI/L)	760,44 ± 25,59	352,00 - 1122,00	761,53 ± 19,59	567,00 - 1274,00
FA (UI/L)	276,14 ± 23,06	90,00 - 814,00	309,63 ± 20,35	101,00 - 716,00
GGT (UI/L)	93,58 ± 2,38	65,00 - 152,00	98,73 ± 3,72	62,00 - 260,00

Cuadro 22.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias.

Los valores de los parámetros obtenidos en los animales infectados fueron superiores a los de los testigos, excepto en proteínas totales y glucosa. Además, el mayor incremento se detectó en las enzimas AST [incremento del 38% = $(x \text{ infectados} - x \text{ testigos}) / x \text{ testigos} \times 100$] y ALT (+ 47%).

De acuerdo con los resultados que se recogen en el Cuadro 23, los valores de proteínas totales, albúmina, bilirrubina y glucosa de los corderos infectados fueron inferiores a los de los testigos en todos los días p.i. en que se realizaron los análisis, excepto en los días: a/ 180 p.i., en el caso de proteínas totales; b/ 0, 150 y 180, en el de albúmina; c/ 90, 120 y 180, en el de bilirrubina; d/ 30, 120, 150 y 180, en el caso de glucosa.

DÍAS	PROT (g/dl)		ALB (g/dl)		BIL (mg/dl)		GLU (mg/dl)		
	P.I.	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000
0		8,12 ± 0,30	7,66 ± 0,12	3,20 ± 0,08	3,18 ± 0,12	0,32 ± 0,03	0,38 ± 0,03	48,00 ± 2,76	51,16 ± 5,09
30		7,71 ± 0,30	7,57 ± 0,15	3,18 ± 0,12	3,26 ± 0,08	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01	52,28 ± 7,11	51,41 ± 1,76
60		7,78 ± 0,15	7,64 ± 0,20	3,48 ± 0,12	3,62 ± 0,13	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,02	48,28 ± 3,13	51,58 ± 4,01
90		7,90 ± 0,17	7,70 ± 0,12	3,52 ± 0,15	3,65 ± 0,16	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,06	56,57 ± 2,96	61,16 ± 4,19
120		7,58 ± 0,37	7,55 ± 0,23	3,58 ± 0,11	3,60 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01	49,60 ± 9,02	34,33 ± 4,18
150		7,82 ± 0,18	7,76 ± 0,19	3,74 ± 0,14	3,65 ± 0,10	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,03	58,00 ± 3,03	55,50 ± 1,58
180		8,26 ± 0,48	8,31 ± 0,18	3,56 ± 0,06	3,45 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	50,60 ± 4,73	48,16 ± 8,22

Cuadro 23.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

En el Cuadro 24 se resumen las cifras de todas las enzimas estudiadas, en los distintos días p.i., en los corderos infectados y en los testigos. Los valores medios de AST y ALT de los corderos infectados fueron superiores a los de los corderos testigos, en todos los días p.i. en que se realizaron los análisis; sin embargo, los de LDH fueron superiores solamente en los días 30 y 180 p.i. y los de FA en todos los días hasta el 90 p.i. Los valores de GGT de los animales infectados fueron siempre superiores a los de los testigos, excepto en el día 60 p.i.

Cuando se consideraron los valores de todos los parámetros obtenidos el día 0 p.i. en los corderos infectados y testigos, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas, mediante la "t" de Student, en los valores de AST ($t = 2,99$; $p = 0,01$; g.l. = 18). Por esta razón, dicho parámetro fue excluido cuando se aplicó el mismo test para comparar los valores del resto de los parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas obtenidos de los corderos infectados y testigos, en los distintos días p.i. Estos análisis nos permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas únicamente en los valores de ALT, entre los de los corderos infectados y testigos a los 30 días ($t = 2,21$; $p = 0,05$; g.l. = 19).

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía se observaron diferencias estadísticamente significativas, al tener en cuenta los distintos días p.i., en los valores de albúmina ($F = 2,92$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 53), bilirrubina ($F = 3,20$; $p = 0,01$; g.l. = 6 y 53), glucosa ($F = 2,61$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 53) y FA ($F = 3,89$; $p = 0,005$; g.l. = 6 y 53). Los resultados del test LSD para los parámetros anteriormente mencionados se resumen en los Cuadros 25-28.

Los valores de los parámetros obtenidos en los animales que recibieron 1.000 y 3.000 metacercarias, respectivamente, fueron superiores a los de los testigos, excepto en proteínas totales, AST, ALT y FA en el caso de la 1ª dosis, y proteínas totales y glucosa en la 2ª dosis. Además, el mayor incremento se detectó en las enzimas AST (+ 38%) y ALT (+ 47%) de los corderos probados con 3.000 metacercarias.

En éstos, los valores de AST, ALT y FA fueron más elevados que en los infectados con 1.000.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de albúmina ($F = 3,14$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 164), AST ($F = 11,45$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 164) y ALT ($F = 7,83$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 164) entre los animales testigos, los infectados con 1.000 metacercarias y los infectados con 3.000. Cuando se aplicó el test LSD se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de: 1/ albúmina de los corderos testigos y de los infectados con 1.000 metacercarias; 2/ AST y ALT de los testigos y de los probados con 3.000 metacercarias; 3/ AST y ALT de los infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias.

DÍAS	AST (UI/L)		ALT (UI/L)		LDH (UI/L)		FA (UI/L)		GGT (UI/L)		
	P.I.	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000
0		115,00 ± 7,60	144,62 ± 11,68	19,42 ± 2,51	24,10 ± 3,83	840,57 ± 47,52	833,75 ± 68,30	211,42 ± 37,47	219,83 ± 25,88	91,57 ± 5,42	95,33 ± 6,07
30		108,28 ± 7,52	147,75 ± 18,94	16,71 ± 2,26	24,75 ± 3,97	797,28 ± 69,25	815,41 ± 34,30	294,00 ± 41,69	382,25 ± 44,98	86,71 ± 5,80	103,41 ± 6,26
60		88,42 ± 8,27	114,00 ± 15,18	11,85 ± 0,73	19,08 ± 2,96	728,00 ± 73,56	722,75 ± 26,81	264,57 ± 71,73	369,83 ± 54,83	92,00 ± 5,98	93,08 ± 6,24
90		107,00 ± 9,95	132,16 ± 38,44	17,14 ± 1,20	28,16 ± 10,68	870,28 ± 88,10	738,50 ± 40,49	323,57 ± 87,43	413,16 ± 69,01	92,00 ± 5,08	95,16 ± 7,22
120		99,60 ± 7,69	115,83 ± 27,58	17,80 ± 1,98	26,33 ± 7,66	738,00 ± 70,70	679,66 ± 48,60	365,00 ± 87,36	344,00 ± 56,30	86,60 ± 6,46	91,66 ± 7,24
150		101,80 ± 13,45	122,33 ± 33,34	17,80 ± 2,08	20,83 ± 2,99	733,20 ± 75,31	650,16 ± 25,91	346,20 ± 81,37	226,83 ± 30,36	93,80 ± 6,15	119,66 ± 28,25
180		101,40 ± 5,93	129,50 ± 21,87	17,00 ± 1,14	23,50 ± 5,67	674,80 ± 91,98	806,33 ± 85,92	238,60 ± 69,97	168,50 ± 20,46	89,00 ± 6,41	97,16 ± 10,22

Cuadro 24.- Valores (x ± E.S.) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DIAS P.I.	60	90	120	150
0	*	**	**	**
30	**	**		**

* p 0,01; ** p 0,05

Cuadro 25.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **albúmina**, obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	30	60	90	120	150	180
0	*		**	*	**	**
30		**				
60				**		

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 26.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **bilirrubina**, obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	120	150
0	**	
30	*	
60	*	
90	*	
120		*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 27.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **glucosa**, obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	30	60	90	150	180
0	*	**	*		
30				**	*
60					*
90				**	*
120					**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 28.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **FA**, obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

4.2.1.3.- Todos los animales infectados

En el Cuadro 29 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos y las enzimas marcadoras hepáticas obtenidos en los animales infectados y en los testigos. Cuando se consideraron los datos recogidos en dicho cuadro, se observó un incremento en todos los parámetros de los animales infectados, con respecto a los de los testigos, excepto en proteínas totales y glucosa. Los valores que más se incrementaron fueron los de AST (+ 19%) y ALT (+ 21%). Sin embargo, mediante la "t" de Student no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, entre los corderos infectados y testigos, en los valores de todos los parámetros estudiados.

A lo largo de los días p.i.

De acuerdo con los resultados que se muestran en el Cuadro 30, los valores de proteínas totales, albúmina, bilirrubina y glucosa de los corderos infectados fueron superiores a los de los testigos en todos los días p.i. en que se realizaron los análisis, excepto en los días 0, 30, 120, 150 y 180 p.i. en el caso de proteínas totales, 150 p.i. en el de albúmina, 180 p.i. en el de bilirrubina y 120 y 150 p.i. en el de glucosa.

En el Cuadro 31 se resumen las cifras de todas las enzimas estudiadas en los corderos infectados y en los testigos, a lo largo de los distintos días p.i.

Los valores medios de AST y ALT de los corderos infectados fueron superiores a los de los testigos en todos los días p.i. en que se realizaron los análisis, a excepción del día 150. De igual forma, los valores de LDH fueron siempre más elevados en los animales infectados que en los testigos, excepto en los días 0, 90, 120 y 150 p.i., mientras que los de FA fueron más altos únicamente hasta el día 90 p.i. Asimismo, los valores medios de GGT fueron mayores en los animales infectados que en los testigos a lo largo de toda la experiencia.

PARÁMETROS SÉRICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
	x ± E. S.	Rango	x ± E. S.	Rango
PROT (g/dl)	7,82 ± 0,09	6,40 - 9,50	7,73 ± 0,05	5,90 - 9,30
ALB (g/dl)	3,41 ± 0,04	2,70 - 4,10	3,51 ± 0,03	2,30 - 4,30
BIL (mg/dl)	0,28 ± 0,01	0,20 - 0,50	0,30 ± 0,01	0,20 - 0,90
GLU (mg/dl)	52,48 ± 1,62	20,00 - 82,00	52,32 ± 1,20	20,00 - 89,00
AST (U/L)	100,70 ± 3,05	67,00 - 152,00	119,58 ± 5,33	63,00 - 322,00
ALT (U/L)	16,14 ± 0,67	10,00 - 31,00	19,58 ± 1,07	10,00 - 80,00
LDH (U/L)	760,44 ± 25,59	352,00 - 1122,00	785,64 ± 15,69	341,00 - 1.466,00
FA (U/L)	276,14 ± 23,06	90,00 - 814,00	289,30 ± 12,94	93,00 - 716,00
GGT (U/L)	93,58 ± 2,38	65,00 - 152,00	100,16 ± 2,26	62,00 - 260,00

Cuadro 29.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados.

DÍAS P.I.	PROT (g/dl)		ALB (g/dl)		BIL (mg/dl)		GLU (mg/dl)	
	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.
0	8,12 ± 0,30	7,63 ± 0,09	3,20 ± 0,08	3,27 ± 0,07	0,32 ± 0,03	0,37 ± 0,03	48,00 ± 2,76	50,95 ± 3,00
30	7,71 ± 0,30	7,66 ± 0,09	3,18 ± 0,12	3,31 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,01	52,28 ± 7,11	52,65 ± 2,02
60	7,78 ± 0,15	7,98 ± 0,15	3,48 ± 0,12	3,63 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,01	48,28 ± 3,13	51,08 ± 2,65
90	7,90 ± 0,17	8,01 ± 0,12	3,52 ± 0,15	3,65 ± 0,09	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,04	56,57 ± 2,96	57,50 ± 3,26
120	7,58 ± 0,37	7,46 ± 0,18	3,58 ± 0,11	3,59 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,01	49,60 ± 9,02	46,33 ± 5,65
150	7,82 ± 0,18	7,59 ± 0,21	3,74 ± 0,14	3,71 ± 0,05	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02	58,00 ± 3,03	56,58 ± 1,15
180	8,26 ± 0,48	7,70 ± 0,23	3,56 ± 0,06	3,65 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,01	50,60 ± 4,73	53,25 ± 4,48

Cuadro 30.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.

DÍAS	AST (UI/L)		ALT (UI/L)		LDH (UI/L)		FA (UI/L)		GGT (UI/L)	
	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.
0	115,00 ± 7,60	120,25 ± 8,42	19,42 ± 2,51	21,00 ± 2,42	840,57 ± 47,52	807,27 ± 30,89	211,42 ± 37,47	225,43 ± 18,41	91,57 ± 5,42	103,60 ± 5,62
30	108,28 ± 7,52	129,86 ± 11,92	16,71 ± 2,26	20,26 ± 2,30	797,28 ± 69,25	804,47 ± 22,11	294,00 ± 41,69	321,91 ± 29,71	86,71 ± 5,80	102,34 ± 3,65
60	88,42 ± 8,27	110,91 ± 8,45	11,85 ± 0,73	17,78 ± 1,79	728,00 ± 73,56	769,21 ± 22,12	264,57 ± 71,73	303,86 ± 34,12	92,00 ± 5,98	98,86 ± 4,41
90	107,00 ± 9,95	115,91 ± 19,32	17,14 ± 1,20	22,41 ± 5,46	870,28 ± 88,10	825,75 ± 46,07	323,57 ± 87,43	339,25 ± 42,87	92,00 ± 5,08	97,25 ± 4,07
120	99,60 ± 7,69	100,00 ± 14,19	17,80 ± 1,98	19,91 ± 4,15	738,00 ± 70,70	699,16 ± 43,35	365,00 ± 87,36	358,33 ± 43,79	86,60 ± 6,46	92,08 ± 3,84
150	101,80 ± 13,45	100,16 ± 17,49	17,80 ± 2,08	16,58 ± 1,97	733,20 ± 75,31	664,58 ± 48,14	346,20 ± 81,37	266,58 ± 35,94	93,80 ± 6,15	106,83 ± 14,11
180	101,40 ± 5,93	117,25 ± 17,69	17,00 ± 1,14	18,83 ± 3,24	674,80 ± 91,98	774,16 ± 76,38	238,60 ± 69,97	225,08 ± 31,87	89,00 ± 6,41	96,16 ± 5,69

Cuadro 31.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.

Mediante la prueba "t" de Student, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada parámetro anteriormente mencionado, obtenidos en los animales infectados y testigos el día 0 p.i.

Cuando se utilizó el mismo test para comparar en cada día p.i. los valores de cada parámetro en los animales infectados y testigos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ALT, a los 60 días p.i. ($t = 2,19$; $p = 0,05$; g.l. = 28).

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía se detectaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en los valores de albúmina ($F = 2,88$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 43) y bilirrubina ($F = 2,74$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 43) de los corderos testigos. Mediante el test LSD se calculó la mínima diferencia significativa entre los pares de valores medios de cada uno de los parámetros mencionados, obtenidos en los corderos testigos en los distintos días p.i., y se detectaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de albúmina los días p.i.: 0 y 150; 0 y 180; 30 y 150; 30 y 180. De igual forma, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de bilirrubina obtenidos los días p.i.: 0 y 30; 0 y 120; 0 y 150; 60 y 120.

Mediante el análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en los valores de los siguientes parámetros obtenidos en los corderos infectados: albúmina ($F = 6,02$; $p = 0,001$; g.l. = 6 y 110); bilirrubina ($F = 3,72$; $p = 0,005$; g.l. = 6 y 110); LDH ($F = 3,55$; $p = 0,005$; g.l. = 6 y 110) y FA ($F = 2,60$; $p = 0,05$; g.l. = 6 y 110). Al aplicar el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores obtenidos de los siguientes parámetros:

- Albúmina entre el día 0 y el resto de los días, excepto el día 30, entre el día 30 y el resto de los días, excepto el día 0.
- Bilirrubina entre el día 0 y el resto de los días, excepto el día 60 y 90, entre los días 30 y 60, 60 y 120.
- LDH entre los días 0 y 120, 0 y 150, 0 y 180, 30 y 120, 30 y 150, 60 y 150, 90 y 120, 90 y 150.
- FA entre los días 0 y 30, 0 y 90, 0 y 120, 30 y 180, 90 y 180, 120 y 180.

Queremos dejar constancia de que las diferencias estadísticamente significativas observadas en los valores de albúmina y bilirrubina, al considerar los distintos días p.i., se detectaron tanto en los corderos infectados como en los testigos.

De acuerdo con la época de sacrificio

En el Cuadro 32 se muestran los valores de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas obtenidos, a lo largo de todo el experimento, de los corderos testigos y de los infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i. Se observaron ligeras variaciones en los valores de los parámetros de los corderos testigos sacrificados a los 2 y a los 6 meses p.i. En el conjunto de los animales infectados los valores

de AST, ALT y LDH fueron más elevados en los animales sacrificados a los 2 meses p.i., mientras que los de FA y GGT lo fueron en los sacrificados a los 6 meses. Esta misma situación se observó en los corderos infectados con 1.000 metacercarias, mientras que en los infectados con 3.000 los valores de AST, LDH y FA fueron superiores en los sacrificados a los 2 meses p.i. y los de ALT y GGT en los sacrificados a los 6.

Los valores de AST, ALT, LDH y FA de todos los animales sacrificados a los 2 meses p.i. fueron superiores (+ 38%, + 28%, + 8% y + 7%) en los animales infectados que en los testigos.

De igual forma, dichos valores fueron superiores a los de los testigos, tanto en los corderos infectados con 3.000 metacercarias como en los de 1.000, excepto los de FA que fueron inferiores en los animales infectados con la dosis más baja.

Por otra parte, los parámetros que más se incrementaron en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, respecto a los de 1.000, fueron AST, ALT y FA (+ 41%, + 27% y + 71%).

Cuando se compararon los resultados obtenidos en los animales sacrificados a los 6 meses p.i., los valores de AST, ALT, LDH, FA y GGT fueron superiores (+ 11%, + 21%, + 1%, + 9% y + 11%) en el conjunto de los animales infectados que en los testigos.

De igual forma, dichos valores fueron superiores, respecto a los testigos, en los corderos infectados con 3.000 y 1.000 metacercarias, excepto los de AST y ALT que fueron inferiores en los animales infectados con la dosis más baja y los de LDH que lo fueron en los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

Por otra parte, los parámetros que más se incrementaron en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, respecto a los de 1.000, fueron AST y ALT (+ 38% y + 71%).

Al considerar el conjunto de los corderos infectados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, mediante el test "t" de Student, entre los valores de albúmina ($t = 3,04$; $p = 0,005$; g.l. = 115), glucosa ($t = 2,14$; $p = 0,05$; g.l. = 115), AST ($t = 3,23$; $p = 0,005$; g.l. = 115), LDH ($t = 2,11$; $p = 0,05$; g.l. = 115), FA ($t = 2,36$; $p = 0,05$; g.l. = 115) y GGT ($t = 3,13$; $p = 0,005$; g.l. = 115) obtenidos de los corderos sacrificados a los 2 meses y de los sacrificados a los 6.

Cuando se aplicó el mismo test, para comparar los valores obtenidos en los animales infectados y testigos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de: 1/ AST ($t = 3,42$; $p = 0,005$; g.l. = 55) y ALT ($t = 2,77$; $p = 0,01$; g.l. = 55), en los animales sacrificados a los 2 meses; y 2/ albúmina ($t = 2,68$; $p = 0,01$; g.l. = 108) y GGT ($t = 2,28$; $p = 0,05$; g.l. = 108), en los sacrificados a los 6.

PARÁMETROS SÉRICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS					
			DOSIS 1.000		DOSIS 3.000		DOSIS 1.000 + DOSIS 3.000	
	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES
PROT (g/dl)	7,80 ± 0,13	7,82 ± 0,09	7,81 ± 0,10	7,73 ± 0,12	7,33 ± 0,12	7,86 ± 0,07	7,55 ± 0,09	7,80 ± 0,07
ALB (g/dl)	3,26 ± 0,06	3,41 ± 0,04	3,46 ± 0,08	3,61 ± 0,04	3,27 ± 0,11	3,52 ± 0,05	3,35 ± 0,07	3,57 ± 0,03
BIL (mg/dl)	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,01
GLU (mg/dl)	50,70 ± 2,42	52,48 ± 1,62	42,40 ± 1,94	58,11 ± 1,57	52,05 ± 3,15	50,19 ± 2,22	47,66 ± 2,08	54,15 ± 1,42
AST (UI/L)	101,37 ± 4,59	100,70 ± 3,05	114,73 ± 4,87	94,07 ± 5,57	161,66 ± 15,77	128,78 ± 10,46	140,33 ± 9,69	111,42 ± 6,19
ALT (UI/L)	15,45 ± 1,17	16,14 ± 0,67	17,26 ± 1,32	14,38 ± 0,75	22,00 ± 1,74	24,57 ± 2,54	19,84 ± 1,18	19,47 ± 1,43
LDH (UI/L)	777,66 ± 33,29	760,44 ± 25,59	863,66 ± 33,16	792,21 ± 30,70	813,05 ± 43,63	739,45 ± 20,27	836,06 ± 28,11	765,83 ± 18,51
FA (UI/L)	239,58 ± 27,68	276,14 ± 23,06	185,33 ± 17,12	297,40 ± 17,97	316,16 ± 43,93	306,83 ± 22,53	256,69 ± 27,39	302,11 ± 14,33
GGT (UI/L)	94,87 ± 4,03	93,58 ± 2,38	92,53 ± 2,44	104,92 ± 3,13	88,05 ± 3,10	103,30 ± 5,01	90,09 ± 2,03	104,11 ± 2,94

Cuadro 32.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados, con distinta dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i.

Al comparar, mediante el análisis de varianza de una vía, los valores obtenidos en los animales infectados con 1.000 metacercarias, con 3.000 y testigos, todos ellos sacrificados a los 2 meses, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de proteínas totales ($F = 4,17$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 54), AST ($F = 10,07$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 54) y ALT ($F = 5,85$; $p = 0,005$; g.l. = 2 y 54). Cuando se aplicó el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de: 1/ proteínas totales, AST y ALT, entre los corderos testigos y los infectados con 3.000; y 2/ proteínas totales, AST y ALT, entre los corderos probados con 1.000 y 3.000 metacercarias.

Cuando se compararon, utilizando el mismo tipo de análisis, los valores obtenidos de los grupos de animales mencionados, pero sacrificados a los 6 meses, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los de albúmina ($F = 4,40$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 107), glucosa ($F = 5,06$; $p = 0,01$; g.l. = 2 y 107), AST ($F = 6,30$; $p = 0,005$; g.l. = 2 y 107) y ALT ($F = 14,16$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 107). Cuando se aplicó el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de: 1/ albúmina de los corderos testigos y de los infectados con 1.000 metacercarias; 2/ AST y ALT de los animales testigos y de los infectados con 3.000; y 3/ glucosa, AST y ALT de los corderos infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias.

DISCUSIÓN

Como ya ha quedado patente en el capítulo de revisión bibliográfica, de acuerdo con nuestra información, son escasos los estudios realizados sobre la dicroceliosis experimental ovina, por lo que parte de nuestros resultados no podrán compararse, incluso, aunque se consideren los obtenidos experimentalmente en otros hospedadores o en condiciones naturales.

La no alteración en los valores de **proteínas totales** y de **albúmina** observada por nosotros, coincide con lo señalado para ambos parámetros por THEODORIDIS *et al.* (1991) en ovejas infectadas naturalmente. Sin embargo, está en desacuerdo con los resultados obtenidos por GUNDLACH *et al.* (1982), quienes observaron un aumento en los dos parámetros y por PETROV & ABALIKHIN (1983) que señalaron hasta un 4% de incremento en las proteínas a los 60 días p.i., en corderos infectados con 2.600 metacercarias. Asimismo, no coincide con el descenso en la albúmina observado por RANUCCI *et al.* (1981), quienes consideran que la disminución del nivel de albúmina podría deberse a la escasa capacidad de síntesis hepática, y a la acentuada velocidad metabólica que se refleja sobre todo en la fracción proteica.

En lo que se refiere a los valores de **glucosa**, nuestros resultados coinciden, sólo en parte, con los señalados por RANUCCI *et al.* (1981) ya que, aunque observamos un ligero incremento en los animales que contenían de 201 a 600 vermes, se produjo una disminución en el cordero con mayor número de parásitos (2.063), lo que concuerda con el tenue descenso,

señalado por dichos autores, al aumentar la carga parasitaria entre 1.500 y 12.000 vermes en ovejas infectadas naturalmente.

En los últimos años, el diagnóstico de las enfermedades hepáticas se ha hecho midiendo la actividad sérica de enzimas específicas que se liberan de las células hepáticas dañadas. Desafortunadamente, el hígado de rumiantes domésticos adultos contiene bajas concentraciones de **ALT**, por lo que en dichos animales se usa con más frecuencia **AST** para ayudar al diagnóstico del daño hepático (CORNELIUS *et al.*, 1959, citado por BULGIN *et al.*, 1984). El que se observara un incremento en los valores de dichas enzimas en los animales infectados con 3.000, con respecto a los testigos, coincide con lo hallado por DEMENT'EV *et al.* (1978) en corderos infectados con 1.000 metacercarias o con 200/día durante 90 días.

Cuando comparamos nuestros resultados con los obtenidos en cricetos infectados con 40 metacercarias de *D. dendriticum* por SÁNCHEZ (1994), el incremento en la actividad de **AST** y **ALT** (+18% y +21%, respectivamente) observado por nosotros en los corderos infectados, con respecto a los testigos, fue muy inferior al señalado por dicha autora (+185% y +143%, respectivamente), para quien la elevación de la actividad sérica de dichas enzimas está asociada con estados patológicos que cursan con daño celular y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática o bien con necrosis de las células, así como con situaciones en las que existe colestasis intrahepática.

Nuestros resultados revelaron un incremento en la actividad de **FA** en los animales infectados con respecto a los testigos, al igual que los de ABALIKHIN (1982b) obtenidos en corderos de 4 meses de edad infectados con 2.600 metacercarias. Además, el incremento en la actividad de esta enzima parece estar relacionado positivamente con la dosis utilizada, de acuerdo con nuestras experiencias y con las de PETROV & ABALIKHIN (1983).

No observamos una relación clara entre el aumento de la actividad de **FA** y la carga parasitaria, al contrario de lo que señaló RANUCCI *et al.* (1981) en ovejas infectadas naturalmente. Estamos de acuerdo en que la actividad de **FA** se incrementa desde 1-3 meses p.i., como señaló ABALIKHIN (1982b), no obstante, en nuestras experiencias dicha actividad continuó aumentando hasta el día 120, fecha en que inició su descenso. Como en el caso de las enzimas **AST** y **ALT**, SÁNCHEZ (1994) observó un incremento en la actividad de **FA** (+18%) en cricetos infectados, con respecto a los testigos, muy superior al nuestro (+5%). De acuerdo con BARNWELL *et al.*, 1984; KITANI *et al.*, 1985; COLEMAN, 1987; NOKUBO, 1987 (citados por SÁNCHEZ, op. cit.) esta enzima, que existe en muchos tejidos, se localiza en la membrana del epitelio canalicular, y su elevación en plasma indica estasis biliar. Es, por tanto, marcadora del estado del tracto biliar a nivel de los canalículos biliares. Además, la actividad sérica de **FA** se incrementa en los procesos colestáticos, en los que se produce un aumento en la síntesis de la enzima que, por la acción detergente de los ácidos biliares sobre la membrana canalicular, se libera a bilis desde donde refluye a sangre.

En cuanto a la actividad de **GGT**, observamos un incremento en los corderos infectados con respecto a los testigos, tal como ocurrió en parte de las ovejas estudiadas por

RANUCCI & GROL-RANUCCI (1978) e infectadas con *D. dendriticum* y *Echinococcus granulosus* de forma natural. Además, el incremento en la actividad de esta enzima parece estar relacionado directamente con la carga parasitaria, de acuerdo con nuestros resultados y los que RANUCCI *et al.* (1981) obtuvieron en ovejas infectadas en la naturaleza.

En el caso de la fasciolosis, la elevación inicial de los valores plasmáticos de GGT se asocia con la penetración de los parásitos en los conductos biliares, aunque el vertido al torrente circulatorio no ocurriría hasta que la lesión de los conductos fuera patente (BULGIN *et al.*, 1984 y GALTIER *et al.*, 1986, citados por FERRE, 1994).

4.2.2- PARÁMETROS HEMÁTICOS EN LA DICROCELIOSIS

4.2.2.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias.

Como se puede apreciar en el Cuadro 33, los valores obtenidos en los animales infectados fueron inferiores a los de los testigos, excepto los de eritrocitos, hematócrito, hemoglobina y linfocitos.

PARÁMETROS HEMÁTICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS DOSIS 1.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
ERITROCITOS (x10 ⁶)/ mm ³	7,23 ± 0,14	4,36 - 9,84	7,41 ± 0,11	4,08 - 9,61
LEUCOCITOS (x 10 ³)/ mm ³	7,13 ± 0,29	2,58 - 16,65	6,51 ± 0,18	3,10 - 12,00
HEMATÓCRITO (%)	29,99 ± 0,40	20,00 - 38,00	30,46 ± 0,34	24,00 - 38,50
HEMOGLOBINA (g/dl)	10,09 ± 0,29	4,70 - 13,00	10,11 ± 0,21	7,80 - 12,60
VCM (fl)	42,61 ± 0,79	24,38 - 61,80	41,97 ± 0,71	29,20 - 72,30
HCM (pg)	15,26 ± 0,42	10,76 - 23,33	14,86 ± 0,25	11,82 - 17,94
CHCM (g/dl)	34,22 ± 0,65	17,40 - 42,86	33,98 ± 0,34	29,28 - 37,73
LINFOCITOS (%) *	63,76 ± 3,03	24,00 - 86,00	67,11 ± 2,33	41,00 - 87,90
MONOCITOS (%) *	6,36 ± 0,85	1,00 - 17,10	4,50 ± 0,78	1,00 - 14,50
NEUTRÓFILOS (%) *	29,68 ± 3,29	3,00 - 73,00	27,37 ± 2,69	6,50 - 56,50
EOSINÓFILOS (%) *	2,11 ± 0,35	0,00 - 0,70	1,03 ± 0,33	1,00 - 7,00

Cuadro 33.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias. * Componentes de la fórmula leucocitaria.

Además, cuando consideramos únicamente los valores de los componentes de la fórmula leucocitaria (expresados por mm^3), los valores medios en los animales infectados (Cuadro 34) fueron inferiores a los de los testigos, excepto los de eosinófilos.

FÓRMULA LEUCOCITARIA	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
	$\bar{x} \pm \text{E.S.}$	Rango	$\bar{x} \pm \text{E.S.}$	Rango
LINFOCITOS/ mm^3	4.923,83 \pm 385,62	1.430,10 - 10.823,15	4.109,14 \pm 251,27	2.479,12 - 8.488,44
MONOCITOS/ mm^3	453,42 \pm 66,31	37,46 - 1.665,10	244,26 \pm 34,54	57,21 - 694,17
NEUTRÓFILOS/ mm^3	2.326,49 \pm 287,23	234,00 - 6.092,73	1.833,61 \pm 232,17	263,44 - 5.406,48
EOSINÓFILOS/ mm^3	55,16 \pm 21,68	49,68-666,04	82,30 \pm 30,21	57,21 - 769,93

Cuadro 34.- Media (\bar{x}), mínimo y máximo (rango) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias.

De acuerdo con los datos de los parámetros hemáticos obtenidos desde el día 0 hasta el día 180 p.i. en los animales infectados con 1.000 metacercarias y en los testigos, el número de leucocitos y la fórmula leucocitaria fueron los parámetros que más se alteraron (Cuadros 35-37). Los valores de leucocitos de los corderos infectados fueron superiores a los de los testigos en los días 60, 120, 150, 165 y 180 p.i. (Cuadro 35). Por el contrario, tal como se observa en el Cuadro 37, los valores de linfocitos y monocitos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias fueron inferiores a los de los testigos en los días 15, 60, 105 y 120 p.i. para los linfocitos, y en los días 0, 15, 60, 90, 165 y 180 p.i. para los monocitos. Sin embargo, los valores de neutrófilos y eosinófilos de los animales infectados fueron superiores a los de los testigos en los días 60, 105 y 165 p.i. en los primeros, y en todos los días p.i., excepto en el día 90 en los segundos.

Mediante el test "t" de Student, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de leucocitos ($t = 2,85$; $p = 0,05$; g.l. = 18) entre los animales infectados y testigos el día 0 p.i. Por esta razón, dicho parámetro fue excluido cuando se aplicó el mismo test para comparar los valores del resto de los parámetros hemáticos obtenidos en los corderos infectados y testigos, en los distintos días p.i. Dichos análisis nos permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas en los valores de VCM ($t = 3,12$; $p = 0,05$; g.l. = 13) entre los corderos infectados y testigos, a los 90 días p.i.

DÍAS P.I.	ERITROCITOS ($\times 10^6$)/mm ³		LEUCOCITOS ($\times 10^3$)/mm ³		HEMATÓCRITO (%)		HEMOGLOBINA (g/dl)	
	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000
0	7,73 \pm 0,47	7,56 \pm 0,25	7,96 \pm 0,66	5,96 \pm 0,41	28,54 \pm 0,78	32,04 \pm 1,38	9,20 \pm 1,20	10,63 \pm 0,50
15	6,99 \pm 0,52	7,32 \pm 0,42	6,62 \pm 0,75	6,59 \pm 0,50	29,97 \pm 1,03	30,59 \pm 1,32	9,10 \pm 1,40	10,26 \pm 0,66
30	7,27 \pm 0,46	7,11 \pm 0,35	6,98 \pm 0,59	6,61 \pm 0,44	29,68 \pm 0,62	30,04 \pm 1,14	8,60 \pm 1,10	9,23 \pm 0,69
45	7,48 \pm 0,76	6,72 \pm 0,40	8,40 \pm 0,13	5,86 \pm 0,49	28,93 \pm 1,25	28,59 \pm 0,57	6,50 \pm 1,80	8,80 \pm 0,26
60	7,20 \pm 0,50	7,42 \pm 0,36	6,44 \pm 0,84	6,53 \pm 0,51	29,36 \pm 2,36	29,02 \pm 0,75	6,65 \pm 0,25	8,83 \pm 0,53
75	8,19 \pm 0,37	7,99 \pm 0,23	7,08 \pm 0,57	6,35 \pm 0,67	31,11 \pm 1,36	29,16 \pm 1,57	9,20 \pm 0,40	*
90	6,49 \pm 0,49	7,66 \pm 0,42	8,23 \pm 0,14	6,74 \pm 1,11	30,37 \pm 1,61	29,58 \pm 1,50	10,60 \pm 0,83	11,10 \pm 1,40
105	6,84 \pm 0,42	6,89 \pm 0,65	7,45 \pm 0,23	6,30 \pm 0,88	33,08 \pm 1,38	32,41 \pm 1,18	12,05 \pm 0,33	10,95 \pm 1,15
120	6,94 \pm 0,60	6,56 \pm 0,53	6,50 \pm 0,12	7,26 \pm 0,86	31,33 \pm 1,85	29,48 \pm 0,29	11,63 \pm 0,29	10,40 \pm 0,50
135	7,81 \pm 0,38	8,47 \pm 0,25	8,91 \pm 0,89	7,78 \pm 1,13	31,50 \pm 1,45	31,58 \pm 1,00	11,76 \pm 0,28	11,20 \pm 0,00
150	7,08 \pm 0,68	7,99 \pm 0,43	7,13 \pm 0,60	7,21 \pm 0,80	29,61 \pm 1,09	32,25 \pm 1,50	10,77 \pm 0,34	10,30 \pm 0,30
165	6,81 \pm 0,67	7,90 \pm 0,52	5,07 \pm 0,47	6,43 \pm 0,78	27,91 \pm 1,84	31,00 \pm 1,53	9,62 \pm 0,66	9,35 \pm 0,35
180	7,03 \pm 0,55	7,44 \pm 0,26	5,38 \pm 0,92	5,77 \pm 0,89	28,03 \pm 1,15	31,91 \pm 1,23	10,20 \pm 0,52	10,83 \pm 0,51

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 35.- Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DIAS P.I.	ÍNDICES ERITROCÍTICOS					
	VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000
0	37,49 ± 1,73	42,69 ± 2,11	14,78 ± 1,58	13,63 ± 0,91	34,41 ± 2,82	32,28 ± 1,52
15	44,30 ± 3,29	42,23 ± 1,36	15,68 ± 2,68	16,11 ± 0,59	32,65 ± 3,55	35,21 ± 0,44
30	41,69 ± 2,18	42,74 ± 1,38	15,18 ± 2,13	15,57 ± 0,47	30,65 ± 3,38	32,29 ± 1,14
45	42,43 ± 4,38	44,29 ± 3,23	13,82 ± 3,06	15,17 ± 0,56	25,30 ± 7,90	33,19 ± 0,64
60	41,22 ± 2,89	40,02 ± 2,29	12,24 ± 0,47	13,83 ± 0,55	30,94 ± 0,27	32,94 ± 0,27
75	38,06 ± 1,06	36,83 ± 2,84	12,76 ± 1,42	*	30,31 ± 3,96	*
90	47,45 ± 2,04	38,79 ± 1,64	14,84 ± 0,60	14,09 ± 0,44	33,67 ± 0,85	34,02 ± 1,69
105	49,01 ± 2,93	49,06 ± 4,55	17,22 ± 1,31	16,03 ± 0,29	34,43 ± 0,31	34,66 ± 2,00
120	46,08 ± 3,33	46,40 ± 3,84	15,64 ± 2,32	16,56 ± 1,10	33,79 ± 1,26	34,99 ± 0,74
135	40,88 ± 2,96	37,62 ± 2,47	14,98 ± 0,87	13,51 ± 0,00	35,33 ± 0,45	36,72 ± 0,00
150	43,19 ± 3,18	40,65 ± 1,89	17,45 ± 2,27	14,35 ± 1,83	38,27 ± 1,37	35,69 ± 2,04
165	41,76 ± 2,08	39,61 ± 1,66	15,45 ± 0,96	14,71 ± 0,00	36,49 ± 0,98	35,28 ± 1,32
180	40,77 ± 2,60	42,91 ± 1,21	15,43 ± 1,06	14,60 ± 0,74	37,58 ± 1,41	33,92 ± 0,80

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 36.- Valores (x ± E.S.) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias , a lo largo de la experiencia.

DÍAS	F Ó R M U L A L E U C O C I T A R I A							
	LINFOCITOS (%)		MONOCITOS (%)		NEUTRÓFILOS (%)		EOSINÓFILOS (%)	
	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000	Test.	Inf. 1.000
0	53,70 ± 17,70	55,00 ± 6,65	4,20 ± 3,20	2,50 ± 0,50	42,10 ± 20,90	42,00 ± 6,42	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
15	56,70 ± 20,70	56,00 ± 7,50	4,65 ± 3,65	1,33 ± 0,33	41,80 ± 21,20	42,00 ± 7,50	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
30	64,25 ± 19,25	72,43 ± 1,37	5,15 ± 4,15	6,83 ± 3,83	30,60 ± 23,40	20,40 ± 2,84	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
45	65,80 ± 18,80	67,86 ± 6,16	6,37 ± 5,70	6,46 ± 3,69	27,50 ± 24,50	25,33 ± 7,43	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
60	60,60 ± 10,60	54,83 ± 7,44	9,55 ± 7,55	2,33 ± 0,60	29,85 ± 18,15	42,50 ± 7,28	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
75	40,50 ± 16,50	*	2,00 ± 1,00	*	57,50 ± 15,50	*	0,00 ± 0,00	*
90	44,60 ± 10,30	69,00 ± 7,00	10,93 ± 0,06	1,00 ± 0,00	43,13 ± 9,72	28,50 ± 8,50	1,33 ± 0,88	1,00 ± 0,00
105	69,00 ± 4,00	67,60 ± 0,00	4,00 ± 3,00	5,30 ± 0,00	25,00 ± 3,51	27,10 ± 0,00	2,00 ± 1,15	*
120	62,00 ± 20,00	61,00 ± 1,00	3,00 ± 1,00	3,00 ± 0,00	35,00 ± 19,00	30,50 ± 4,50	0,00 ± 0,00	4,50 ± 2,50
135	74,00 ± 1,00	*	3,00 ± 0,00	*	22,50 ± 1,50	*	0,50 ± 0,50	*
150	66,37 ± 8,37	72,15 ± 4,15	6,25 ± 2,39	13,60 ± 0,00	26,12 ± 8,49	16,05 ± 5,95	1,25 ± 0,47	6,00 ± 0,00
165	75,47 ± 6,85	77,95 ± 1,95	5,80 ± 2,87	3,00 ± 0,00	17,97 ± 7,91	19,05 ± 1,95	0,75 ± 0,75	3,00 ± 0,00
180	76,12 ± 5,37	83,22 ± 2,05	10,72 ± 2,68	8,55 ± 2,95	13,10 ± 3,10	8,65 ± 1,12	0,00 ± 0,00	*

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 37.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de neutrófilos ($F = 5,81$; $p = 0,001$; g.l. = 10 y 17) de los animales infectados, cuando se consideraron los distintos días p.i. Los resultados del test LSD se resumen en el Cuadro 38.

DIAS P.I.	30	60	150	165	180
0	**		**		*
15			**		*
30		*			**
45		**			*
60			*	**	*
90			**		*
120			**		*
165					**

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Cuadro 38.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **neutrófilos** obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias.

4.2.2.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias

Los valores de los parámetros hemáticos obtenidos en los animales infectados fueron inferiores a los de los testigos, excepto los de leucocitos, hemoglobina, índices eritrocíticos y neutrófilos (Cuadro 39).

PARÁMETROS HEMÁTICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS DOSIS 3.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
ERITROCITOS (x10 ⁶)/ mm ³	7,23 ± 0,14	4,36 - 9,84	7,01 ± 0,12	4,04 - 9,92
LEUCOCITOS (x 10 ³)/ mm ³	7,13 ± 0,29	2,58 - 16,65	8,30 ± 0,34	30,65 - 21,14
HEMATÓCRITO (%)	29,99 ± 0,40	20,00 - 38,00	29,67 ± 0,39	19,00 - 39,10
HEMOGLOBINA (g/dl)	10,09 ± 0,29	4,70 - 13,00	10,70 ± 0,19	7,60 - 13,30
VCM (fl)	42,61 ± 0,79	24,38 - 61,80	43,47 ± 0,87	27,14 - 89,80
HCM (pg)	15,26 ± 0,42	10,76 - 23,33	15,71 ± 0,38	10,75 - 29,61
CHCM(g/dl)	34,22 ± 0,65	17,40 - 42,86	34,69 ± 0,33	29,39 - 41,45
LINFOCITOS (%) *	63,76 ± 3,03	24,00 - 86,00	61,99 ± 2,45	19,00 - 86,00
MONOCITOS (%) *	6,36 ± 0,85	1,00 - 17,10	5,80 ± 0,68	1,00 - 14,80
NEUTRÓFILOS (%) *	29,68 ± 3,29	3,00 - 73,00	31,21 ± 2,72	4,50 - 80,00
EOSINÓFILOS (%) *	2,11 ± 0,35	0,00 - 0,70	1,20 ± 0,28	1,00 - 6,00

Cuadro 39.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias. * Componentes de la fórmula leucocitaria.

Cuando consideramos únicamente los valores de los componentes de la fórmula leucocitaria (por mm³), la media de dichos valores (Cuadro 40) fue inferior en los animales infectados que en los testigos, excepto la de neutrófilos y eosinófilos.

FÓRMULA LEUCOCITARIA	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
			DOSIS 3.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
LINFOCITOS/mm ³	4.923,83 ± 385,62	1.430,10 - 10.823,15	4.791,80 ± 328,13	1.647,33 - 10.787,45
MONOCITOS/mm ³	453,42 ± 66,31	37,46 - 1.665,10	388,46 ± 41,06	55,84 - 1124,11
NEUTRÓFILOS/mm ³	2.326,49 ± 287,23	234,00 - 6.092,73	2.923,23 ± 483,50	189,99 - 16916,80
EOSINÓFILOS/mm ³	55,16 ± 21,68	49,68-666,04	104,88 ± 25,28	60,44 - 668,10

Cuadro 40.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de la fórmula leucocitaria de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias.

A la vista de los Cuadros 41-43, en los que se muestran los valores de los distintos parámetros hemáticos obtenidos desde el día 0 hasta el día 180 p.i., el n° de leucocitos y la fórmula leucocitaria fueron los parámetros más alterados en los corderos infectados con 3.000 metacercarias en relación con los testigos, como también ocurrió en los infectados con 1.000 mencionados en el apartado anterior. Así, los valores de leucocitos de los infectados fueron superiores a los de los testigos en todos los días p.i., excepto en los días 0, 105 y 135 p.i. (Cuadro 41). Sin embargo, tal como se muestra en el Cuadro 43, los valores de linfocitos y monocitos de los corderos infectados fueron inferiores a los de los testigos en todos los días p.i., a excepción de los días 0 y 150 p.i. para los linfocitos, y 105 a 165 p.i. para los monocitos. En cambio, los valores de neutrófilos y eosinófilos de los corderos infectados fueron superiores a los de los testigos en todos los días p.i., excepto en los días 0, 135 y 150 para los neutrófilos.

Cuando se consideraron los valores de todos los parámetros obtenidos el día 0 p.i., no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, mediante la prueba "t" de Student, entre los de los corderos infectados y testigos. Dicha prueba se utilizó para comparar los valores de los parámetros hemáticos obtenidos en los animales infectados y testigos, en los distintos días p.i., no detectándose diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía, se observaron diferencias estadísticamente significativas, respecto a los distintos días p.i., en los valores de los siguientes parámetros obtenidos en los corderos infectados: a/ eritrocitos (F = 2,28; p = 0,05; g.l. = 12 y 110), b/ leucocitos (F = 2,52; p = 0,001; g.l. = 12 y 110), c/ hematócrito (F = 5,33; p = 0,001; g.l. = 12 y 110), d/ hemoglobina (F = 11,52; p = 0,001; g.l. = 11 y 37), e/ VCM (F = 2,78; p = 0,005; g.l. = 12 y 110), f/ CHCM (F = 9,33; p = 0,001; g.l. = 11 y 37), y g/ neutrófilos (F = 3,48; p = 0,005; g.l. = 11 y 31). Los resultados del test LSD, para los parámetros anteriormente mencionados, se resumen en los Cuadros 44-50.

DÍAS	ERITROCITOS ($\times 10^6$)/mm ³		LEUCOCITOS ($\times 10^3$)/mm ³		HEMATÓCRITO (%)		HEMOGLOBINA (%)	
	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000
0	7,73 \pm 0,47	6,95 \pm 0,36	7,96 \pm 0,66	6,81 \pm 0,50	28,54 \pm 0,78	27,41 \pm 0,66	9,20 \pm 1,20	9,80 \pm 0,10
15	6,99 \pm 0,52	5,92 \pm 0,36	6,62 \pm 0,75	7,92 \pm 0,91	29,97 \pm 1,03	26,29 \pm 1,23	9,10 \pm 1,40	9,15 \pm 0,55
30	7,27 \pm 0,46	6,49 \pm 0,25	6,98 \pm 0,59	7,80 \pm 0,66	29,68 \pm 0,62	27,63 \pm 0,98	8,60 \pm 1,10	8,45 \pm 0,55
45	7,48 \pm 0,76	7,75 \pm 0,45	8,40 \pm 0,13	9,89 \pm 1,15	28,93 \pm 1,25	28,01 \pm 1,01	6,50 \pm 1,80	8,05 \pm 0,45
60	7,20 \pm 0,50	7,07 \pm 0,39	6,44 \pm 0,84	8,85 \pm 0,68	29,36 \pm 2,36	30,92 \pm 1,25	6,65 \pm 0,25	8,40 \pm 0,40
75	8,19 \pm 0,37	8,28 \pm 0,73	7,08 \pm 0,57	9,95 \pm 1,51	31,11 \pm 1,36	32,78 \pm 0,84	9,20 \pm 0,40	*
90	6,49 \pm 0,49	7,83 \pm 0,35	8,23 \pm 0,14	4,13 \pm 2,82	30,37 \pm 1,61	34,36 \pm 0,99	10,60 \pm 0,83	11,95 \pm 0,36
105	6,84 \pm 0,42	6,86 \pm 0,34	7,45 \pm 0,23	6,53 \pm 1,17	33,08 \pm 1,38	34,15 \pm 0,51	12,05 \pm 0,33	11,65 \pm 0,26
120	6,94 \pm 0,60	6,15 \pm 0,52	6,50 \pm 0,12	9,69 \pm 1,66	31,33 \pm 1,85	33,91 \pm 1,70	11,63 \pm 0,29	11,56 \pm 0,21
135	7,81 \pm 0,38	7,40 \pm 0,50	8,91 \pm 0,89	7,90 \pm 0,99	31,50 \pm 1,45	32,13 \pm 1,93	11,76 \pm 0,28	11,90 \pm 0,38
150	7,08 \pm 0,68	7,40 \pm 0,44	7,13 \pm 0,60	7,36 \pm 1,37	29,61 \pm 1,09	30,26 \pm 0,80	10,77 \pm 0,34	10,81 \pm 0,30
165	6,81 \pm 0,67	6,86 \pm 0,44	5,07 \pm 0,47	5,65 \pm 0,62	27,91 \pm 1,84	27,93 \pm 0,67	9,62 \pm 0,66	10,51 \pm 0,36
180	7,03 \pm 0,55	7,12 \pm 0,34	5,38 \pm 0,92	5,74 \pm 0,80	29,97 \pm 0,90	28,04 \pm 0,75	10,20 \pm 0,52	10,28 \pm 0,25

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 41.- Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias , a lo largo de la experiencia.

DÍAS	ÍNDICES ERITROCÍTICOS					
	VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000
0	37,49 ± 1,73	40,36 ± 1,86	14,78 ± 1,58	15,19 ± 0,97	34,31 ± 2,82	33,24 ± 0,78
15	44,30 ± 3,29	46,09 ± 3,35	15,68 ± 2,68	15,97 ± 1,64	32,65 ± 3,55	29,52 ± 0,13
30	41,69 ± 2,18	43,10 ± 1,95	15,18 ± 2,13	14,66 ± 1,10	30,65 ± 3,38	34,85 ± 0,89
45	42,43 ± 4,38	37,10 ± 1,90	13,82 ± 3,06	14,10 ± 0,94	25,30 ± 7,90	33,61 ± 0,92
60	41,22 ± 2,89	44,40 ± 1,77	12,24 ± 0,47	14,20 ± 1,10	30,94 ± 0,27	30,81 ± 0,61
75	38,06 ± 1,06	42,27 ± 6,25	12,76 ± 1,42	*	30,31 ± 3,96	*
90	47,45 ± 2,04	44,11 ± 1,40	14,84 ± 0,60	15,35 ± 0,58	33,67 ± 0,85	34,77 ± 0,38
105	49,01 ± 2,93	50,28 ± 2,22	17,22 ± 1,31	17,11 ± 0,64	34,43 ± 0,31	34,10 ± 0,50
120	46,08 ± 3,33	57,34 ± 6,54	15,64 ± 2,32	19,33 ± 2,62	33,79 ± 1,26	32,72 ± 0,70
135	40,88 ± 2,96	43,64 ± 1,79	14,98 ± 0,87	15,16 ± 0,85	35,33 ± 0,45	34,65 ± 0,90
150	43,19 ± 3,18	41,47 ± 2,11	17,45 ± 2,27	14,84 ± 0,84	38,27 ± 1,37	35,75 ± 0,53
165	41,76 ± 2,08	41,50 ± 2,78	15,45 ± 0,96	15,53 ± 0,81	36,49 ± 0,98	37,63 ± 0,84
180	40,77 ± 2,60	39,67 ± 1,55	15,43 ± 1,06	14,56 ± 0,62	37,58 ± 1,41	36,68 ± 0,29

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 42.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DÍAS P. I.	F Ó R M U L A L E U C O C I T A R I A							
	LINFOCITOS (%)		MONOCITOS (%)		NEUTRÓFILOS (%)		EOSINÓFILOS (%)	
	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000	Test.	Inf. 3.000
0	53,70 ± 17,70	59,50 ± 0,50	4,20 ± 3,20	1,50 ± 0,50	42,10 ± 20,90	37,50 ± 0,50	0,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
15	56,70 ± 20,70	49,50 ± 1,50	4,65 ± 3,65	4,00 ± 0,00	41,80 ± 21,20	47,00 ± 5,00	0,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
30	64,25 ± 19,25	56,00 ± 5,00	5,15 ± 4,15	2,00 ± 0,00	30,60 ± 23,40	39,50 ± 3,50	0,00 ± 0,00	3,50 ± 2,50
45	65,80 ± 18,80	53,00 ± 3,00	6,37 ± 5,70	3,00 ± 1,00	27,50 ± 24,50	41,00 ± 5,00	0,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
60	60,60 ± 10,60	42,50 ± 9,50	9,55 ± 7,55	5,00 ± 2,00	29,85 ± 18,15	52,00 ± 12,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
75	40,50 ± 16,50	*	2,00 ± 1,00	*	57,50 ± 15,50	*	0,00 ± 0,00	*
90	44,60 ± 10,30	40,00 ± 8,03	10,93 ± 0,06	4,40 ± 1,77	43,13 ± 9,72	53,75 ± 9,57	1,33 ± 0,88	3,00 ± 2,00
105	69,00 ± 4,00	68,33 ± 7,68	4,00 ± 3,00	4,66 ± 1,66	25,00 ± 3,51	25,33 ± 6,88	2,00 ± 1,15	5,00 ± 0,00
120	62,00 ± 20,00	58,66 ± 4,36	3,00 ± 1,00	4,71 ± 0,86	35,00 ± 19,00	35,16 ± 4,69	0,00 ± 0,00	3,00 ± 0,57
135	74,00 ± 1,00	71,05 ± 4,05	3,00 ± 0,00	6,85 ± 3,85	22,50 ± 1,50	20,60 ± 6,40	0,50 ± 0,50	3,00 ± 0,00
150	66,37 ± 8,37	72,38 ± 5,38	6,25 ± 2,39	7,55 ± 2,10	26,12 ± 8,49	20,06 ± 6,26	1,25 ± 0,47	1,33 ± 0,33
165	75,47 ± 6,85	66,16 ± 8,38	5,80 ± 2,87	7,91 ± 2,49	17,97 ± 7,91	26,75 ± 8,63	0,75 ± 0,75	5,00 ± 0,00
180	76,12 ± 5,37	75,73 ± 3,75	10,72 ± 2,68	9,57 ± 0,76	13,10 ± 3,10	14,00 ± 4,45	0,00 ± 0,00	*

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 43.- Valores (x ± E.S.) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.

DIAS P.I.	15	45	60	75	90	120	135	150	180
0	**								
15		*	**	*	*		**	**	**
30		**		**	**				
45						**			
60									
75						*			
90						**			

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 44.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **eritrocitos** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	45	90	105	135	150	165	180
0	**	*					
15		*					**
30		*					
45			**			*	*
60						**	**
75			**			**	**
90			*	**	*	*	*
120						**	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 45.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **leucocitos** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	60	75	90	105	120	135	150	165	180
0		**	*	*	*	**			
15	**	*	*	*	*	*	**		
30		*	*	*	*	**			
45		*	*	*	*	*			
60			**	**	**				
75								**	**
90							**	*	*
105								*	*
120								*	*
135								**	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 46.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores del **hematócrito** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	45	90	105	120	135	150	165	180
0	**	*	*	*	*			
15		*	*	*	*	*	**	
30		*	*	*	*	*	**	*
45		*	*	*	*	*	*	*
60		*	*	*	*	*	*	*
90						**	*	*
105							**	*
120							**	*
135						**	*	*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 47.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **hemoglobina** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.I.	45	60	90	105	120	135	150	165	180
0				**	*				
15	**				*				
30	**				*				
45		**	**	*	*				
60					*				
75				**	*				
90					**				
105									**
120						**	*	*	*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 48.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **VCM** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.L.	15	30	45	60	90	105	120	135	150	165	180
0	**								**	*	*
15		*	*		*	*	*	*	*	*	*
30				*						**	
45				**						*	*
60					*	*		*	*	*	*
90							**			*	**
105									**	*	*
120								**	*	*	*
135										*	**
150										**	

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 49.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **CHCM** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

DIAS P.L.	105	135	150	165	180
0					*
15			**		**
30					**
45	**		**	**	*
60					*
90	**	**	*	*	*
120			**	**	*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 50.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **neutrófilos** obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.

Cuando se consideraron por separado los parámetros hemáticos de los corderos testigos y de los infectados con cada una de las dosis (Cuadros 33 y 39), los valores de estos últimos fueron inferiores a los de los testigos, excepto los de eritrocitos, hematócrito, hemoglobina y linfocitos en el caso de los corderos infectados con 1.000 metacercarias, y los de leucocitos, hemoglobina, índices eritrocíticos y neutrófilos en los infectados con 3.000. Por otra parte, los valores de eritrocitos, hematócrito y linfocitos obtenidos en estos últimos fueron inferiores a los observados en los infectados con 1.000. Sin embargo, cuando se consideraron los valores de la fórmula leucocitaria (expresados por mm^3), los valores medios

en los animales infectados fueron inferiores a los de los testigos (Cuadros 34 y 40), excepto los de neutrófilos en los infectados con 3.000 metacercarias y los de eosinófilos en los infectados con cada una de las dosis.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de leucocitos ($F = 10,02$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 305), entre los animales testigos, los infectados con 1.000 metacercarias y los infectados con 3.000. Cuando se aplicó el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) entre los valores de leucocitos de los corderos testigos y de los infectados con 3.000 metacercarias, y entre los de los infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias.

4.2.2.3.- Todos los animales infectados

Los valores de los parámetros hemáticos estudiados en los animales infectados no difirieron, en general, de aquellos detectados en los testigos (Cuadro 51), por lo que al aplicar la prueba "t" de Student, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en los valores de dichos parámetros, entre ambos grupos.

A lo largo de los días p.i.

A la vista de los Cuadros 52-54, en que se recogen los valores de los distintos parámetros hemáticos obtenidos en los corderos testigos e infectados desde el día 0 hasta el día 180 p.i., fue la fórmula leucocitaria la que más se alteró (Cuadro 54). Así, los valores medios de linfocitos y monocitos de los animales infectados fueron inferiores a los de los testigos en todos los días en que se realizaron los análisis, excepto en los días 0, 30, 90, 150 y 180 p.i. para los linfocitos, y desde el día 105 al 165 p.i. para los monocitos. Sin embargo, la media de neutrófilos y eosinófilos fue superior en los animales infectados en todos los días p.i., con excepción de los días 0, 30, 120, 135, 150 y 180 p.i. en los primeros, y de los días 90 y 105 p.i. en los segundos. Además, en uno de los animales infectados con 3.000 metacercarias sacrificado a los 2 meses se observaron basófilos (1%) el día 60 p.i. (este dato no se refleja en ningún cuadro).

Mediante la prueba "t" de Student, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de leucocitos ($t = 2,39$; $p = 0,05$; g.l. = 30), entre los animales infectados y testigos el día 0 p.i. Por esta razón, dicho parámetro fue excluido cuando se aplicó el mismo test para comparar los valores del resto de los parámetros hemáticos obtenidos en los corderos infectados y testigos, en los distintos días p.i. Estos análisis nos permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas en los valores de eritrocitos ($t = 2,58$; $p = 0,05$; g.l. = 19) y VCM ($t = 2,59$; $p = 0,05$; g.l. = 19) entre los corderos infectados y testigos, a los 90 días p.i.

PARÁMETROS HEMÁTICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
ERITROCITOS (x 10 ⁶)/mm ³	7,23 ± 0,14	4,36 - 9,84	7,21 ± 0,08	4,04 - 9,92
LEUCOCITOS (x 10 ³)/mm ³	7,13 ± 0,29	2,58 - 16,65	7,43 ± 0,20	3,06 - 21,14
HEMATÓCRITO (%)	29,99 ± 0,40	20,00 - 38,00	30,05 ± 0,26	19,00 - 39,10
HEMOGLOBINA (g/dl)	10,09 ± 0,29	4,70 - 13,00	10,47 ± 0,14	7,60 - 13,30
VCM (fl)	42,61 ± 0,79	24,38 - 61,80	42,74 ± 0,56	27,14 - 89,81
HCM (pg)	15,26 ± 0,42	10,76 - 23,33	15,37 ± 0,25	11,83 - 29,61
CHCM (g/dl)	34,22 ± 0,65	17,40 - 42,86	34,41 ± 0,24	29,29 - 41,45
LINFOCITOS (%) *	63,76 ± 3,03	24,00 - 86,00	64,01 ± 1,76	19,00 - 87,90
MONOCITOS (%) *	6,36 ± 0,85	1,00 - 17,10	5,69 ± 0,52	1,00 - 14,80
NEUTRÓFILOS (%) *	29,68 ± 3,29	3,00 - 73,00	29,70 ± 1,96	4,50 - 80,00
EOSINÓFILOS (%) *	2,11 ± 0,35	1,00 - 4,00	2,70 ± 0,34	1,00 - 7,00

Cuadro 51.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados.

* Componentes de la fórmula leucocitaria.

DÍAS	ERITROCITOS ($\times 10^6$)/mm ³		LEUCOCITOS ($\times 10^3$)/mm ³		HEMATÓCRITO (%)		HEMOGLOBINA (g/dl)		
	P.I.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.
0		7,73 ± 0,47	7,24 ± 0,23	7,96 ± 0,66	6,40 ± 0,33	28,54 ± 0,78	29,63 ± 0,87	9,20 ± 1,20	10,30 ± 0,34
15		6,99 ± 0,52	6,59 ± 0,30	6,62 ± 0,75	7,28 ± 0,54	29,97 ± 1,03	28,34 ± 0,99	9,10 ± 1,40	9,82 ± 0,48
30		7,27 ± 0,46	6,78 ± 0,22	6,98 ± 0,59	7,23 ± 0,41	29,68 ± 0,62	28,78 ± 0,77	8,60 ± 1,10	8,92 ± 0,45
45		7,48 ± 0,76	7,25 ± 0,31	8,40 ± 0,13	7,96 ± 0,76	28,93 ± 1,25	28,29 ± 0,58	6,50 ± 1,80	8,50 ± 0,27
60		7,20 ± 0,50	7,24 ± 0,26	6,44 ± 0,84	7,74 ± 0,49	29,36 ± 2,36	30,01 ± 0,76	6,65 ± 0,25	8,66 ± 0,33
75		8,19 ± 0,37	8,13 ± 0,37	7,08 ± 0,57	8,15 ± 0,95	31,11 ± 1,36	30,97 ± 1,01	9,20 ± 0,40	*
90		6,49 ± 0,49	7,75 ± 0,26	8,23 ± 0,14	10,44 ± 1,82	30,37 ± 1,61	31,97 ± 1,12	10,60 ± 0,83	11,73 ± 0,40
105		6,84 ± 0,42	6,87 ± 0,35	7,45 ± 0,23	6,41 ± 0,70	33,08 ± 1,38	33,28 ± 0,67	12,05 ± 0,33	11,47 ± 0,31
120		6,94 ± 0,60	6,35 ± 0,36	6,50 ± 0,12	8,48 ± 0,96	31,33 ± 1,85	31,70 ± 1,06	11,63 ± 0,29	11,22 ± 0,28
135		7,81 ± 0,38	7,94 ± 0,31	8,91 ± 0,89	7,84 ± 0,72	31,50 ± 1,45	31,85 ± 1,04	11,76 ± 0,28	11,76 ± 0,32
150		7,08 ± 0,68	7,70 ± 0,30	7,13 ± 0,60	7,28 ± 0,75	29,61 ± 1,09	31,25 ± 0,86	10,77 ± 0,34	10,68 ± 0,24
165		6,81 ± 0,67	7,38 ± 0,36	5,07 ± 0,47	6,04 ± 0,49	27,91 ± 1,84	29,46 ± 0,92	9,62 ± 0,66	10,22 ± 0,33
180		7,03 ± 0,55	7,28 ± 0,21	5,38 ± 0,92	5,76 ± 0,57	28,03 ± 1,15	29,97 ± 0,90	10,20 ± 0,52	10,55 ± 0,28

* Por razones ajenas a nuestra voluntad, no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 52.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.

DÍAS	ÍNDICES ERITROCÍTICOS					
	VCM (fl)		HCM (pg)		CHCM (g/dl)	
	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.
0	37,49 ± 1,73	41,47 ± 1,39	14,78 ± 1,58	14,25 ± 0,69	34,31 ± 2,82	32,66 ± 0,90
15	44,30 ± 3,29	44,24 ± 1,87	15,68 ± 2,68	16,05 ± 0,61	32,65 ± 3,55	32,93 ± 1,41
30	41,69 ± 2,18	42,93 ± 1,18	15,18 ± 2,13	15,20 ± 0,49	30,65 ± 3,38	33,31 ± 0,93
45	42,43 ± 4,38	40,54 ± 1,95	13,82 ± 3,06	14,74 ± 0,50	25,30 ± 7,90	33,36 ± 0,46
60	41,22 ± 2,89	42,31 ± 1,47	12,24 ± 0,47	13,98 ± 0,47	30,94 ± 0,27	32,09 ± 0,57
75	38,06 ± 1,06	39,55 ± 3,37	12,76 ± 1,42	*	30,31 ± 3,96	*
90	47,45 ± 2,04	41,45 ± 1,30	14,84 ± 0,60	15,04 ± 0,48	33,67 ± 0,85	34,58 ± 0,44
105	49,01 ± 2,93	49,67 ± 2,42	17,22 ± 1,31	16,84 ± 0,50	34,43 ± 0,31	34,24 ± 0,53
120	46,08 ± 3,33	51,87 ± 3,97	15,64 ± 2,32	18,54 ± 1,90	33,79 ± 1,26	33,37 ± 0,66
135	40,88 ± 2,96	40,63 ± 1,71	14,98 ± 0,87	14,83 ± 0,73	35,33 ± 0,45	35,06 ± 0,81
150	43,19 ± 3,18	41,06 ± 1,36	17,45 ± 2,27	14,71 ± 0,71	38,27 ± 1,37	35,73 ± 0,54
165	41,76 ± 2,08	40,56 ± 1,57	15,45 ± 0,96	15,32 ± 0,61	36,49 ± 0,98	37,04 ± 0,77
180	40,77 ± 2,60	41,29 ± 1,06	15,43 ± 1,06	14,58 ± 0,46	37,58 ± 1,41	35,30 ± 0,58

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 53.- Valores ($\bar{x} \pm E.S.$) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.

DÍAS	F Ó R M U L A L E U C O C I T A R I A							
	LINFOCITOS (%)		MONOCITOS (%)		NEUTRÓFILOS (%)		EOSINÓFILOS (%)	
	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.	Test.	Inf.
0	53,70 ± 17,70	56,80 ± 3,81	4,20 ± 3,20	1,60 ± 0,50	42,10 ± 20,90	40,20 ± 3,69	0,00 ± 0,00	1,40 ± 0,60
15	56,70 ± 20,70	53,40 ± 4,43	4,65 ± 3,65	1,60 ± 0,67	41,80 ± 21,20	44,00 ± 4,57	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,54
30	64,25 ± 19,25	65,86 ± 4,38	5,15 ± 4,15	4,50 ± 2,55	30,60 ± 23,40	28,04 ± 5,05	0,00 ± 0,00	1,60 ± 1,12
45	65,80 ± 18,80	61,92 ± 5,05	6,37 ± 5,70	5,08 ± 2,21	27,50 ± 24,50	31,60 ± 5,81	0,00 ± 0,00	1,40 ± 1,16
60	60,60 ± 10,60	49,90 ± 5,89	9,55 ± 7,55	3,40 ± 0,96	29,85 ± 18,15	46,30 ± 5,97	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,24
75	40,50 ± 16,50	*	2,00 ± 1,00	*	57,50 ± 15,50	*	0,00 ± 0,00	*
90	44,60 ± 10,30	49,66 ± 5,43	10,93 ± 0,06	3,83 ± 1,55	43,13 ± 9,72	45,33 ± 8,35	1,33 ± 0,88	1,16 ± 0,79
105	69,00 ± 4,00	68,15 ± 5,43	4,00 ± 3,00	4,82 ± 1,18	25,00 ± 3,51	25,77 ± 4,89	2,00 ± 1,15	1,25 ± 1,25
120	62,00 ± 20,00	59,25 ± 3,22	3,00 ± 1,00	4,50 ± 0,77	35,00 ± 19,00	34,00 ± 3,62	0,00 ± 0,00	2,25 ± 0,86
135	74,00 ± 1,00	71,05 ± 4,05	3,00 ± 0,00	6,85 ± 3,85	22,50 ± 1,50	20,60 ± 6,40	0,50 ± 0,50	1,50 ± 1,50
150	66,37 ± 8,37	72,32 ± 4,01	6,25 ± 2,39	7,36 ± 2,01	26,12 ± 8,49	19,06 ± 4,76	1,25 ± 0,47	1,25 ± 0,72
165	75,47 ± 6,85	69,11 ± 6,44	5,80 ± 2,87	6,31 ± 2,12	17,97 ± 7,91	24,82 ± 6,45	0,75 ± 0,75	1,00 ± 0,68
180	76,12 ± 5,37	78,73 ± 2,59	10,72 ± 2,68	9,37 ± 0,76	13,10 ± 3,10	11,86 ± 2,74	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

* Por razones ajenas a nuestra voluntad no tenemos el resultado correspondiente a ese día.

Cuadro 54.- Valores ($x \pm E.S.$) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.

Al realizar los correspondientes análisis de varianza de una vía, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas, con respecto a los distintos días p.i., en los valores de hemoglobina ($F = 4,70$; $p = 0,001$; g.l. = 12 y 27) y en los de CHCM ($F = 2,73$; $p = 0,05$; g.l. = 12 y 27) de los corderos testigos. Los resultados del test LSD, para dichos parámetros se resumen en los Cuadros 55 y 56.

DIAS P.I.	45	75	90	105	120	135	150	165	180
0	**			**	**	**			
15				**	**	**			
30				*	**	**			
45		**	*	*	*	*	*	*	*
60			*	*	*	*	*	**	*
75				**	**	**			
105								**	**
135								**	

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 55.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **hemoglobina** obtenidos de los corderos testigos.

DIAS P.I.	45	90	105	120	135	150	165	180
0	**							
15	**							
30						**		**
45		*	*	**	*	*	*	*
60						**		**
75						**	**	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 56.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **CHCM** obtenidos de los corderos testigos.

Asimismo, mediante el análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en los valores de los siguientes parámetros obtenidos en los corderos infectados: a/ eritrocitos ($F = 2,62$; $p = 0,005$; g.l. = 12 y 203), b/ hematócrito ($F = 2,82$; $p = 0,005$; g.l. = 12 y 203), c/ hemoglobina ($F = 9,53$; $p = 0,001$; g.l. = 11 y 69), d/ HCM ($F = 2,54$; $p = 0,05$; g.l. = 11 y 69), e/ VCM ($F = 2,86$; $p = 0,005$; g.l. = 12 y 203), f/ CHCM ($F = 4,04$; $p = 0,001$; g.l. = 11 y 69), y g/ neutrófilos ($F = 5,95$; $p = 0,001$; g.l. = 11 y 59). Los resultados del test LSD para los parámetros anteriormente mencionados se resumen en los Cuadros 57-63.

DIAS P.I.	15	75	90	105	120	135	150	165	180
0	**				**				
15		**	**			**	*		
30		*	**			*	**		
45		**							
60		**							
75				**	*				
90					*				
105						**			
120						*	*	**	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 57.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **eritrocitos** obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	75	90	105	120	135	150	165	180
0			*					
15	**	**	**	**	**	**		
30		**	**	**	**			
45	**	**	**	**	**	**		
60			**					
105							**	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 58.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores del **hematócrito** obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	30	45	60	90	105	120	135	150	165	180
0	**	*	*	*	**		**			
15		**	**	*	*	*	*			
30				*	*	*	*	*	**	*
45				*	*	*	*	*	*	*
60				*	*	*	*	*	*	*
90								**	*	*
105									*	**
120									**	
135								**	*	**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 59.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **hemoglobina** obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	105	120	135	150	165	180
0	*	*				
15	**	*				
30	**	*				
45	*	*				
60	*	*				
75	*	*				
90	**	*				
105			*	*	*	**
120			*	*	*	*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 60.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de **VCM** obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	105	120	135	150	165	180
	**	*				
15		**				
30		*				
45		*				
60	**	*				
90		*				
105		**				**
120			*	*	*	*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 61.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de HCM obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	90	105	135	150	165	180
0			**	*	*	*
15				**	*	**
30				**	*	**
45				**	*	
60	**	**	**	*	*	*
90					**	
105					*	
120				**	*	**
165						**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 62.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de CHCM obtenidos de los corderos infectados.

DIAS P.I.	90	105	150	165	180
0			**	**	*
15			**		**
30	**				*
45					*
60		**	*	*	*
90		*	*	*	*
105					**
120			*	**	*
135					**
150					**
165					**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 63.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de neutrófilos obtenidos de los corderos infectados.

Queremos dejar constancia de que las diferencias estadísticamente significativas observadas en los valores de hemoglobina y de CHCM, al considerar los distintos días p.i., se detectaron tanto en los corderos infectados como en los testigos.

De acuerdo con la época de sacrificio

En el Cuadro 64 se muestran los valores de algunos parámetros hemáticos obtenidos, durante todo el experimento, de los corderos testigos y de los infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i. Al tener en cuenta la fecha de sacrificio, se observaron ligeras variaciones en los parámetros de los corderos testigos. En el conjunto de los animales infectados y en los probados con 1.000 metacercarias, los valores de linfocitos, monocitos y eosinófilos fueron inferiores en los animales sacrificados a los 2 meses p.i., mientras que los de neutrófilos lo fueron en los sacrificados a los 6 meses. Sin embargo, en los infectados con 3.000 los valores de dichos parámetros fueron inferiores en los sacrificados a los 2 meses p.i., excepto los de neutrófilos y eosinófilos que lo fueron en los sacrificados a los 6 meses.

Cuando se consideraron únicamente los resultados de los corderos sacrificados a los 2 meses p.i. (Cuadro 64), los valores de monocitos y linfocitos de los animales testigos fueron superiores a los de los infectados con cada una de las dosis en el caso del primer parámetro (-39%), y con la dosis de 3.000 en el segundo (-13%); mientras que los valores de neutrófilos fueron inferiores a los de todos los corderos infectados (+11%). Por otra parte, los parámetros que más se incrementaron en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, respecto a los de 1.000, fueron los leucocitos, neutrófilos y eosinófilos (+32%, +26% y +166%, respectivamente) y los que más disminuyeron fueron los linfocitos (-15%).

Al tener en cuenta los resultados de los parámetros hemáticos de todos los corderos sacrificados a los 6 meses p.i. (Cuadro 64), se observó que los valores de linfocitos de los testigos fueron inferiores a los de todos los animales infectados (+15%) y a los de los infectados con 1.000 metacercarias, respectivamente, mientras que los valores de neutrófilos fueron superiores a los de los probados con cada una de las dosis. Por otra parte, los valores que más se incrementaron en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, respecto a los probados con 1.000, fueron los de leucocitos y neutrófilos y los que más decrecieron los de linfocitos.

Al considerar el conjunto de los corderos infectados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, mediante la prueba "t" de Student, en los valores de eritrocitos ($t = 3,94$; $p = 0,001$; g.l. = 215), hematócrito ($t = 4,66$; $p = 0,001$; g.l. = 215), hemoglobina ($t = 7,13$; $p = 0,001$; g.l. = 79), CHCM ($t = 4,687$; $p = 0,001$; g.l. = 79), monocitos ($t = 2,47$; $p = 0,05$; g.l. = 70) y neutrófilos ($t = 2,67$; $p = 0,01$ g.l. = 70) entre los corderos sacrificados a los 2 meses y los sacrificados a los 6. Cuando se aplicó la misma prueba para comparar los valores obtenidos en los animales infectados y en los testigos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de: 1/ eritrocitos ($t = 2,26$; $p = 0,05$; g.l. = 99), hemoglobina ($t = 2,49$; $p = 0,05$; g.l. = 33) y eosinófilos ($t = 3,69$; $p = 0,001$; g.l. = 36) en los animales sacrificados a los 2 meses; y 2/ hemoglobina ($t = 3,13$; $p = 0,005$; g.l. = 95) en los sacrificados a los 6.

PARÁMETROS HEMÁTICOS	CORDEROS TESTIGOS		CORDEROS INFECTADOS					
			DOSIS 1.000		DOSIS 3.000		DOSIS 1.000 ± DOSIS 3.000	
	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES
ERITROCITOS (x10⁶)mm³	7,34 ± 0,23	7,23 ± 0,14	6,65 ± 0,18	7,65 ± 0,13	6,72 ± 0,29	7,13 ± 0,13	6,68 ± 0,17	7,39 ± 0,97
LEUCOCITOS (x10⁶)mm³	7,31 ± 0,39	7,13 ± 0,29	6,43 ± 0,31	6,53 ± 0,21	8,51 ± 0,56	8,22 ± 0,43	7,56 ± 0,36	7,38 ± 0,25
HEMATÓCRITO (%)	29,35 ± 0,59	29,99 ± 0,40	28,52 ± 0,59	31,08 ± 0,38	27,70 ± 0,70	30,43 ± 0,45	28,07 ± 0,46	30,75 ± 0,29
HEMOGLOBINA	8,01 ± 0,57	10,09 ± 0,29	9,55 ± 0,29	10,61 ± 0,27	8,77 ± 0,25	11,19 ± 0,15	9,24 ± 0,21	11,01 ± 0,13
VCM (fl)	41,28 ± 1,31	42,61 ± 0,79	43,31 ± 0,88	41,54 ± 0,89	42,64 ± 1,46	43,78 ± 1,07	42,95 ± 0,88	42,66 ± 0,70
HCM (pg)	14,34 ± 0,83	15,26 ± 0,42	14,86 ± 0,35	14,86 ± 0,37	14,82 ± 0,45	15,94 ± 0,45	14,85 ± 0,27	15,61 ± 0,34
CMHC (g/dl)	30,77 ± 1,76	34,22 ± 0,65	33,18 ± 0,45	34,68 ± 0,45	32,41 ± 0,69	35,28 ± 0,32	32,87 ± 0,38	35,09 ± 0,26
LINFOCITOS (%) *	60,21 ± 6,11	63,76 ± 3,03	61,64 ± 2,52	73,90 ± 2,53	52,10 ± 2,56	64,99 ± 2,92	57,57 ± 2,27	67,51 ± 2,27
MONOCITOS (%) *	6,05 ± 1,82	6,36 ± 0,85	3,99 ± 1,17	5,85 ± 1,07	3,12 ± 0,66	7,02 ± 0,78	3,67 ± 0,77	6,70 ± 0,63
NEUTRÓFILOS (%) *	34,37 ± 7,54	29,68 ± 3,29	34,44 ± 3,56	19,22 ± 2,81	43,40 ± 2,78	27,51 ± 3,19	38,02 ± 2,53	25,17 ± 2,47
EOSINÓFILOS (%) *	0,00 ± 0,00	2,11 ± 0,35	1,25 ± 0,16	3,80 ± 1,15	3,33 ± 0,91	2,90 ± 0,49	2,14 ± 0,47	3,18 ± 0,48

Cuadro 64.- Valores ($\bar{x} \pm E. S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados, con distinta dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p. i. * Componentes de la fórmula leucocitaria.

Al comparar, mediante el análisis de varianza de una vía, los valores obtenidos en los animales infectados con 1.000 metacercarias, con 3.000 y en los testigos, todos ellos sacrificados a los 2 meses, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de leucocitos ($F = 8,47$; $p = 0,001$; g.l. = 2 y 97), hemoglobina ($F = 4,31$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 32) y eosinófilos ($t = 7,34$, $p = 0,005$; g.l. = 2 y 34). Cuando se aplicó el test LSD, se detectaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de: 1/ hemoglobina, entre los testigos y los infectados con 1.000 metacercarias; 2/ leucocitos, entre los testigos y los infectados con 1.000 metacercarias, entre los testigos y los infectados con 3.000 y entre los probados con 1.000 y 3.000 metacercarias; y 3/ eosinófilos, entre los testigos y los infectados con 1.000 metacercarias y entre los testigos y los infectados con 3.000 metacercarias

Cuando se compararon, utilizando el mismo tipo de análisis, los valores obtenidos de los grupos de animales mencionados, pero sacrificados a los 6 meses, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de eritrocitos ($F = 3,82$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 205), leucocitos ($F = 4,53$; $p = 0,05$; g.l. = 2 y 205) y hemoglobina ($F = 5,94$; $p = 0,005$; g.l. = 2 y 94). Cuando se aplicó el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en los valores de: 1/ eritrocitos, entre los corderos testigos y los infectados con 1.000 metacercarias; 2/ leucocitos y hemoglobina, entre los testigos y los infectados con 3.000; y 3/ eritrocitos y leucocitos, entre los infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias.

DISCUSIÓN

En términos generales, no se observó alteración en el número de **eritrocitos**, lo que coincide con lo señalado por SÁNCHEZ (1994) en cricetos infectados con 40 metacercarias. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos: por PETROV & ABALIKHIN (1983), quienes observaron un descenso a los 60 días p.i. en corderos infectados con 2.600 metacercarias de *D. dendriticum*; por SALIMOV (1972a), quien detectó eritropenia desde el día 50 p.i. en terneros infectados con 5.000 metacercarias; por GUNDLACH *et al.* (1982), quienes encontraron que en ovejas infectadas naturalmente el número de eritrocitos descendió por debajo de los límites normales; y por SINCLAIR (1967), que observó anemia en ovejas parasitadas de forma natural.

En los corderos infectados por nosotros se detectaron ligeras variaciones en el valor **hematócrito**, hecho observado también por SÁNCHEZ (1994) en cricetos infectados experimentalmente. En los animales que infectamos con 1.000 metacercarias, el valor más bajo correspondió al día 45 p.i. (28,59%) y se incrementó hasta el día 105 (32,41%), lo que está en desacuerdo con lo señalado por VASIL'EVA (1974), quien observó un descenso gradual desde el día 45 p.i. hasta el 75, en ovejas infectadas experimentalmente con 1.000 a 1.200 metacercarias.

Los valores de **hemoglobina** del total de los corderos infectados no se alteraron con respecto a los de los testigos, lo que coincide con lo señalado por SÁNCHEZ (1994) en cricetos. Sin embargo, PETROV & ABALIKHIN (1983) observaron un descenso en los valores de hemoglobina a los 60 días p.i. en corderos infectados con 2.600 metacercarias, hecho similar al señalado por SALIMOV (1972a) en terneros infectados experimentalmente con 5.000 metacercarias.

En los animales infectados detectamos aumento en los **leucocitos** y **eosinófilos**, lo que concuerda con la eosinofilia (5-11%) y ligera leucocitosis observadas en el hombre por GIGITASHVILI (1962) (citado por VASALLO MATILLA, 1971) y que, según FAUST *et al.* (1974), se debe a la absorción de productos tóxicos de excreción de los vermes. Nuestros resultados sobre leucocitos coinciden también con los observados por PETROV & ABALIKHIN (1983) en corderos infectados experimentalmente y por SALIMOV (1972a) en terneros. Asimismo, los valores de eosinófilos obtenidos por nosotros concuerdan con los observados por GUNDLACH *et al.* (1982) en ovejas y por VERMEIL *et al.* (1964) (citado por VASALLO MATILLA, 1971) en el hombre (14%).

El incremento detectado en el número de leucocitos (+4%) y en el porcentaje de **neutrófilos** (+0,06%) fue muy inferior al observado por SÁNCHEZ (1994) para ambos parámetros (+102%, +73%, respectivamente). Asimismo, la disminución del porcentaje de **linfocitos** (-11%) también fue inferior al de dicha autora (-70%).

Los valores de la fórmula leucocitaria detectados por nosotros a los 2 meses (fase aguda) difirieron de los hallados a los 6 meses (fase crónica), mientras que los obtenidos por PETROV & ABALIKHIN (1983) fueron similares. Por otra parte, la fórmula leucocitaria varió con la dosis, aunque los cambios fueron menos acusados en los animales infectados con 1.000 metacercarias que en los probados con 3.000, hecho observado también por PETROV & ABALIKHIN (op. cit.) en corderos infectados con 1.800 y 2.600 metacercarias de *D. dendriticum*.

4.2.3.- ANÁLISIS COPROLÓGICOS

Los huevos de *D. dendriticum*, operculados y embrionados (Fig. 1 de Lámina III), que se recuperaron de las heces de los corderos infectados, medían entre 33,32 y 45,22 μm (x 39,41 \pm 0,78) de longitud y entre 21,42 y 28,56 μm (x 26,27 \pm 0,43) de anchura.

4.2.3.1.- Todos los animales infectados con *Dicrocoelium dendriticum*

Todos los corderos probados con cada una de las dosis de metacercarias comenzaron la eliminación de huevos de *D. dendriticum* entre los días 49 y 79 p.i. (x 59 \pm 1,63), excepto cuatro de ellos (Cuadro 65). A pesar de ser negativos, tres de estos animales, probados con 1.000 metacercarias, contenían también vermes cuando se sacrificaron a los 2 meses, mientras

que ignoramos si el otro cordero, probado con 3.000, albergaba vermes en el hígado y en la vesícula cuando murió a los 58 días, por no haber podido examinarlo.

CORDEROS PROBADOS	
DOSIS 1.000	DOSIS 3.000
1 ^{er} día de eliminación	1 ^{er} día de eliminación
53	49
56	53
56	54
56	54
56	55
60	56
63	56
63	60
79	61
—	63
—	77
—	—

Cuadro 65.- Período de prepatencia en cada uno de los animales probados con distintas dosis de metacercarias.

Al tener en cuenta todos los corderos positivos, el número de huevos por gramo (hpg) observado el primer día de eliminación osciló entre 33,33 y 133,33 ($x = 58,32 \pm 6,61$), no detectándose diferencia entre los animales probados con distintas dosis.

Al considerar la totalidad de los análisis coprológicos realizados sobre muestras tomadas por la mañana y por la tarde, el número de hpg eliminado osciló entre 33,33 y 2.266,44 ($x = 274,81 \pm 23,79$). Sin embargo, cuando se tuvieron en cuenta los resultados, por separado, se observó un incremento en el número de huevos eliminados por la tarde (rango = 33,33-2.266,44; $x = 357,78 \pm 47,59$), en relación con el de la mañana (33,33 - 1.566,51; $215,75 \pm 21,29$).

Mediante la prueba "t" de Student, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de hpg eliminado por los corderos infectados con 1.000 y con 3.000 metacercarias.

Además, con la "t" de Student (para muestras apareadas), se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de hpg eliminado por la mañana y por la tarde ($t = 2,49$; $p = 0,05$; g.l. = 74).

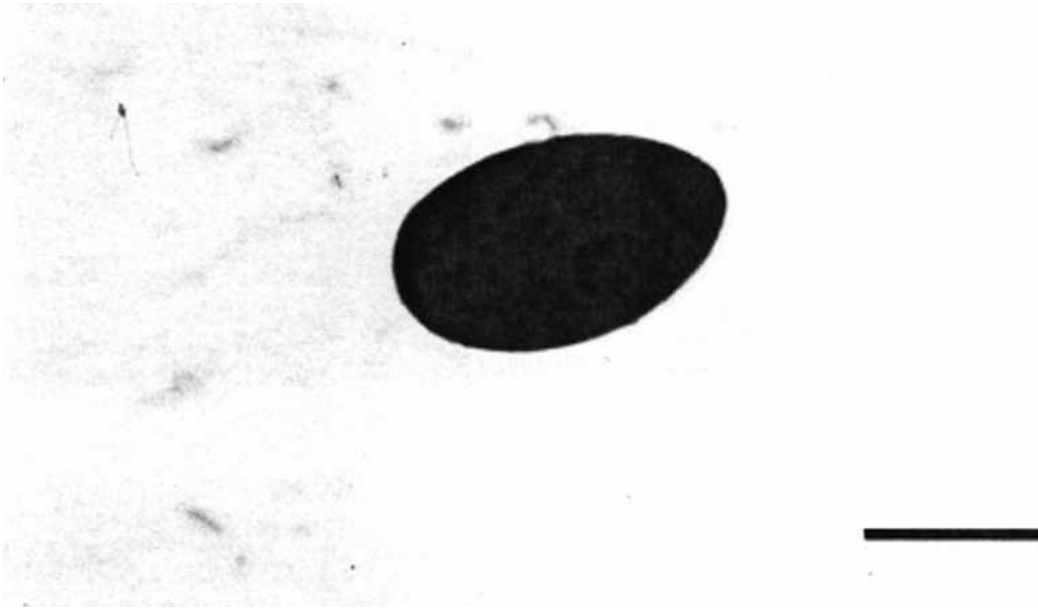


Figura 1.- Huevo de *Dicrocoelium dendriticum*. Barra = 0,02 mm.



Figura 2.- Adulto de *Dicrocoelium dendriticum*. Escala = 1 mm.

4.2.3.2.- Animales infectados con 1.000 y 3.000 metacercarias

El número medio de hpg eliminado por los corderos infectados tanto con 1.000 como con 3.000 metacercarias fue siempre superior en las muestras tomadas por la tarde que en las recogidas por la mañana (Cuadro 66). Por otra parte, la eliminación de huevos fue más elevada en los animales infectados con la dosis más alta.

MUESTRAS ANALIZADAS	HPG ELIMINADOS POR LOS CORDEROS INFECTADOS			
	DOSIS 1.000		DOSIS 3.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
MAÑANA	165,66 ± 15,04	33,33-533,28	258,01 ± 36,66	33,33-1.566,51
TARDE	232,31 ± 25,60	33,33-799,70	483,25 ± 88,01	33,33-1.566,51
TOTAL	194,82 ± 14,36	33,33-799,70	347,25 ± 42,44	33,33-1.566,51

Cuadro 66.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de huevos por gramo (hpg) eliminados por los corderos infectados con distinta dosis, en la mañana y en la tarde.

En las Figs. 5 y 6 se representan, por separado, los resultados obtenidos para cada uno de los 20 animales que llegaron a eliminar huevos. No obstante, en algunos corderos no aparecen datos en la tarde (Fig. 6), ya que se sacrificaron entre la 1ª y la 2ª toma de muestras positivas, fecha esta última en que se iniciaba la recogida por la tarde.

El valor más elevado de la media de hpg fue 240,11 ± 45,69 en los corderos infectados con 1.000 metacercarias y 966,53 ± 147,54 en los infectados con 3.000 (Fig. 5). El máximo de la media de hpg obtenido en las muestras recogidas por la mañana de los animales infectados con 1.000 metacercarias fue 205,47 ± 42,30, mientras que el de las recolectadas por la tarde ascendió a 312,41 ± 78,12 (Fig. 6).

De igual forma, en el caso de los corderos probados con 3.000 metacercarias, el valor máximo de la media de hpg obtenido en las muestras de la mañana 645,36 ± 135,22 se incrementó en las de la tarde 1.408,15 ± 221,16 (Fig. 6).

Sin embargo, mediante la "t" de Student (para muestras apareadas) solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de hpg eliminado en la mañana y en la tarde por uno de los animales (cordero 45) infectado con 1.000 metacercarias ($t = 1,95$; $p = 0,05$; g.l. = 9) y por otro de los infectados con 3.000 (cordero 104) ($t = 2,40$; $p = 0,05$; g.l. = 7).

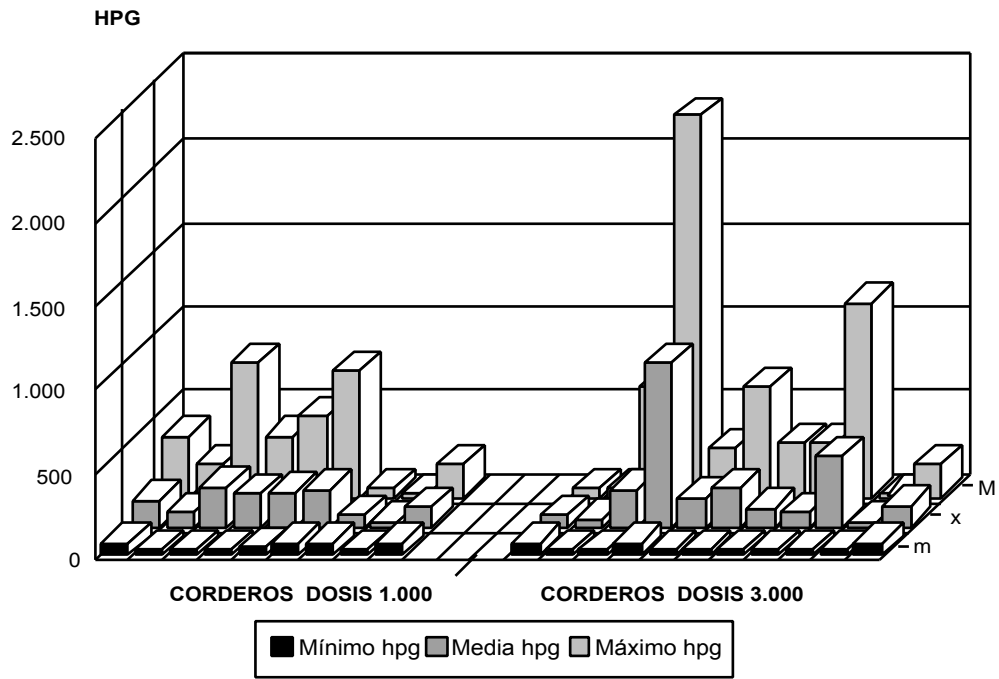


Figura 5.- Huevos por gramo (hpg) de *D. dendriticum* eliminados por cada cordero, en todo el período de muestreo.

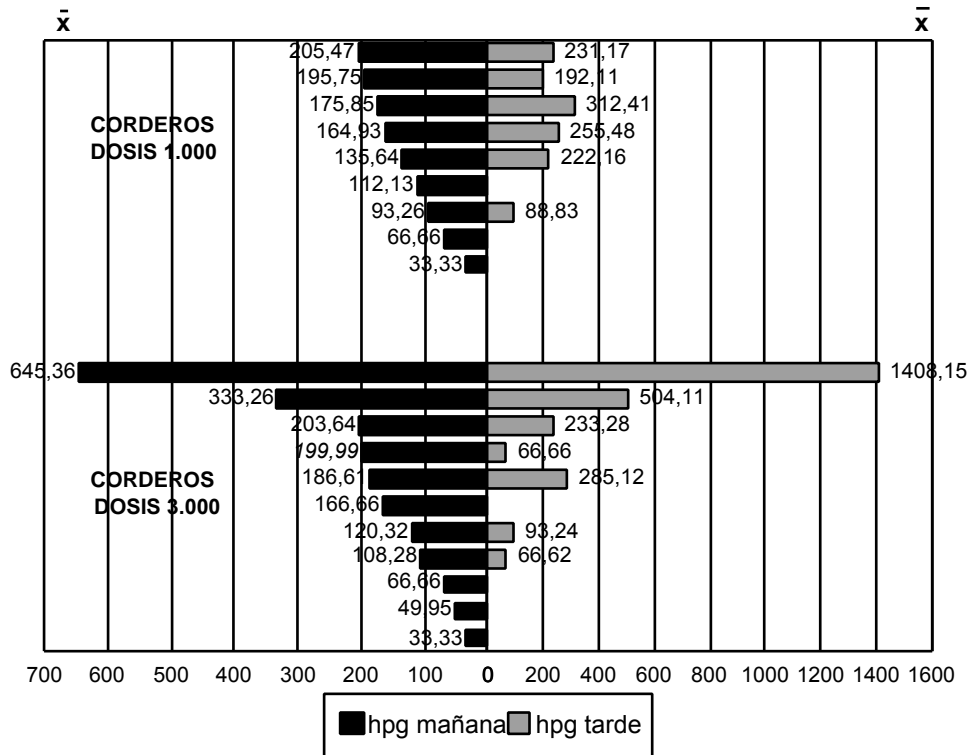


Figura 6.- Valores de hpg (x) de *D. dendriticum* eliminados en la mañana y en la tarde, por cada cordero, a lo largo de toda la experiencia.

4.2.3.3.- Todos los animales infectados: días post-infección

De acuerdo con los datos que se recogen en el Cuadro 67, el valor más elevado del máximo y de la media de hpg, tanto en el total de los corderos infectados como en los infectados con cada dosis, se obtuvo a los 150 y 180 días p.i., respectivamente. Mediante el análisis de varianza de una vía, se observaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en el número de hpg eliminado por el total de los animales infectados ($F = 5,94$; $p = 0,001$; g.l. = 8 y 171), por los infectados únicamente con 1.000 metacercarias ($F = 5,74$; $p = 0,001$; g.l. = 8 y 74) y por los infectados con 3.000 ($F = 2,61$; $p = 0,05$; g.l. = 8 y 88). Los respectivos resultados del test LSD, se resumen en los Cuadros 68-70.

DÍAS	HPG ELIMINADOS POR LOS CORDEROS INFECTADOS					
	DOSIS 1.000		DOSIS 3.000		DOSIS 1.000 + DOSIS 3.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
60	88,02 ± 22,03	33,33-199,98	112,05 ± 31,22	33,33-299,97	102,71 ± 20,61	33,33-299,97
75	133,26 ± 22,71	33,33-233,31	211,04 ± 48,74	33,33-399,96	174,44 ± 28,79	33,33-399,96
90	136,97 ± 26,89	33,33-266,64	275,66 ± 138,94	33,33-1.599,84	213,25 ± 77,30	33,33-1.599,84
105	214,74 ± 40,48	66,66-366,63	336,30 ± 131,52	33,33-1.533,18	281,60 ± 74,23	33,33-1.533,18
120	138,14 ± 26,45	66,66-299,97	294,36 ± 84,34	33,33-1.066,56	227,41 ± 51,52	33,33-1.066,56
135	257,51 ± 25,46	133,32-366,63	484,77 ± 173,44	33,33-2.066,46	371,14 ± 89,05	33,33-2.066,46
150	289,89 ± 64,96	99,99-799,70	579,92 ± 214,01	33,33-2.266,44	434,90 ± 113,81	33,33-2.266,44
165	181,40 ± 31,47	66,66-299,97	480,47 ± 144,73	66,66-1.566,51	352,30 ± 88,59	33,33-1.566,51
180	351,42 ± 48,94	133,32-749,90	599,90 ± 123,32	99,99-1.166,55	469,74 ± 68,23	33,33-1.166,55

Cuadro 67.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de huevos por gramo de heces (hpg) eliminados por los corderos infectados, en los distintos días p.i.

DIAS P.I.	105	120	135	150	165	180
60	*	**	*	*	*	*
75			**	**		*
90			*	*	**	*
105						*
120			**			*

* p 0,01; ** p 0,05

Cuadro 68.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el n° de **hpg** eliminado por **todos los corderos** probados.

DIAS P.I.	105	135	150	165	180
60	*	*	*	**	*
75		*	**		*
90		*	*		*
105					**
120		*	**		*
165					*

* p 0,01; **p 0,05

Cuadro 69.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el n° de **hpg** eliminado por todos los corderos probados con **1.000 metacercarias**.

DIAS P.I.	135	150	165	180
60	*	**	*	*
75				**
90				*
120				**

* p 0,01; **p 0,05

Cuadro 70.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el n° de **hpg** eliminado por todos los corderos probados con **3.000 metacercarias**.

A la vista de los valores que se muestran en el Cuadro 71 se observó, en términos generales, un incremento en el número medio de hpg al aumentar los días p.i., tanto en las muestras tomadas por la mañana como en las recogidas por la tarde.

DÍAS P. I.	HPG ELIMINADOS POR LOS CORDEROS INFECTADOS					
	DOSIS 1.000		DOSIS 3.000		DOSIS 1.000 + 3.000	
	MAÑANA	TARDE	MAÑANA	TARDE	MAÑANA	TARDE
60	99,94 ± 29,80	49,93 ± 9,61	116,60 ± 34,14	66,66 ± 0,00	111,04 ± 24,26	54,10 ± 7,97
75	108,25 ± 34,34	158,27 ± 28,47	213,26 ± 82,04	208,27 ± 55,07	166,58 ± 49,05	183,27 ± 30,21
90	79,94 ± 16,99	179,94 ± 35,90	138,83 ± 73,73	439,86 ± 292,69	112,06 ± 40,26	309,90 ± 145,60
105	155,48 ± 41,86	333,26 ± 19,25	306,62 ± 96,25	361,05 ± 238,71	224,18 ± 52,24	351,78 ± 154,26
120	122,15 ± 37,18	170,13 ± 26,76	277,73 ± 79,66	311,00 ± 157,61	199,94 ± 48,02	264,04 ± 104,70
135	219,94 ± 24,94	288,83 ± 39,12	316,61 ± 126,12	686,56 ± 350,60	272,67 ± 68,43	469,61 ± 163,37
150	233,24 ± 55,78	346,54 ± 119,48	305,48 ± 161,56	991,57 ± 429,09	272,64 ± 88,39	633,22 ± 217,93
165	186,58 ± 45,45	174,92 ± 49,75	466,58 ± 221,42	494,36 ± 207,51	339,30 ± 125,26	366,59 ± 131,93
180	305,46 ± 28,44	406,58 ± 102,81	544,35 ± 125,79	683,22 ± 265,78	424,90 ± 71,25	529,53 ± 130,65

Cuadro 71.- Valor medio de huevos por gramo (hpg) eliminados, en la mañana y en la tarde, por los corderos infectados, en los distintos días p.i.

No obstante, en los corderos infectados con 3.000 metacercarias el valor medio más elevado de hpg se obtuvo por la tarde a los 150 días p.i. y por la mañana a los 180, mientras que en los infectados con 1.000 el valor más alto coincidió, en ambos casos, en el día 180 p.i.

Mediante el análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, al considerar los distintos días p.i., en el número de hpg eliminado, por el total de los corderos infectados, en la mañana (F = 4,46; p = 0,001; g.l.= 8 y 94), y en la tarde (F = 3,09; p = 0,005; g.l. = 8 y 70). Los resultados del test LSD, se resumen en los Cuadros 72 y 73.

DIAS P.I.	105	135	150	165	180
60	**	*	**	*	*
75				**	*
90	**	*	**	*	*
105					**
120					*
150					**

*p = 0,01; **p = 0,05

Cuadro 72.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado en la **mañana** por **todos los corderos** probados.

DÍAS P.I.	75	90	105	120	135	150	165	180
60	**	**	**	**	*	*	*	*
75						**		**
90						**		
105						**		
120						**		**

* p = 0,01; ** p = 0,05

Cuadro 73.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado en la **tarde** por **todos los corderos** probados.

4.2.3.4.- Todos los animales infectados: época de sacrificio

Al comparar el número de huevos eliminado, durante todo el experimento, por los animales sacrificados a los 6 y a los 2 meses p.i. (Cuadro 74), la media de hpg fue superior en los del grupo primero, tanto cuando se tuvieron en cuenta las dos dosis en conjunto, como cuando se consideraron por separado.

Por otra parte, la media de hpg obtenida en ambos grupos de animales sacrificados a los 2 meses, pero infectados con distinta dosis, fue prácticamente similar, mientras que la del grupo probado con 3.000 metacercarias y sacrificado a los 6 meses fue superior que la del infectado con la dosis de 1.000.

El valor más elevado de la media de hpg se observó en las muestras recogidas por la tarde, procedentes de los animales infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses.

Mediante el test "t" de Student, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de hpg eliminado por el conjunto de los corderos sacrificados a los 2 y a los 6 meses p.i. ($t = 3,48$; $p = 0,001$; g.l. = 200). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de hpg eliminado por los animales infectados con 1.000 y con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 2 meses, ni en el grupo de corderos sacrificados a los 6 meses.

Mediante el análisis de varianza multifactorial, se estudió la variación en la eliminación de huevos en función de los días p.i. y el momento de recogida de las heces. De esta forma, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto al número de hpg, entre los distintos días p.i. en que se realizaron los análisis ($F = 6,03$; $p = 0,001$; g.l. = 8) y el momento de recogida de las heces ($F = 4,42$; $p = 0,05$; g.l. = 1); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la interacción doble días p.i.-momento de recogida. Los resultados del test LSD, se resumen en el Cuadro 75.

MUESTRAS ANALIZADAS	HPG ELIMINADOS POR LOS CORDEROS INFECTADOS					
	DOSIS 1.000		DOSIS 3.000		DOSIS 1.000 + DOSIS 3.000	
	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES	2 MESES	6 MESES
MAÑANA	93,26 ± 28,66	173,05 ± 15,99	95,77 ± 35,31	279,40 ± 40,67	128,50 ± 36,52	241,59 ± 24,9
TARDE	*	232,31 ± 25,60	66,66 ± 0,00	493,41 ± 89,58	66,66 ± 0,00	374,94 ± 49,6
TOTAL	93,26 ± 28,66	173,05 ± 15,99	92,53 ± 31,30	369,86 ± 45,57	92,79 ± 21,86	287,83 ± 25,29

* No tenemos el resultado correspondiente a ese día debido a que los animales de este grupo se sacrificaron entre la 1ª y la 2ª toma de muestras positivas, fecha esta última en que se iniciaba la recogida por la tarde.

Cuadro 74.- Valores (x ± E.S.) de huevos por gramo de heces (hpg) de corderos infectados con distintas dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i.

DIAS P.I.	75	90	105	120	135	150	165	180
60	**	**	*	*	*	*	*	*
75					**	**		*
90					*	*	**	*
105								**
120					**	**		*

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 75.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de **hpg** eliminado por todos los corderos probados al considerar, conjuntamente, los **días p.i.** y el **momento de recogida** de las heces.

Además, con el análisis de varianza multifactorial, se estudió la variación en la eliminación de huevos en función de los días p.i. y la dosis probada. De esta forma, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto al número de hpg, entre los distintos días p.i. en que se realizaron los análisis ($F = 5,80$; $p = 0,001$; $g.l. = 8$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la dosis ni en la interacción doble días p.i.-dosis probada. Los resultados del test LSD se resumen en el Cuadro 76.

DIAS P.I.	105	120	135	150	165	180
60	*	**	*	*	*	*
75			**	**		*
90			*	*	**	*
105						*
120			**	**		*
165						**

*p 0,01; **p 0,05

Cuadro 76.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de **hpg** eliminado por todos los corderos probados al considerar, conjuntamente, los **días p.i.** y la **dosis probada**.

Por otra parte, se detectó la presencia de huevos en la vesícula biliar de 11 corderos infectados con 3.000 metacercarias y de 6 probados con 1.000. En dos de estos últimos no se observaron huevos en las heces, pero sí se recuperaron vermes de hígado.

DISCUSIÓN

Al comparar el tamaño de los huevos de *D. dendriticum* procedentes de nuestros corderos con el dado por diversos autores, que se recogen en el Cuadro 6, el valor medio de la longitud obtenido por nosotros estaba incluido, en general, dentro del rango señalado por dichos autores, aunque el valor más bajo del rango fue superior, para todos ellos, al encontrado por nosotros. No obstante, los valores de la longitud señalados por ROCHE (1948), ALUNDA (1984), URQUHART *et al.* (1987) y AMBROSI (1991) fueron más elevados que los nuestros, mientras que los de DESOWITZ (1980) y MEHLHORN & WALLDORF (1988) fueron inferiores.

En lo que a la anchura se refiere, la media obtenida por nosotros se situó dentro del rango mencionado por los autores citados en el Cuadro 6, excepto en el caso de los valores señalados por FRIGATO (1961), ALUNDA (1984), URQUHART *et al.* (1987) y MEHLHORN & WALLDORF (1988), ya que fueron más elevados que los nuestros, y los de ROCHE (1948) y DESOWITZ (1980) que fueron inferiores.

El período medio de prepatencia de la dicroceliosis obtenido en los corderos infectados por nosotros fue, en general, superior al observado en distintas especies de hospedadores por los diversos autores que se recogen en los Cuadros 2 y 5. No obstante, nuestro resultado se incluye dentro del rango señalado por AKBAEV (1970) en cordero y por CAMPO *et al.* (1994) en criceto, mientras que fue inferior al mencionado por GRIGORYAN & AKOPYAN (1960) en cordero y en conejo, y por TARRY (1969) en oveja. Sin embargo, el valor más bajo del rango observado por nosotros fue similar al hallado por la mayoría de los autores.

Por otra parte, no detectamos diferencias en cuanto al período de prepatencia, entre los dos grupos de corderos infectados con distinta dosis, ni entre los animales con diferente carga, hecho este último también señalado por CHANDRA (1973), TARRY (1969) y SALIMOV (1972e).

A pesar de haber recogido vermes maduros en tres corderos sacrificados a los 2 meses p.i., nunca pudimos observar huevos en sus heces. Esto nos hace pensar que, aunque se produjera la eliminación de huevos, el número sería tan bajo que no permitiría su detección por las técnicas coprológicas habituales, lo que concuerda con lo señalado por GRIGORYAN & AKOPYAN (1960).

En la revisión bibliográfica no hemos podido encontrar trabajos en los que se siguiera, en todo el período p.i., la eliminación de huevos de *D. dendriticum* en las heces de animales infectados experimentalmente, por lo que solo podremos comparar algunos de nuestros resultados con los obtenidos por varios autores en distintas especies de hospedadores.

Los números medios de huevos por gramo obtenidos por nosotros en los corderos infectados con 1.000 metacercarias de *D. dendriticum* (x 194,82 hpg) y en los probados con 3.000 (x 347,25) fueron muy superiores a los observados por TARRY (1969) en ovejas infectadas con 1.200 (x 39,0) y 906 metacercarias (x 12,7); sin embargo fueron, en general,

muy inferiores a los hallados por dicho autor en 9 cricetos infectados con dosis de 50 a 242 metacercarias (x 962,66 hpg), a excepción de lo observado en un criceto infectado con 50 metacercarias (x 141 hpg).

Los valores del mínimo (33,33) y máximo (2.066,46) de hpg obtenidos por nosotros entre los días 90 y 135 p.i., en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, fueron superiores a los hallados por HOHORST & LÄMMLER (1962), entre los días 90-131 p.i. (15-450 hpg), en ovejas infectadas con la misma dosis.

Sin embargo, los valores extremos hallados por nosotros a los 90-105 días, en los corderos infectados con 1.000 metacercarias (33,33-366,63 hpg) fueron inferiores a los obtenidos en conejos infectados con esta misma dosis por HOHORST & LÄMMLER (1962), entre los días 89 y 103 p.i. (160-960 hpg)

Por otra parte, la máxima eliminación de huevos en nuestros corderos se produjo a los 180 días, mientras que en 9 cricetos infectados por HOHORST & LÄMMLER (1962) con 15 metacercarias, el punto álgido en el número de hpg eliminado por todos los animales se alcanzó, aproximadamente, el día 80 p.i., fecha a partir de la cual se inició el descenso, de forma que después de 120 días sólo eliminaron huevos del parásito 5 de los 9 animales.

4.2.4.- VERMES DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* RECUPERADOS DE HÍGADO Y VESÍCULA BILIAR

Los 24 corderos probados (excepto uno que murió a los 58 días p.i. y no pudimos examinarlo) contenían vermes (Fig. 2 de Lámina III) en el hígado cuando fueron sacrificados, incluso aquellos en los que no se habían detectado huevos de *D. dendriticum* en las heces antes de su sacrificio a los 2 meses. Además, 7 de ellos albergaban vermes en la vesícula biliar.

El número de vermes recuperado del hígado de cada animal infectado osciló entre 30 y 2.044 (x 342,30 \pm 81,67), mientras que el recolectado de la vesícula biliar varió entre 1 y 30 vermes (x 14 \pm 3,46). No se observó relación entre el número de parásitos recuperados de sendos órganos. El total de vermes obtenidos en cada cordero osciló entre 30 y 2.063 (x 346,56 \pm 80,55).

Los 24 animales de los que se extrajeron parásitos se distribuyeron, de acuerdo con la carga parasitaria, en los siguientes grupos: A/ 4 corderos con < 100 vermes; B/ 4 con 101 a 200; C/ 5 con 201 a 300; D/ 4 con 301 a 400; E/ 5 con 401 a 600; y F/ 1 con 2.063.

La media de parásitos recuperados de los corderos infectados con 3.000 metacercarias (489,27 \pm 163,11) fue más elevada que la obtenida de los probados con 1.000 (215,75 \pm 41,37), aunque, en algunos casos, se recolectaron más vermes de los corderos infectados con esta última dosis (Cuadro 77).

FECHA SACRIFICIO	N° VERMES / CORDERO INFECTADO		
	CORDEROS	CON DOSIS 1.000	CON DOSIS 3.000
2 MESES		30	139
		70	251
		72	293
		139	341
		169	570
		252	—
6 MESES		68	110
		292	282
		313	360
		327	478
		420	495
		437	2.063

Cuadro 77.- Número de vermes recuperado de cada cordero infectado con 1.000 ó 3.000 metacercarias y sacrificado a los 2 ó a los 6 meses p.i.

Al considerar los animales en conjunto, el n° medio de vermes recuperado de los corderos sacrificados a los 6 meses p.i. ($470,41 \pm 149,68$) fue superior al de los matados a los 2 meses ($211,45 \pm 46,69$). Asimismo, los valores medios de parásitos recogidos en los 2 grupos de corderos sacrificados a los 6 meses e infectados con dosis de 1.000 y 3.000 metacercarias ($309,50 \pm 53,97$ y $631,33 \pm 292,07$, respectivamente) fueron superiores a los de los otros 2 grupos probados con dichas dosis y matados a los 2 meses ($122,0 \pm 33,19$ y $318,80 \pm 771,12$, respectivamente). Sin embargo, en algunos corderos sacrificados a los 2 meses p.i. se recolectaron más ejemplares que en los sacrificados a los 6 (Cuadro 77 y Fig. 7).

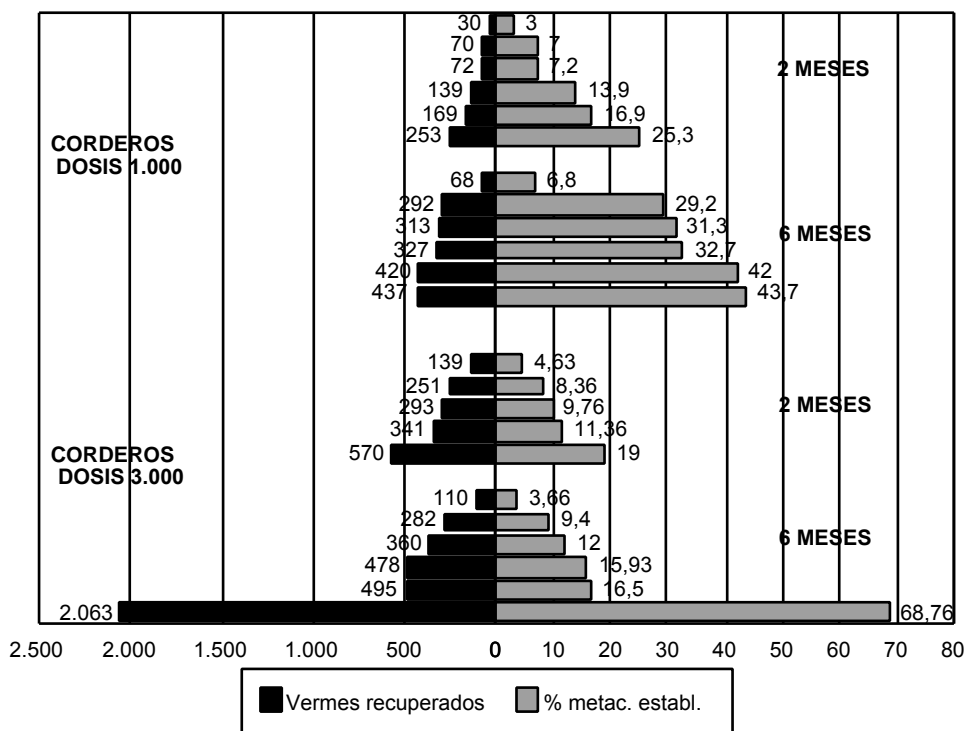


Figura 7.- Vermes de *D. dendriticum* recuperados y porcentaje de metacercarias establecidas en el hígado de cada cordero.

El porcentaje de metacercarias que llegaron a establecerse como vermes en el total de los corderos infectados fue 19,05%. En la Fig. 7 se representa dicho valor para cada uno de los corderos infectados. En general, se obtuvo un porcentaje más elevado de vermes en los animales probados con la dosis de 1.000 (21,57%) que en los infectados con la de 3.000 (16,30%), tanto en los sacrificados a los 2 meses p.i. (12,20% y 10,62%, respectivamente) como en los matados a los 6 (30,95% y 21,04%, respectivamente). Asimismo, dicho porcentaje fue superior en el total de los animales sacrificados a los 6 meses (25,99%) que en los matados a los 2 (11,49%).

Según nuestras observaciones el porcentaje de establecimiento de las metacercarias fue, en general, más elevado en aquellos corderos infectados con quistes procedentes de hormigas recolectadas en fase de tetania en el campo y mantenidas vivas entre 10 y 19 días en el laboratorio, que cuando permanecieron en el mismo un período inferior o superior al citado. Esto podría explicar el que los porcentajes más elevados de metacercarias que se transformaron en adultos correspondieron a los corderos sacrificados a los 6 meses, ya que habían sido infectados con 1.000 metacercarias (Fig. 7) obtenidas de hormigas mantenidas entre 10 y 19 días en el laboratorio, excepto en un caso en el que las metacercarias procedían de hormigas sacrificadas el mismo día de su recolección (6,8%)

Mediante la prueba "t" de Student, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de vermes recuperado de los corderos infectados con 1.000 y de los infectados con 3.000 metacercarias ($t = 2,25$; $p = 0,05$; g.l. = 21).

De la misma forma, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número de vermes recuperado de los corderos sacrificados a los 2 meses, entre los infectados con 1.000 y con 3.000 metacercarias ($t = 2,67$; $p = 0,05$; g.l. = 9), pero no se observaron entre los probados con cada una de las dosis y sacrificados a los 6 meses p.i. Sin embargo, sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de vermes recuperado de los corderos sacrificados a los 2 y a los 6 meses p.i. ($t = 2,11$; $p = 0,05$; g.l. = 21).

DISCUSIÓN

El que no todas las metacercarias administradas por nosotros se recuperaran como vermes adultos de *D. dendriticum* (19,05%) puede ser debido, entre otras razones, a que algunas metacercarias obtenidas de hormigas halladas en fase de tetania en el campo, pudieran ya estar envejecidas o no ser todavía infectantes. Esto último fue también argumentado por FRANK *et al.* (1984) para explicar este hecho en el caso de *D. hospes*. Además, una parte de las metacercarias que no se establecieron podría haber sido expulsada con las heces como quistes o larvas libres, tal como señalaron HOHORST & LÄMMLER (1962). Asimismo, es posible que algunos vermes que si se establecieron en el hígado no se recuperaran, principalmente los inmaduros, debido a la dificultad en visualizarlos dentro de los conductos biliares. Por otra parte, no podemos olvidar la influencia y reacción individual de los corderos frente al parásito. KRULL & MAPES (1953b) y MALEK (1980b) señalaron que solo un número muy reducido de metacercarias tiene éxito en su establecimiento en el hospedador definitivo, aunque no explicaron las causas que lo producían.

La presencia de vermes en la vesícula (de 10 a 60) y la proporción variable entre los hallados en el hígado y en dicho órgano también fueron observadas por MASSOUD (1981), en ovejas infectadas en la naturaleza.

Seguidamente compararemos nuestros resultados con los obtenidos en ganado ovino por algunos autores de los que se recogen en el Cuadro 2.

Al considerar la totalidad de los corderos estudiados por nosotros, el porcentaje de metacercarias que evolucionaron hasta adultos (19,05%) fue similar al obtenido por WOLFF *et al.* (1984) y superior al hallado por KRULL & MAPES (1953b) en corderos y KALKAN (1976) en ovejas. Sin embargo, dicho valor fue inferior al señalado por SALIMOV (1972d, e), CHANDRA (1973) y MALEK (1980b) en corderos y por VOGEL & FALCAO (1954) y HOHORST & LÄMMLER (1962) en ovejas.

Si tenemos en cuenta únicamente la dosis infectante, el porcentaje de vermes que se establecieron en los corderos infectados con 1.000 metacercarias (21,57%) fue muy superior al hallado por KRULL & MAPES (1953b), en corderos infectados con 1.968 ejemplares, y por KALKAN (1976), en ovejas a las que administró 645 metacercarias. Sin embargo, nuestro valor fue inferior al obtenido por WOLFF *et al.* (1984) en corderos probados con 1.500 metacercarias. Por otra parte, el porcentaje de vermes obtenido por nosotros en los

corderos infectados con 3.000 (16,30%) fue similar al observado por WOLFF *et al.* (1984), en corderos infectados con esta misma dosis, mientras que fue inferior al encontrado por HOHORST & LÄMMLER (1962) en ovejas probadas con 3.905.

Al comparar el porcentaje de parásitos recuperados, sobre la dosis administrada, de acuerdo con la época de sacrificio de los animales, el valor de dicho parámetro en los animales sacrificados por nosotros a los 2 meses (11,49%) fue similar al hallado por KRULL & MAPES (1953b) en corderos, 43 días después de su infección experimental, y se situó dentro del rango señalado por CHANDRA (1973) en corderos sacrificados a los 60 días p.i., y por WOLFF *et al.* (1984) en los matados a los 70 días. Sin embargo, nuestro porcentaje fue inferior al encontrado por WOLFF *et al.* (1984) en corderos sacrificados a los 54 días p.i. Por otra parte, el valor obtenido por nosotros en los corderos sacrificados a los 6 meses p.i. (25,99%) fue superior al hallado por KALKAN (1976) y por HOHORST & LÄMMLER (1962), en ovejas infectadas experimentalmente y sacrificadas a los 270 días p.i.

De acuerdo con nuestros resultados, el porcentaje de vermes recuperados al sacrificio de los corderos aumenta, en general, al incrementarse los días post-infección, lo que concuerda con lo observado por CHANDRA (1973) y WOLFF *et al.* (1984) en corderos sacrificados entre los días 15 y 90 p.i. Este hecho no parece lógico, si tenemos en cuenta que la mayor parte de los autores mencionados en el apartado 2.3.2. señalan, que sólo son necesarias unas horas (hasta 24) para que los parásitos lleguen a los conductos biliares de distintas especies de hospedadores.

4.2.4.1.- Tamaño y grado de maduración de los vermes

El tamaño de los vermes recuperados del total de los corderos infectados osciló entre 2,60 y 7,10 mm ($x = 5,19 \pm 0,11$) de longitud y entre 0,90 y 2,50 mm ($x = 1,71 \pm 0,03$) de anchura. Por otra parte, el tamaño de los recuperados de los corderos sacrificados a los 2 meses p.i. fue, en general, inferior al de los obtenidos de los sacrificados a los 6 (Cuadro 78).

ÉPOCA DE SACRIFICIO DE LOS CORDEROS	MEDIDAS DE LOS VERMES DE <i>DICROCOELIUM DENDRITICUM</i>			
	Longitud (mm)		Anchura (mm)	
	$x \pm E.S.$	Rango	$x \pm E.S.$	Rango
2 MESES	$3,72 \pm 0,16$	2,65-4,53	$1,45 \pm 0,06$	1,09-1,87
6 MESES	$5,64 \pm 0,09$	4,21-7,18	$1,82 \pm 0,04$	0,93-2,50

Cuadro 78.- Tamaño de los vermes recuperados de los corderos sacrificados en distintas épocas.

Mediante el test "t" de Student, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de longitud ($t = 4,77$; $p = 0,05$; g.l. = 8) y entre los de anchura ($t = 3,73$; $p = 0,05$; g.l. = 8) de los vermes recuperados de los corderos sacrificados a los 2 y a los 6 meses p.i.

En nuestra experiencia hemos considerado los huevos de color oscuro como maduros y los de color claro como inmaduros. Los vermes con predominio de huevos maduros fueron más abundantes en los corderos sacrificados a los 6 meses que en los matados a los 2 meses, mientras que la proporción de vermes con huevos maduros e inmaduros fue similar para ambos grupos (Cuadro 79). Sin embargo, el porcentaje de vermes con huevos inmaduros fue más bajo en los sacrificados a los 6 meses p.i. que en los matados a los 2.

Los vermes incluidos dentro de las categorías 3 y 2, que a nuestro juicio son los más maduros, eran de tamaño similar ($x = 5,35 \pm 0,15$; $5,40 \pm 0,12$ mm de longitud) pero superior a los de la categoría 1 ($x = 4,01 \pm 0,23$ mm de longitud).

ÉPOCA DE SACRIFICIO DE LOS CORDEROS	% DE VERMES CON DISTINTO GRADO DE MADURACIÓN DE HUEVOS		
	Categoría 1 ^a	Categoría 2 ^a	Categoría 3 ^a
2 MESES	38,46	46,15	15,38
6 MESES	3,03	46,96	50,00

Cuadro 79.- Grado de maduración de los vermes recuperados en distintas épocas de sacrificio. Categorías de vermes: 1^a/ con predominio de huevos inmaduros, 2^a/ con igual proporción de huevos maduros e inmaduros y 3^a/ con predominio de huevos maduros.

DISCUSIÓN

Al comparar el tamaño de los vermes de *D. dendriticum* procedentes de nuestros corderos con el observado por diversos autores en diferentes especies de hospedadores (Cuadro 6), el valor medio de la longitud obtenido por nosotros a los 2 y 6 meses p.i. fue, en términos generales, inferior a los valores del rango señalado por dichos autores. No obstante, la longitud media de los vermes hallados por nosotros está incluida entre los valores extremos dados por FROMUNDA *et al.* (1973) en ovejas, SALIMOV (1972b) en terneros y FRIGATO (1961) en liebres. Sin embargo, se sitúa por encima del rango señalado por PARASCHIVESCU (1981b) para corderos, KRULL (1956) para ratones y ROCHE (1948) para el hombre.

La longitud de los vermes recuperados por nosotros a los 60 días p.i. fue ligeramente inferior a la señalada por PARASCHIVESCU (1981b), para vermes obtenidos de corderos a los 37 días p.i. Dicha diferencia se incrementó al considerar la longitud de los vermes recuperados por nosotros a los 180 días p.i. y por dicho autor a los 161.

En lo que se refiere a la anchura, el valor medio obtenido por nosotros está dentro del rango mencionado para distintas especies por la mayor parte de los autores que se citan en el Cuadro 6, aunque en algunos casos se sitúa por debajo.

Por otra parte, nuestras observaciones sobre el grado de maduración de los parásitos y el tamaño de los mismos parecen concordar con las de KRULL (1956), quien señaló que los vermes maduros son los de mayor tamaño y los que contienen huevos de color oscuro.

De acuerdo con nuestros resultados, al menos a los 49 días p.i. algunos vermes albergaban huevos maduros, puesto que en dicha fecha fueron detectados en las heces eliminadas por uno de los corderos. Esto coincide con lo obtenido por KRULL & MAPES (1953b), quienes observaron que la mayor parte de los 165 vermes recuperados de corderos a los 43 días p.i. eran pequeños pero maduros y contenían masas de huevos de color oscuro. Asimismo, WOLFF *et al.* (1984) detectaron la presencia de huevos maduros en vermes recuperados de corderos a los 50 p.i.

4.2.4.2.- Estudio isoenzimático de los vermes

En la interpretación de los resultados obtenidos, mediante isoelectroenfoque, de los análisis individualizados de vermes adultos de *D. dendriticum* procedentes de ganado ovino infectado natural ó experimentalmente, se tuvieron en cuenta todas las bandas de actividad enzimática observadas pero diferenciándolas en: fuertes (■), débiles (■) y muy débiles (□).

La actividad de **LDH** (Fig. 1 de Lámina IV) en la totalidad de vermes adultos de *D. dendriticum* analizados se observó en un rango de pH de 6,30 a 7,13. Se hallaron 5 tipos enzimáticos (Fig. 8), designados como LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5.

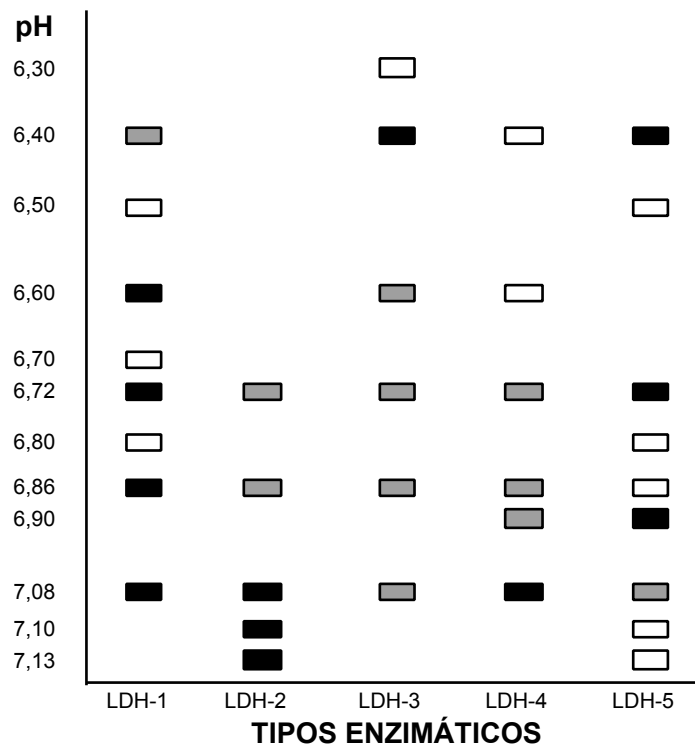


Figura 8.- Diagrama de los tipos enzimáticos de LDH encontrados en los adultos de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (■) y muy débiles (□).

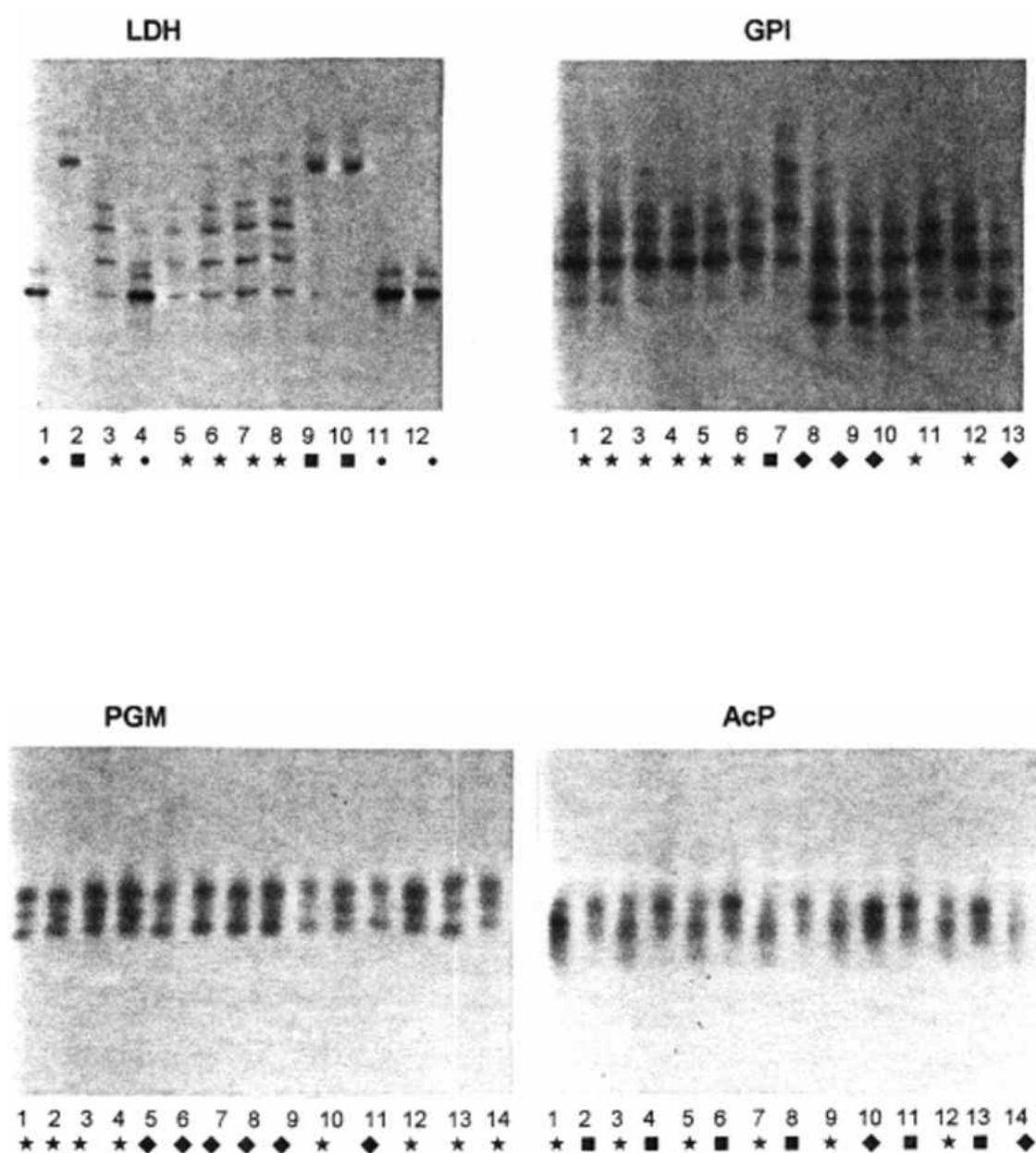


Figura 1.- Ejemplos de patrones enzimáticos obtenidos en vermes adultos de *D. dendriticum*. Cada número corresponde a una muestra de distintos parásitos. **LDH:** • LDH-4; ■ LDH-3; ★LDH-1 / **GPI:** ★ GPI-1; ■ GPI-3; ◆ GPI-2 / **PGM:** ★PGM-3; ◆ PGM-4 / **AcP:** ★ AcP-1; ■ AcP-3; ◆ AcP-2.

Al analizar los ejemplares de *D. dendriticum* recuperados de ganado ovino infectado naturalmente, el modelo hallado con mayor frecuencia fue LDH-1 (39,50%), seguido de LDH-3 (41,97%), LDH-4 (16,66%), LDH-5 (1,23%) y LDH-2 (0,61%).

Mediante el índice de frecuencia corregida (Cuadro 80), se observó una relación positiva entre los siguientes tipos enzimáticos detectados en los parásitos y las localidades de procedencia de los animales que albergaban dichos parásitos: LDH-1 y Benavente, Redipollos; LDH-2 y Santa Olaja de la Ribera; LDH-3 y León, Toledo; LDH-4 y Ambasaguas de Curueño, Ribaseca, Santa Olaja de la Ribera; y LDH-5 y esta última localidad.

PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>				
	LDH - 1	LDH - 2	LDH - 3	LDH - 4	LDH - 5
Ambasaguas de Curueño	1,01**	0*	0,28*	2,90***	0*
Benavente	1,98***	0*	0,15*	1,16**	0*
León	0,98**	0*	1,34***	0,26*	0*
Redipollos	1,46***	0*	0,75*	0,72*	0*
Ribaseca	0*	0*	0,75*	3,87***	0*
Santa Olaja de la Ribera	0,66*	2,98***	1,03**	1,42***	2,96***
Toledo	0,84**	0*	1,49***	0,18*	0*

Cuadro 80.- Frecuencias corregidas para LDH, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

De forma similar, se detectó una relación positiva muy fuerte entre LDH-5 y la raza Assaf x Churra, y una relación positiva más débil entre: LDH-1 y las razas Awassi, Awassi x Churra, Manchega x Churra; LDH-2 y la raza Churra; LDH-3 y las razas Assaf, Manchega; y LDH-4 y las razas Awassi, Assaf x Churra, Manchega x Churra (Cuadro 81).

RAZAS DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>				
	LDH - 1	LDH - 2	LDH - 3	LDH - 4	LDH - 5
Assaf	0,87**	0*	1,30***	0,53*	0*
Awassi	1,34***	0*	0,56*	1,63***	0*
Churra	0,98**	3,47***	0,99**	1,04**	0*
Manchega	0*	0*	2,13***	0*	0*
Assaf x Churra	0,31*	0*	0,47*	2,72***	15,75***
Awassi x Churra	2,61***	0*	0*	0,55*	0*
Manchega x Churra	1,25***	0*	0,74*	1,33***	0*

Cuadro 81.- Frecuencias corregidas para LDH, con respecto a la raza del hospedador * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

Por otra parte, al examinar los ejemplares de *D. dendriticum* recuperados de los corderos infectados experimentalmente, el modelo más frecuente fue LDH-1 (54,69%), seguido de LDH-3 (27,69%), LDH-4 (13,84%), LDH-5 (3,28%) y LDH-2 (0,46%).

Cuando se analizó el tejido hepático de los corderos testigos, se observó una banda de actividad de LDH situada a pH 6,2.

Al estudiar la actividad de **GPI** (Fig. 1 de Lámina IV) en los adultos de *D. dendriticum* procedentes de ganado ovino, infectado natural o experimentalmente, se hallaron 3 ó 4 tipos enzimáticos, respectivamente, designados como GPI-1, GPI-2, GPI-3 y GPI-4. Las bandas de actividad se observaron en un rango de pH de 6,13 a 6,80 (Fig. 9). Cuando se analizaron los ejemplares de *D. dendriticum* recuperados de ganado ovino infectado naturalmente, el modelo más frecuente fue GPI-1 (57,40%), seguido de GPI-2 (41,66%) y GPI-3 (0,92%).

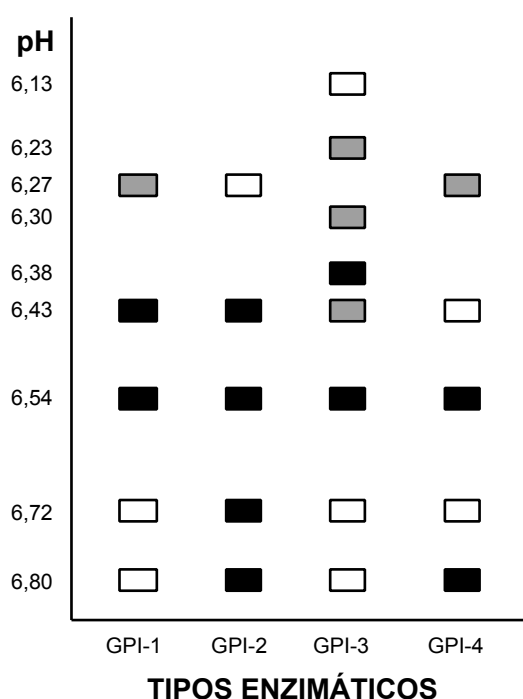


Figura 9.- Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI encontrados en los adultos de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (▒) y muy débiles (□).

Mediante el índice de frecuencia corregida (Cuadro 82), se detectó una relación positiva muy fuerte entre el tipo enzimático GPI-3 y los parásitos procedentes de animales de Ribaseca. Además, se observó una relación positiva más débil entre: GPI-1 y los de León y Palazuelo de Torío; GPI-2 y los de Benavente, Redipollos y Ribaseca.

PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>		
	GPI - 1	GPI - 2	GPI - 3
Ambasaguas de Curueño	1,11**	0,79*	0*
Benavente	0,83**	1,38***	0*
León	1,40***	0,16*	0*
Palazuelo de Torío	1,48***	0*	0*
Redipollos	0*	3,27***	0*
Ribaseca	0,49*	1,58***	15,42***
Santa Olaja de la Ribera	1,08**	0,85**	0*
Toledo	1,15**	0,70*	0*

Cuadro 82. - Frecuencias corregidas para GPI, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador.
* Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

Asimismo, se observó una relación positiva entre: GPI-1 y las razas Assaf, Awassi x Churra; GPI-2 y las razas Castellana, Manchega x Churra; y GPI-3 y la raza Churra (Cuadro 83).

RAZAS DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>		
	GPI - 1	GPI - 2	GPI - 3
Assaf	1,45***	0*	0*
Awassi	1,14**	0,70*	0*
Castellana	0*	3,33***	0*
Churra	0,99**	0,97**	2,18***
Manchega	1,01**	1,00**	0*
Assaf x Churra	0,96**	1,11**	0*
Awassi x Churra	1,45***	0*	0*
Manchega x Churra	0*	3,33***	0*

Cuadro 83. - Frecuencias corregidas para GPI, con respecto a la raza del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

Por otra parte, al examinar los ejemplares de *D. dendriticum* procedentes de los corderos infectados de forma experimental, el modelo más frecuente fue GPI-1 (65,56%), seguido de GPI-2 (32,78%), GPI-3 (1,41%) y GPI-4 (0,23%).

En el tejido hepático de los corderos testigos se detectaron 3 bandas de actividad GPI, situadas en un rango de pH de 6,89 a 6,98.

Al estudiar la actividad de **PGM** sobre ejemplares de *D. dendriticum* procedentes de ovejas infectadas en la naturaleza, se observaron los tipos enzimáticos PGM-1, PGM-2, PGM-3 y PGM-4 (Fig. 1 de Lámina IV), con bandas de actividad entre pH 6,20-6,60 (Fig. 10). El modelo más frecuente fue PGM-3 (38,46%), seguido de PGM-4 (28,84%), PGM-1 (17,30%) y PGM-2 (15,38%).

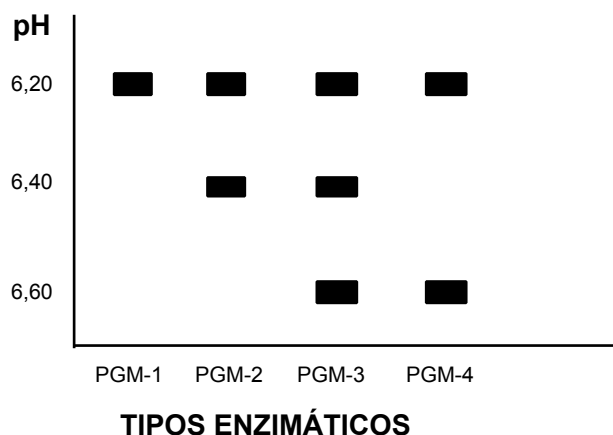


Figura 10.- Diagrama de los tipos enzimáticos de PGM encontrados en los adultos de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (▒) y muy débiles (□).

Mediante el índice de frecuencia corregida (Cuadro 84), se observó una relación positiva entre los siguientes tipos enzimáticos detectados en los parásitos y las localidades de procedencia de los animales que albergaban dichos parásitos: PGM-1 y Ambasaguas de Curueño, Benavente y Santa Olaja de la Ribera; PGM-2 y Ambasaguas de Curueño, Benavente y Redipollos; PGM-3 y Todelo; y PGM-4 y esta última localidad.

PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>			
	PGM - 1	PGM - 2	PGM - 3	PGM - 4
Ambasaguas de Curueño	3,85***	2,16***	0*	0*
Benavente	3,85***	2,16***	0*	0*
Redipollos	0*	4,33***	0,86**	0*
Santa Olaja de la Ribera	3,21***	2,81**	0*	0*
Toledo	0*	0*	1,45***	1,52***

Cuadro 84. - Frecuencias corregidas para PGM, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

De forma similar, se detectó una relación positiva entre: PGM-1 y las razas Awassi, Churra, Assaf x Churra; PGM-2 y las razas Awassi, Churra, Assaf x Churra, Manchega x Churra; PGM-3 y Manchega; y PGM-4 y esta última raza (Cuadro 85).

RAZAS DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>			
	PGM - 1	PGM - 2	PGM - 3	PGM - 4
Awassi	4,12***	1,85***	0*	0*
Churra	2,31***	3,90***	0*	0*
Manchega	0*	0*	1,45***	1,52***
Assaf x Churra	3,85***	2,16***	0*	0*
Manchega x Churra	0*	4,33***	0,86**	0*

Cuadro 85. - Frecuencias corregidas para PGM, con respecto a la raza del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

Cuando se analizó el tejido hepático de los corderos testigos, se observaron 3 bandas de actividad, situadas en un rango de pH de 6,80 a 7,47.

La actividad de **AcP** (Fig. 1 de Lámina IV) en vermes adultos de *D. dendriticum*, recolectados de ovejas infectadas naturalmente, se detectó a pH 5,70-5,92. Se observaron 3 tipos enzimáticos (Fig. 11) designados como AcP-1, AcP-2 y AcP-3. El modelo más frecuente fue AcP-2 (47,05%), seguido de AcP-3 (33,33%) y AcP-1 (19,60%).

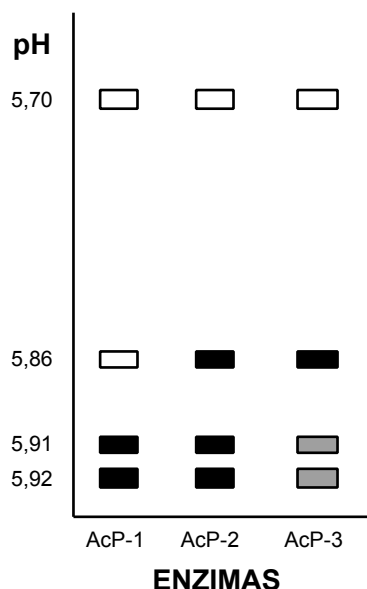


Figura 11.- Diagrama de los tipos enzimáticos de AcP encontrados en los adultos de *D. dendriticum*. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (▒) y muy débiles (□).

Mediante el índice de frecuencia corregida (Cuadro 86), se observó una relación positiva entre los siguientes tipos enzimáticos detectados en los parásitos y las localidades de procedencia de los animales que albergaban dichos parásitos: AcP-1 y Ribaseca, Redipollos; y AcP-3 y Benavente, Ribaseca, Santa Olaja de la Ribera.

PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>		
	AcP - 1	AcP- 2	AcP - 3
Benavente	0*	1,06**	1,50***
Redipollos	2,55***	0,53*	0,75*
Ribaseca	2,55***	0*	1,50***
Santa Olaja de la Ribera	0,85**	0,35*	2***
Toledo	0,82**	1,20**	0,81**

Cuadro 86. - Frecuencias corregidas para AcP, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

Asimismo, se obtuvo una relación positiva entre AcP-1 y la raza Manchega x Churra; AcP-2 y la raza Churra; y AcP-3 y la raza Assaf x Churra (Cuadro 87).

RAZAS DE LOS ANIMALES PARASITADOS	TIPOS ENZIMÁTICOS HALLADOS EN <i>D. DENDRITICUM</i>		
	AcP - 1	AcP- 2	AcP - 3
Awassi	1,02**	0,85**	1,20**
Churra	0*	2,12***	0*
Manchega	0,87**	1,15**	0,85**
Assaf x Churra	0*	0*	3,00***
Manchega x Churra	2,55***	0,35*	1**

Cuadro 87. - Frecuencias corregidas para AcP, con respecto a la raza del hospedador. * Relación de rechazo; ** Relación incipiente; *** Relación positiva.

La enzima **MDH**, que únicamente se estudió en ejemplares de *D. dendriticum* procedentes de ovejas infectadas naturalmente, mostró actividad entre pH 4,8 y 6,2. Dicha actividad fue débil y difusa y no permitió una interpretación detallada de la misma.

No se observó actividad enzimática de **-GPDH** y de **HBDH** en los parásitos estudiados procedentes de ovejas infectadas naturalmente, aunque hay que tener en cuenta que para el estudio de la primera enzima mencionada se examinó un número escaso de ejemplares de *D. dendriticum*.

En el tejido hepático de los corderos testigos se observaron 3 bandas de actividad de -GPDH situadas entre pH 7,10 y 7,35.

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se observó actividad de las enzimas LDH, GPI, PGM, AcP y MDH, pero no de la -GPDH y HBDH, en los vermes adultos de *D. dendriticum* de ganado ovino analizados. La actividad de LDH, MDH y AcP ya había sido detectada en adultos del parásito procedentes de distintas especies de hospedadores, mediante electroforesis horizontal en gel de poliacrilamida, por LEÓN *et al.* (1986, 1988, 1989, respectivamente).

En nuestro estudio las enzimas LDH, GPI, PGM y AcP fueron polimórficas. La actividad de MDH, que se estudió en un número escaso de parásitos, fue débil y difusa, por lo que no se pudieron establecer modelos enzimáticos.

El número de bandas detectado por nosotros, en los 5 modelos de LDH observados, varió entre 9 en LDH-5 y 5 en LDH-2. Este último número de bandas coincidió con el señalado por LEÓN *et al.* (1986), en el único modelo observado por ellos en *D. dendriticum* procedente de ovejas.

A pesar de que nosotros detectamos 4 bandas de actividad de AcP, la intensidad de una de ellas siempre fue muy débil, por lo que nuestros resultados parecen concordar con los de LEÓN *et al.* (1989), quienes observaron únicamente 3 bandas isoenzimáticas en vermes recolectados de oveja y cabra.

Como ya comentamos con anterioridad, no pudimos distinguir bandas de actividad de MDH, aunque LEÓN *et al.* (1988) sí habían detectado 2 bandas en *D. dendriticum* procedente de oveja y cabra.

Al comparar la actividad de los sistemas enzimáticos: LDH, GPI, PGM, AcP, MDH y -GPDH estudiados por nosotros en *D. dendriticum*, con la que muestran en otras especies de Digenea, al utilizar la misma técnica, podemos decir que, de acuerdo con CAMPO *et al.* (1993) LDH no presenta actividad en adultos de *Fasciola hepatica* procedentes de oveja y vaca, pero sí -GPDH, hecho contrario a lo que ocurre en *D. dendriticum*. Además, dichos autores detectaron actividad de GPI, PGM y AcP en *F. hepatica*.

Por otra parte, SOUTHGATE *et al.* (1985a) observaron actividad de LDH, GPI, PGM, AcP y MDH en vermes de *Schistosoma bovis*, *Schistosoma curassoni* y *Schistosoma haematobium* procedentes de ovejas y vacas infectadas en la naturaleza y cricetos infectados experimentalmente. Asimismo, ROSS (1976) detectó actividad de LDH, AcP y MDH en adultos de *Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma margrebowiei* y *Schistosoma mattheei* obtenidos de cricetos infectados experimentalmente.

En nuestros estudios encontramos, a veces, variación en los tipos enzimáticos de LDH, GPI, PGM y AcP en los vermes procedentes del mismo animal. Además, parece que existe cierta relación entre algunos tipos enzimáticos detectados en los adultos de *D. dendriticum*, la raza de los animales de los que dichos parásitos proceden, y el lugar de origen de los mismos. En este sentido, ROSS *et al.* (1978) encontraron diferencias significativas en el sistema de

AcP entre cepas de *Schistosoma bovis* de Kenia y otras de la región mediterránea, y WRIGHT *et al.* (1979b) observaron diferencias en la actividad de LDH y PGM entre cepas de *Schistosoma intercalatum* de Zaire y Baja Guinea.

De los sistemas enzimáticos estudiados, parece que LDH, GPI y PGM son los mejores para caracterizar, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, los adultos de *D. dendriticum*, tanto por la nitidez de sus bandas de actividad, como por la situación de éstas en un rango de pH distinto a las del tejido hepático de los corderos testigos. Esto último ayudaría a diferenciar la actividad del parásito y la del hígado, tal como señalaron LEÓN *et al.* (1986) para LDH. Además, el grado de variabilidad observado al estudiar la actividad de LDH y GPI sirve para detectar variaciones intraespecíficas en *D. dendriticum* y, posiblemente, interespecíficas. LDH es, según ROSS (1976), el mejor sistema para diferenciar a nivel específico e intraespecífico las especies *Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma margrebowiei* y *Schistosoma mattheei*. En este sentido, SOUTHGATE *et al.* (1985a) señalaron que, entre los sistemas enzimáticos por ellos estudiados, GPI permitió establecer diferencias entre *Schistosoma bovis* y *Schistosoma curassoni*, así como entre las dos últimas especies mencionadas, y LDH diferenció *Schistosoma haematobium* y *Schistosoma curassoni*, al tiempo que permitió observar variaciones intraespecíficas en *Schistosoma bovis*.

Por otra parte, los resultados obtenidos al comparar los modelos isoenzimáticos de los adultos con los de las fases larvarias, aisladas de moluscos y hormigas, se discutirán en el apartado 4.3.3.

4.2.5.- RELACIÓN ENTRE ELIMINACIÓN DE HUEVOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* CON LAS HECES Y CARGA PARASITARIA

El número de huevos eliminados, en la mañana y en la tarde, por los corderos de los seis grupos establecidos de acuerdo con el número de vermes recuperados, se incrementó al mismo tiempo que la carga parasitaria (Cuadro 88, Fig. 12). Esta misma tendencia se observó, en términos generales, al considerar cada uno de los animales por separado, como se puede apreciar en la Fig. 13 (en dicha gráfica no aparecen datos de hpg en algunos corderos infectados con 1.000 metacercarias, por haber sido sacrificados antes de que se detectaran huevos en las heces y, además, en los probados con 3.000 faltan todos los datos del cordero que se murió).

GRUPOS DE CORDEROS POR CARGA PARASITARIA	HPG ELIMINADOS POR LOS CORDEROS INFECTADOS					
	HPG (MAÑANA)		HPG (TARDE)		HPG (MAÑANA + TARDE)	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
< 100 *	83,26 ± 25,44	33,33 - 199,98	116,60 ± 50,00	66,66 - 166,65	91,60 ± 21,58	33,33 - 199,98
101 - 200 *	93,29 ± 30,95	33,33 - 333,30	66,62 ± 23,57	33,33 - 133,32	84,40 ± 21,29	33,33 - 333,30
201 - 300 *	142,29 ± 23,07	33,33 - 416,60	228,11 ± 56,07	66,66 - 799,70	172,44 ± 25,20	33,33 - 799,70
301 - 400 *	165,98 ± 21,17	33,33 - 399,96	234,25 ± 33,63	33,33 - 666,60	196,63 ± 19,49	33,33 - 666,60
401 - 600 *	224,49 ± 26,90	33,33 - 666,60	305,15 ± 42,53	33,33 - 1.166,55	259,26 ± 24,54	33,33 - 1.166,55
2.063 *	645,36 ± 135,22	66,66 - 1.566,51	1.408,15 ± 221,16	266,64 - 2.266,44	966,53 ± 147,54	66,66 - 2.266,44

Cuadro 88.- Valores de hpg eliminados por los corderos en la mañana, en la tarde y en ambos casos, de acuerdo con los vermes (*) recuperados al sacrificio.

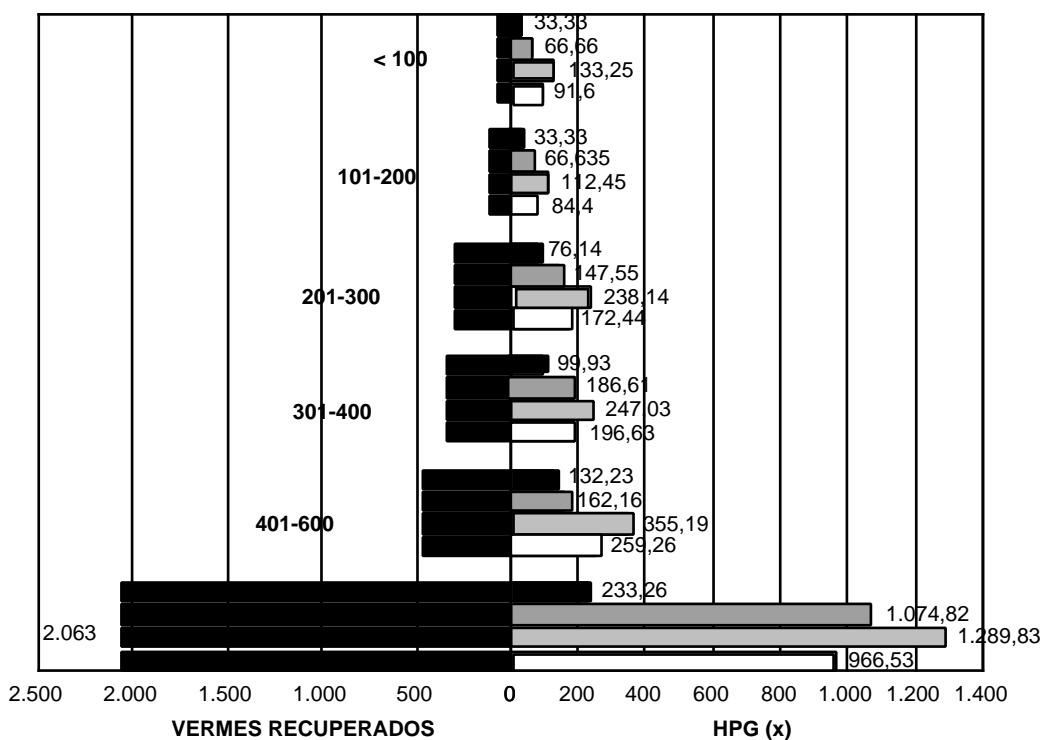


Figura 12.- Vermes recuperados de los animales sacrificados a los 6 meses p.i., en relación con el n° de hpg (x) eliminado a lo largo de todo el experimento (□), y durante los días p.i. 49-79 (■), 80-119 (■) y 120-180 (□).

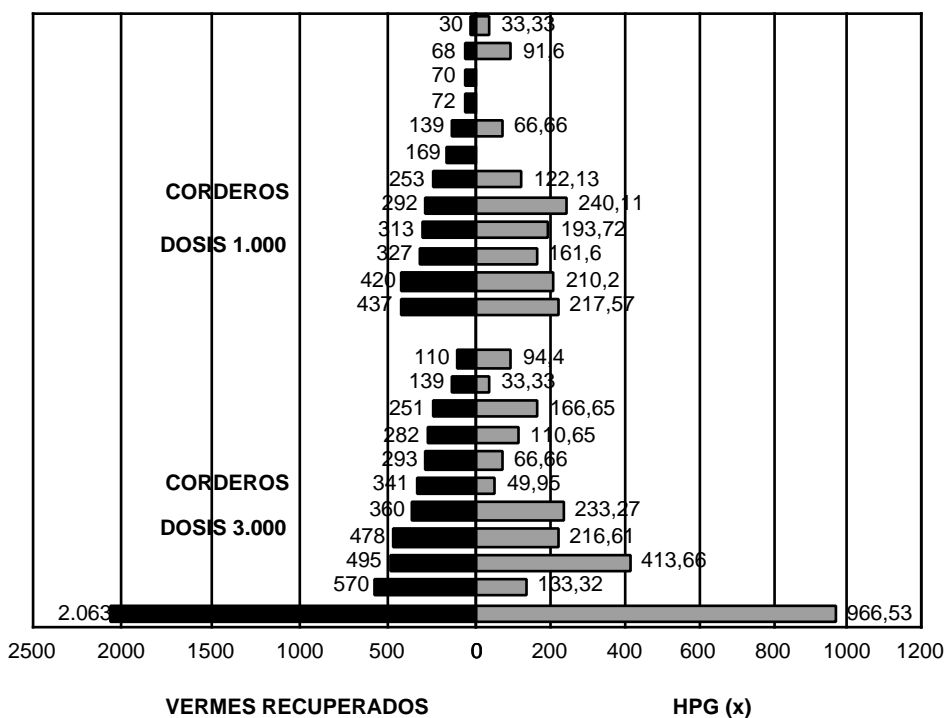


Figura 13.- Huevos por gramo (x hpg) eliminados por cada cordero a lo largo de toda la experiencia, en relación con el número de vermes recuperados al sacrificio.

Con el fin de ayudar en la interpretación de los resultados de los análisis coprológicos realizados sobre muestras recogidas de animales infectados naturalmente, hemos establecido tres intervalos en la eliminación de huevos por los corderos de los grupos formados de acuerdo con la carga parasitaria, y sacrificados a los 6 meses p.i. (Fig. 12). El primer intervalo, que comprende entre los días 49-79 p.i. y durante el cual parte de los vermes pueden no eliminar huevos por ser inmaduros, lo fijamos teniendo en cuenta el período de prepatencia observado en los corderos infectados experimentalmente por nosotros. En el segundo, que abarca entre los días 80 y 119 p.i., todavía puede permanecer algún parásito inmaduro. El tercer intervalo, en el que consideramos que todos los vermes ya son adultos y, por tanto, eliminan huevos, comprende el período entre los días 120 y 180 p.i.

De acuerdo con el número medio de huevos por gramo eliminado en cada uno de dichos intervalos por los corderos de cada grupo, se observó, en general, un incremento de dicho número al aumentar los días p.i. y la carga parasitaria (Fig. 12).

La relación entre la carga parasitaria de los animales y el número medio de hpg por ellos eliminado, en el primer intervalo (Fig. 12 □), ayudaría en la interpretación de los resultados de los análisis realizados sobre heces de ganado ovino, tomadas entre 1 1/2 y 2 1/2 meses después de que los animales libres de infección, bien por ser la primera vez que salen al campo o por haber recibido un antihelmíntico 100% eficaz contra *D. dendriticum*, iniciaran el proceso de pastoreo en zonas en las que las hormigas están parasitadas con *D. dendriticum* y en épocas en que están activas (Marzo-Octubre, en la provincia de León). Asimismo, la relación hpg / carga parasitaria, observada en el segundo intervalo (Fig. 12 □), serviría para explicar los resultados de los análisis realizados sobre heces de los mismos animales mencionados, pero habiendo tomado las muestras entre 2 1/2 y 4 meses después de iniciado el proceso de pastoreo. De igual forma, la correspondencia entre hpg eliminados y vermes recuperados, observada en el tercer intervalo (Fig. 12 □), ayudaría en la interpretación de los resultados de los análisis realizados sobre heces de ganado ovino tomadas entre 4 y 6 meses después de que dichos animales hubieran pastado en zonas con hormigas parasitadas activas, pero sin posibilidad de reinfección posterior. Dicha reinfección no se produciría, bien porque los animales fueran estabulados o trasladados a pastos exentos del parásito o porque no hubiera hormigas parasitadas activas (Noviembre-Febrero). La relación entre la carga parasitaria y el número de huevos por gramo eliminados por los animales de los distintos grupos (Fig. 12 □), durante los 6 meses que duró el experimento, ayudará en la interpretación de los resultados de los análisis efectuados sobre heces de ganado ovino, extraídas de animales que, habiendo iniciado su contacto con el pasto contaminado con hormigas parasitadas activas 2 1/2 meses antes de la toma de muestras, tuvieran posibilidad de reinfectarse hasta los 6 meses.

De todo lo anteriormente expuesto parece que, conociendo el número de hpg que elimina un animal con las heces y las condiciones a las que ha estado sometido, podría deducirse el número aproximado de vermes de *D. dendriticum* que alberga.

En cada uno de los grupos de corderos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria, se comparó, mediante la "t" de Student (para muestras apareadas), el número de

hpg eliminado por los animales en la mañana y en la tarde, detectándose diferencias estadísticamente significativas en el grupo formado por los corderos con 301 a 400 parásitos ($t = 1,75$; $p = 0,05$; g.l. = 19), con 401 a 600 parásitos ($t = 2,04$; $p = 0,05$; g.l. = 31) y en el animal con 2.063 vermes ($t = 2,40$; $p = 0,05$; g.l. = 7). Sin embargo, no se detectaron en los demás grupos.

Mediante el análisis de varianza de una vía, se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos de corderos con distinta carga, definidos en el apartado 4.2.4. (excluyendo el animal con 2.063 vermes), en el número de hpg eliminado en la mañana ($F = 3,56$; $p = 0,01$; g.l. = 4 y 89) y en la tarde ($F = 3,32$; $p = 0,05$; g.l. = 4 y 66). Cuando se aplicó el test LSD, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en el número de hpg eliminado en la mañana entre los grupos A-D, A-E, B-C, B-D, B-E; y en la tarde entre los grupos B-C, B-D, B-E.

Además, con el mismo tipo de análisis, se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre dichos grupos de corderos, en el número total de hpg eliminado ($F = 7,88$; $p = 0,001$; g.l. = 4 y 176). Cuando se aplicó el test LSD, se detectaron diferencias estadísticamente significativas (para $p = 0,05$) en el número de hpg eliminado, entre los grupos A-D, A-E, B-C, B-D, B-E.

La estrecha relación entre el número de hpg, eliminado por cada uno de los corderos a lo largo de toda la experiencia, y el de vermes recuperados (Fig. 13) se corroboró mediante el cálculo del coeficiente de correlación ($r = 0,65 \pm 1,43$; $p = 0,001$; g.l. = 22). Dicha relación fue aún más intensa y el coeficiente de correlación más elevado ($r = 0,89 \pm 0,31$; $p = 0,001$; g.l. = 11) cuando consideramos, únicamente, el número de huevos por gramo eliminado por los corderos desde el día 120 p.i. hasta el final de la experiencia (Fig. 14), período éste en el que suponemos que todos los vermes ya están maduros y eliminan huevos.

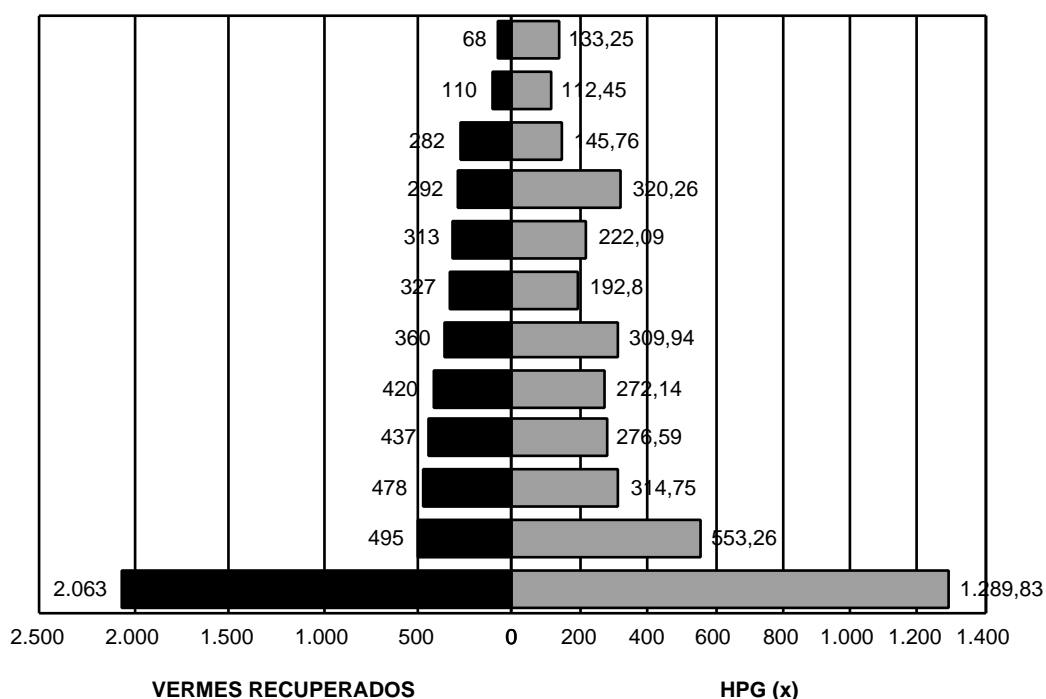


Figura 14.- Huevos por gramo (x hpg) eliminados por cada cordero desde el día 120 p.i. hasta el final de la experiencia, en relación con el número de vermes recuperados al sacrificio.

DISCUSIÓN

Seguidamente compararemos nuestros resultados sobre la relación entre la eliminación de huevos y la carga parasitaria de cada animal, con los obtenidos por otros autores en infecciones naturales, puesto que, en la revisión bibliográfica realizada, no pudimos encontrar trabajos en los que dicha relación se hubiera estudiado en animales infectados experimentalmente con *D. dendriticum*.

El número de huevos de *D. dendriticum* eliminado con las heces de los corderos infectados por nosotros aumentó, en general, al incrementarse el de vermes, tendencia que ya había sido observada por CALAMEL & GIAUFFRET (1976) y ROJO *et al.* (1981), en ganado ovino infectado naturalmente.

Cuando comparamos el número de vermes recuperado por nosotros con el hallado por otros autores, en ovejas que eliminaban el mismo número de huevos que nuestros corderos, la carga parasitaria fue inferior a la observada por ROJO *et al.* (1981), CORDERO *et al.* (1982), CALAMEL & GIAUFFRET (1976) y CALAMEL *et al.* (1979) en ovejas. Sin embargo fue, en general, semejante o ligeramente inferior o superior a la obtenida por SANZ *et al.* (1987) en ovejas y por CALAMEL *et al.* (1979) en corderos. Por el contrario, no observamos coincidencia entre nuestros resultados y los de MACCHIONI *et al.* (1978) y AMBROSI (1991). Por otra parte, la carga parasitaria media recuperada por nosotros en los 3 corderos que no eliminaron huevos antes de su sacrificio a los 2 meses fue superior a la observada por CALAMEL & GIAUFFRET en 4 ovejas en las que tampoco habían detectado huevos de *D. dendriticum*.

Cuando tuvimos en cuenta las categorías establecidas por nosotros en base a la carga parasitaria, el número medio de hpg eliminado por nuestros corderos fue: 1) en el grupo de animales con < 100 vermes, superior al señalado por CALAMEL & GIAUFFRET (1976) y AMBROSI (1991), e inferior al obtenido por CALAMEL *et al.* (1979); 2) en el de 101 a 200 vermes, similar al hallado por CALAMEL & GIAUFFRET (1976) e inferior al de SANZ *et al.* (1987) y CALAMEL *et al.* (1979); 3) en el de 201 a 300 vermes, superior al señalado por SANZ *et al.* (1987) y AMBROSI (1991) e inferior al de CALAMEL *et al.* (1979); 4/ en el de 301 a 400 vermes, similar al hallado por estos últimos autores; 5/ en el de 401 a 600 parásitos, semejante al observado por CALAMEL & GIAUFFRET (1976) e inferior al obtenido por SANZ *et al.* (1987) y CALAMEL *et al.* (1979). En el animal del que se recuperaron 2.063 vermes, el nº medio de hpg fue superior al indicado por ROJO *et al.* (1981), CORDERO *et al.* (1982), CALAMEL *et al.* (1979) y AMBROSI (1991), e inferior al obtenido por MACCHIONI *et al.* (1978).

El que no observáramos manifestaciones clínicas en los animales infectados por nosotros, creemos que fue debido a que el número de vermes que contenían era menor de 1.000, excepto en un caso, lo que concuerda con lo señalado por ROJO *et al.* (1981), para quienes la presencia de 1.000 ejemplares de *D. dendriticum*, o menos, no tiene significación clínica ni repercusiones económicas. De acuerdo con CALAMEL & GIAUFFRET (1976),

uno de nuestros corderos (con 2.063 vermes) tenía una infección-decomiso, 18 de ellos (con 110-570 vermes) una infección ligera y sin incidencia, y otros 4 (con 30-72 vermes) una presencia testimonial del parásito sin incidencia patológica y económica.

Según nuestros resultados, el número de huevos eliminado es aproximadamente la mitad del número de vermes, lo que parece indicar que el número de huevos eliminados por cada animal y la carga parasitaria que contiene están relacionados. Esto no concuerda con lo señalado por CORDERO *et al.* (1985), para quienes no existe proporcionalidad entre ambos parámetros, incluso en animales con cargas parasitarias elevadas.

4.2.6.- RELACIÓN ENTRE ENZIMAS MARCADORAS HEPÁTICAS, PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMÁTICOS, ELIMINACIÓN DE HUEVOS Y CARGA PARASITARIA EN LA DICROCELIOSIS

En este apartado consideraremos únicamente los valores de las enzimas hepáticas (Cuadros 16-18, 22-24, 29-32) y parámetros hemáticos (Cuadros 33-37, 39-43, 51-54, 64) que más se alteraron en los corderos a lo largo de la experiencia.

En general, no se observó uniformidad entre los corderos, en cuanto a los valores de dichos parámetros, por lo que solo comentaremos los datos más significativos obtenidos en los distintos grupos de animales, establecidos en el apartado 4.2.4., de acuerdo con el número de vermes recuperado al hacer la necropsia. Estos fueron: A (< 100 vermes), B (101-200), C (201-300), D (301-400), E (401-600) y F (2.063).

En el cordero con mayor número de vermes (2.063), el día 90 p.i. se detectó el valor máximo de AST, ALT y leucocitos, al tiempo que se observó un brusco aumento en el número de hpg eliminado (Figs. 15a, 15b, 16a). No obstante, el valor más elevado de hpg se obtuvo el día 150 p.i., fecha en la que también se detectó un incremento en el valor de GGT (Fig. 16b).

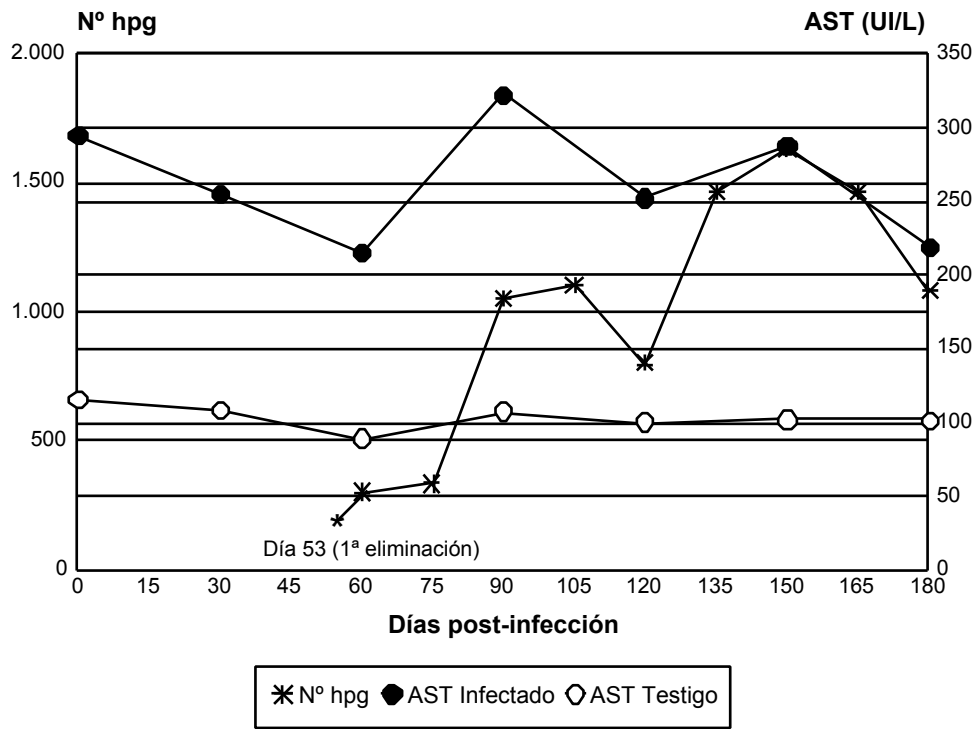


Figura 15a

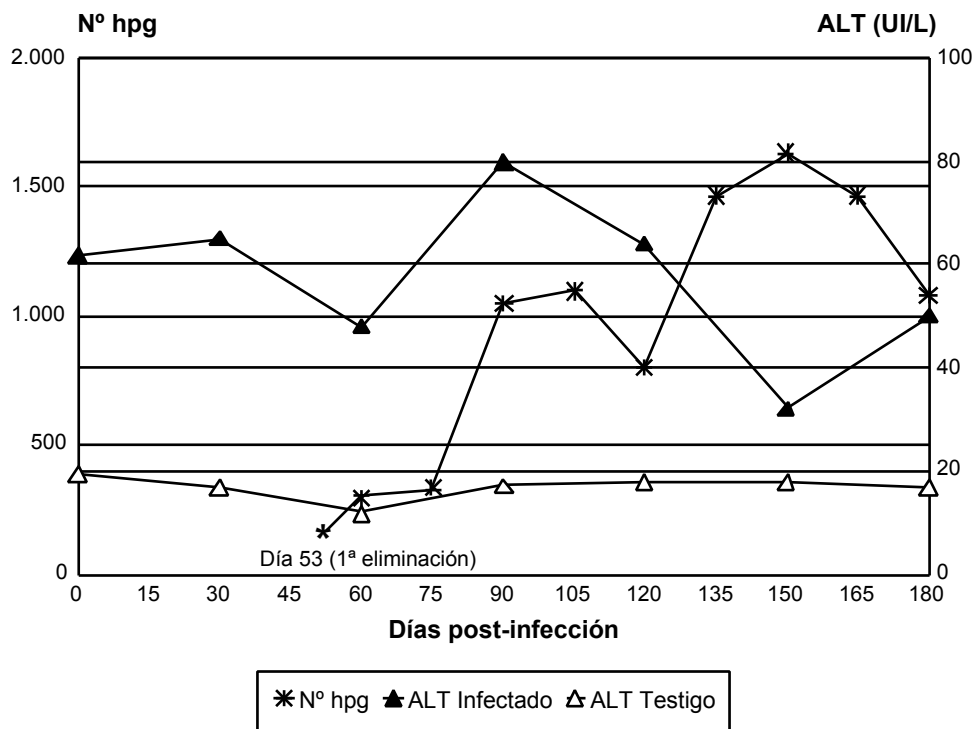


Figura 15b

Figura 15 (a, b).- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de AST (a) y ALT (b) obtenidos en un cordero infectado con 2.063 vermes.

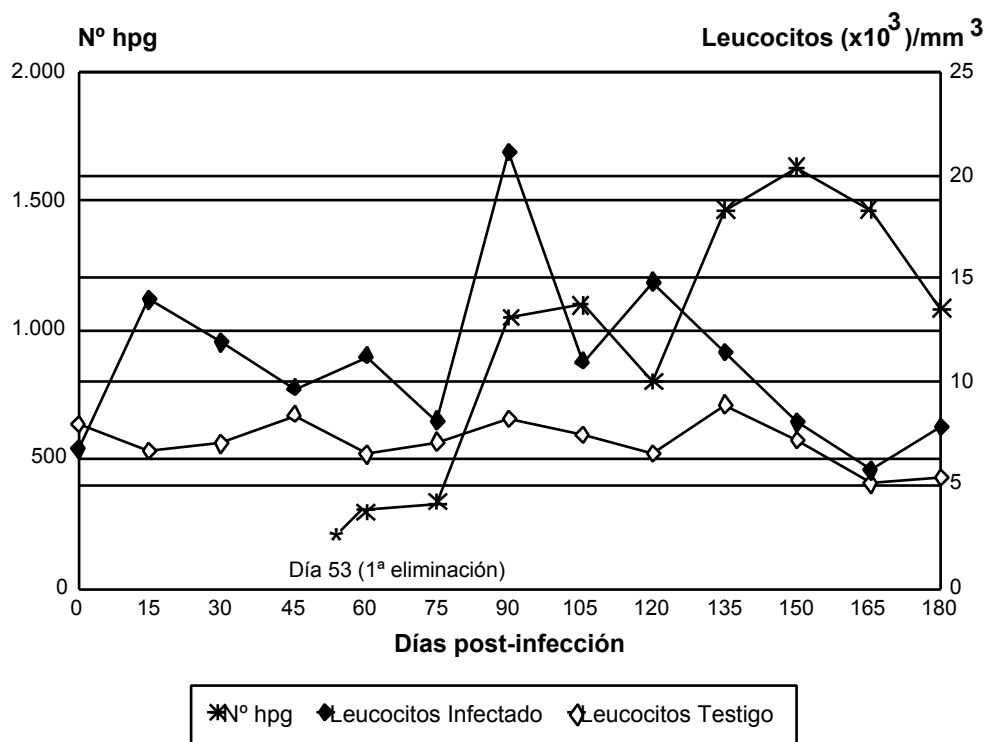


Figura 16a

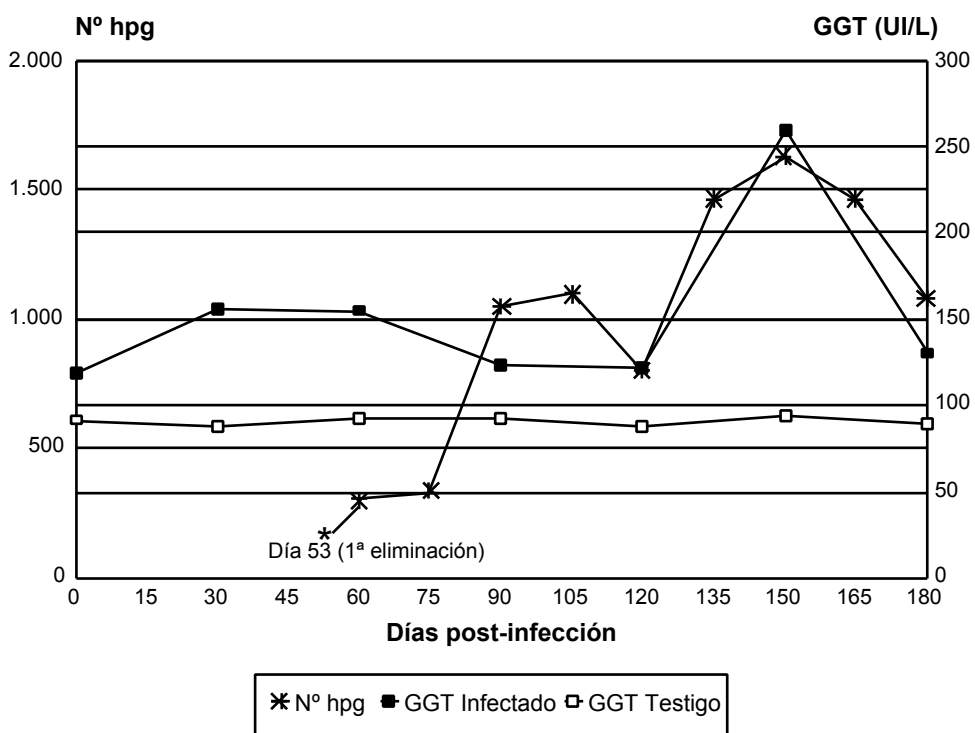


Figura 16b

Figura 16 (a, b). Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos (a) y GGT (b) obtenidos en un cordero infectado con 2.063 vermes.

En los animales con carga parasitaria entre 401 y 600 vermes se observó, en términos generales, entre los días 60 y 90 p.i., un incremento en los valores de ALT, FA, leucocitos y huevos por gramo (Figs. 17, 18a, 18b). El día 150 se detectó una disminución en el número de monocitos y un incremento en los valores de ALT, neutrófilos y huevos por gramo, aunque fue en el día 180 p.i. cuando se observó la máxima eliminación de huevos.

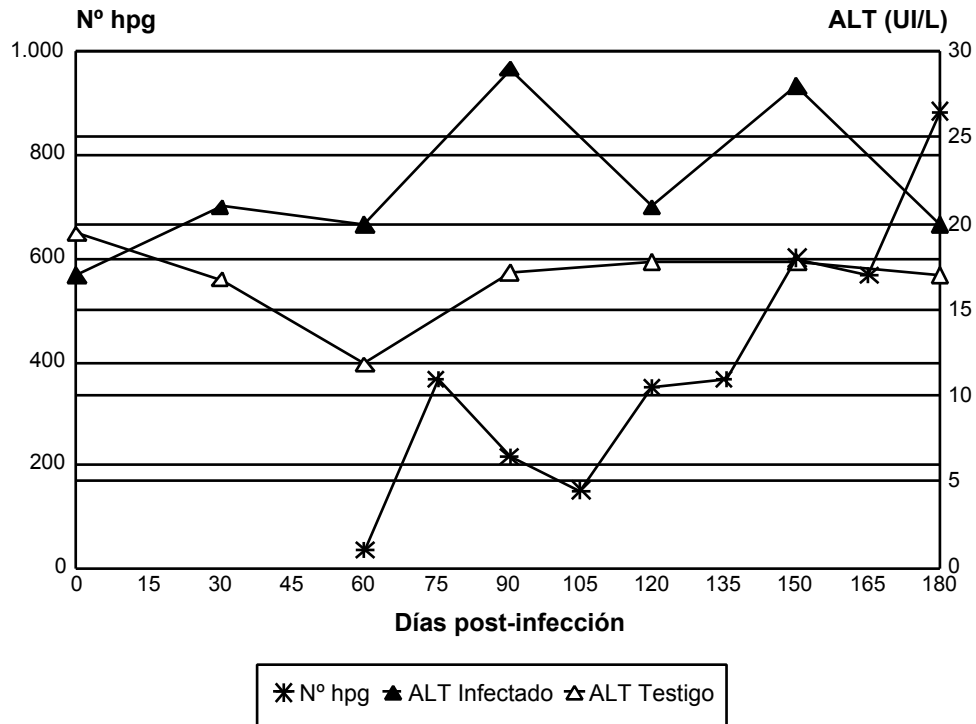


Figura 17.- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de ALT obtenidos en un cordero infectado con 495 vermes.

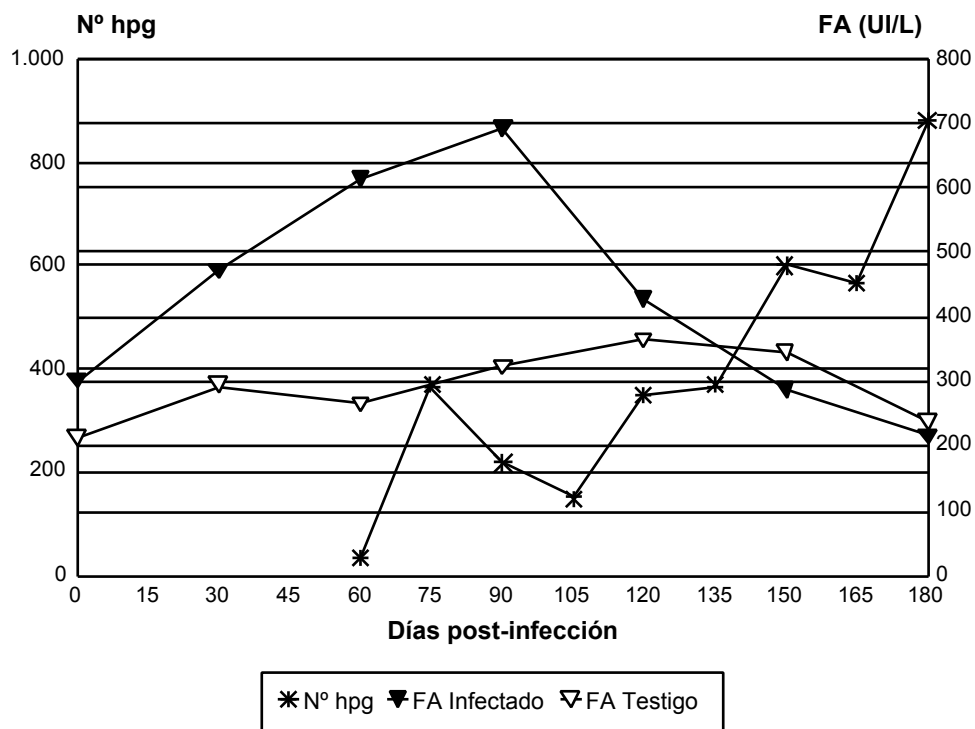


Figura 18a

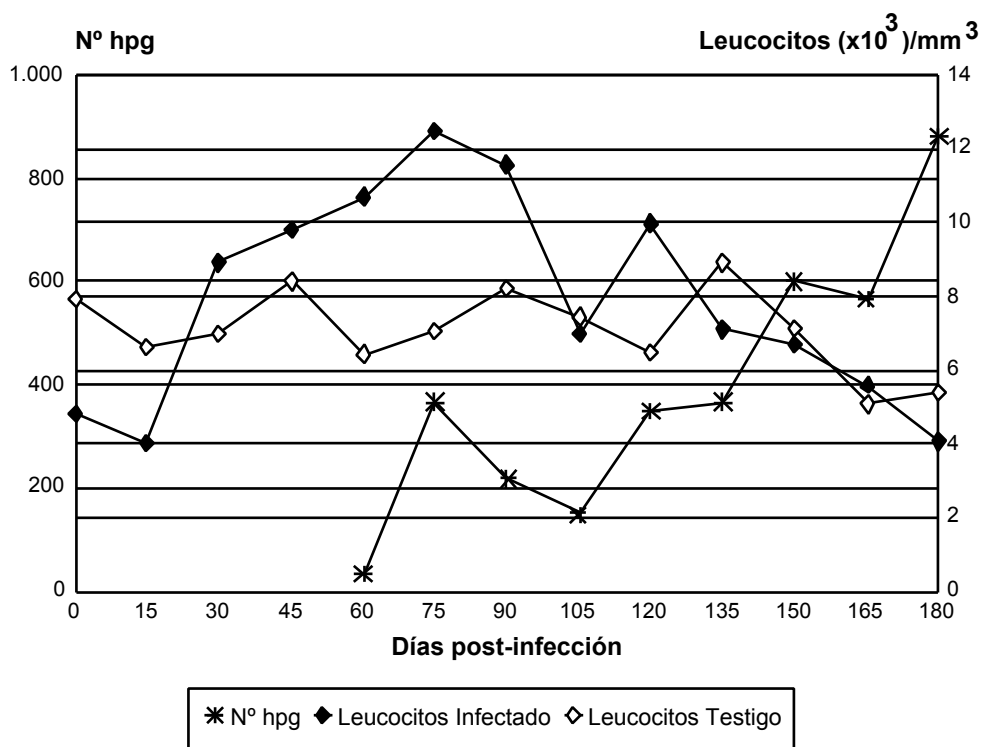


Figura 18b

Figura 18 (a, b).- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de FA (a) y leucocitos (b) obtenidos en un cordero infectado con 495 vermes.

En uno de los animales del grupo con carga parasitaria entre 301 y 400 vermes se detectaron, entre los días 105 y 135 p.i., los valores máximos de FA y leucocitos, mientras que el número de huevos por gramo osciló a lo largo de toda la experiencia, alcanzando el máximo a los 180 días p.i. (Figs. 19, 20).

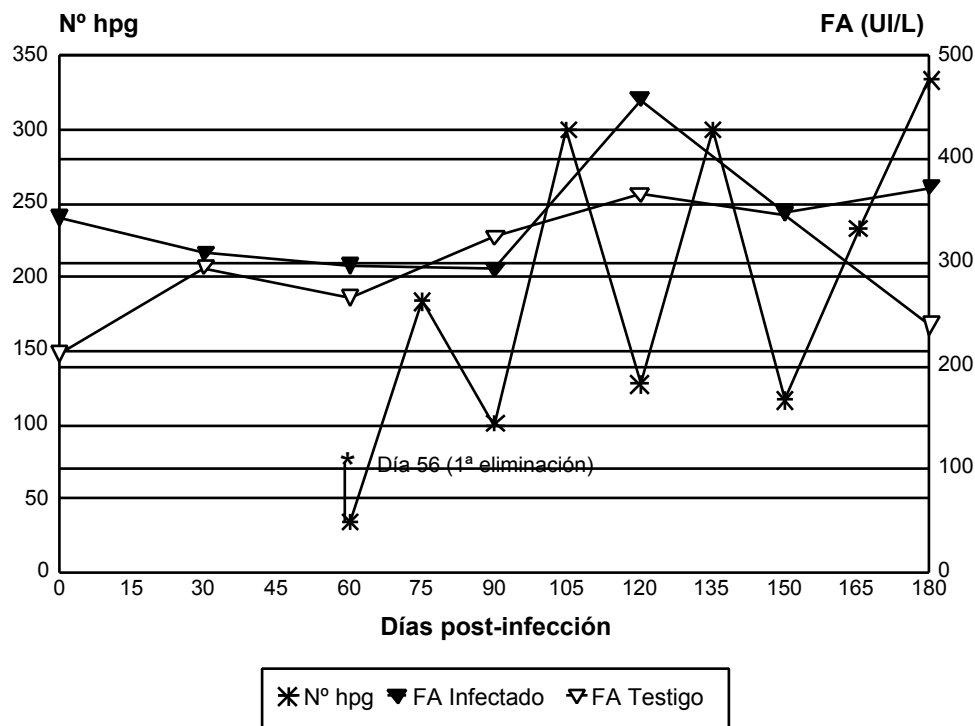


Figura 19.- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de FA obtenidos en un cordero infectado con 313 vermes.

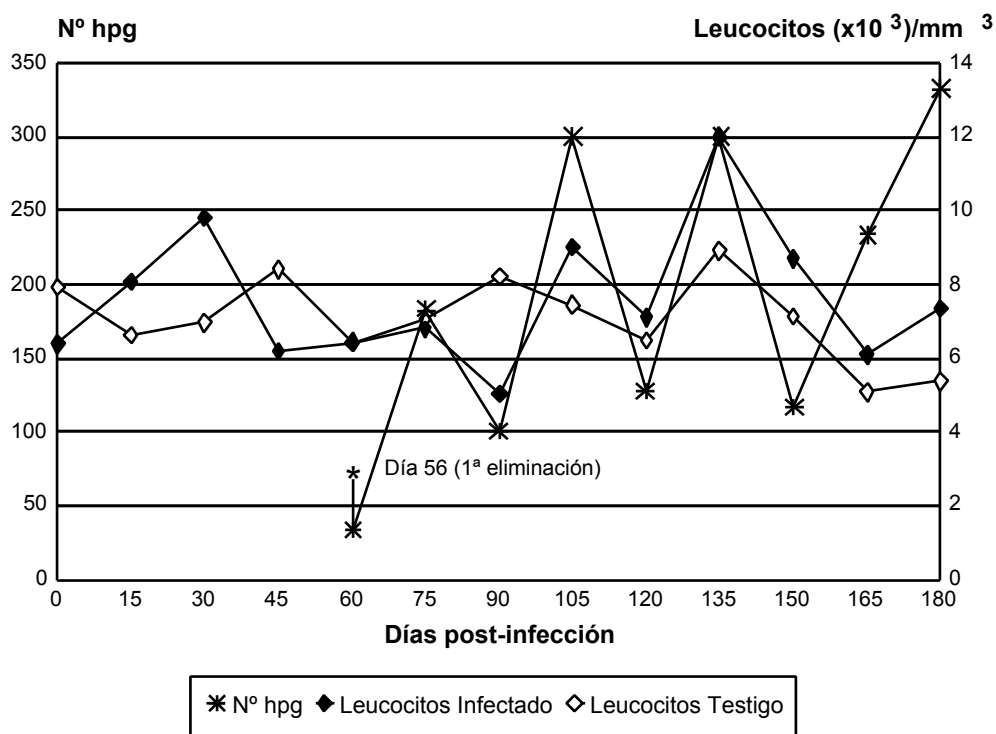


Figura 20.- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 313 vermes.

En un cordero, del grupo que albergaba de 201 a 300 vermes, se detectó un aumento en los valores de ALT y LDH y una disminución en el número de monocitos en el día 180 p.i., es decir, 15 días después de que se observara el máximo en la eliminación de huevos (Figs. 21a, 21b). Sin embargo, el número más elevado de leucocitos y de neutrófilos se detectó el día 90 p.i., esto es, 40 días con posterioridad a la primera eliminación de huevos (Fig. 22).

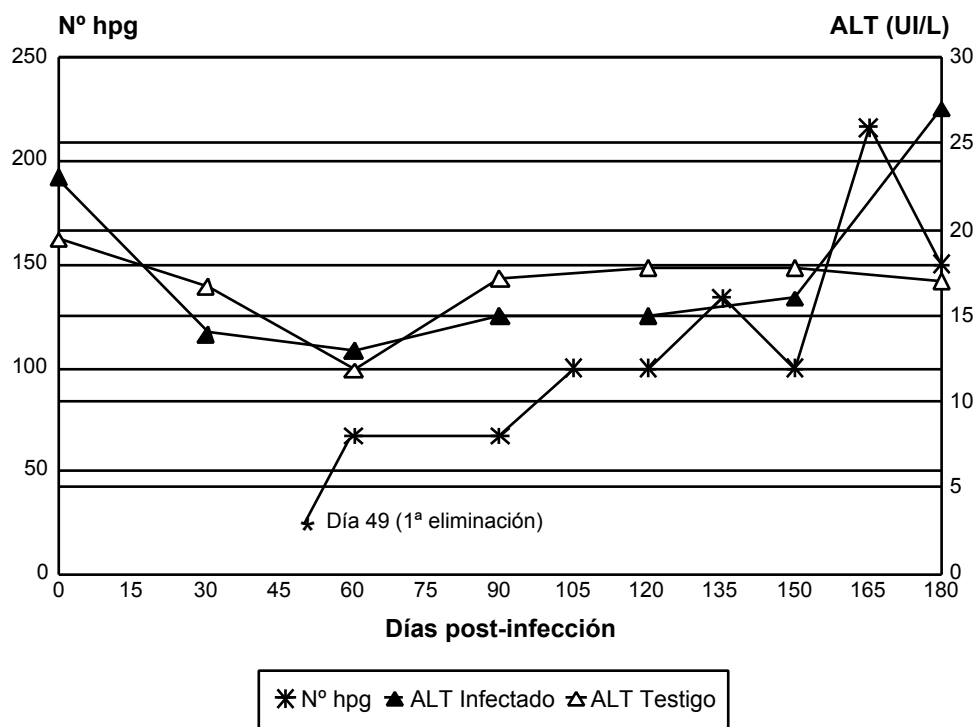


Figura 21a

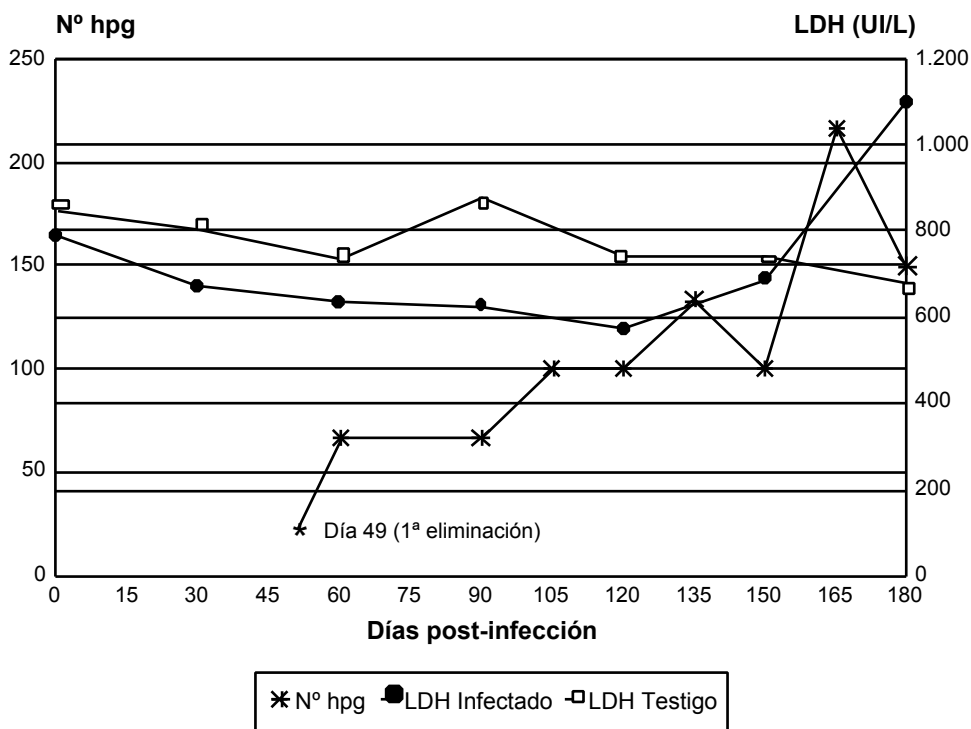


Figura 21b

Figura 21 (a, b).- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de ALT (a) y LDH (b) obtenidos en un cordero infectado con 282 vermes.

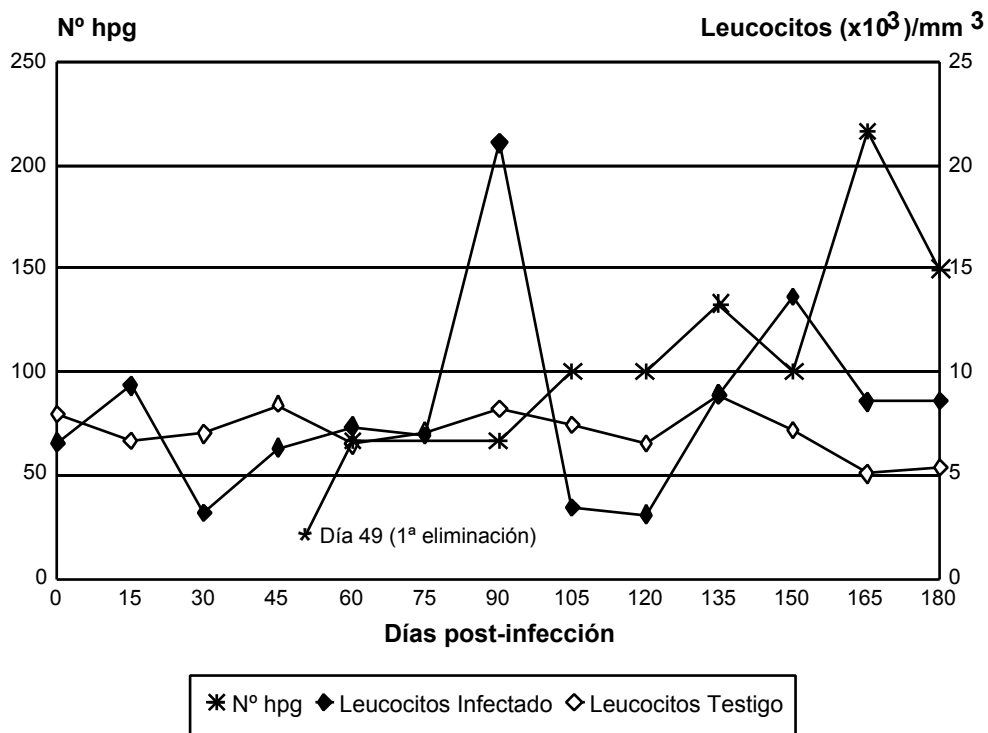


Figura 22.- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 282 vermes.

Dentro de los corderos con menos de 200 vermes, en uno de ellos se detectó el valor máximo de AST, LDH y del número de huevos por gramo a los 180 días p.i. (Figs. 23a, 23b). Sin embargo, el máximo de leucocitos se observó a los 90 días p.i., 10 días después de la primera eliminación de huevos (Fig. 24).

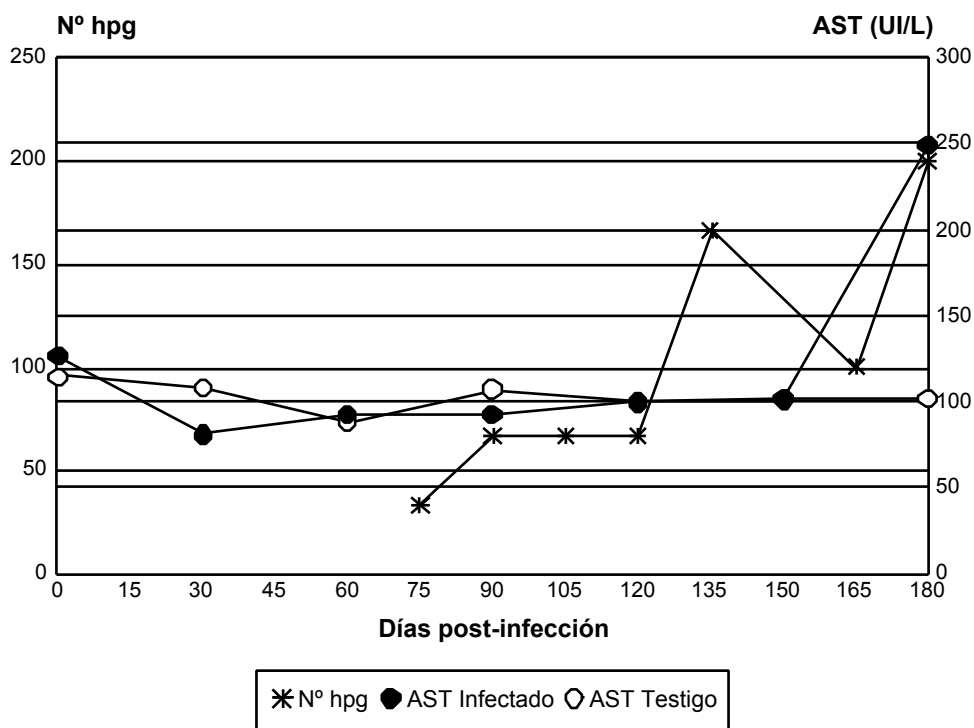


Figura 23a

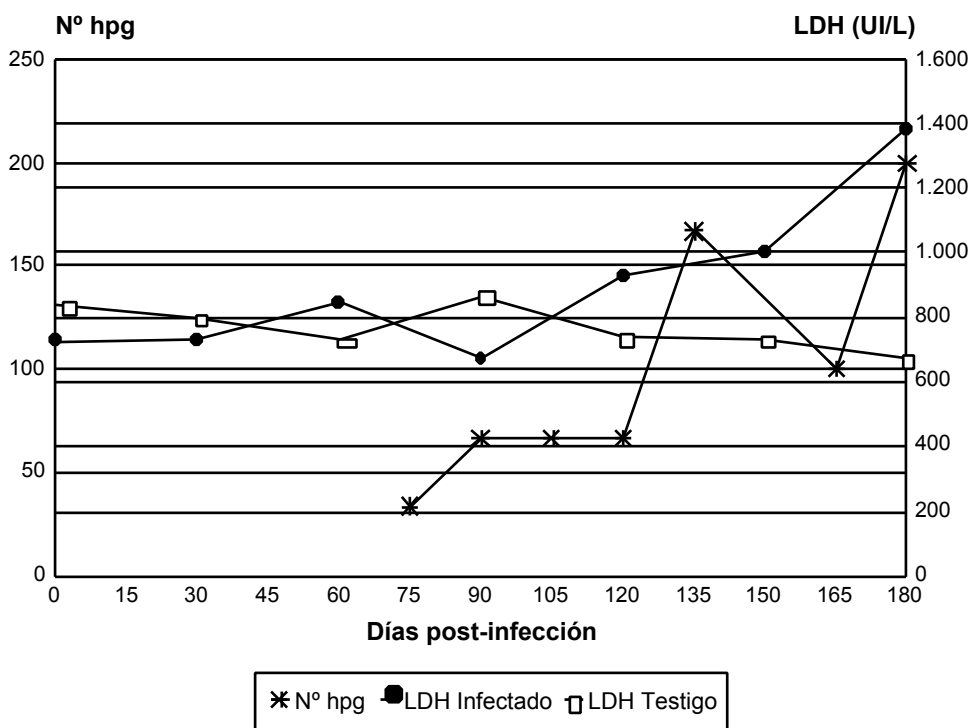


Figura 23b

Figura 23 (a, b).- Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de AST (a) y LDH (b) obtenidos en un cordero infectado con 68 vermes.

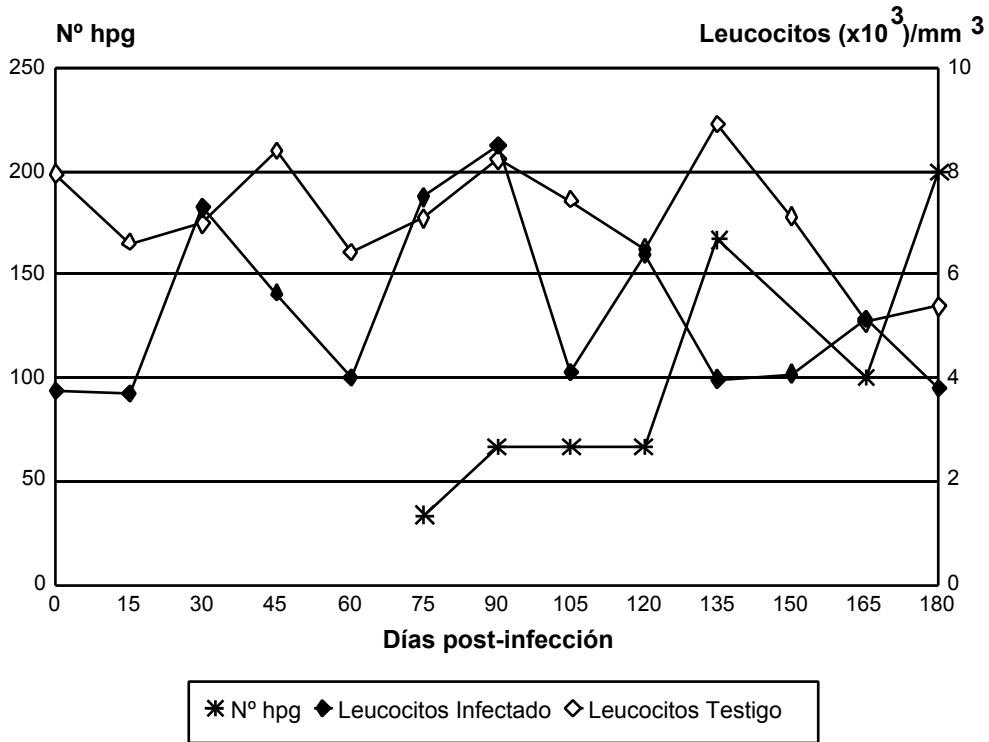


Figura 24.- Relación del número de huevos por gramo con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 68 vermes.

Al comparar los valores que más se alteraron de cada enzima (Cuadro 89) y de cada parámetro hemático (Cuadro 90), entre los grupos de corderos establecidos por la carga parasitaria, las mayores diferencias se observaron para AST, ALT, GGT, leucocitos, linfocitos y neutrófilos y los valores más altos se detectaron en el animal con mayor carga parasitaria, excepto en el caso de linfocitos.

PARÁMETROS SÉRICOS	GRUPOS DE CORDEROS INFECTADOS					
	A	B	C	D	E	F
PROT (g/dl)	7,75 ± 0,10	7,65 ± 0,09	7,57 ± 0,17	8,07 ± 0,13	7,65 ± 0,11	7,76 ± 0,23
ALB (g/dl)	3,48 ± 0,07	3,52 ± 0,07	3,57 ± 0,08	3,62 ± 0,05	3,51 ± 0,06	3,10 ± 0,12
BIL (mg/dl)	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,21 ± 0,01
GLU (mg/dl)	46,56 ± 2,37	46,50 ± 3,82	56,45 ± 1,86	58,20 ± 2,07	56,22 ± 2,28	36,50 ± 5,57
AST (UI/L)	122,62 ± 9,75	111,87 ± 8,91	103,75 ± 11,71	102,75 ± 6,19	106,51 ± 9,42	258,33 ± 16,68
ALT (UI/l)	17,68 ± 1,66	17,50 ± 1,34	16,35 ± 1,46	15,70 ± 0,98	17,87 ± 1,07	56,50 ± 6,82
LDH (UI/L)	904,06 ± 46,17	772,75 ± 27,05	714,15 ± 47,77	835,00 ± 25,73	709,74 ± 27,38	855,00 ± 67,81
FA (UI/L)	177,87 ± 15,93	248,81 ± 25,38	372,95 ± 37,76	306,45 ± 18,46	335,16 ± 28,39	174,16 ± 11,06
GGT (UI/L)	93,18 ± 1,97	90,75 ± 3,01	91,25 ± 4,08	101,04 ± 3,01	102,90 ± 4,18	157,66 ± 21,38

Cuadro 89.- Valores (x ± E.S.) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de los siguientes grupos de corderos: A/ < 100 vermes; B/ 101-200; C/ 201-300; D/ 301-400; E/ 401-600; F/ 2.063.

PARÁMETROS HEMÁTICOS	GRUPOS DE CORDEROS INFECTADOS					
	A	B	C	D	E	F
ERITROCITOS (x10 ⁶)/mm ³	6,73 ± 0,17	7,06 ± 0,25	7,12 ± 0,24	7,35 ± 0,18	7,60 ± 0,17	6,87 ± 0,27
LEUCOCITOS (x10 ³)/mm ³	5,72 ± 0,31	6,53 ± 0,31	7,75 ± 0,58	7,64 ± 0,39	7,44 ± 0,41	10,89 ± 1,14
HEMATÓCRITO (%)	29,23 ± 0,59	28,37 ± 0,55	29,96 ± 0,65	31,22 ± 0,54	30,88 ± 0,55	29,24 ± 1,15
HEMOGLOBINA (g/dl)	9,95 ± 0,27	10,40 ± 0,28	10,92 ± 0,35	11,16 ± 0,22	10,07 ± 0,52	11,22 ± 0,19
VCM (fl)	43,85 ± 1,03	41,11 ± 1,09	43,79 ± 1,75	43,78 ± 1,58	41,41 ± 0,90	43,31 ± 2,44
HCM (pg)	14,97 ± 0,30	15,71 ± 0,46	14,96 ± 0,42	15,42 ± 0,71	15,27 ± 0,52	18,00 ± 0,32
CHCM (g/dl)	34,11 ± 0,45	35,17 ± 0,52	34,39 ± 0,59	34,59 ± 0,52	34,11 ± 0,74	36,00 ± 0,53
LINFOCITOS (%) *	63,97 ± 2,57	70,13 ± 6,42	70,05 ± 7,57	69,45 ± 2,64	67,17 ± 3,14	41,48 ± 7,99
MONOCITOS (%) *	4,66 ± 1,02	9,90 ± 1,83	6,84 ± 1,97	6,21 ± 1,35	5,90 ± 0,89	4,12 ± 1,22
NEUTRÓFILOS (%) *	31,05 ± 3,09	20,95 ± 6,59	23,91 ± 7,62	22,43 ± 2,52	25,74 ± 3,50	54,20 ± 8,89
EOSINÓFILOS (%) *	1,33 ± 0,16	4,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	3,85 ± 0,82	2,85 ± 0,63	1,00 ± 0,00

Cuadro 90.- Valores (x ± E.S.) de algunos parámetros hemáticos de los siguientes grupos de corderos: A/ < 100 vermes; B/ 101-200; C/ 201-300; D/ 301-400; E/ 401-600; F/ 2.063. * Componentes de la fórmula leucocitaria.

Al comparar entre sí los valores de las enzimas hepáticas y parámetros bioquímicos obtenidos con anterioridad y con posterioridad a la primera eliminación de huevos por todos los corderos, las cifras medias de AST, ALT, LDH, GGT y neutrófilos fueron superiores en el primer período, mientras que las de FA, leucocitos, linfocitos, monocitos y eosinófilos fueron inferiores (Figs. 25, 26a, 26b, 27a, 27b, 28, 29a, 29b, 30a y 30b).

Por otra parte, los valores medios de las enzimas AST (Fig. 25), ALT (Fig. 26a), LDH (Fig. 26b) y GGT (Fig. 27b), obtenidos en los 6 grupos de corderos establecidos, fueron superiores antes de la primera eliminación de huevos que después, excepto los de AST y LDH, en el grupo de corderos con menos de 100 vermes, y GGT, en el animal con 2.063 parásitos. De igual forma, los valores de FA (Fig. 27a) fueron superiores, en el primer período, en todos los grupos de corderos, a excepción de aquellos con 201-300, 301-400 y 2.063 vermes.

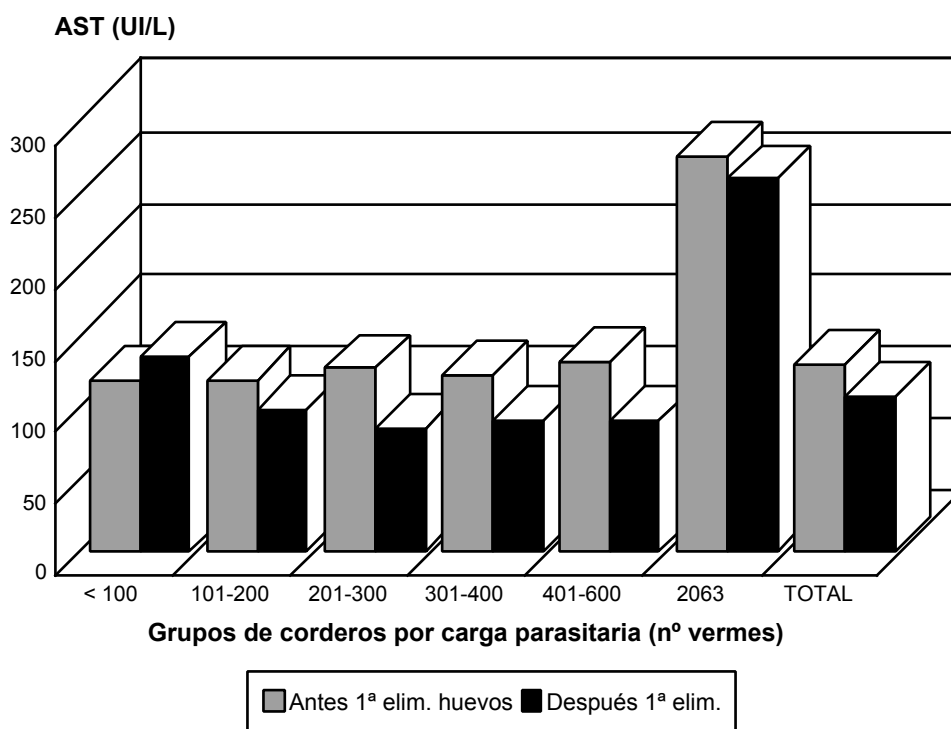


Figura 25.- Valores medios de AST obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

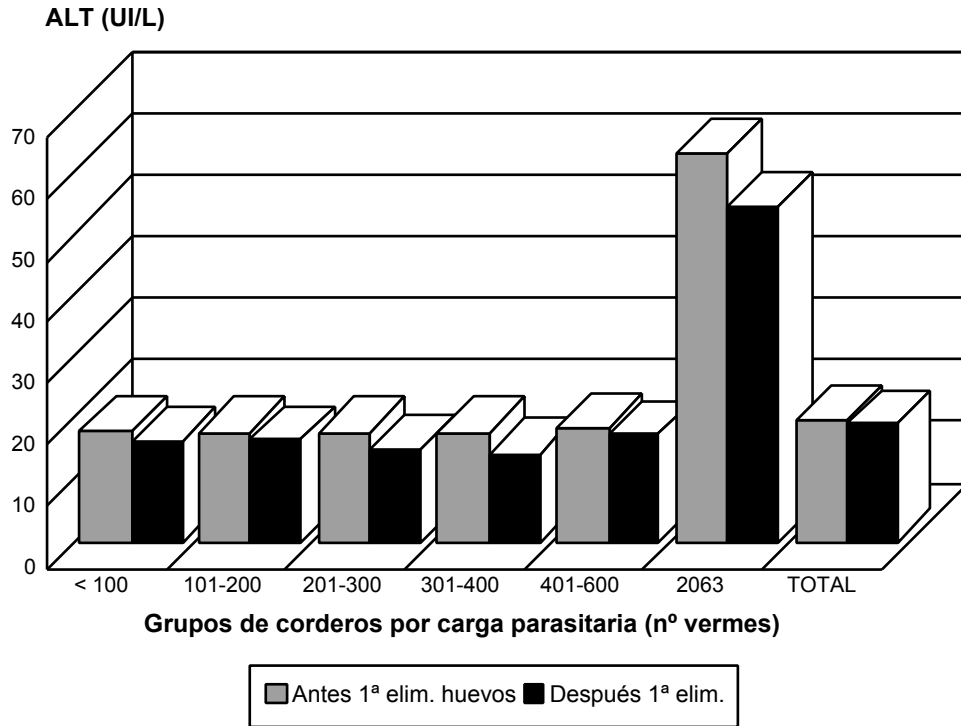


Figura 26a

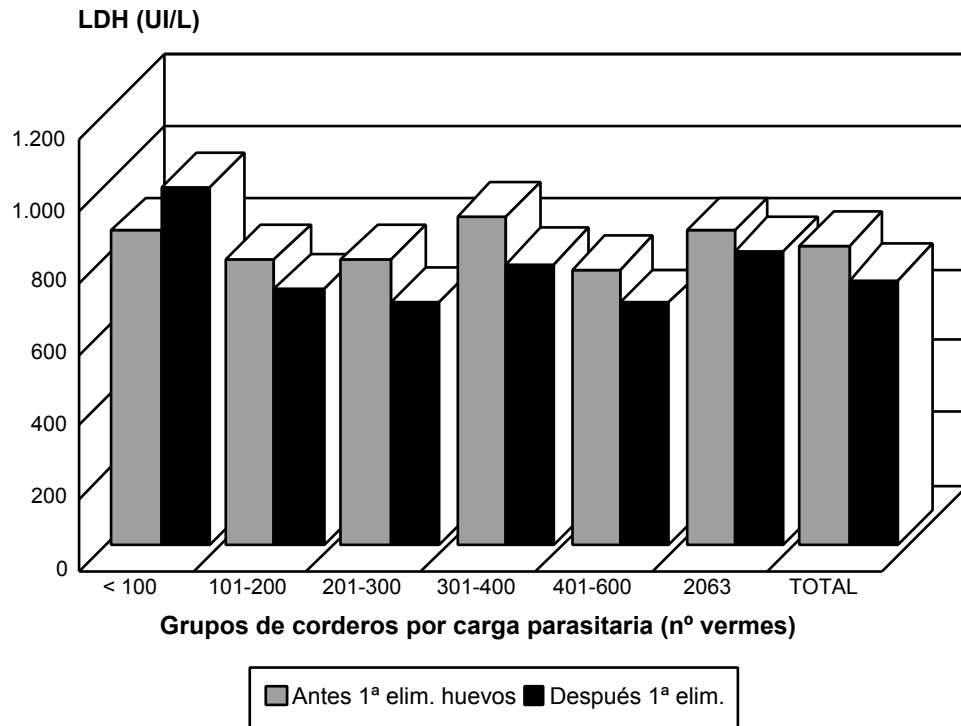


Figura 26b

Figura 26 (a, b).- Valores medios de ALT (a) y LDH (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

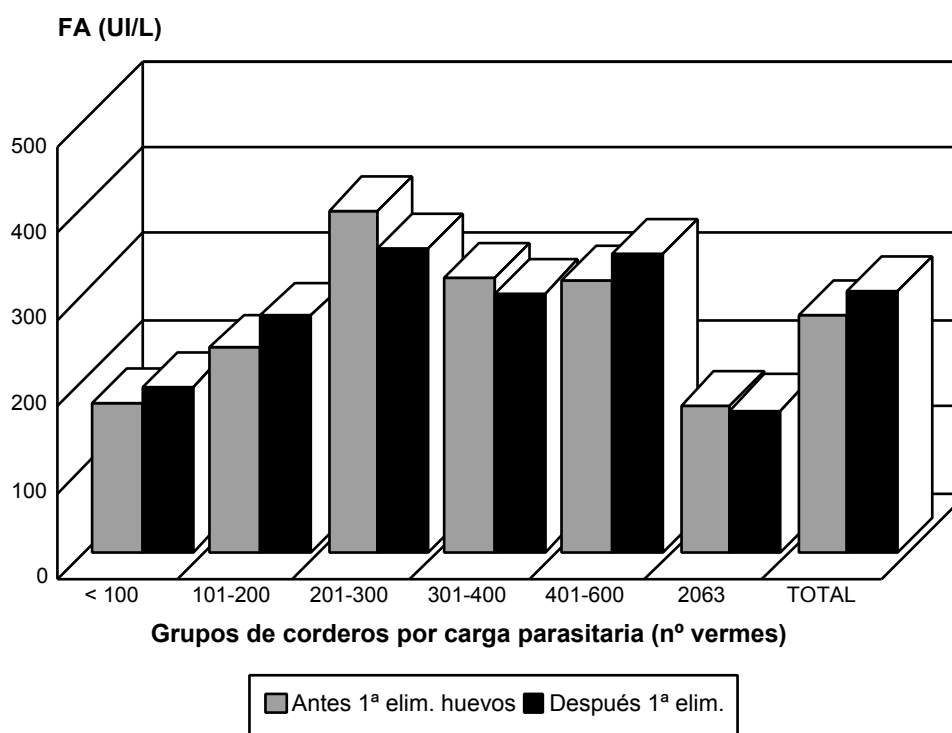


Figura 27a

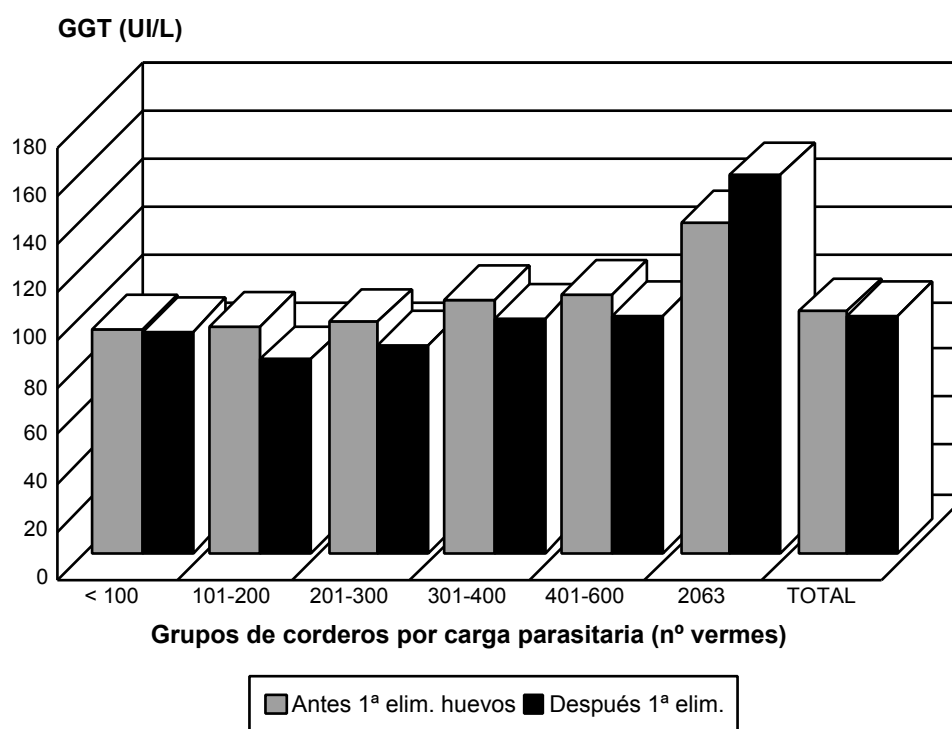


Figura 27b

Figura 27 (a, b).- Valores medios de FA (a) y GGT (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

Asimismo, los valores medios de leucocitos (Fig. 28) y neutrófilos (Fig. 30) fueron superiores, antes de la 1ª eliminación de huevos, en los animales de los grupos con menos de

100 y con 401 a 600 vermes y, además, en el caso de leucocitos en los corderos con 101 a 200 vermes. En las Figs. 29a, 29b, 30a y 30b se representan algunos de los resultados obtenidos para linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos, respectivamente. Por razones ajenas a nuestra voluntad, no hemos podido disponer de los datos correspondientes a los animales de los grupos con 101-200, 201-300 y 301-400 vermes.

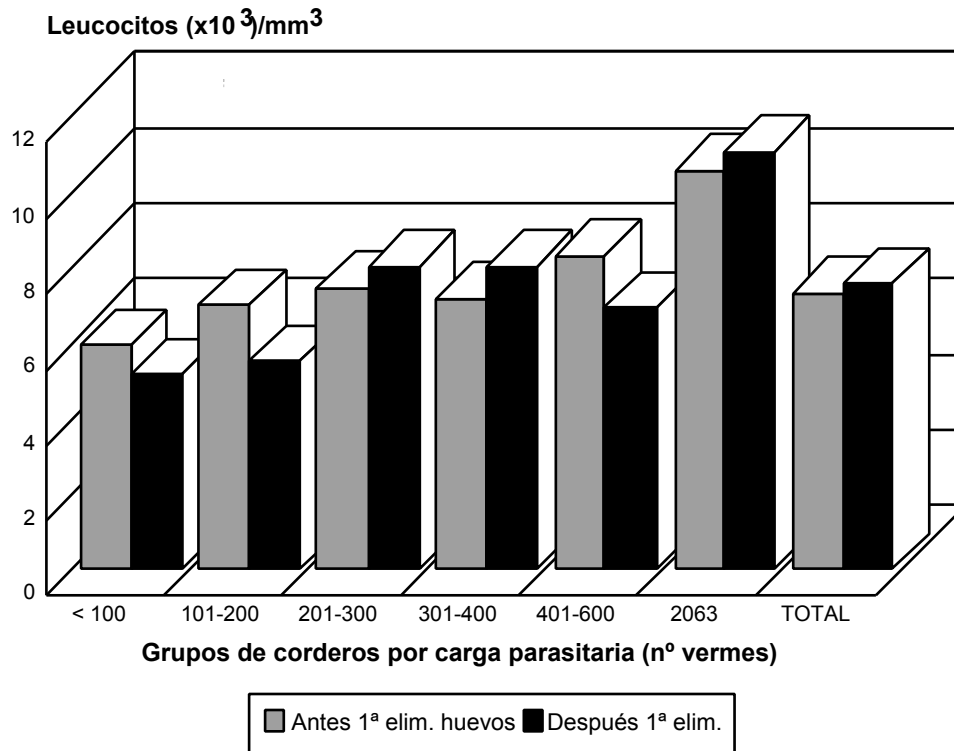


Figura 28.- Valores medios de leucocitos obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

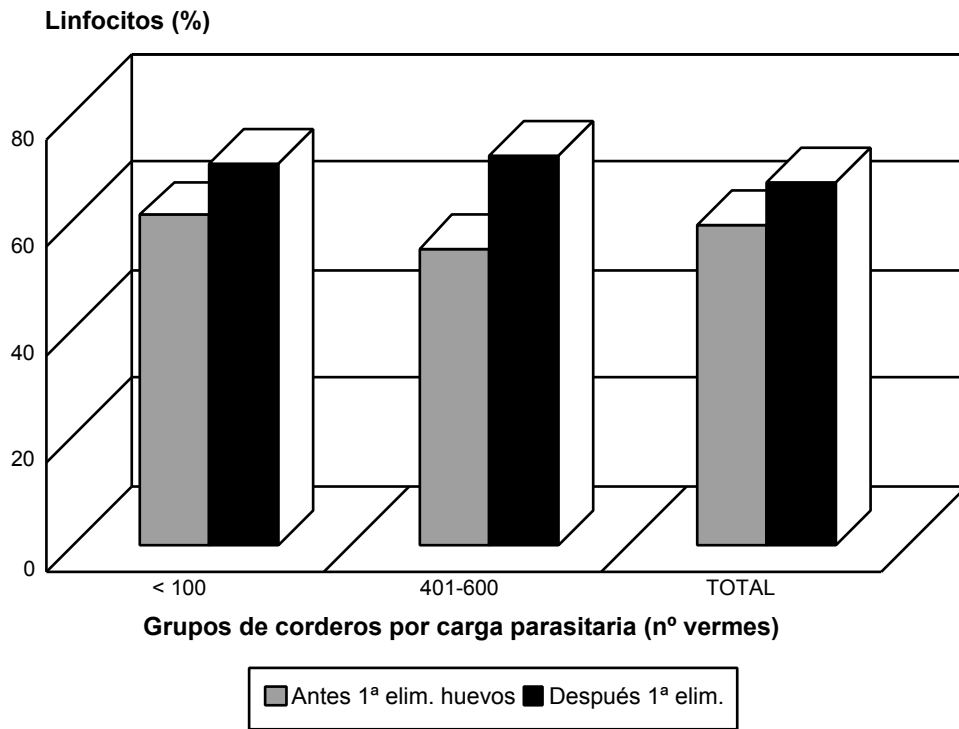


Figura 29a

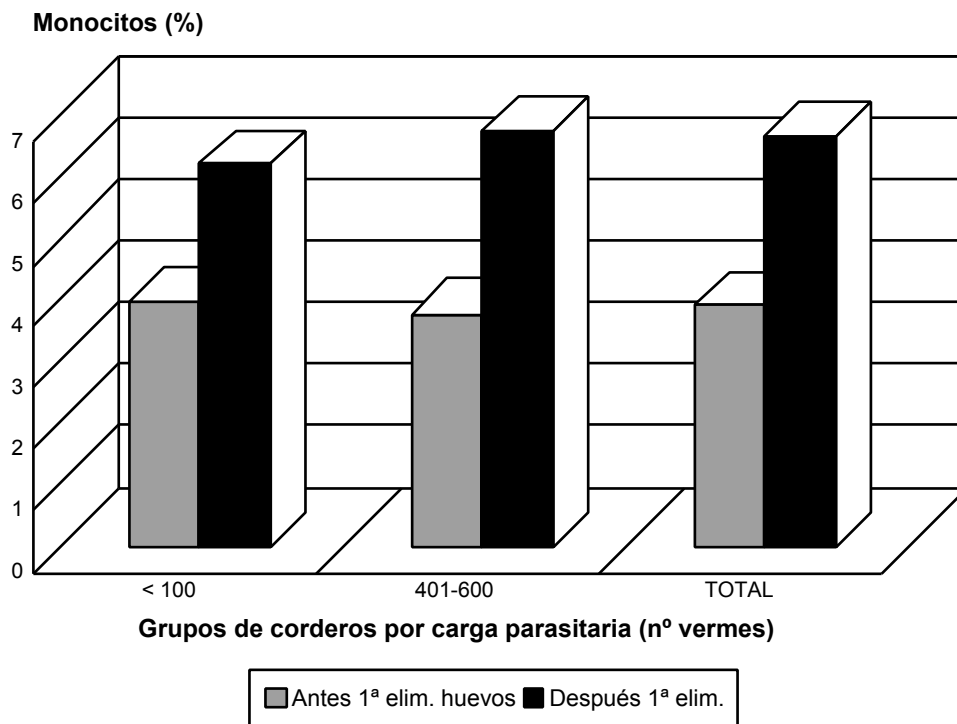


Figura 29b

Figura 29 (a, b).- Valores medios de linfocitos (a) y monocitos (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

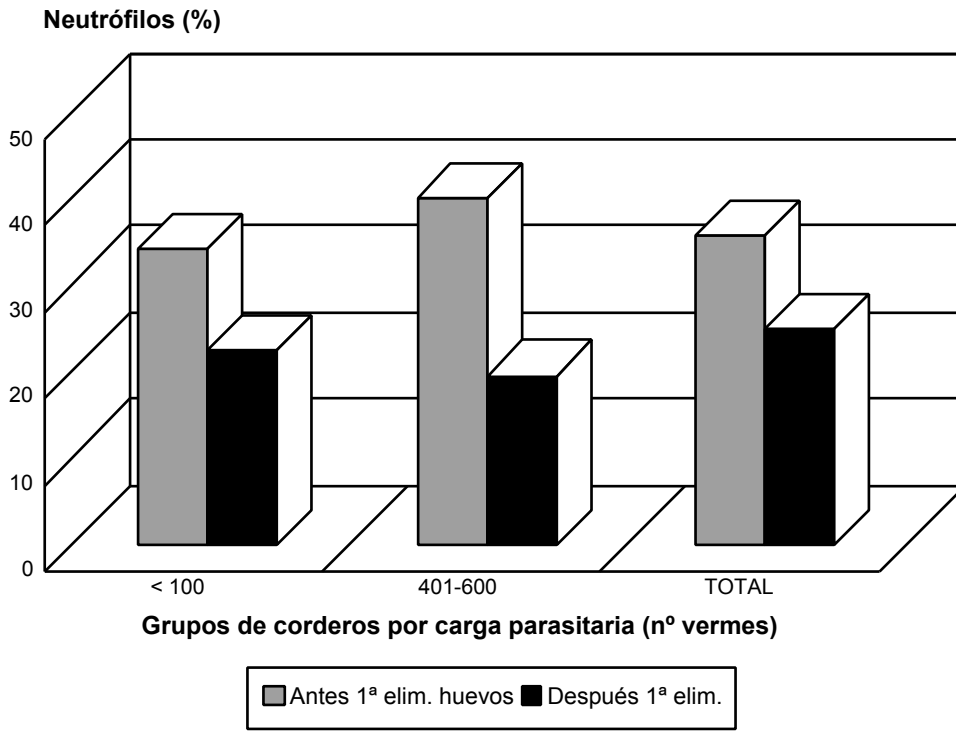


Figura 30a

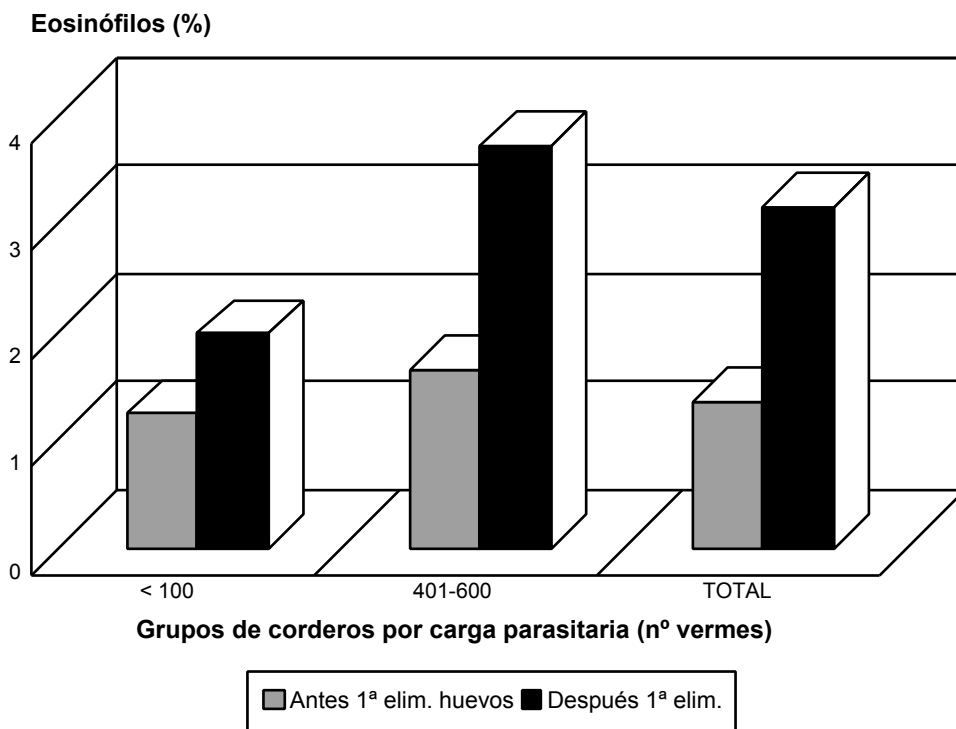


Figura 30b

Figura 30 (a, b).- Valores medios de neutrófilos (a) y eosinófilos (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.

La información anteriormente expuesta, creemos que puede ser útil para la interpretación de los resultados de los análisis realizados sobre muestras recogidas de animales infectados naturalmente.

A nuestro juicio, la relación entre el número de ejemplares de *D. dendriticum* que albergaban los corderos y el valor medio de las enzimas hepáticas y los parámetros hemáticos antes de la 1ª eliminación de huevos, ayudaría a la interpretación, en los trabajos de campo, de los resultados de los análisis realizados sobre suero de ganado ovino, tomado hasta 1_ meses después de que los animales libres de infección (bien por ser la primera vez que salen al campo o por haber recibido un antihelmíntico 100% eficaz contra *D. dendriticum*) iniciaran el proceso de pastoreo, en zonas con hormigas parasitadas con *D. dendriticum* y en épocas en que están activas (Marzo-Octubre, en la provincia de León).

De igual forma, la correspondencia entre la carga parasitaria y los valores de las enzimas hepáticas y parámetros hemáticos, observada después de la primera eliminación de huevos, serviría para explicar los resultados de los análisis realizados sobre suero tomado de ganado ovino entre 2_ y 6 meses después de que los animales hubieran pastado en zonas con hormigas parasitadas activas, pero sin posibilidad de reinfección posterior. No se produciría reinfección, bien porque los animales fueran estabulados o trasladados a pastos exentos del parásito, o porque no hubiera hormigas parasitadas activas (Noviembre-Febrero).

El grupo F de corderos, formado por el animal con 2063 vermes, no se incluyó en los análisis estadísticos que se detallan a continuación.

Mediante el análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, entre los otros 5 grupos de corderos establecidos, en los valores de glucosa (F = 5,16; p 0,001; g.l. = 4 y 102), LDH (F = 5,42; p 0,001; g.l. = 4 y 102), FA (F = 7,73; p 0,001; g.l. = 4 y 102) y GGT (F = 2,48; p 0,05; g.l. = 4 y 102). Cuando se aplicó el test LSD, se detectaron diferencias estadísticamente significativas (para p 0,05) en los valores de: 1/ glucosa, entre los grupos de corderos A-C, A-D, A-E, B-C, B-D, B-E; 2/ LDH, entre los grupos A-B, A-C, A-E, C-D, D-E; 3/ FA, entre los grupos A-B, A-C, A-D, A-E, B-C, B-E; 4/ GGT, entre los grupos B-E, C-D, C-E. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de AST y ALT.

Asimismo, utilizando el análisis de varianza de una vía, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, entre los mismos grupos de corderos, en los valores de eritrocitos (F = 2,43; p 0,05; g.l. = 4 y 188), leucocitos (F = 2,96; p 0,05; g.l. = 4 y 188), hematócrito (F = 3,51; p 0,01; g.l. = 4 y 188), hemoglobina (F = 3,28; p 0,05; g.l. = 4 y 64) y linfocitos (F = 2,91; p 0,05; g.l. = 4 y 56). Cuando se aplicó el test LSD, se observaron diferencias estadísticamente significativas (para p 0,05) en los valores de: 1/ eritrocitos, entre los grupos de corderos A-D, C-E; 2/ leucocitos, entre los grupos A-C, A-D, A-E; 3/ hematócrito, entre los grupos A-D, B-D, B-E; 4/ hemoglobina, entre los grupos A-D; 5/ linfocitos, entre los grupos A-C, B-C. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de VCM, HCM, CHCM, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

4.2.7.- VALORACION MORFOPATOLÓGICA EN LA DICROCELIOSIS

En este capítulo abordaremos la descripción de las lesiones anatomopatológicas, macroscópicas e histopatológicas evidenciadas en el hígado, conducto hepático, vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos, en los diferentes grupos de animales estudiados.

4.2.7.1.- Estudio macroscópico

En los corderos infectados experimentalmente con *D. dendriticum* se comprobó que no existía obstrucción biliar. Al presionar ligeramente la vesícula biliar, el conducto biliar común, que se une con el pancreático formando una ampolla inmediatamente antes de su desembocadura en el duodeno, permitía la entrada de flujo biliar en esta primera porción del intestino delgado.

4.2.7.1.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias

Hígado

Macroscópicamente el hígado mostraba áreas congestivas, de color rojo oscuro, que alternaban con otras más pálidas. Sus bordes eran redondeados y su consistencia se encontraba discretamente aumentada (Fig. 1 de Lámina V).

En la cara diafragmática y preferentemente en el lóbulo derecho, destacaban pequeños nódulos que hacían un ligero relieve sobre la superficie, con bordes netos, de color amarillo opaco y consistencia dura. Su número era escaso (de 1 a 8 nódulos en cada órgano) y sus dimensiones oscilaban entre 1 y 4 mm de diámetro, aunque algunos podían alcanzar 1 ó 2 cm (Fig. 1 de Lámina V). Estos focos necróticos también se identificaron en la cara visceral, si bien en menor número, y aunque alguno alcanzó 1,5 cm, normalmente semejaban nodulillos miliare.

También se observaron tractos blanquecino-amarillentos, más abundantes en la cara visceral del lóbulo izquierdo, de 1 ó 2 mm de grosor y de 1 a 3 cm de longitud. Estos tractos sinuosos hacían relieve y presentaban una consistencia dura (Fig. 2 de Lámina V). Asimismo, en dos de los animales, destacaron pequeñas áreas arborescentes en la superficie parietal y, sólo en uno, cuatro cordones de pared blanquecinos, brillantes, localizados en la superficie visceral del lóbulo izquierdo.

En la superficie de corte se hicieron patentes numerosas secciones correspondientes a conductos biliares que se encontraban ligeramente engrosados y ectásicos. Además, existían algunos nódulos amarillentos, similares a los observados externamente en el órgano, de 0,25 a 0,5 cm de diámetro.

Los conductos biliares extrahepáticos, dilatados, mostraban una mucosa de color amarillo claro, teñida por secreción biliar.

LÁMINA V

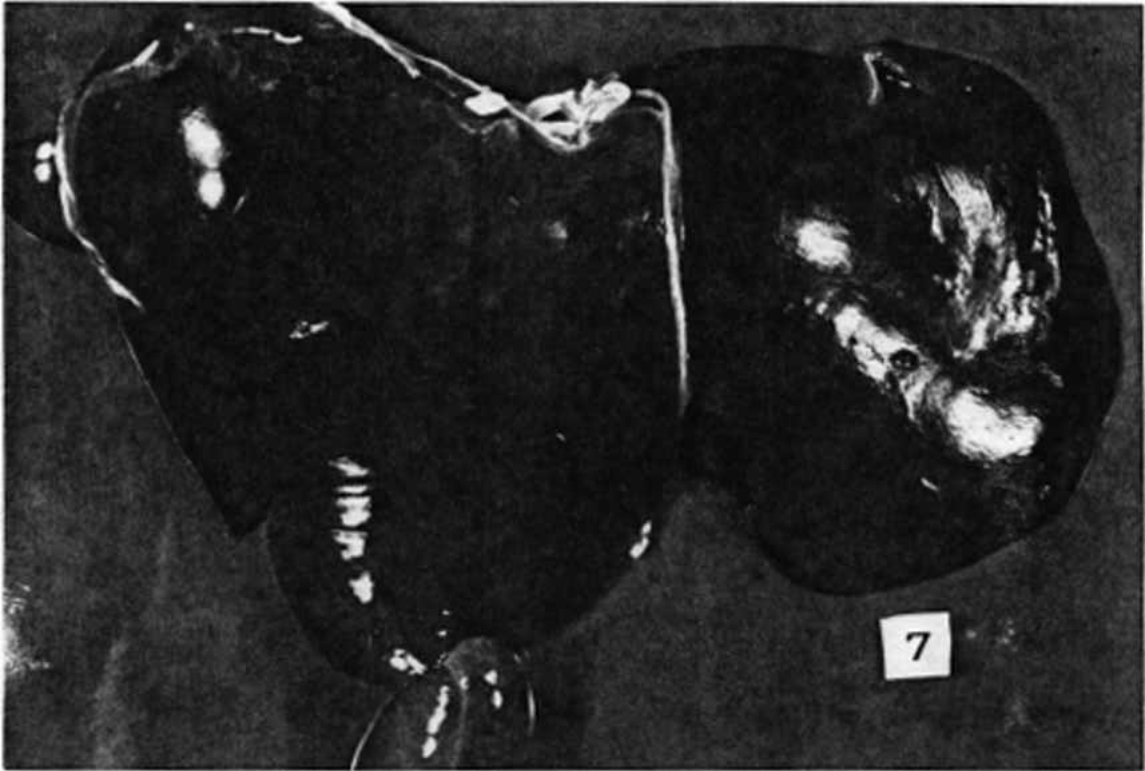


Figura 1.- Hígado. Cara diafragmática con áreas congestivas y pequeños focos necróticos.

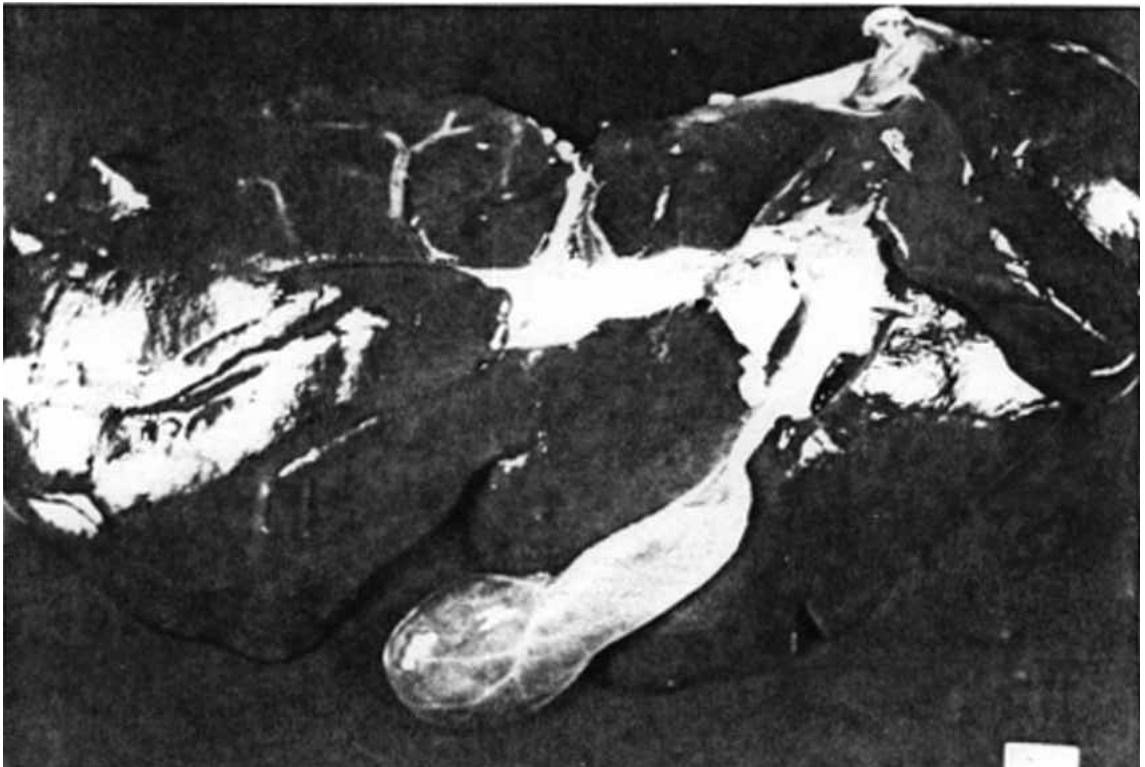


Figura 2.- Hígado. Escasos tractos blanquecinos en la cara visceral del lóbulo izquierdo.

Vesícula biliar

Aunque en 3 animales el contenido de la vesícula biliar era escaso, en el resto este órgano aparecía distendido, conteniendo abundante secreción verde-amarillenta y, en ocasiones, parásitos adultos.

Ganglios linfáticos hepáticos

Estos ganglios linfáticos, agrupados en la cisura portal, en las inmediaciones de la vena porta, arteria hepática y conducto biliar común, se encontraban aumentados de tamaño, pudiendo alcanzar dimensiones de 3,2 x 1,8 x 1,3 cm. Su consistencia era firme y a la sección, destacaban áreas foliculares blanquecinas en la corteza. La zona medular, en ocasiones, era de color marrón oscuro.

Principales diferencias observadas entre los corderos sacrificados a los 2 y 6 meses post-infección

En los animales sacrificados a los 6 meses p.i. fueron más evidentes la congestión focal y el aumento de consistencia hepática, así como las alteraciones de los conductos biliares, fundamentalmente un ligero engrosamiento de su pared y ectasia.

4.2.7.1.2.- Animales infectados con 3.000 metacercarias

Hígado

La superficie hepática, tanto en la cara parietal como visceral, presentaba en la mayoría de los corderos, áreas de aspecto congestivo, de color rojo oscuro, donde era perceptible el dibujo lobulillar. Otras zonas del parénquima destacaban por su tonalidad amarillenta y alternaban con otras de color normal, pardo claro (Fig. 1 de Lámina VI).

La consistencia se encontró aumentada en todos los hígados examinados, si bien en grado variable.

La presencia de focos amarillentos, circunscritos, de 1 a 7 mm de diámetro, dispersos por los diferentes lóbulos hepáticos fue un hallazgo común en todos los animales infectados. Sin embargo, en alguno de ellos estas lesiones hepáticas múltiples, que hacían relieve sobre la superficie, llegaron a alcanzar mayor tamaño (de 1,1 a 1,3 cm de diámetro) y se localizaban en la cara diafragmática de los lóbulos derecho e izquierdo, y en la visceral del lóbulo cuadrado (Fig. 2 de Lámina VI). A la sección, sobre material fijado, estos nódulos mayores presentaban una zona central necrótica, deprimida, de color ocre, claramente separada del parénquima hepático vecino por una franja blanquecina.

LÁMINA VI

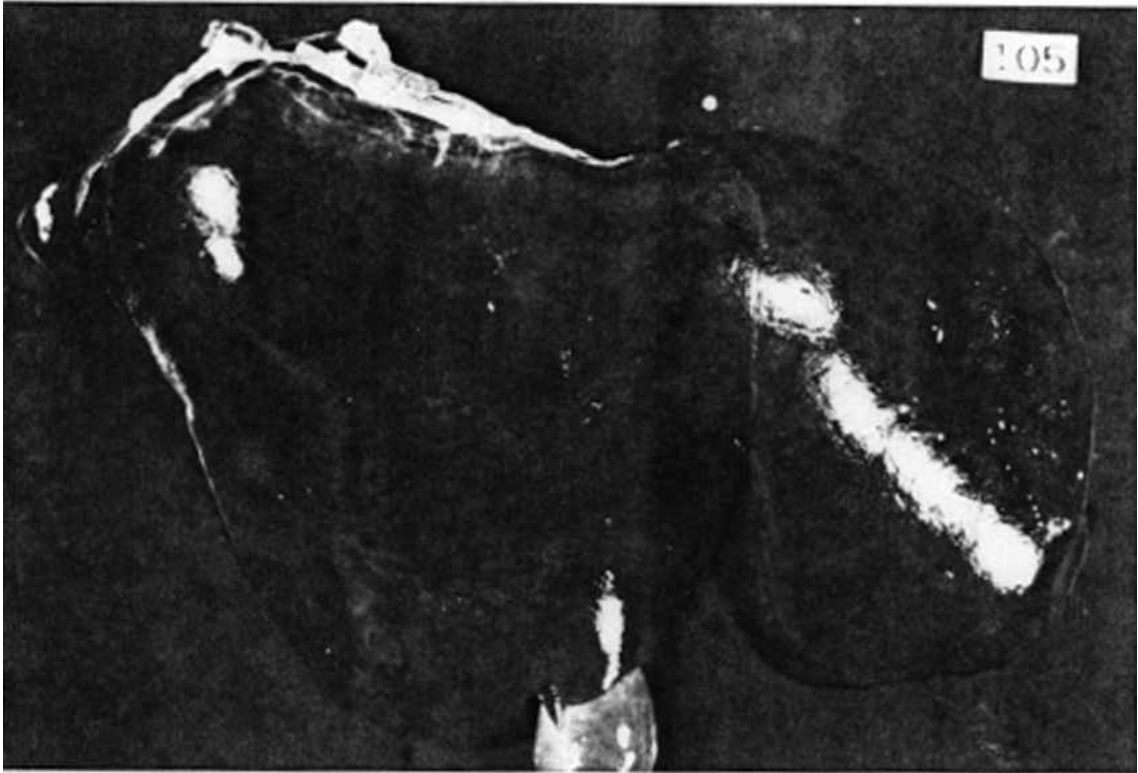


Figura 1.- Hígado en el que alternan zonas rojizas con áreas de color pardo en la cara diafragmática.

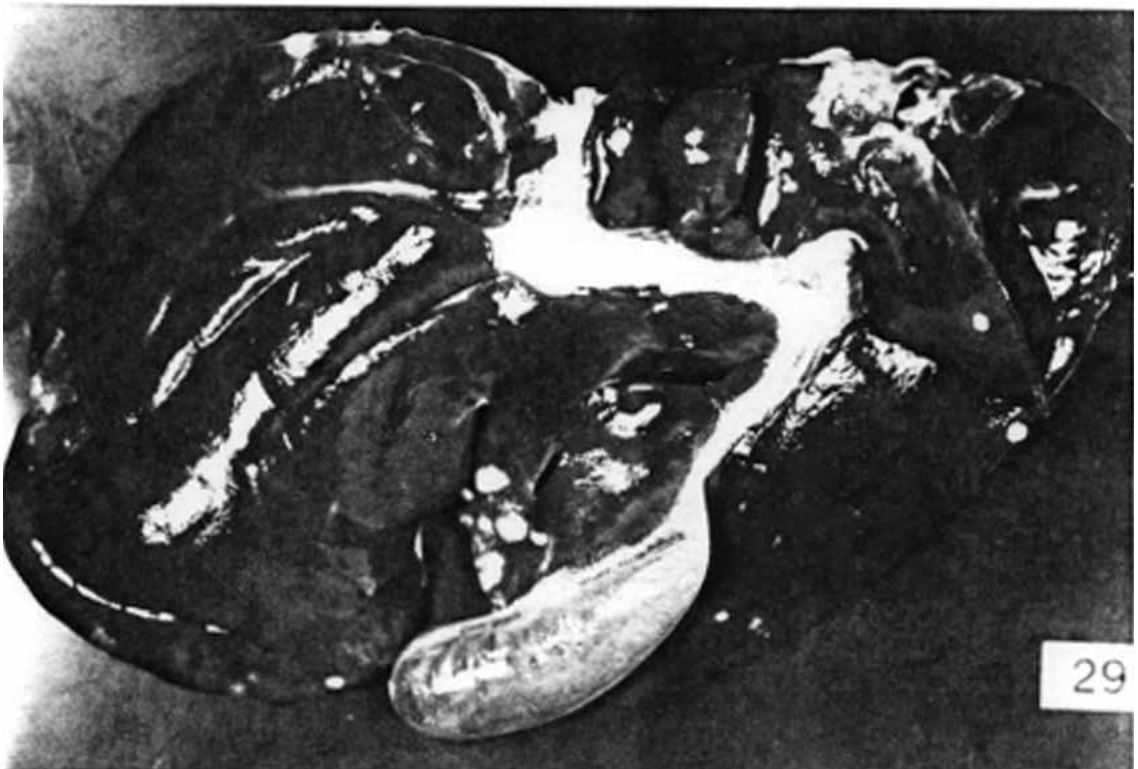


Figura 2.- Hígado. Nódulos amarillentos en la cara visceral, preferentemente en el lóbulo cuadrado y repleción de la vesícula biliar.

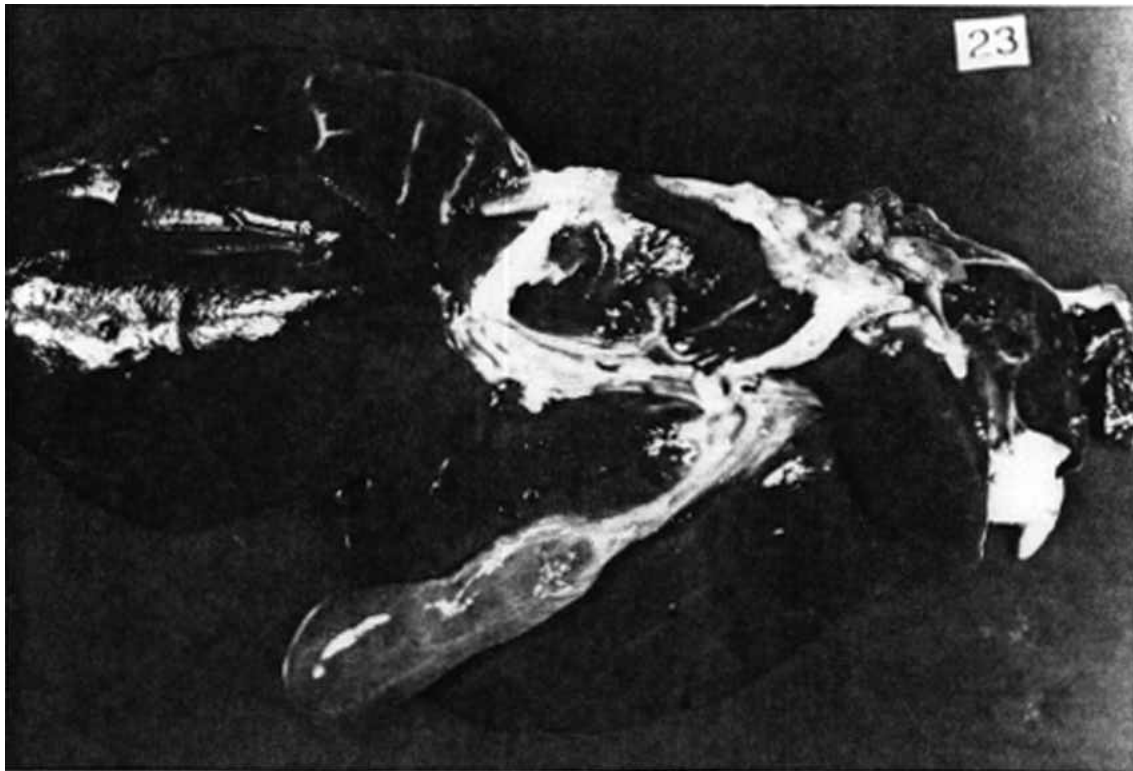


Figura 1.- Cordones blanquecinos en la cara visceral, más evidentes en el lóbulo hepático izquierdo.

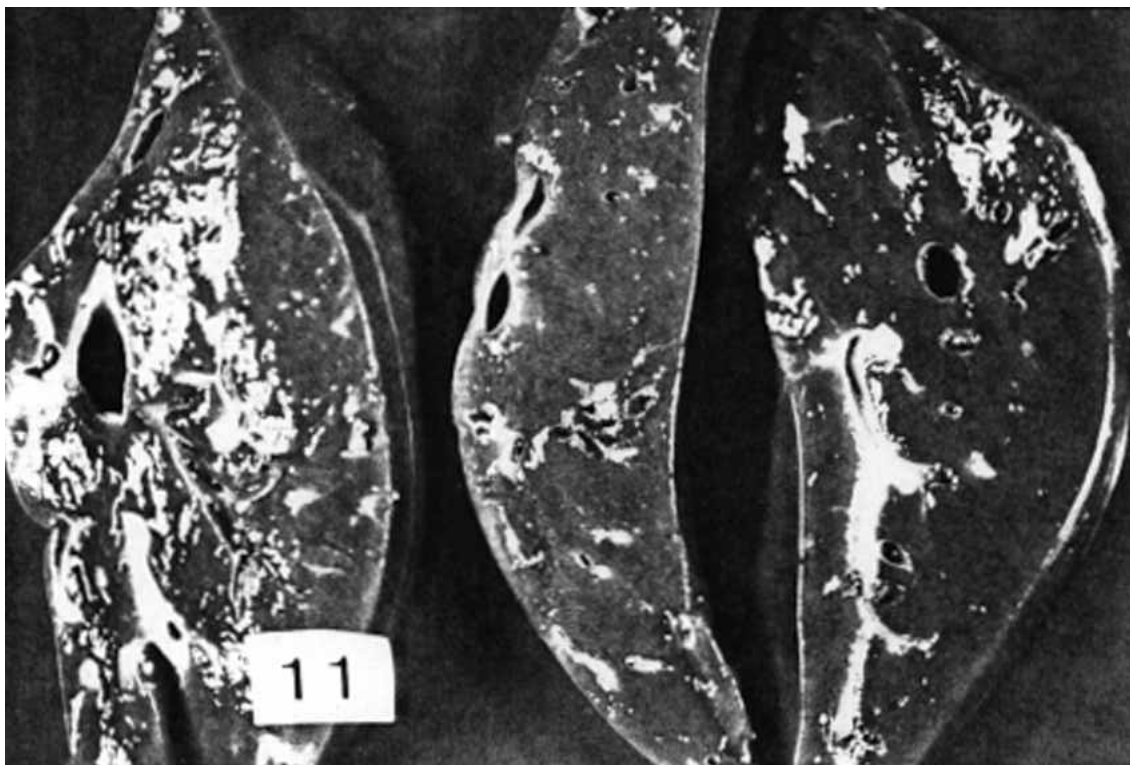


Figura 2.- Hígado. Superficie de sección mostrando vías biliares engrosadas y ectásicas.

Los tractos blanco-amarillentos aparecían tanto en la superficie parietal como visceral, en todos los lóbulos, si bien eran más numerosos en el izquierdo. Sus dimensiones más frecuentes fueron de 1 ó 2 cm de longitud y de 1 a 4 mm de grosor, pero alguno de mayor tamaño llegó a medir 4,5 cm x 0,3 cm.

Además de la presencia de nódulos y tractos dispuestos de forma difusa, la superficie del hígado mostraba pequeñas retracciones cicatriciales, muy visibles en los bordes de los lóbulos, que producían induración focal en este órgano. También se observaron pequeñas depresiones (de 2 a 5 mm de diámetro) y áreas arborescentes, amarillentas que, a veces, se localizaban próximas a los bordes hepáticos y que probablemente representan una malla de septos interlobulillares engrosados, típica de la hepatitis intersticial focal crónica. Finalmente, queremos destacar la existencia de algunos cordones blanquecinos, irregulares, sobre todo en la cara visceral, que a la sección, se correspondían con vías biliares ectásicas (Figs. 1-2 de Lámina VII).

En la superficie de corte se identificaron áreas de necrosis, duras, amarillentas, que podían alcanzar un tamaño de 1,3 x 0,7 cm y aparentemente encapsuladas. Asimismo, se observaron pequeños focos necróticos, con aspecto de nodulillos miliars. Los conductos biliares aparecían ectásicos, a pesar del aparente engrosamiento de su pared y, en ocasiones, taponados por un material amarillento y ennegrecidos por los parásitos (Fig 1 de Lámina VIII).

Vesícula biliar

Salvo en dos animales, en los cuales la vesícula biliar presentó un escaso contenido, en el resto se comprobó repleción de la misma, al contener abundante secreción verdosa, de aspecto denso, filante, además de parásitos (Fig. 2 de Lámina VI). Su superficie serosa era blanca, opaca y su pared aparecía engrosada. A la sección presentaba una mucosa lisa, brillante, ligeramente teñida de color amarillo claro por la secreción biliar.

Ganglios linfáticos hepáticos

En todos los animales examinados estos ganglios linfáticos eran grandes y de consistencia firme, pudiendo alcanzar dimensiones de 5,5 x 1,2 x 0,8 cm y de 7 x 1,5 x 0,5 cm, aunque fueron más habituales los tamaños en torno a 2,6 x 1,6 x 1,1 cm (Fig. 2 de Lámina VIII). En la superficie de corte destacaban áreas nodulares blanquecinas, en la zona cortical, de 1 x 0,5 cm las más amplias, probablemente debidas a una hiperplasia linfoide paracortical. La porción medular presentaba en general un color ocre, pero en ocasiones su tonalidad variaba de marrón oscura a negruzca.



Figura 1.- Hígado. Conductos biliares con un contenido amarillento y parásitos.

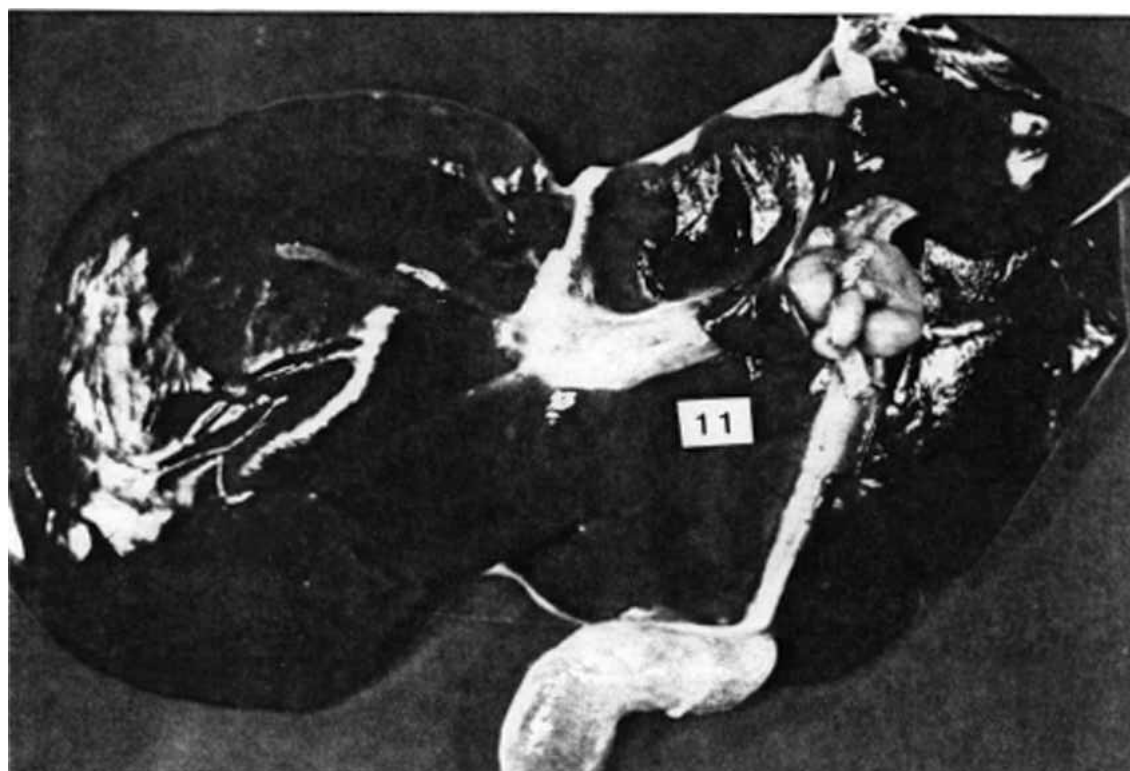


Figura 2.- Cisura portal. Ganglios linfáticos hepáticos aumentados de tamaño.

Principales diferencias observadas entre los corderos sacrificados a los 2 y 6 meses post-infección

Aunque los fenómenos congestivos se observaron en todos los animales infectados con 3.000 metacercarias de *D. dendriticum*, en aquellos sacrificados a los 6 meses p.i. la congestión pasiva afectaba a zonas más amplias del parénquima hepático. En los corderos sacrificados a los 2 meses p.i. fueron más numerosos los focos miliares sobre la superficie hepática, mientras que en aquellos examinados a los 6 meses p.i., eran más característicos los nódulos de mayor tamaño y consistencia dura. Además, en esta última fase, el hígado se encontraba claramente indurado y sobre su superficie, con preferencia en la cara visceral del lóbulo izquierdo, destacaban cordones blanquecinos que hacían discreto relieve y se correspondían con conductos biliares engrosados y ectásicos.

4.2.7.2.- Estudio estructural

4.2.7.2.1.- Animales infectados con 1.000 metacercarias y sacrificados a los 2 meses post-infección

Cápsula hepática

La cápsula hepática, constituida por tejido conjuntivo fibroso, no mostró alteraciones en los animales infectados de este grupo.

Parénquima hepático y sinusoides

En 4 de los 6 animales examinados (con 30, 70, 72 y 252 vermes), se comprobó degeneración vacuolar multifocal de los hepatocitos, los cuales aparecían globosos, con el citoplasma claro, ocupado por vacuolas de tamaño diverso, ópticamente vacías, que no comprimían al núcleo (Fig. 1 de Lámina IX). En algunas de estas células se formaban vacuolas confluentes que llegaban a desplazar al núcleo. Estos núcleos excéntricos, y a veces picnóticos, podían incluso llegar a faltar (degeneración hidrópica). Los hepatocitos degenerados mostraron tinción negativa con el sudán negro B para lípidos neutros y fosfolípidos, si bien algunas partes de su citoplasma se tiñeron ligeramente con el PAS. En los 2 corderos restantes (con 139 y 169 vermes) el parénquima hepático era prácticamente normal.

En los sinusoides fue constante la presencia de células inflamatorias (linfocitos, monocitos, eosinófilos), aisladas o formando pequeños acúmulos, en su luz (Fig. 2 de Lámina IX). En 2 corderos del grupo (con 139 y 169 vermes) se observó discreta congestión, acompañada de dilatación en otros 2 animales (con 70 y 72 vermes). En el resto, únicamente

existía ectasia sinusoidal. Las células de Kupffer eran prominentes y en algunas de ellas destacaba un contenido parduzco.

Espacio porta

En las áreas porta se observaron discretos infiltrados, constituidos por células redondas mononucleadas (linfocitos, macrófagos) y polimorfonucleares eosinófilos, si bien fueron más marcados en 2 animales con 70 y 72 vermes (Fig. 1 de Lámina X).

Las ramas de la vena porta presentaban pequeñas vacuolas, con distensión de sus fibras conjuntivo-musculares (edema) que se acompañaba de ectasia linfática (Fig. 2 de Lámina X). En general, en estos vasos distendidos, fue evidente la marginación de células blancas. También se observaron, en otros 2 animales (con 72 y 139 vermes), pequeñas soluciones de continuidad y descamación en el endotelio vascular.

Los conductos biliares interlobulillares, rodeados por linfocitos y eosinófilos, mostraron falta de polaridad y picnosis nuclear en sus células epiteliales (en 2 animales con 70 y 72 vermes) (Fig. 1 de Lámina X); en otras ocasiones, aparecieron dilatados, con el epitelio aplanado, en vez de cúbico simple, presentando soluciones de continuidad y células desprendidas en su luz, junto a un material amorfo acidófilo (en 2 animales).

Conductos biliares septales

Otros conductos biliares, en los cuales podían observarse hasta 3 secciones del parásito por conducto, aparecían ectásicos, con el epitelio aplanado y con picnosis nuclear (Fig. 1 de Lámina XI). En otras ocasiones, la ventosa de algunos de estos parásitos presionaba sobre la pared, lesionando el epitelio ductal (Fig. 2 de Lámina XI).

Simultáneamente con estos cambios degenerativos, existían conductos biliares septales, en todos los corderos del grupo, tapizados por un epitelio cilíndrico, hiperplásico y con abundantes pliegues.

Alrededor de estos conductos aparecían infiltrados difusos de linfocitos, macrófagos y eosinófilos. A veces, estas células inflamatorias aparecían en el seno del epitelio, próximos a leucocitos globulares y en la luz del conducto, junto a mucina y restos celulares.

Su pared mostraba engrosamiento fibroso (fibrosis periductal), identificándose fibras musculares lisas entre los fibroblastos y fibras colágenas. En conductos con fibrosis e infiltrados intensos se observó atrofia de los hepatocitos vecinos, los cuales presentaban forma alargada, incluso fusiforme, citoplasma acidófilo y núcleo hiper cromático (Fig. 1 de Lámina XI).

Atendiendo a las alteraciones señaladas, principalmente cambios degenerativos en el epitelio biliar, presencia de infiltrado inflamatorio crónico y fibrosis periductal, hemos considerado que se trata de una colangitis crónica.

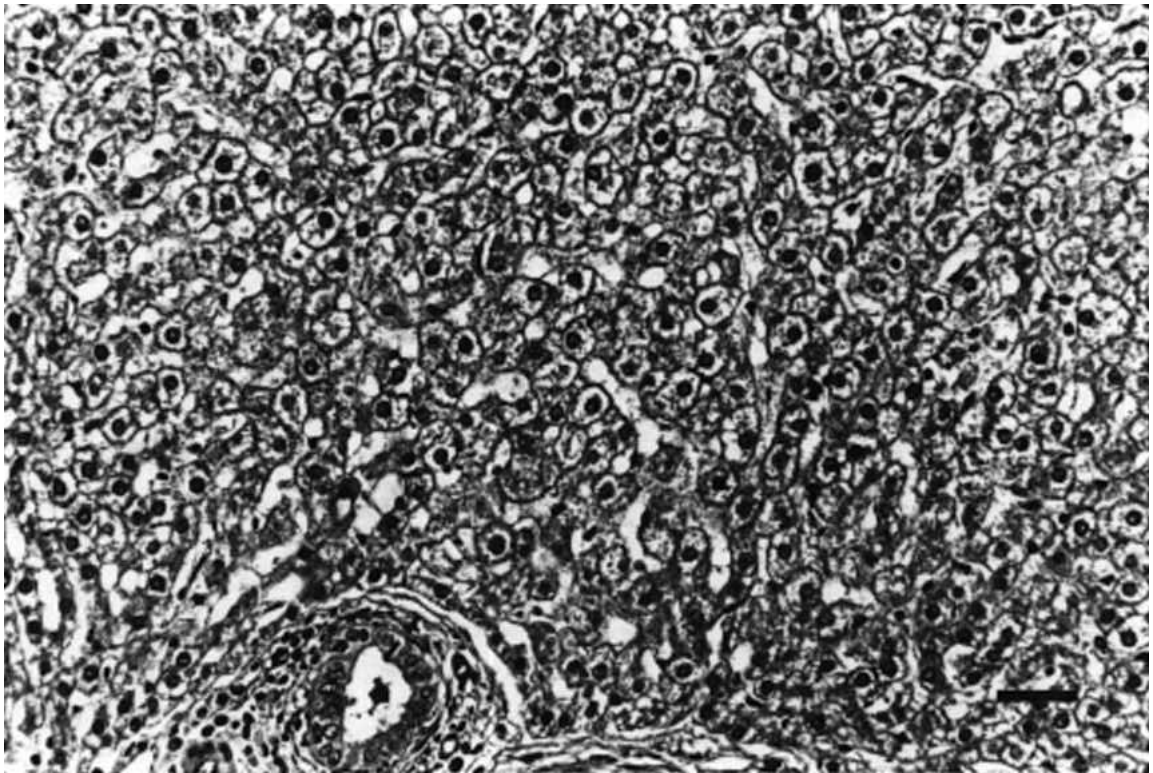


Figura 1.- Hepatocitos con degeneración vacuolar. H-E. Barra = 20 μ m.

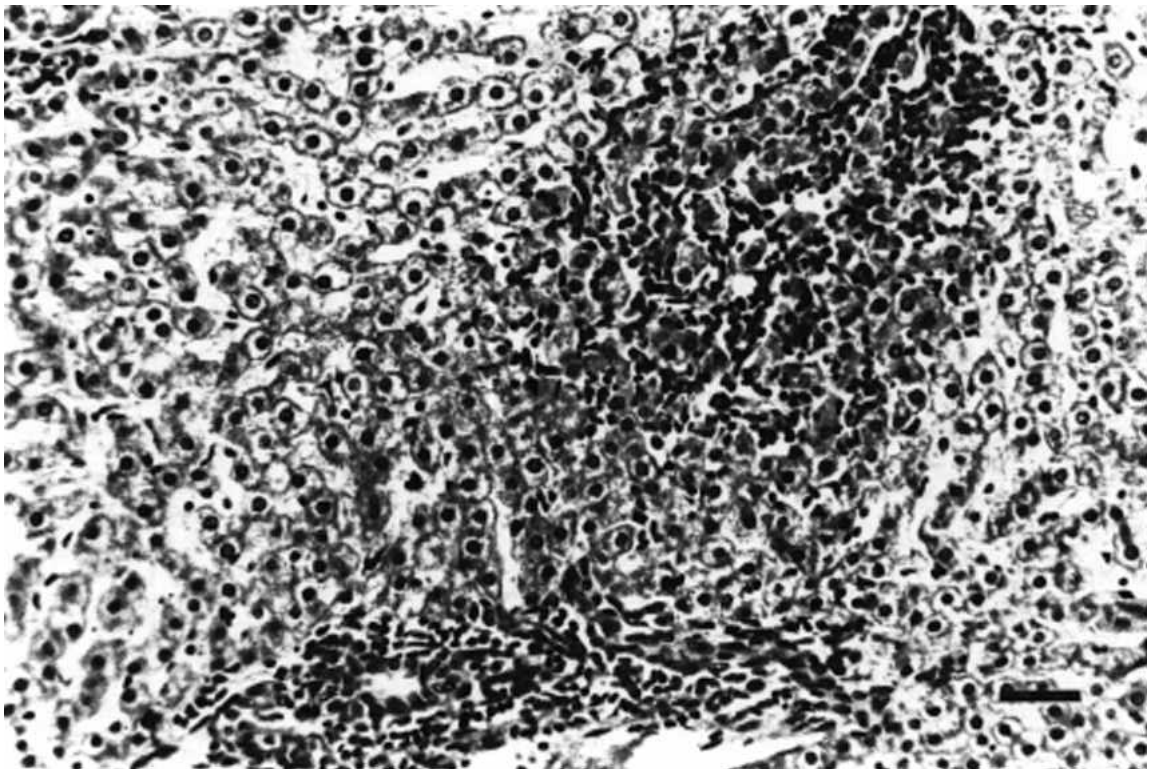


Figura 2.- Acúmulos focales de células inflamatorias en los sinusoides hepáticos. H-E. Barra = 200 μ m.

Granulomas

En 2 animales (con 139 y 252 vermes) destacaron intensos infiltrados subcapsulares de linfocitos, macrófagos y eosinófilos, que provocaron atrofia de las trabéculas hepáticas. En relación con estos infiltrados, destacaban pequeñas formaciones (2 y 5 en cada animal) constituidas por restos celulares (acidófilos y basófilos) rodeados por macrófagos, dispuestos en empalizada, y que se interpretaron como microgranulomas (hepatitis granulomatosa).

En el resto del grupo se observaron granulomas, con frecuencia subcapsulares, salvo en un animal (con 30 vermes), en el que fueron numerosos y aparecían también en zonas más profundas del parénquima. Dichos granulomas, que eran de diferentes tamaños, estaban constituidos por un núcleo central de necrosis (acidófilo), con frecuencia calcificado (basófilo), rodeado por macrófagos PAS+ y siempre por células gigantes multinucleadas. Externamente se disponían fibras conjuntivas y fibroblastos, a veces constituyendo una franja de tejido fibroso en los macrogranulomas (granuloma fibroso calcificado) y un infiltrado de linfocitos, formando en ocasiones folículos con centro secundario, además de células plasmáticas, pequeños acúmulos de macrófagos, algunos eosinófilos y células gigantes aisladas. En la periferia de alguno de estos granulomas, de gran tamaño, y en el seno del tejido conjuntivo se observaron pequeñas estructuras ductulares, tapizadas por un epitelio cúbico bajo (hiperplasia biliar o proliferación ductular).

Conducto hepático

El conducto hepático, localizado en el hilio, presentaba una mucosa con pliegues, tapizada por un epitelio cilíndrico alto, con células caliciformes, el cual aparecía hiperplásico y mostraba pequeñas soluciones de continuidad. La luz del conducto contenía pequeños acúmulos de células descamadas. En localización subepitelial, entre acinos secretores predominantemente mucosos (glándulas biliares), existía un infiltrado difuso de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y algunas células plasmáticas. Por fuera, los fibroblastos y fibras colágenas adoptaban una disposición concéntrica, formando una túnica externa, en la que se encontraban incluidos haces de fibras musculares lisas. Estas alteraciones eran compatibles con una colangitis crónica.

Vesícula biliar

Los pliegues mucosos se encontraban tapizados por un epitelio cilíndrico alto, cuyas células, con núcleo basal y protusión característica en su borde apical, presentaban pequeñas vacuolas claras en su citoplasma, que se tiñeron de rojo con el tricrómico de Masson-Goldner.

En 2 animales (con 30 y 70 vermes) este epitelio se encontró preservado en amplias zonas; en otras porciones aparecía desprendido e incluso llegaba a faltar. Sin embargo, en el resto de animales estudiados, existían amplias soluciones de continuidad en dicho epitelio. En

la lámina propia, de tejido conjuntivo laxo, destacaban escasos acinos secretores mucosos, tapizados por un epitelio simple cúbico.

Un hallazgo común en el grupo estudiado fue la existencia de edema y ectasia de vasos linfáticos en todas las capas de este órgano (lámina propia de la mucosa, muscular, perimuscular y serosa). Las fibras conjuntivas y musculares lisas se encontraban separadas por espacios claros, debido a la presencia en exceso de líquido extravascular.

Ganglios linfáticos hepáticos

Microscópicamente en los ganglios linfáticos hepáticos de todos los animales se observó proliferación de los nódulos linfoides de la corteza, provistos o no de centros secundarios o reaccionales (hiperplasia linfoide). Asimismo, existía edema local, particularmente visible en el tejido conjuntivo perivascular, y presencia focal de glóbulos rojos en los senos medulares. Aunque en general se observaron pequeñas agrupaciones de macrófagos, en uno de los corderos (con 70 vermes) destacó una clara proliferación de células reticulares (histiocitosis sinusal), que llegó, incluso, a ocluir los senos. En este animal, y en relación con la cápsula de un ganglio linfático, se observó la sección de un vaso linfático aferente, el cual contenía abundantes macrófagos y linfocitos retenidos en mallas de fibrina (trombosis por coagulación).

4.2.7.2.2.- Animales infectados con 1.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses post-infección

Cápsula hepática

En este grupo, de 6 animales, se comprobó engrosamiento de la cápsula hepática en 2 de ellos (con 313 y 437 vermes). Dicha cápsula se mantenía unida, mediante tejido fibroso, a los espacios porta superficiales.

Parénquima hepático y sinusoides

Las células hepáticas en 2 animales (con 68 y 437 vermes) mostraron degeneración vacuolar e hidrópica, multifocal, muy evidente, por ejemplo, en hepatocitos próximos a una vena que contenía el parásito. El citoplasma de algunos hepatocitos, sobre todo de localización periportal, se tiñó positivamente de color negruzco con la técnica de plata metenamina. Asimismo, en el parénquima destacaron acúmulos de linfocitos, semejantes a folículos, delimitados por fibras colágenas y otros infiltrados, nodulares o difusos, de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas que comprimían y enmascaraban las hileras de hepatocitos e, incluso, provocaban la desestructuración de los lobulillos (en 3 animales con 68, 327 y 437 vermes).

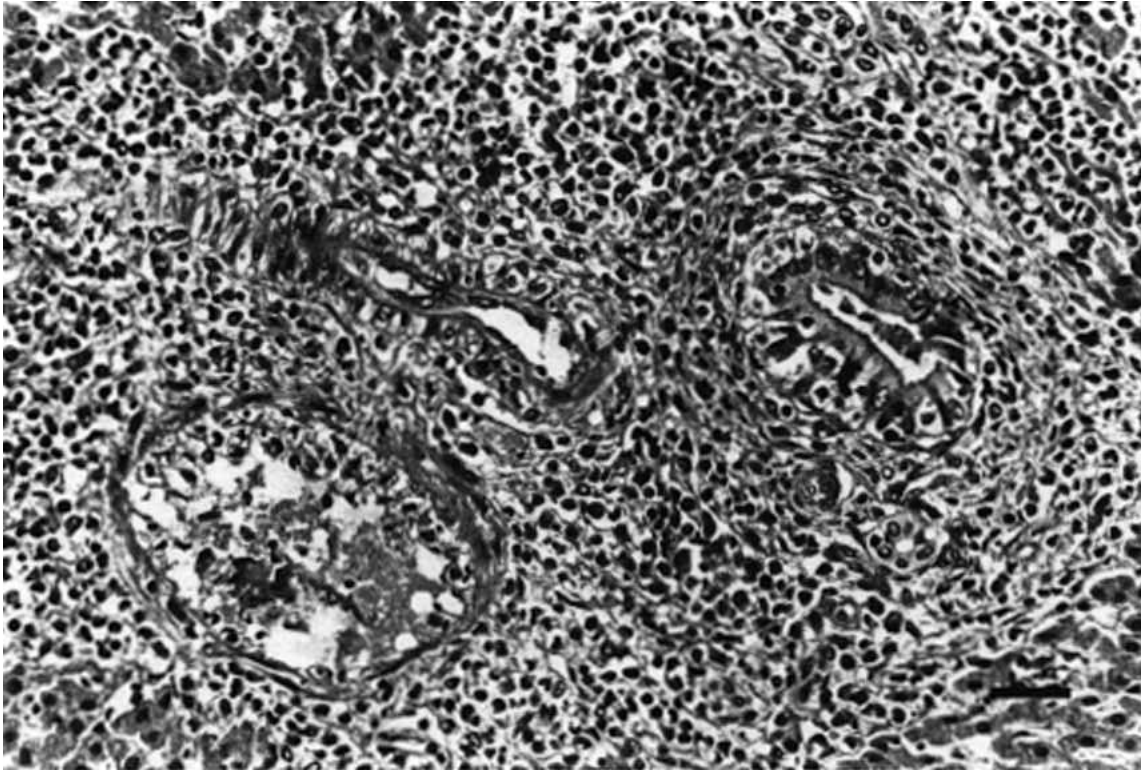


Figura 1.- Espacio porta. Presencia de abundantes eosinófilos, macrófagos y linfocitos. Picnosis nuclear en las células epiteliales del conducto biliar interlobulillar. H.E. Barra = 200 μ m.

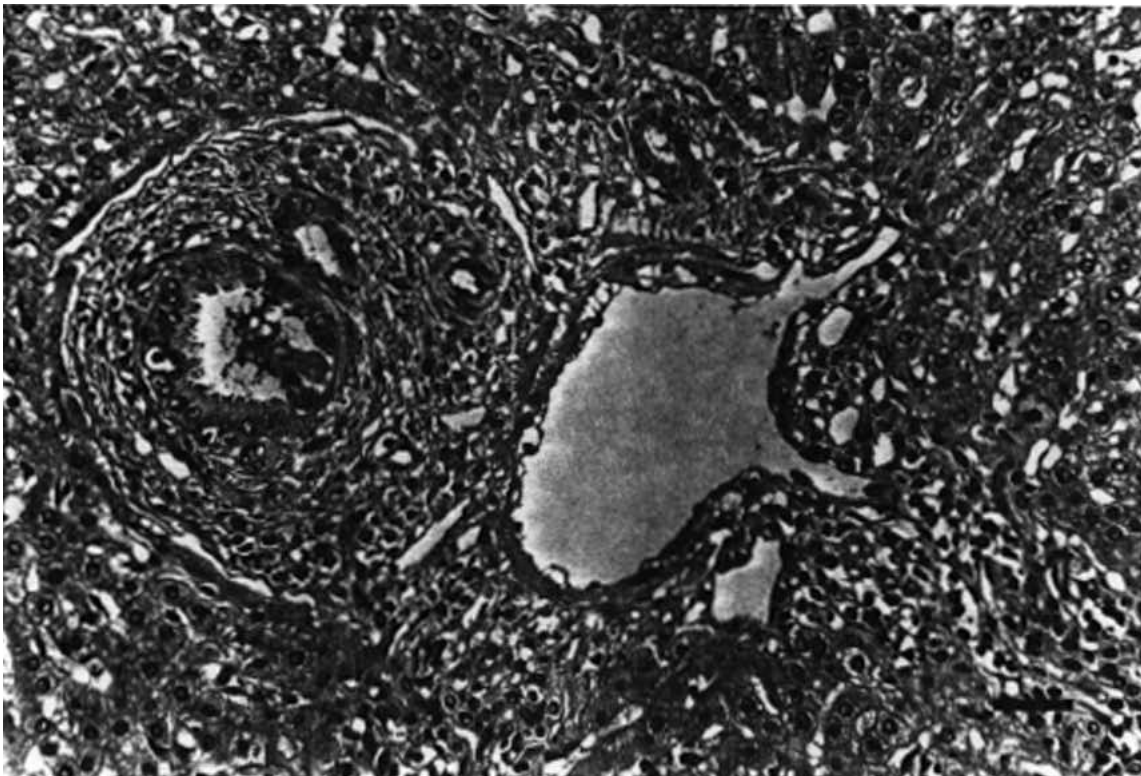


Figura 2.- Rama de la vena porta con vacuolización del endotelio. H-E. Barra = 200 μ m.

Los sinusoides aparecían ectásicos, si bien, en ocasiones, esta dilatación focal era muy acusada y se observaban amplios espacios, ópticamente vacíos, que llegaban a provocar atrofia hepatocítica (en 2 animales con 68 y 292 vermes). Además, se comprobó discreta congestión sinusoidal (Fig. 1 de Lámina XII) y presencia de leucocitos (linfocitos, eosinófilos), en hilera o formando pequeños agregados, en la luz del sinusoides. Las células de Kupffer, localizadas en relación con estos capilares, fueron muy evidentes.

Espacio porta

En las áreas porta fueron constantes los infiltrados de células inflamatorias (linfocitos, eosinófilos, macrófagos, células plasmáticas) que se extendían, en ocasiones, a otras zonas del parénquima (hepatitis portal y periportal).

En 3 animales, en los cuales se recuperó un mayor número de parásitos adultos (327, 420 y 437 vermes), se observó fibrosis portal, que se extendía a los septos (fibrosis septal) (Fig. 2 de Lámina XII) e, incluso, al parénquima, identificándose fibras colágenas próximas a los sinusoides (fibrosis perisinusoidal) (Fig. 1 de Lámina XIII) y a la vena central (fibrosis centrolobulillar).

Las ramas de la vena porta mostraron congestión (en 3 animales con 68, 292 y 313 vermes); otras venas de mayor calibre y las centrales, además de glóbulos rojos contenían células blancas, junto a un material amorfo acidófilo. Asimismo, en la luz de una vena septal se observaron las secciones de 2 parásitos, al tiempo que hepatocitos descamados, células blancas y material amorfo.

En los conductos biliares interlobulillares se comprobó discreta picnosis nuclear en su epitelio de revestimiento, así como descamación celular y la presencia de una sustancia acidófila en su luz.

Conductos biliares septales

En los pequeños conductos biliares septales las células epiteliales de revestimiento mostraron positividad, en su polo apical, a la plata metenamina y al azul alcian, al igual que las células caliciformes, intercaladas entre ellas (Fig. 2 de Lámina XIII). La secreción de estas células, aumentada en relación con los testigos, se observó igualmente en la luz del conducto. Además, se comprobaron alteraciones degenerativas en algunas células ductales, tales como picnosis nuclear y descamación celular. Otros conductos aparecían ectásicos, tapizados por un epitelio aplanado, en vez de cilíndrico simple. Un hallazgo común en muchos de ellos fue la presencia de linfocitos y leucocitos globulares intraepiteliales (Fig. 1 de Lámina XIV).

Las alteraciones observadas en las vías biliares septales de mayor calibre, compatibles con una colangitis crónica, fueron similares a las descritas para el grupo anterior, es decir: soluciones de continuidad e incluso necrosis epitelial, preservándose únicamente los pliegues mucosos; hiperplasia epitelial; intensa descamación celular, visible en la luz del conducto junto a un material amorfo, células inflamatorias, huevos y secciones del parásito; presencia de abundantes leucocitos globulares en relación con el epitelio biliar; infiltrados nodulares o difusos de linfocitos, macrófagos y eosinófilos en la pared del conducto; fibrosis periductal y, en ocasiones, atrofia del parénquima hepático adyacente.

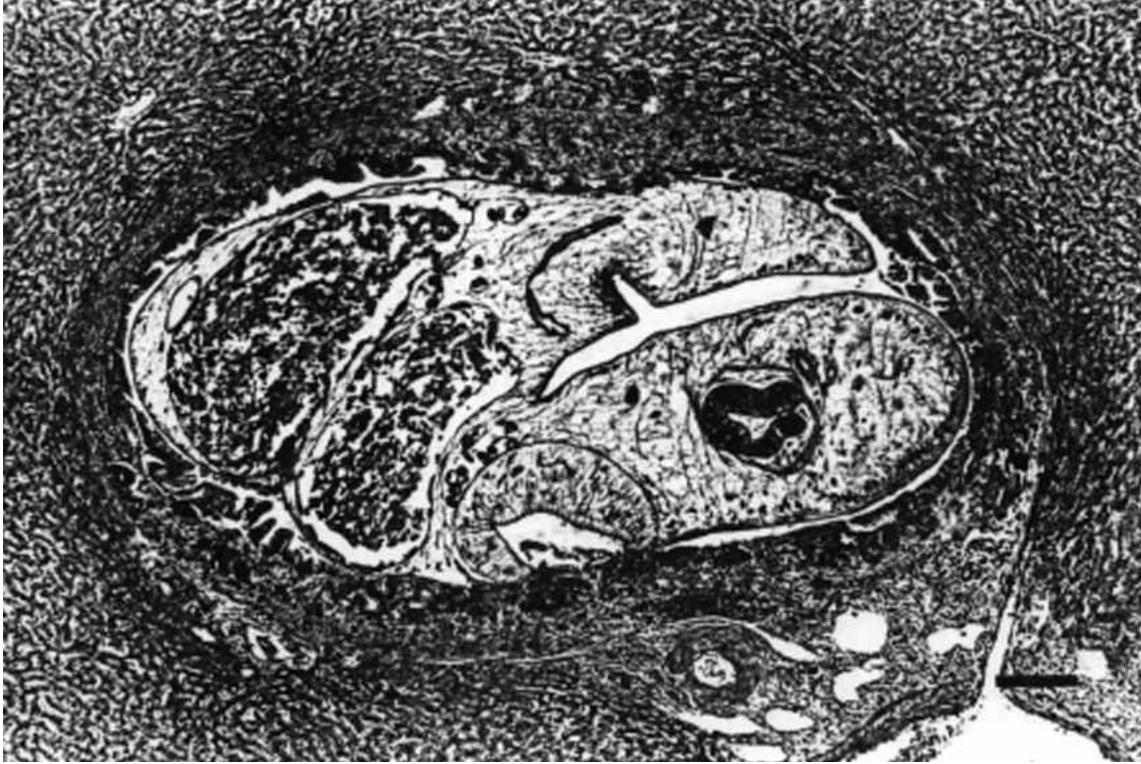


Figura 1.- Conducto biliar septal ectásico. Sección del parásito y necrosis del epitelio de revestimiento. Atrofia del parénquima hepático adyacente. H.E. Barra = 800 μ m.

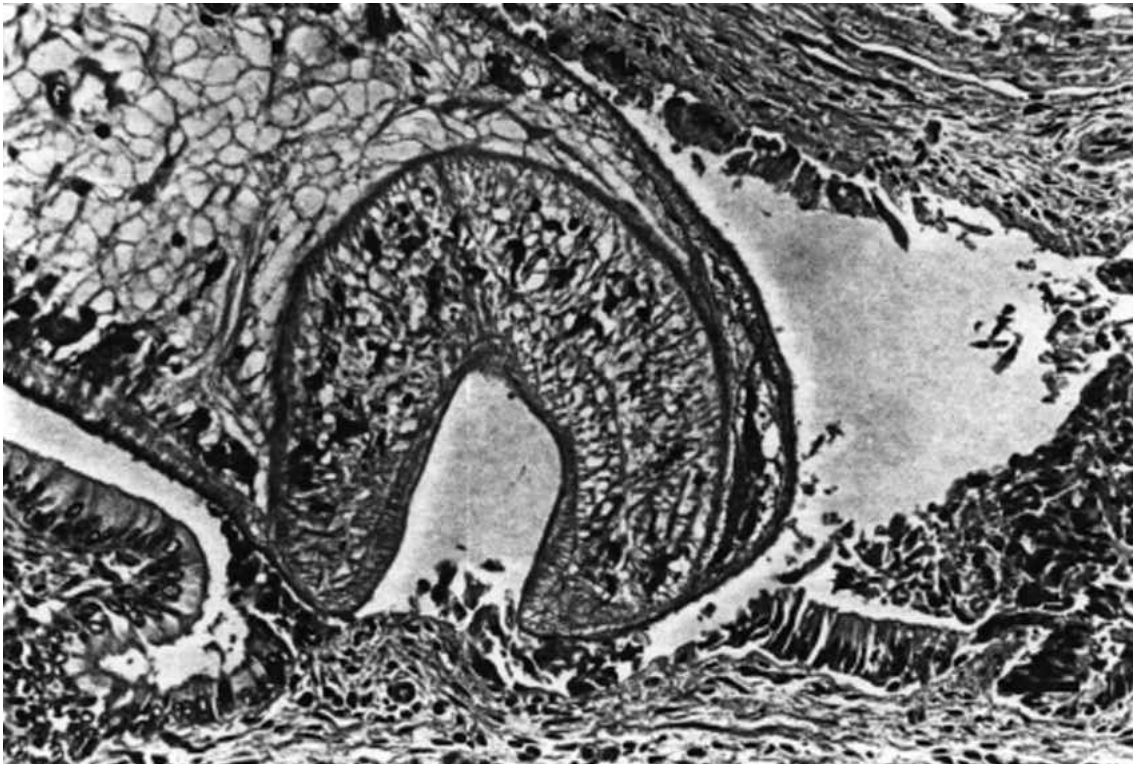


Figura 2.- Efecto erosivo de la ventosa del parásito sobre el epitelio de revestimiento ductal. H-E. Barra = 200 μ m.

Granulomas

Excepto en un animal (con 313 vermes), en el resto se identificaron granulomas, generalmente calcificados (hepatitis granulomatosa). Concretamente, en el cordero del que se recuperaron más parásitos (437), se observaron granulomas múltiples en distintas fases de evolución. Estas reacciones granulomatosas se localizaban en los espacios porta (Fig. 2 de Lámina XIV) o bien próximas a conductos biliares septales (Fig. 1 de Lámina XV) y áreas subcapsulares. Las células gigantes, muy voluminosas, presentaban múltiples núcleos, periféricos o dispersos, en la masa citoplasmática (Fig. 2 de Lámina XV).

Conducto hepático

El conducto excretor del hígado aparecía dilatado, con abundantes células descamadas en la luz. En la mucosa se comprobó necrosis prácticamente total del epitelio, respetándose sólo algunos segmentos del mismo, donde podían identificarse leucocitos globulares. En las glándulas de la lámina propia también se comprobó destrucción, principalmente en las unidades secretoras más superficiales. En esta localización, se observaron abundantes células inflamatorias, sobre todo macrófagos y linfocitos, estos últimos formando nódulos con centro germinal pálido, constituido por grandes linfocitos y macrófagos. Externamente, las fibras colágenas, de aspecto hialinizado, formaban una gruesa capa alrededor del conducto, junto con haces de fibras musculares lisas (fibrosis periductal).

Hemos considerado que estas modificaciones estructurales son compatibles con una colangitis crónica.

Vesícula biliar

Como en el grupo anterior, las alteraciones observadas consistieron en necrosis epitelial, que afectó a amplias zonas de la mucosa, presencia de infiltrados subepiteliales difusos de linfocitos y edema inflamatorio en las diferentes capas.

Ganglios linfáticos hepáticos

En las secciones correspondientes a distintos ganglios linfáticos hepáticos, hay que destacar la presencia de numerosos nódulos linfoides con centros germinales, rodeados por una zona, más o menos amplia, de linfocitos maduros (hiperplasia linfoide).

4.2.7.2.3.- Animales infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 2 meses.

Cápsula hepática

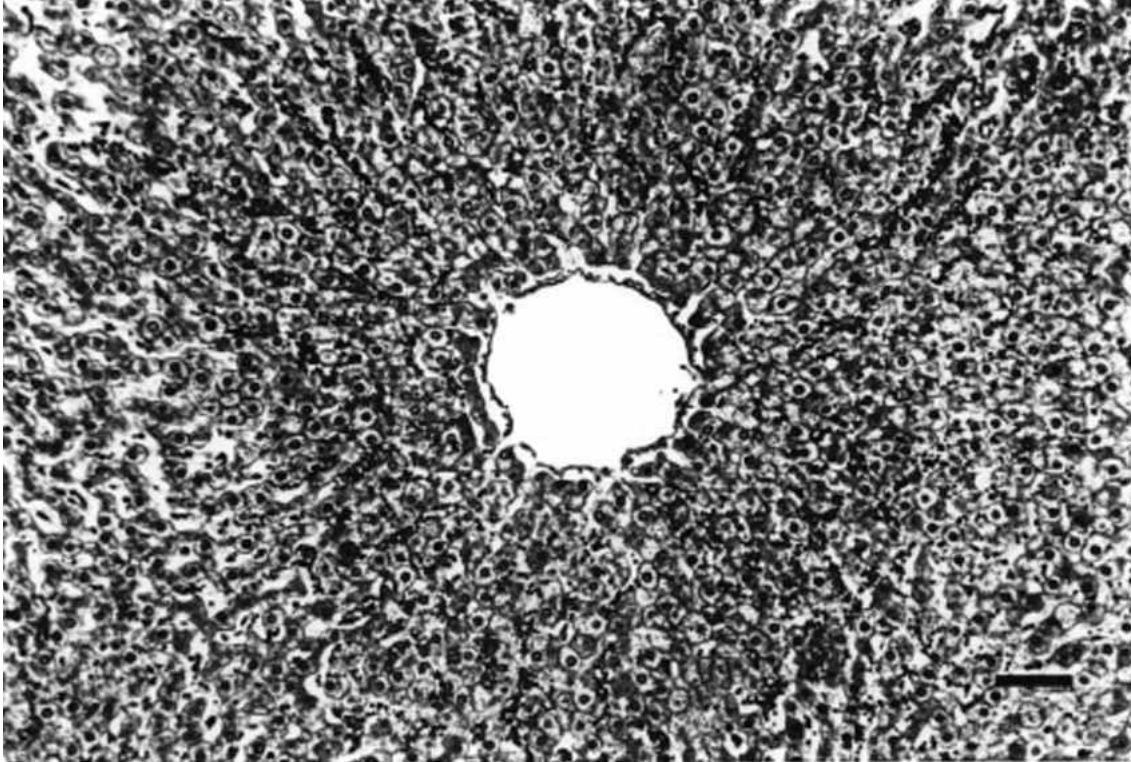


Figura 1.- Congestión de los sinusoides en localización centrolobulillar. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 325 μm .

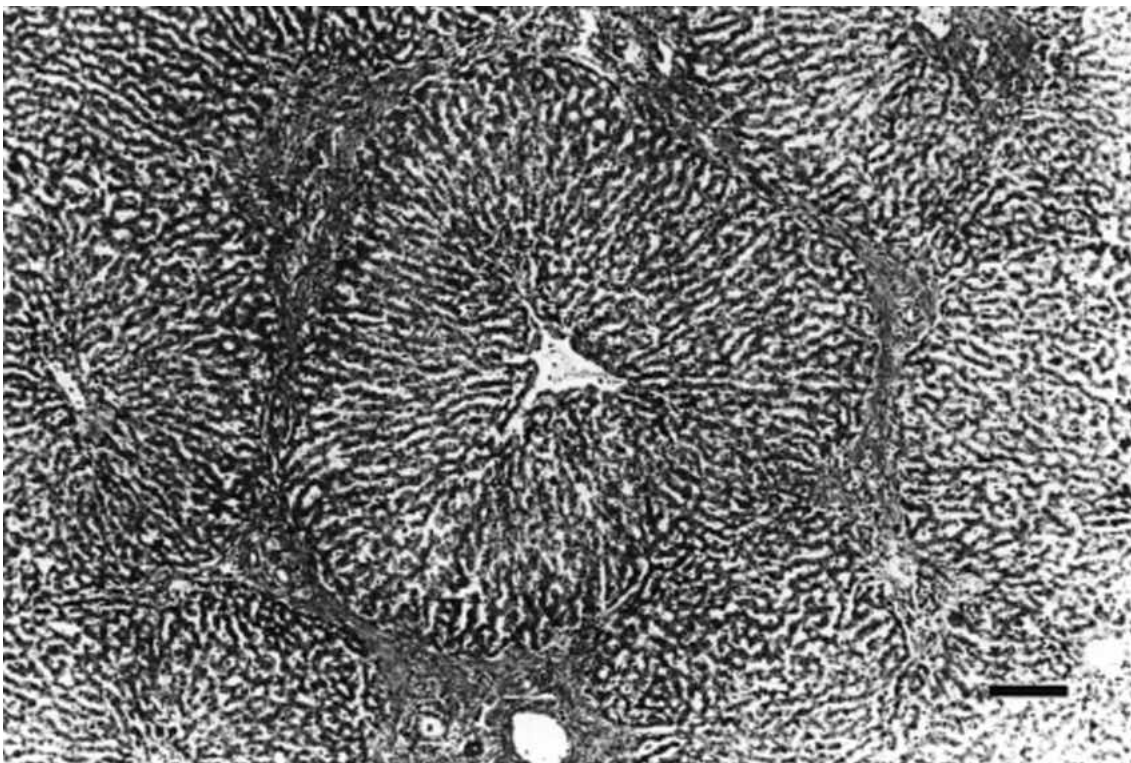


Figura 2.- Fibrosis portal y septal. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 800 μm .

La cápsula hepática se encontró engrosada en 2 animales (con 251 y 570 vermes) de los 6 que constituyen el grupo, y a veces, infiltrada de células inflamatorias.

Parénquima hepático y sinusoides

En las células hepáticas se comprobó degeneración vacuolar multifocal (en 4 animales con 251, 293, 341 y 570 vermes). Sin embargo, en el cordero del que más vermes adultos se recuperaron (570), los hepatocitos en amplias zonas del parénquima mostraban vacuolas de gran tamaño, que desplazaban al núcleo (degeneración hidrópica multifocal). En ocasiones, este proceso degenerativo se observó en células próximas a granulomas, donde, además, eran evidentes los fenómenos de atrofia hepatocítica y de desorganización del parénquima (en un animal con 293 vermes).

Los hepatocitos, de localización preferentemente periportal, presentaban un citoplasma teñido positivamente con plata metenamina (Figs. 1-2 de Lámina XVI). En el animal en el que el recuento de vermes adultos fue mayor, la práctica totalidad de estas células aparecían teñidas de color negro. En este último caso, la distribución no sólo fue periportal sino centrolobulillar, siendo negativos los hepatocitos con degeneración vacuolar.

En todos los animales estudiados de este grupo se comprobó ectasia sinusoidal acompañada de congestión focal (Fig. 2 de Lámina XVII) y presencia de linfocitos y eosinófilos, a veces formando pequeños acúmulos (infiltrado parenquimatoso focal). Las células sinusoidales y de Kupffer eran prominentes. Estas últimas presentaban gránulos citoplasmáticos, claramente visibles en cortes semifinos.

Espacio porta

En todos los corderos se observó una marcada hepatitis portal (Fig. 1 de Lámina XVII). A veces, el infiltrado de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas se extendía al parénquima adyacente (hepatitis periportal). En los macrófagos se identificó la presencia de un pigmento pardo (en un animal con 293 vermes). Asimismo, se comprobó intensa fibrosis portal y septal (en 3 animales con 139, 251 y 293 vermes), pudiéndose, incluso, identificar fibras colágenas en el parénquima en uno de estos animales. En el seno del estroma fibroso, portal y septal, se observó proliferación de estructuras ductulares biliares, prominente en un animal (hiperplasia biliar) (Fig. 1 de Lámina XVII).

Por lo que se refiere a las alteraciones vasculares, éstas fueron más acusadas que en los grupos anteriores, comprobándose linfangiectasia y flebectasia. Algunas secciones venosas, además de abundantes eritrocitos (congestión), mostraban glóbulos blancos y hepatocitos en la luz, en el seno de un material amorfo acidófilo. Asimismo, se comprobó vacuolización y descamación endotelial e hipertrofia de la pared venosa (en 3 animales con 139, 251 y 341 vermes) (Fig. 1 de Lámina XVII).

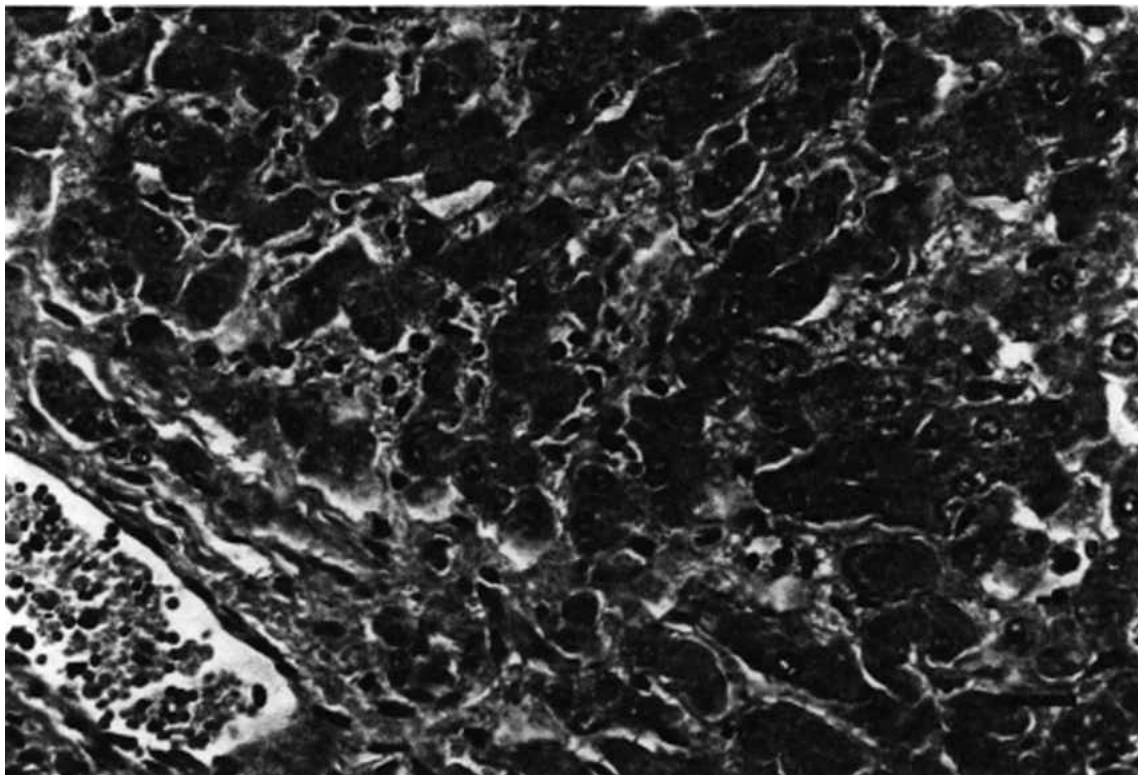


Figura 1.- Fibrosis perisinusoidal. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 125 μ m.

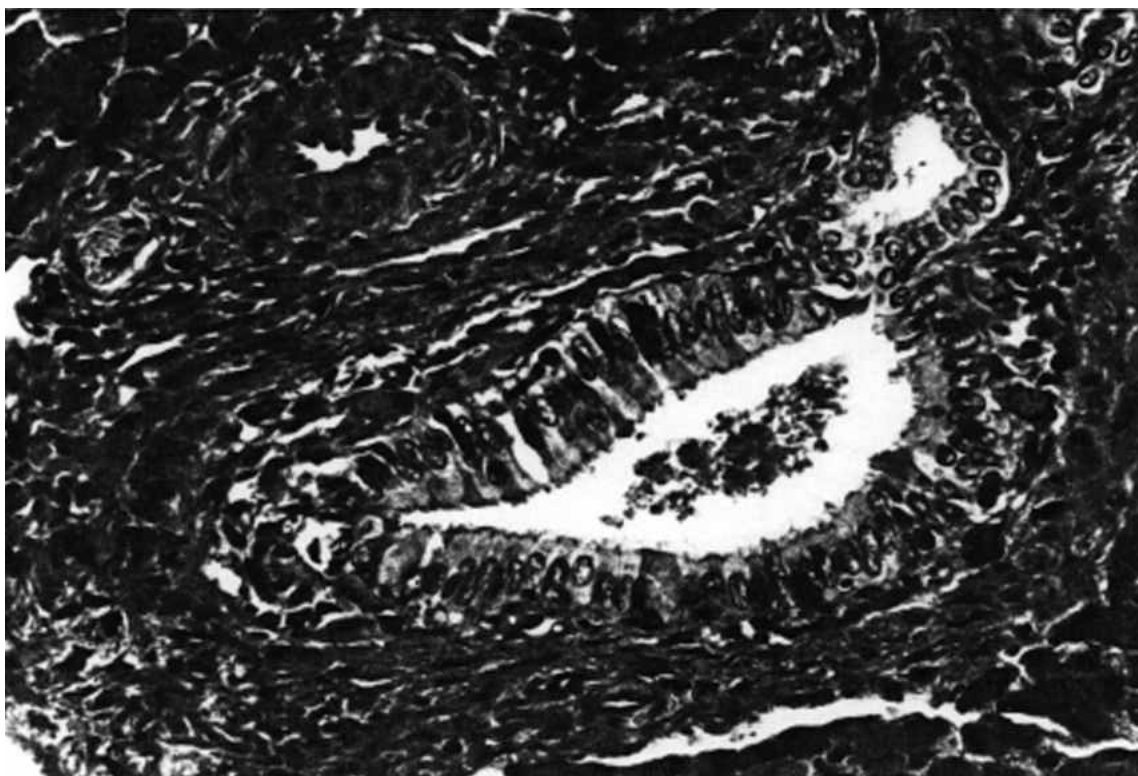


Figura 2.- Conducto biliar interlobulillar desembocando en un pequeño conducto biliar septal con células caliciformes. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 125 μ m.

Las modificaciones observadas en los conductos biliares interlobulillares fueron similares a las descritas en los dos grupos anteriores. En todos los animales del grupo se comprobó picnosis, vacuolización y descamación de células epiteliales aisladas, y finalmente, presencia de contenido amorfo en la luz. Asimismo, se identificaron leucocitos globulares intraepiteliales (en un animal con 341 vermes).

Conductos biliares septales

Tanto en los conductos biliares septales de menor calibre como en los grandes conductos, se comprobó una intensa hiperplasia epitelial. El epitelio, cilíndrico alto, formaba a veces proyecciones (hiperplasia papilar) que daban a la luz un aspecto estrellado en los pequeños conductos; sin embargo, los grandes presentaban profundos y numerosos pliegues.

Además de los fenómenos de vacuolización, que fueron prácticamente constantes en el polo basal de estas células, hay que señalar otras alteraciones ya descritas como picnosis nuclear, erosión en tramos, más o menos amplios, del epitelio (a veces total, preservándose sólo los pliegues) y descamación celular.

Asimismo, se identificaron células calciformes en pequeños conductos biliares septales, siendo abundantes en los de mayor calibre. La secreción procedente de estas glándulas unicelulares y de las células de revestimiento, se incrementó y fue positiva al PAS, azul alcian y plata metenamina (Fig. 2 de Lámina XVI).

Los leucocitos globulares, subepiteliales e intraepiteliales, fueron numerosos en relación con estos conductos (Fig. 2 de Lámina XVII), y en su pared, destacó un intenso infiltrado difuso, fundamentalmente de linfocitos y eosinófilos, además de macrófagos y células plasmáticas. En ocasiones, los linfocitos formaban verdaderos agregados de aspecto folicular (colangitis crónica).

Los fibroblastos, fibras conjuntivas y fibras musculares lisas (estas últimas sólo en grandes conductos) se disponían formando una amplia franja alrededor del conducto (hiperplasia conjuntivo-muscular) (Fig. 1 de Lámina XVI y Fig. 2 de Lámina XVII). En sus proximidades se observó ectasia linfática y venosa, así como un engrosamiento de la pared en grandes venas.

La luz de estos conductos estaba ocupada por secreción, células descamadas y gránulos acidófilos (procedentes de la degranulación de leucocitos globulares). En los grandes conductos podían observarse también huevos y secciones del parásito. En algunas secciones, se pudo comprobar cómo la ventosa del parásito lesionaba mecánicamente la mucosa ductal.

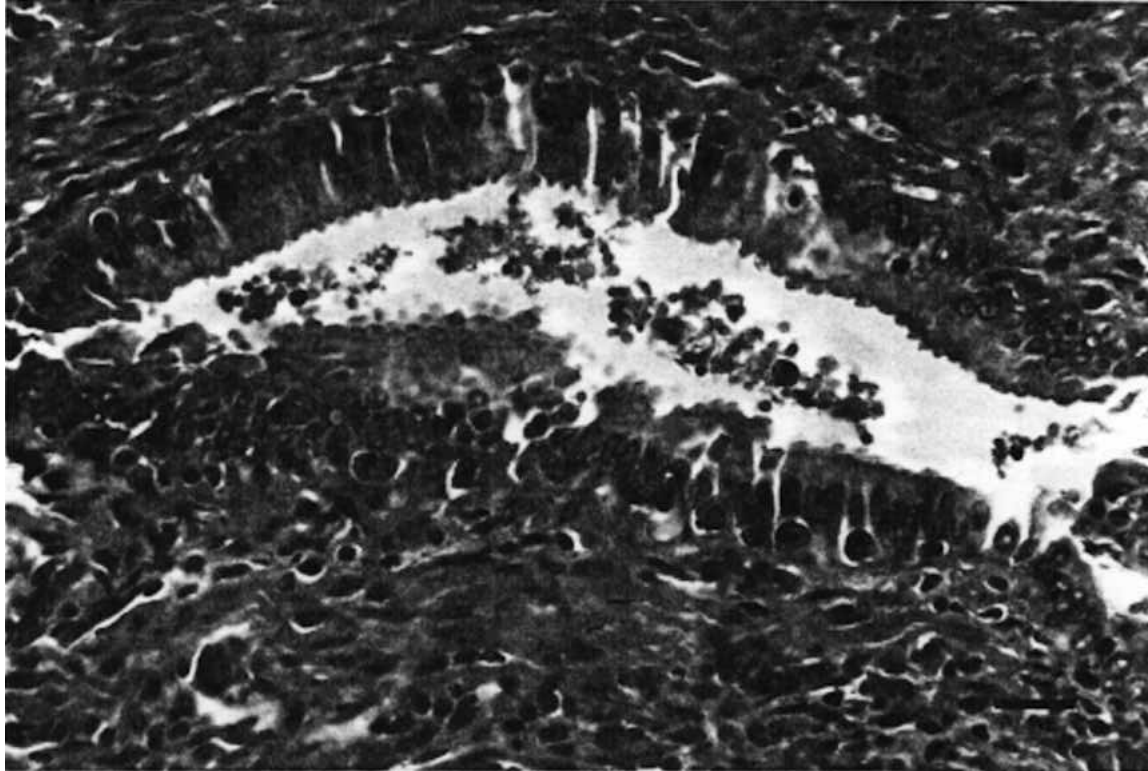


Figura 1.- Conducto biliar septal con abundantes leucocitos globulares. Tricómico de Masson-Goldner. Barra = 125 μ m.

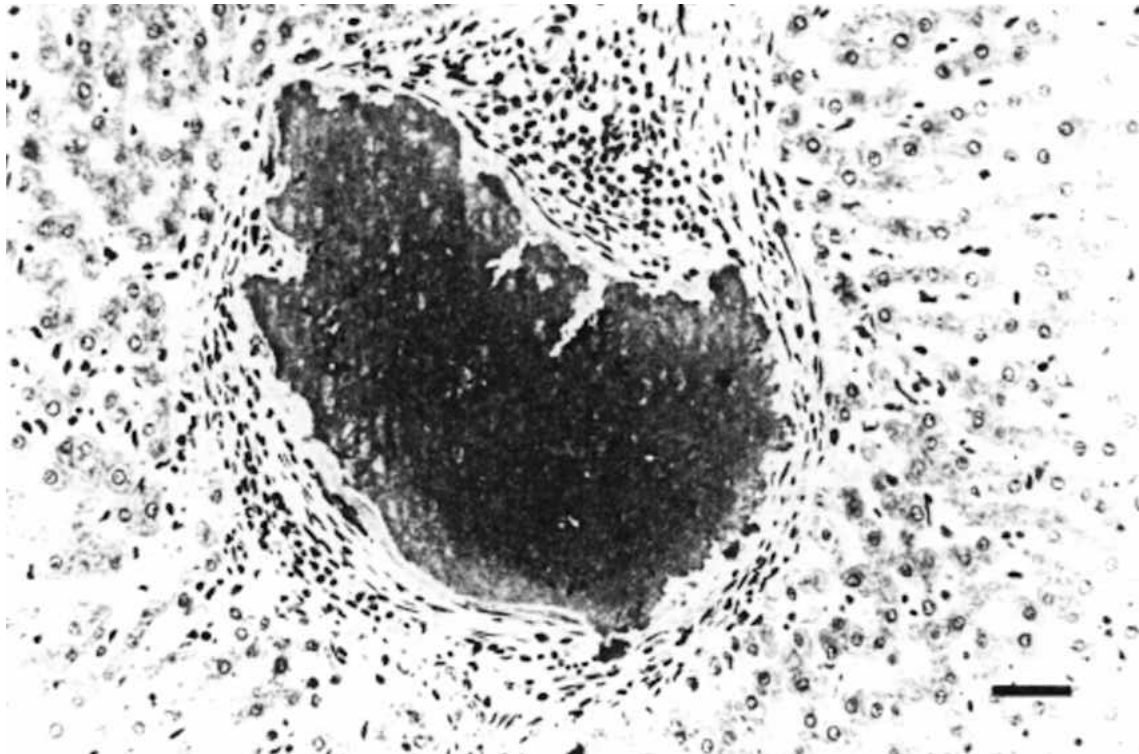


Figura 2.- Granuloma en un espacio porta. Tricómico de Masson-Goldner. Barra = 200 μ m.

Granulomas

En todos los corderos del grupo se observaron múltiples granulomas en localización subcapsular, portal, septal y parenquimatosa, de diferente composición, pero no calcificados (hepatitis granulomatosa).

En el seno del parénquima, los granulomas aparecían constituidos por acúmulos de linfocitos, algunos macrófagos periféricos y escasas fibras colágenas y fibroblastos, o bien, se observaban como nódulos con mayor presencia de fibras conjuntivas, fibroblastos y células plasmáticas, siendo escasos los macrófagos, eosinófilos y linfocitos.

También se observaron granulomas formados por un núcleo central, irregular, de restos celulares, delimitado por macrófagos dispuestos en empalizada y células gigantes multinucleadas. Externamente, se disponían linfocitos, macrófagos, eosinófilos y escasas fibras conjuntivas y fibroblastos. En sus proximidades se identificaron secciones de pequeños conductos biliares (hiperplasia biliar).

En las áreas porta y septos destacaron granulomas de pequeño tamaño, con escasa necrosis y abundante infiltrado celular (linfocitos, macrófagos, eosinófilos).

Por último, en los granulomas subcapsulares, de diferentes dimensiones, se observaron macrófagos en empalizada y gran número de células gigantes multinucleadas externamente a la zona central de necrosis. En la periferia, detectamos un infiltrado, difuso o nodular, de linfocitos, además de macrófagos, eosinófilos, fibras colágenas y fibroblastos de disposición concéntrica. Estos granulomas llegaban a provocar atrofia y desorganización del parénquima hepático.

Conducto hepático

En la mucosa se comprobó hiperplasia epitelial de células de revestimiento y calciformes, así como la presencia de abundantes leucocitos globulares intraepiteliales. La necrosis afectó solo a pequeños tramos de dicha mucosa. Entre las unidades secretoras de la lámina propia se identificó un infiltrado difuso de macrófagos, eosinófilos, células plasmáticas y linfocitos; estos últimos, los más numerosos, tendían a formar pequeños agregados (colangitis crónica). El conducto se encontraba delimitado externamente por una capa de tejido conjuntivo fibroso y fibras musculares lisas.

Vesícula biliar

Como en los grupos anteriores, destacó la necrosis del epitelio, preservándose sin embargo, tramos del mismo constituidos por células cilíndricas altas, con gránulos secretores en su polo apical. Entre ellos, se identificaron escasos leucocitos globulares. En la lámina propia se observaron acinos secretores mucosos, algunos con descamación y necrosis, acúmulos, nodulares y difusos, de linfocitos y algunos eosinófilos. Asimismo, se comprobó edema y linfangiectasia en las diferentes capas del órgano (Fig. 1 de Lámina XVIII).

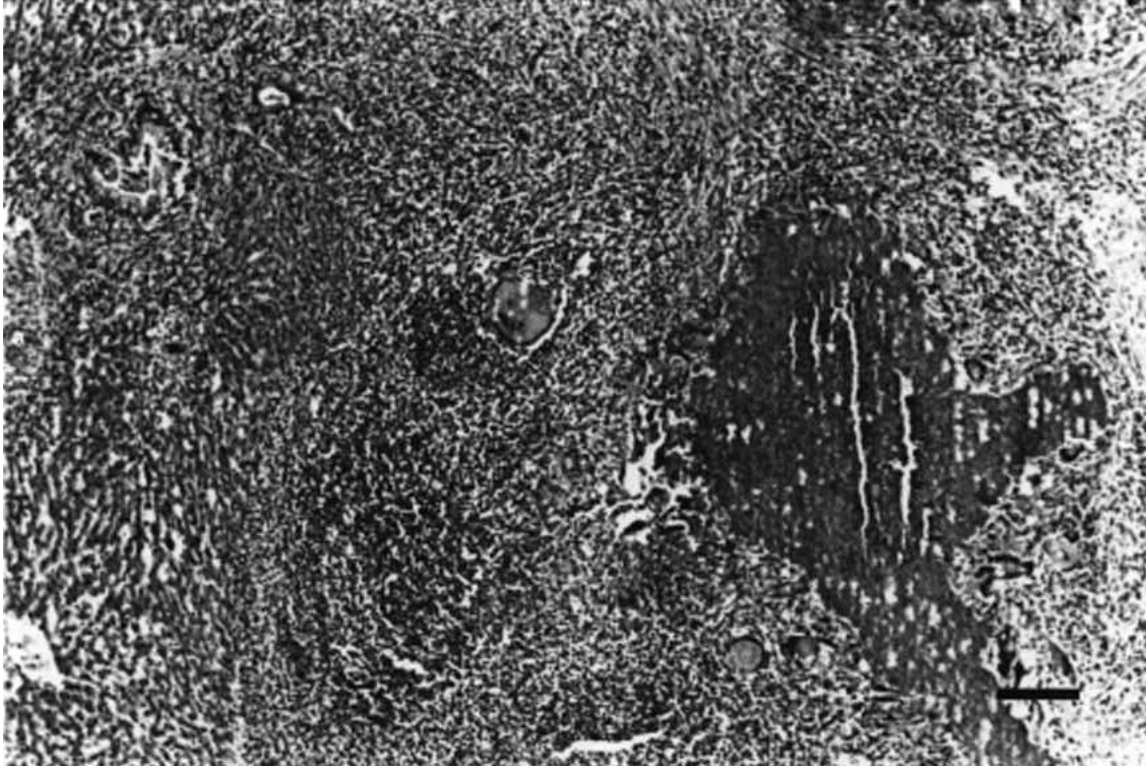


Figura 1.- Hepatitis granulomatosa. Zona amplia de necrosis, numerosas células gigantes y acúmulos nodulares de linfocitos. H.E. Barra = 800 μ m.

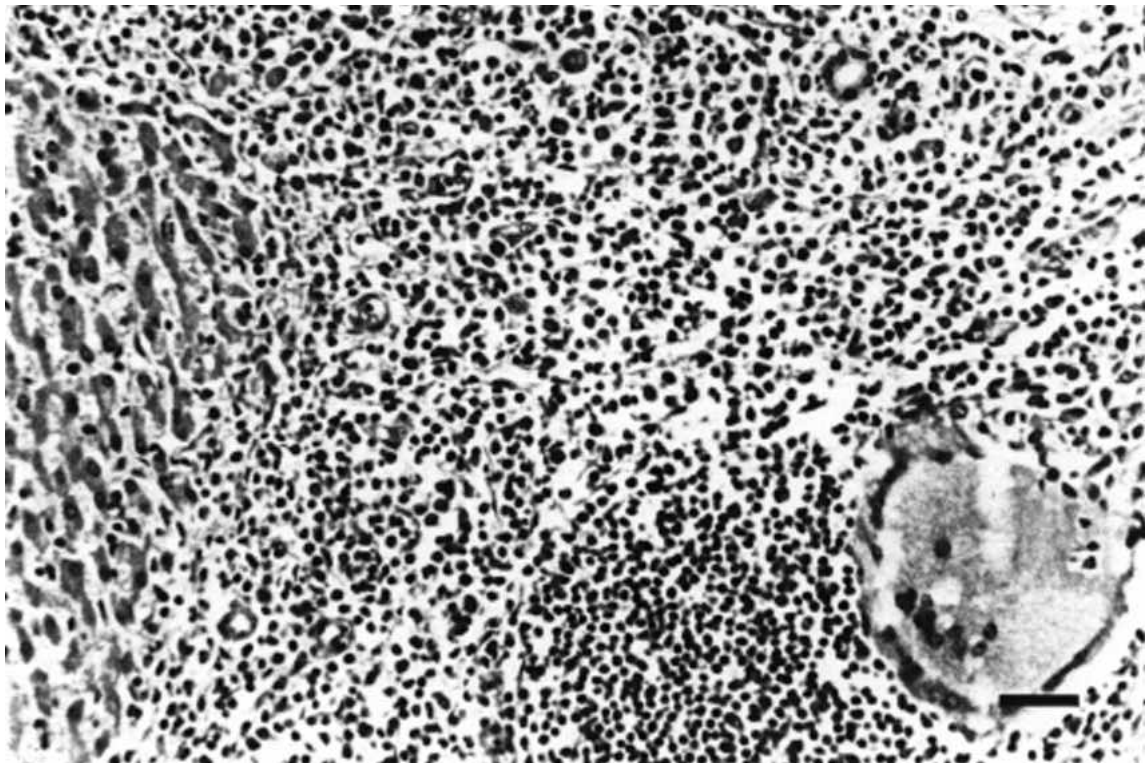


Figura 2.- Detalle del granuloma anterior donde destaca una célula gigante multinucleada y abundantes linfocitos. Barra = 200 μ m.

Ganglios linfáticos hepáticos

Además de la proliferación de folículos linfoides en la corteza, ya descrita en los grupos anteriores, se observó hiperplasia de células reticulares, en relación con los senos medulares. Dichos senos se encontraban ocupados por gran número de células plasmáticas, eosinófilos, linfocitos, y macrófagos (Fig. 2 de Lámina XVIII y Fig. 1 de Lámina XIX). Las células macrofágicas, a veces aparecían fusionadas recordando elementos multinucleados, y en su citoplasma se identificaron glóbulos rojos (eritrofagocitosis) y un pigmento pardo. En los vasos linfáticos aferentes, en los senos (subcapsulares y medulares) y en la pared de los vasos sanguíneos destacaban vacuolas claras de diferentes tamaños (edema local). Consideramos que estas alteraciones son compatibles con una linfadenitis crónica.

En un animal (con 570 vermes), uno de los ganglios linfáticos examinados presentaba un abundante infiltrado difuso, tanto en la corteza como en la zona medular, de linfocitos, algunos eosinófilos y sobre todo macrófagos, con pigmento pardo en su interior. A veces, estos macrófagos se agrupaban formando células gigantes multinucleadas. Además, se identificaron 3 granulomas no calcificados y otros 6 calcificados (Fig. 2 de Lámina XIX). Los primeros estaban constituidos por macrófagos, alguna célula gigante, fibroblastos y fibras colágenas. En los granulomas calcificados, se disponían abundantes macrófagos y eosinófilos alrededor de la zona central necrosada y calcificada (linfadenitis granulomatosa).

4.2.7.2.4.- Animales infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses post-infección

Cápsula hepática

La cápsula hepática, en 2 corderos (con 110 y 495 vermes) de los 6 examinados, estaba engrosada y, en ocasiones, presentaba un discreto infiltrado inflamatorio (linfocitos, macrófagos, eosinófilos), además de ectasia linfática.

Parénquima hepático y sinusoides

En los hepatocitos se comprobó, en ciertas áreas, degeneración vacuolar e hidrópica (en los 6 animales). Asimismo, en 2 animales (con 360 y 495 vermes), la intensa dilatación y presencia de abundantes células inflamatorias en los sinusoides provocaron atrofia e incluso necrosis de las células hepáticas. La positividad de estas células a la plata metenamina fue más escasa, si bien la distribución más frecuente fue periportal. Sin embargo, fueron negativas con el sudán negro B.

Los sinusoides, en todos los animales del grupo, aparecían ectásicos y con discreta congestión, generalmente periportal. En su luz contenían células blancas, macrófagos, y en 2 animales (con 478 y 495 vermes), además, fibras colágenas y fibroblastos en su pared. Las células de Kupffer siempre fueron prominentes.

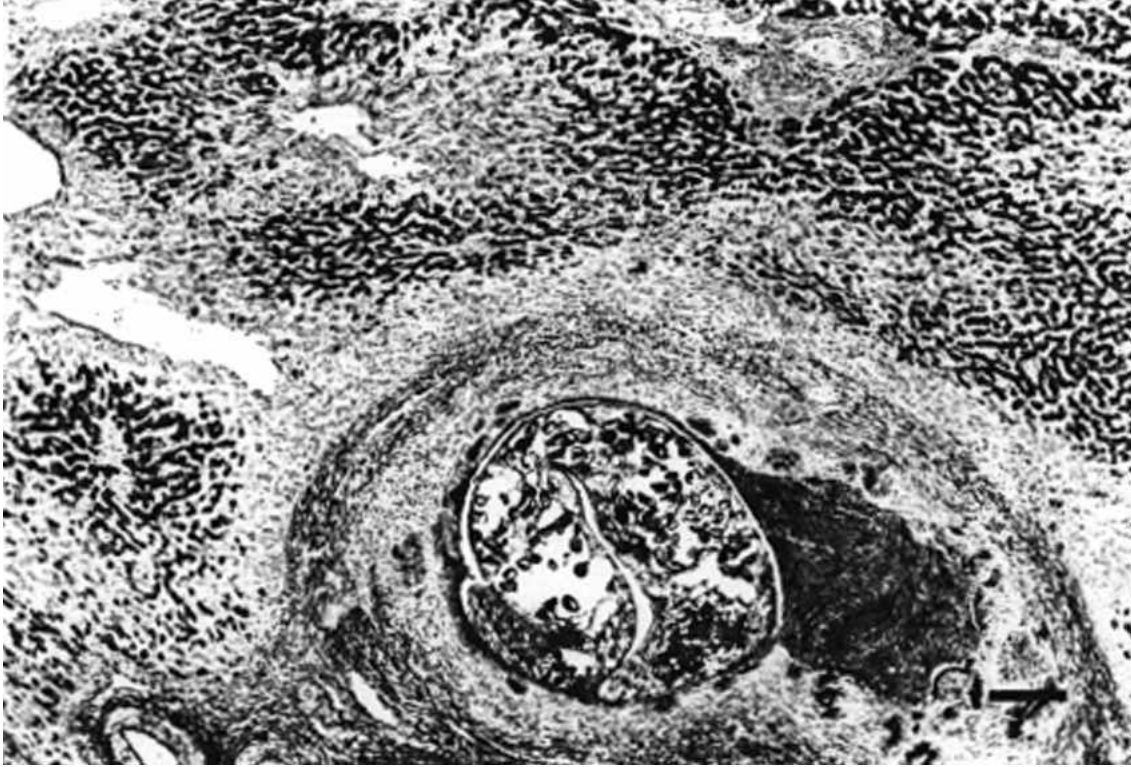


Figura 1.- Tinción positiva de los hepatocitos periportales. Conducto biliar septal ectásico con la luz ocupada por el parásito y restos celulares. El tejido fibroso forma una amplia franja alrededor del conducto. Plata metenamina. Barra = 800 μ m.

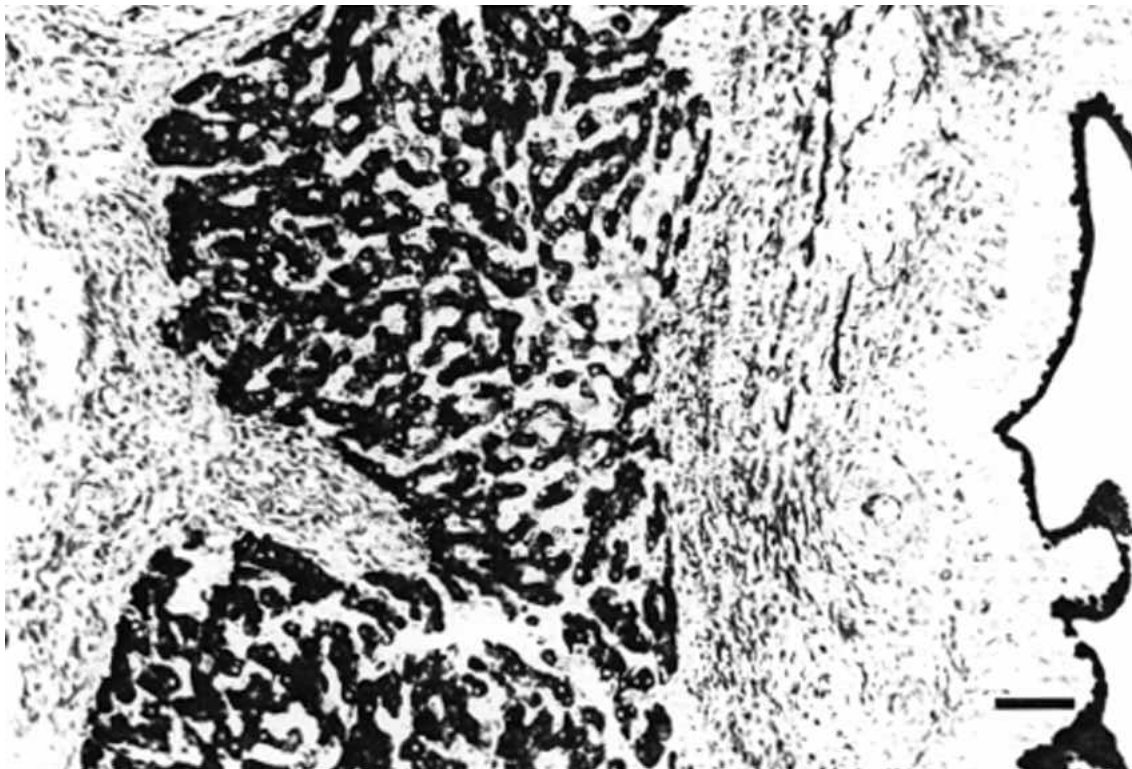


Figura 2.- Hepatocitos y polo apical de las células epiteliales de un conducto biliar septal teñidos con plata metenamina. Barra = 325 μ m.

Espacio porta

Los infiltrados portales constituyeron un hallazgo constante en el grupo estudiado y estaban formados por linfocitos, eosinófilos, abundantes macrófagos (a veces con pigmento pardo) y células plasmáticas (hepatitis portal).

Asimismo, se observó fibrosis portal, más grave en 2 de los animales en los que se recogió un mayor número de vermes adultos (495 y 2.063). En estos últimos, la fibrosis se extendía a los septos e, incluso, al parénquima, en relación con los sinusoides y venas centrales.

En ramas de la vena porta, además de ectasia y congestión, se identificaron pequeños trombos constituidos por células blancas y fibrina (en 2 animales con 360 y 478 vermes). También en estas venas se observaron fenómenos de descamación celular y presencia de hepatocitos en la luz (en 2 animales con 282 y 478 vermes), así como engrosamiento de la pared (en el animal con 282 vermes). En una vena de gran calibre se halló la sección de un parásito adulto, rodeada de glóbulos rojos, leucocitos y células endoteliales descamadas (Fig. 1 de Lámina XX). En otra, próxima a un conducto biliar septal con importantes fenómenos de descamación y necrosis, destacó la presencia de células caliciformes en la luz.

Los conductos biliares interlobulillares se encontraban generalmente ectásicos y tapizados por un epitelio cúbico bajo. Además de picnosis nuclear, descamación celular y presencia de material acidófilo en su luz, queremos señalar su hiperplasia epitelial, en los 2 animales de los que se recuperaron más vermes adultos.

Conductos biliares septales

En los conductos biliares septales de menor calibre se observó, como en los interlobulillares, ectasia ductal y presencia de material amorfo e, incluso, algún huevo del parásito en la luz (Fig. 2 de Lámina XX). Sin embargo, el hallazgo más constante fue su intensa hiperplasia epitelial, caracterizada por la presencia de un epitelio cilíndrico alto, con núcleos a diferentes alturas. Esta hiperplasia del epitelio biliar estaba asociada con fenómenos de vacuolización basal, descamación celular, picnosis nuclear y presencia de soluciones de continuidad en algunos segmentos del conducto.

En los grandes conductos fue también muy acusada la hiperplasia epitelial en todo el grupo, pero sobre todo en el animal del que se recogió el número más elevado de vermes adultos (2.063) (Fig. 1 de Lámina XXI y Fig. 2 de Lámina XXII). En él, todos los conductos biliares mostraban multitud de pliegues y un epitelio de aspecto estratificado, además de pequeñas vacuolas teñidas de rojo con el Masson-Goldner en el citoplasma de sus células. Entre ellas, se identificaron abundantes células caliciformes, siendo los dos tipos celulares, positivos al PAS, azul alcian y plata metenamina (Figs. 1-2 de Lámina XXII).

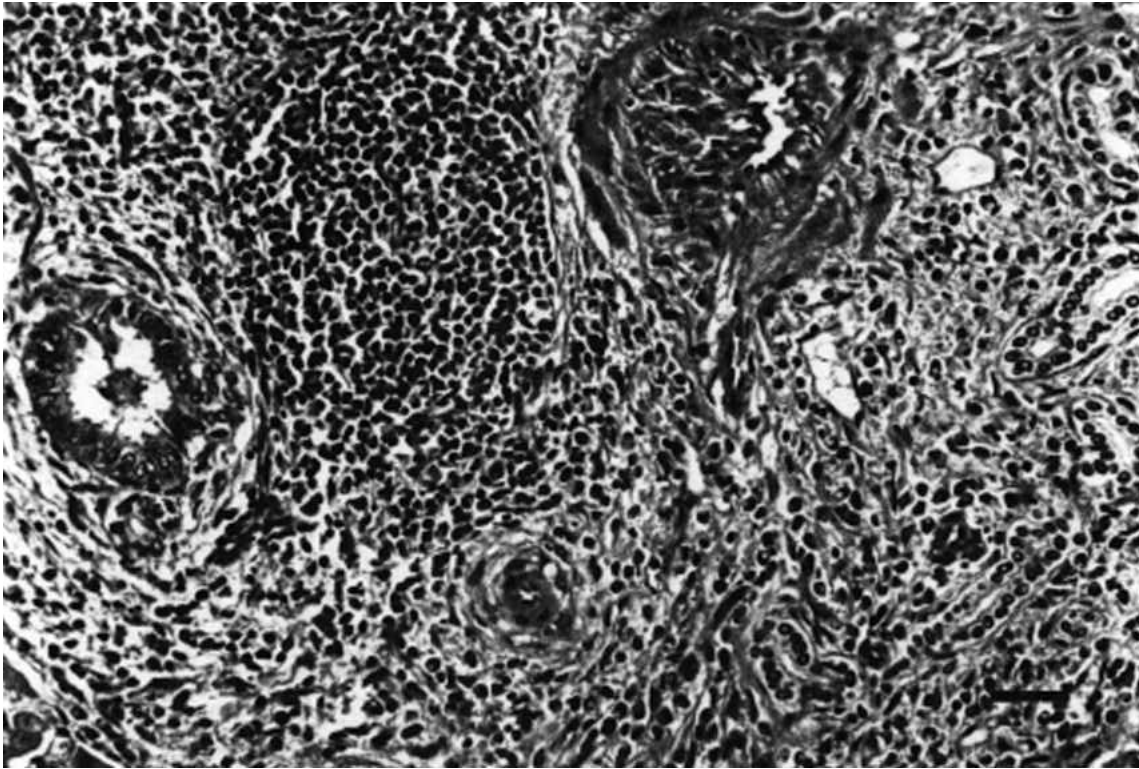


Figura 1.- Hepatitis portal, proliferación de estructuras ductulares biliares y engrosamiento de la pared de la rama de la vena porta. Barra = 200 μ m.

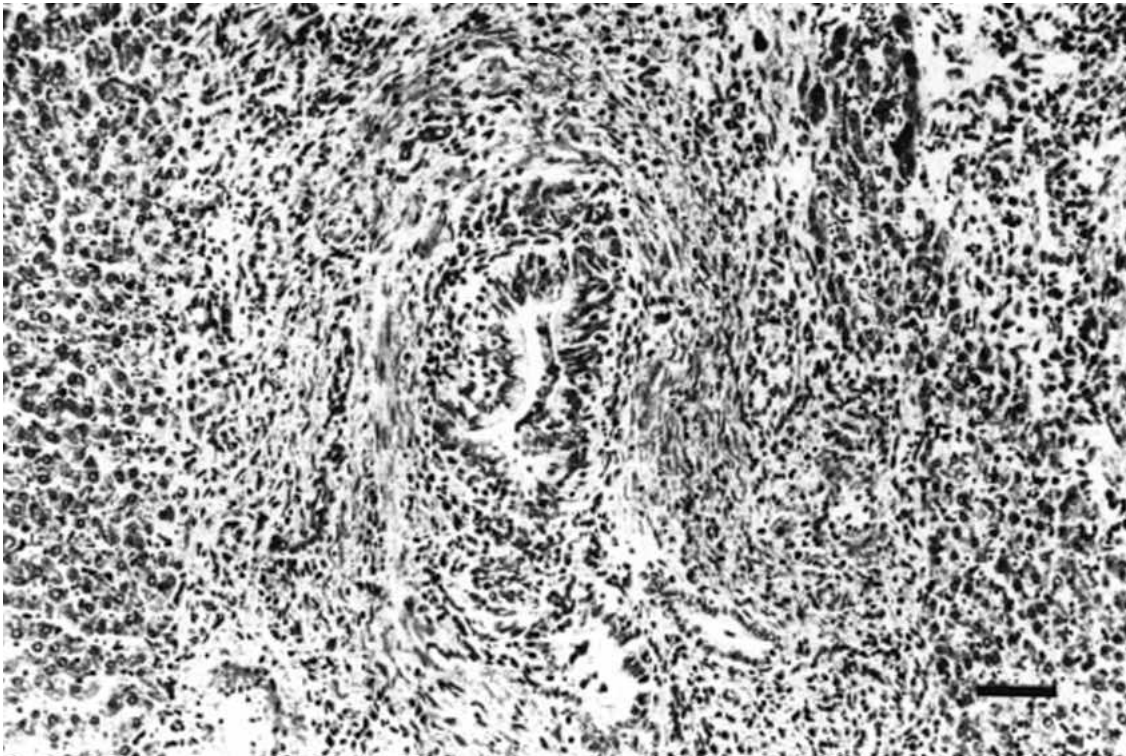


Figura 2.- Conducto biliar septal. Agudantes leucocitos globulares y fibrosis periductal. Discreta congestión sinusoidal en el parénquima hepático adyacente. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 325 μ m.

En ocasiones, se identificaron secciones del parásito en el interior de conductos biliares septales, de mediano y gran calibre, con un epitelio bastante preservado, hiperplásico o aplanado (Fig. 2 de Lámina XXI). Sin embargo, más frecuentemente, la presencia de parásitos en la luz se encontró asociada con necrosis y descamación epitelial intensas (Fig. 1 de Lámina XXIII), que incluso afectaban a los pliegues mucosos y acinos secretores. A veces, existía erosión focal del epitelio, conservándose sólo las porciones más profundas de los pliegues (Fig. 2 de Lámina XXIII). En todos los conductos biliares septales destacaron abundantes leucocitos globulares, tanto en las proximidades del epitelio como en el seno del mismo (Fig. 2 de Lámina XX). El infiltrado celular existente en relación con estos conductos, estaba constituido predominantemente por linfocitos, los cuales se disponían formando folículos linfoides (Fig. 2 de Lámina XXI y Fig. 1 de Lámina XXIII). Además de estos infiltrados nodulares de linfocitos, muy numerosos, se identificaron eosinófilos, macrófagos y células plasmáticas (colangitis crónica). Externamente se comprobó fibrosis periductal, que iba también acompañada de hiperplasia de fibras musculares lisas en los grandes conductos. Algunos grupos de hepatocitos, próximos a estos grandes conductos biliares con hipertrofia de su pared, aparecían atróficos.

Granulomas

En este grupo de corderos los granulomas fueron escasos, identificándose fundamentalmente macrogranulomas calcificados, capsulares o subcapsulares, provistos de abundantes células gigantes multinucleadas y acúmulos nodulares de linfocitos (en 3 animales con 110, 495 y 2.063 vermes). También se observó un granuloma constituido primordialmente por linfocitos, fibroblastos y fibras conjuntivas (en un animal con 495 vermes) y otros 3 subcapsulares, semejantes en su composición a los descritos en el grupo de corderos infectados con la misma dosis pero sacrificados a los 2 meses p.i. (en 2 animales con 478 y 495).

Conducto hepático

Las alteraciones observadas en este grupo fueron cualitativamente similares a las descritas en los animales infectados con 1.000 metacercarias y sacrificados también a los 6 meses p.i., pero de mayor intensidad.

En la mucosa se comprobó hiperplasia del epitelio de revestimiento y del componente glandular (células caliciformes y glándulas biliares de la lámina propia). La necrosis epitelial fue asimismo muy intensa, afectando a amplias zonas del conducto, en las cuales únicamente se observaban los pliegues de la mucosa. En otros tramos, las alteraciones degenerativas afectaban también a los acinos secretores (picnosis nuclear, descamación celular, entre otras). Finalmente, existían zonas donde la necrosis era tan acusada que sólo se reconocían escasos acinos en la mucosa biliar. En la lámina propia destacó un intenso infiltrado de linfocitos, agrupados en numerosos folículos linfoides con centro germinal, macrófagos y algunos eosinófilos. Su pared, de tejido conjuntivo hialinizado y edematoso y fibras musculares lisas, estaba engrosada (fibrosis periductal) (Fig. 1 de Lámina XXIV).

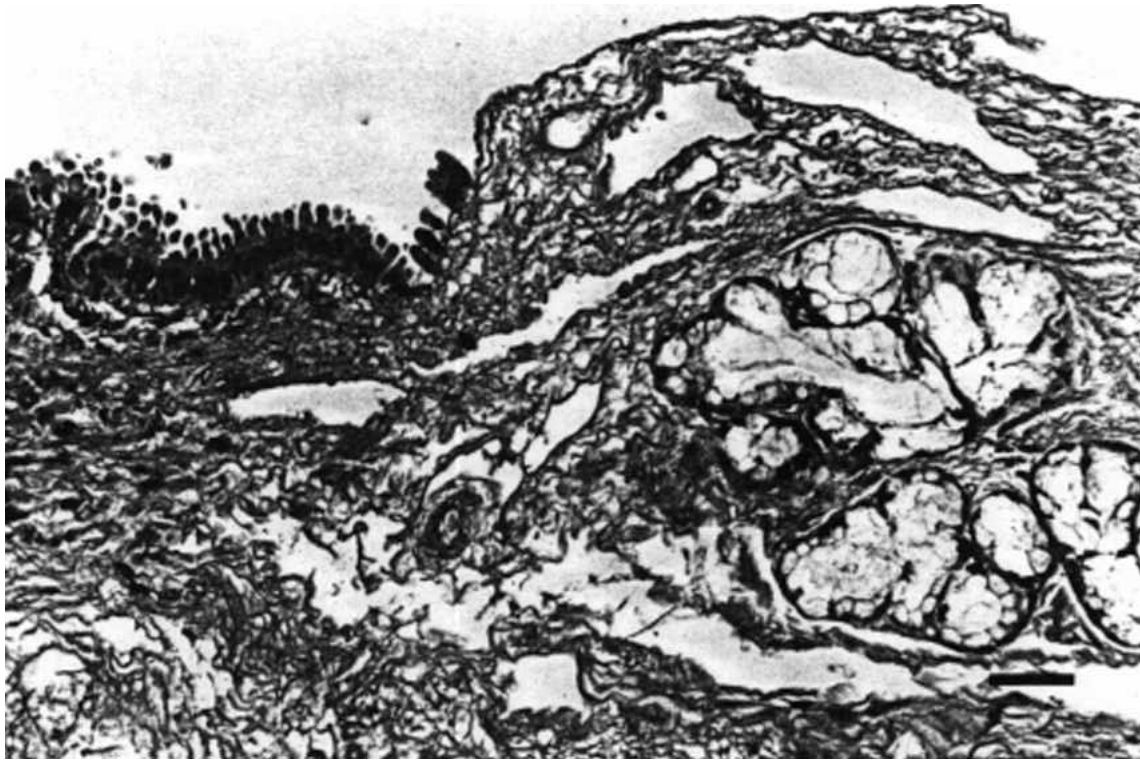


Figura 1.- Mucosa de la vesícula biliar. Necrosis parcial del epitelio de revestimiento y de las unidades secretoras de la lámina propia, edema y linfangiectasia. H-E. Barra = 325 μ m.

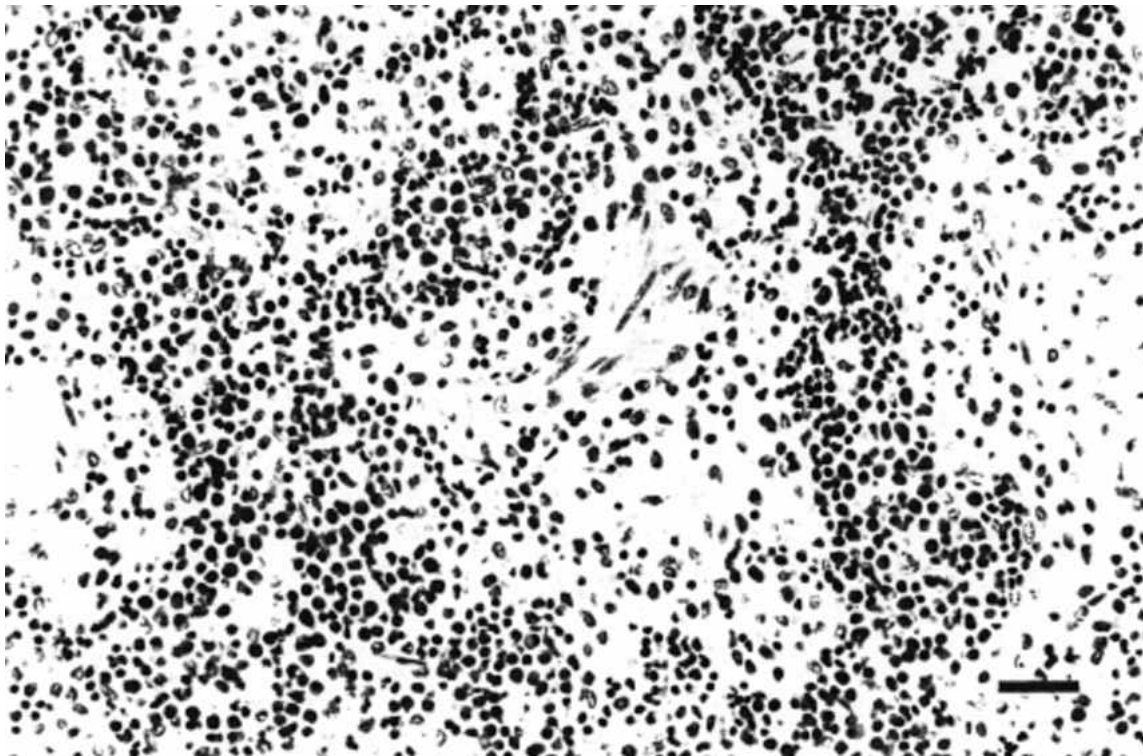


Figura 2.- Linfadenitis crónica. Abundantes células plasmáticas en los senos medulares. H.E.
Barra = 325 μ m.

Vesícula biliar

Las alteraciones observadas en la vesícula biliar fueron similares pero más graves que las descritas en los apartados anteriores. La necrosis fue prácticamente total en el epitelio, y el edema de la pared, así como la presencia de linfangiectasia y de nódulos linfoides subepiteliales fueron constantes en este grupo.

Ganglios linfáticos hepáticos

En todos los animales estudiados, los ganglios linfáticos hepáticos mostraron hiperplasia linfoide, con desarrollo de centros germinales. Asimismo, se comprobó edema en los vasos linfáticos aferentes y vasos sanguíneos, los cuales presentaban abundantes vacuolas en la pared y un material amorfo acidófilo en la luz (en 3 animales con 110, 282 y 360 vermes). En los senos, claramente ectásicos, junto a una sustancia acidófila se observaron linfocitos, abundantes células plasmáticas y macrófagos, éstos últimos cargados con un pigmento pardo (en 3 animales con 110, 282 y 2.063 vermes) (Fig. 2 de Lámina XXIV).

4.2.7.3.- Estudio ultraestructural

Parénquima hepático y sinusoides

La degeneración vacuolar de los hepatocitos, observada en todos los grupos de animales estudiados, se correspondía ultraestructuralmente con una tumefacción mitocondrial caracterizada, en una fase inicial, por la presencia de mitocondrias dilatadas, con matriz menos densa de lo normal y crestas cortas, desorientadas y disminuidas en número (Fig. 1 de Lámina XXV). En fases más avanzadas de este proceso degenerativo, se producía desintegración de las crestas y de la matriz, y estos orgánulos celulares se transformaban en grandes vacuolas sin estructura (vacuolización mitocondrial) (Fig. 2 de Lámina XXV). En el retículo endoplásmico (RE), tanto liso (REL) como granular (REG), se observó una transformación de sus cisternas en vacuolas (dilatación y vesiculación). Estas alteraciones del RE, que acompañaban a la degeneración celular, fueron muy evidentes en áreas citoplasmáticas próximas a canalículos biliares (Fig. 1 de Lámina XXVI).

Los canalículos biliares, localizados entre hepatocitos degenerados, estaban dilatados y carecían prácticamente de microvellosidades (Fig. 2 de Lámina XXVI). Las uniones entre hepatocitos contiguos a este nivel, representadas por complejos de unión y nexos, no eran tan firmes, observándose cierta separación entre dichas superficies celulares.

Entre las células hepáticas y en los sinusoides, con células endoteliales y de Kupffer, se identificaron macrófagos y eosinófilos.

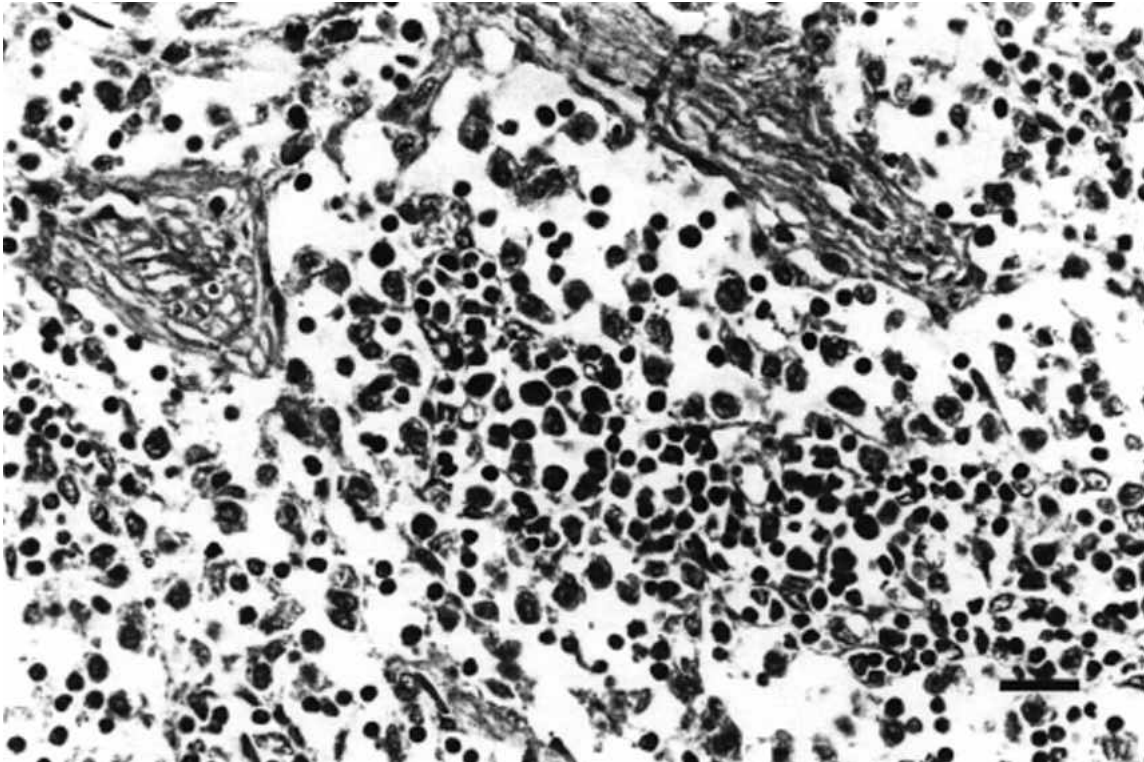


Figura 1.- Linfadenitis crónica. Senos medulares dilatados con voluminosos macrófagos. Tricrómico de Massón-Goldner. H-E. Barra = 125 μ m.



Figura 2.- Linfadenitis granulomatosa. Granulomas calcificados en la corteza de un ganglio. H.E. Barra = 800 μ m.

Espacio porta

Los conductos biliares interlobulillares de luz estrecha estaban constituidos por células de morfología cúbica, que se apoyaban en una delicada membrana basal. Sus núcleos eran voluminosos y su citoplasma contenía escasos orgánulos. Estas células estaban tumefactas con el hialoplasma claro (edema celular) (Fig. 1 de Lámina XXVII) y carecían de microvellosidades en su polo apical. Entre ellas aparecían linfocitos y en la luz del conducto, células descamadas.

Asimismo, en estas áreas porta, entre los grupos de fibras colágenas y fibroblastos se disponía un intenso infiltrado inflamatorio periductal de linfocitos y eosinófilos, éstos con núcleo lobulado y citoplasma provisto de gránulos de estructura cristalóide en su interior. Además, se observaron macrófagos, con núcleo ovoide y escasa heterocromatina, y células plasmáticas, con núcleo redondeado y cromatina condensada en acúmulos periféricos.

Grandes conductos biliares

Los grandes conductos biliares se encontraban tapizados por un epitelio cilíndrico simple apoyado en una membrana basal delgada, de estructura homogénea. En dicho epitelio se podían distinguir 2 tipos de células columnares: células claras y células oscuras (Figs. 1-2 de Lámina XXVIII).

Las células claras eran más numerosas, con citoplasma abundante y núcleo ovalado, basal, con nucleolo y cromatina laxa. En su polo basal contenían polirribosomas, algunas mitocondrias y cisternas aisladas de REG. En localización supranuclear y en la porción luminal se disponían abundantes mitocondrias, cisternas de REG y el aparato de Golgi, además de numerosos gránulos con membrana, redondeados (aunque a veces se deformaban por compresión), de variable tamaño y densidad (Fig. 1 de Lámina XXIX). Su contenido en unos era más pálido y granular, mientras que en otros era más denso y homogéneo. Probablemente se trate de gránulos secretores de naturaleza mucinosa. La membrana celular mostraba en su región apical delgadas y cortas microvellosidades.

Las células oscuras presentaban un citoplasma electrónicamente denso, y un núcleo de contornos irregulares, con nucleolo y heterocromatina parietonuclear. En su citoplasma basal existían abundantes polirribosomas. Cisternas aisladas de REG se disponían por toda la célula, y eran también numerosas las mitocondrias y los gránulos de diferente densidad y de mayor tamaño, ambos localizados en posición supranuclear (Figs. 1-2 de Lámina XXIX). En la membrana apical de estas células se observaron escasas microvellosidades.

Las membranas laterales de las células ductales, claras y oscuras, mostraban complejos de unión e interdigitaciones. Entre estas células epiteliales, como ya se señaló en los conductos biliares interlobulillares, se identificaron linfocitos.

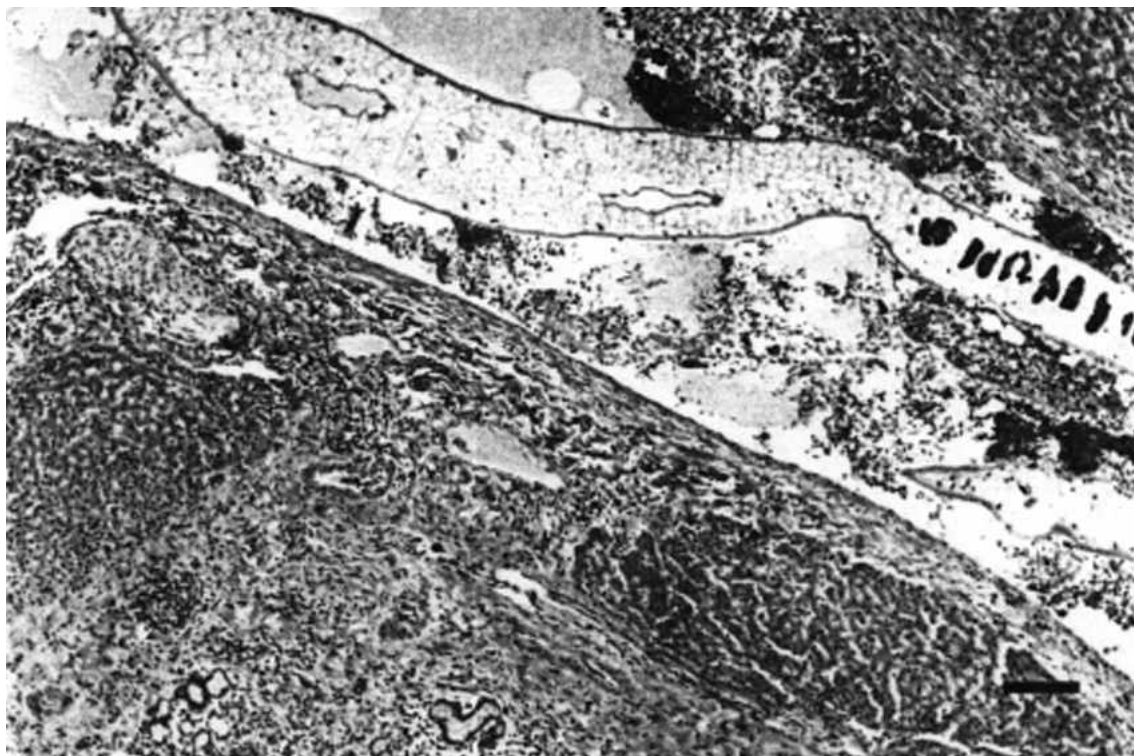


Figura 1.- Vena conteniendo el parásito, abundantes glóbulos rojos y leucocitos. Tricrómico de Massón-Goldner. Barra = 800 μ m.

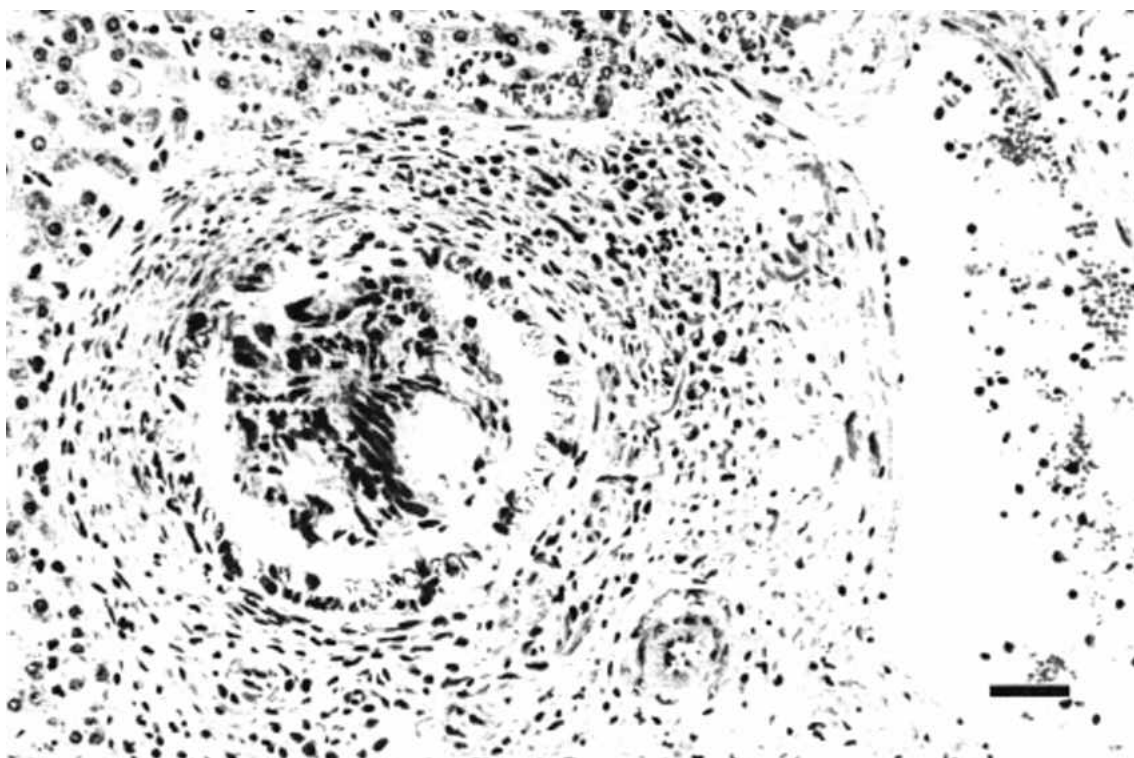


Figura 2.- Pequeño conducto biliar septal ectásico con descamación celular y numerosos leucocitos globulares intraepiteliales. Tricrómico de Massón-Goldner. Barra = 200 μ m.

DISCUSIÓN

En este capítulo pretendemos destacar aquellos hallazgos anatomopatológicos más notables asociados con la infección experimental por *D. dendriticum*, contrastándolos con los obtenidos por otros autores en el ganado ovino. Cuando lo consideremos oportuno, haremos referencia también a trabajos de investigación, experimentales o no, en los que se empleen otros hospedadores definitivos u otras especies de *Dicrocoelium*. Con el fin de facilitar la lectura de este apartado de la discusión, seguiremos el mismo orden establecido en la exposición de los resultados.

Las lesiones macroscópicas observadas en el hígado fueron cualitativamente similares en los diferentes grupos de corderos estudiados, variando cuantitativamente en los animales sacrificados a los 6 meses p.i., como consecuencia de la cronicidad del proceso, y en aquéllos infectados con un mayor número de metacercarias.

En nuestros resultados hemos comprobado induración hepática así como ectasia y engrosamiento de la pared en los conductos biliares intrahepáticos, preferentemente en animales infectados con 3.000 metacercarias, lo que coincide con lo señalado por WOLFF *et al.* (1984), quienes utilizaron la misma dosis infectante.

El hallazgo constante en nuestro estudio de áreas de congestión pasiva y de nódulos y tractos necróticos, en los diferentes lóbulos hepáticos, ya fue descrito por CHENG (1978) y BORCHERT (1981), pero sólo en casos de una parasitación muy intensa.

En las vías biliares extrahepáticas y vesícula biliar, las características más reseñables han sido la dilatación y repleción de esta última, al contener abundante secreción verdosa y parásitos, alteraciones asimismo observadas, sobre todo en infecciones naturales, por ALIEV (1968), MASSOUD (1981) y WOLFF *et al.* (1984), en ganado ovino y por DHAR & SING (1963b) y SOMVANSHI *et al.* (1992), en caprino.

En cuanto a los ganglios linfáticos hepáticos, exceptuando la referencia a un discreto aumento de tamaño señalada por WOLFF *et al.* (1984), también observado por nosotros, en nuestra revisión no hemos encontrado datos sobre posibles modificaciones macroscópicas de estos órganos linfoides relacionadas con la dicroceliosis.

Microscópicamente, hay autores que no han comprobado modificaciones en el parénquima hepático (BORCHERT, 1981). Por el contrario, algunos trabajos consultados hacen mención a alteraciones regresivas de las células hepáticas, tanto en ganado ovino (MARCHAND, 1966; PRICE & CHILD, 1971; MASSOUD, 1981) como en el caprino (RAHKO, 1972a), a lo que nosotros añadimos atrofia hepatocítica e, incluso, necrosis y desorganización del parénquima, observadas en todos los grupos de corderos estudiados. Consideramos que la degeneración hidrópica indica una posible disfunción hepática, derivada probablemente de una respiración celular alterada. Asimismo, la necrosis focal de estas células puede asociarse al proceso inflamatorio biliar o a trastornos vasculares de naturaleza oclusiva.

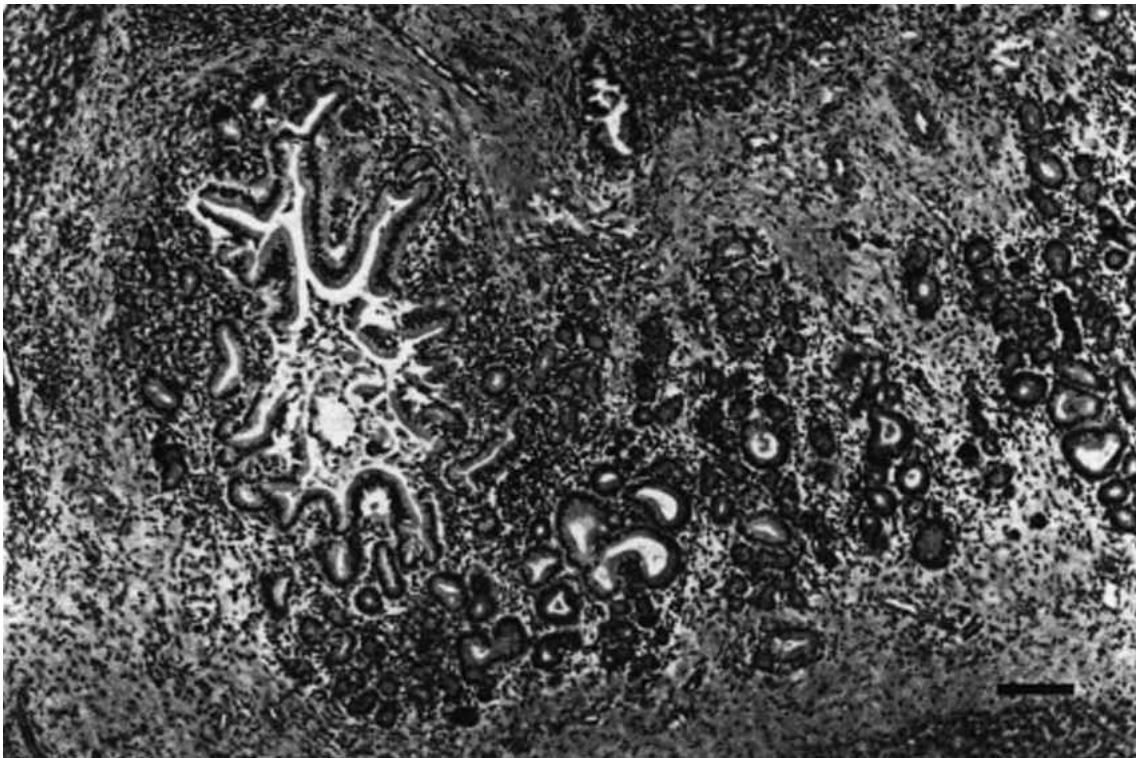


Figura 1.- Conducto biliar septal. Intensa hiperplasia epitelial. H-E. Barra = 800 μ m.

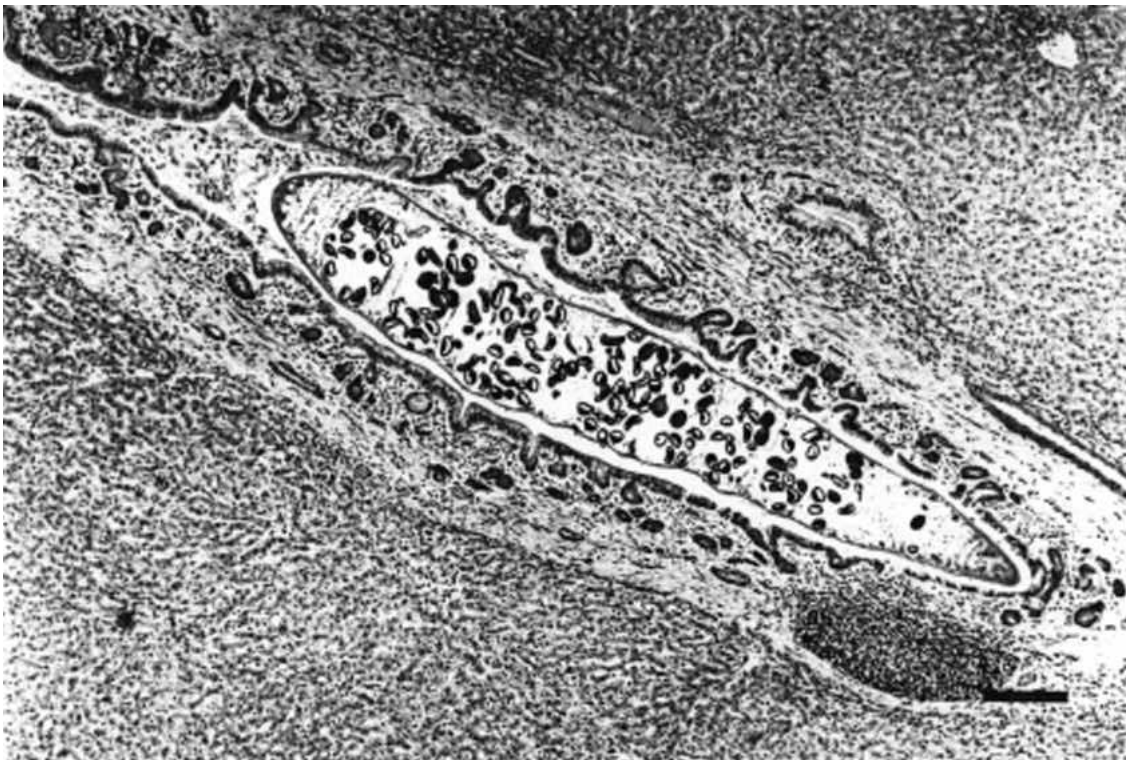


Figura 2.- Conducto biliar septal con el parásito en su luz. Moderada necrosis y descamación celular. Acúmulo de linfocitos en localización subepitelial. PAS. Barra = 800 μ m.

Otro hallazgo histológico que queremos resaltar, por no haber sido descrito previamente en animales infectados con *D. dendriticum*, es la reacción positiva de los hepatocitos, de localización preferentemente periportal, a la plata metenamina. En la bibliografía consultada solo se hace referencia a esta característica microscópica en la epilepsia mioclónica humana y se asocia a la presencia de polímeros anormales de naturaleza glucídica (PATRICK & McGEE, 1988).

Por lo que se refiere a las alteraciones de los sinusoides, únicamente ha sido señalada una dilatación de estos capilares en cabra (SOMVANSHI *et al.*, 1992) y en criceto (SÁNCHEZ, 1994). Otros autores han descrito alteraciones en los vasos sanguíneos en cordero, coincidiendo con las primeras fases de la infección con 1.000 metacercarias (ALIEV, 1968) o en el curso de infecciones naturales con *D. hospes* (FRANK *et al.*, 1984).

Sobre el significado de estas modificaciones estructurales, que nosotros hemos observado en los diferentes grupos, pero sobre todo en los corderos infectados con 3.000 metacercarias, queremos indicar que se han asociado con procesos inflamatorios crónicos y suelen estar relacionados con una fibrosis hepática (PATRICK & McGEE, 1988). La localización heterotópica de este trematodo en el interior de venas, descrita en nuestro trabajo en 2 animales pertenecientes a los grupos sacrificados a los 6 meses p.i., probablemente se produzca por un mecanismo activo de penetración a través de la vena porta, si bien hemos de indicar que esta probable vía de migración portal o pileflebítica desde la vena porta hacia los canalículos biliares, sólo nos permitiría explicar la presencia de vermes jóvenes en las venas durante las fases iniciales de la infección (5 ó 6 días) (ALZIEU & DUCOS DE LAHITTE, 1991) y no a los 6 meses p.i., como se ha confirmado en nuestro estudio. En los trabajos consultados, la presencia de *D. dendriticum* en la luz de vasos hepáticos ha sido solo destacado por POLOZHENTSEVA (1968), sin embargo otros autores (WOLFF *et al.*, 1984) no han llegado a comprobar este hecho, y tampoco la existencia de lesiones en los vasos sanguíneos que pudieran tener relación con esta parasitosis.

La presencia de acúmulos de leucocitos, identificados por nosotros en el parénquima y, a veces, en la propia cápsula, han sido destacados por WOLFF *et al.* (1984), también en cordero. La localización de estas células en los espacios porta, indica, según nuestra opinión, una reacción normal frente a los conductos biliares interlobulillares lesionados.

Por lo que se refiere al incremento del estroma hepático, nuestros resultados coinciden, en general, con lo aportado por distintos autores (CHENG, 1978; DUNN, 1978; BORCHERT, 1981, MASSOUD, 1981, WOLFF *et al.*, 1984). Otros, como BOCH & SUPPERER (1982), consideran que se produce una cirrosis en fases avanzadas de la infección. Por el contrario, nosotros pensamos, de acuerdo con DRABICK *et al.* (1988), que en la dicroceliosis ovina se produce una fibrosis, como consecuencia de una colangitis, pero no llegan a identificarse nódulos de regeneración hepatocítica que serían, según CARLTON & Mc GAVIN (1995), típicos de una cirrosis. Además, la proliferación de estructuras ductulares (hiperplasia biliar), observada por RAHKO (1972a) en infecciones naturales en cabra y que se encuentra asociada no sólo a la cirrosis sino a otros procesos patológicos del hígado, ha constituido un hallazgo esporádico en nuestro estudio.

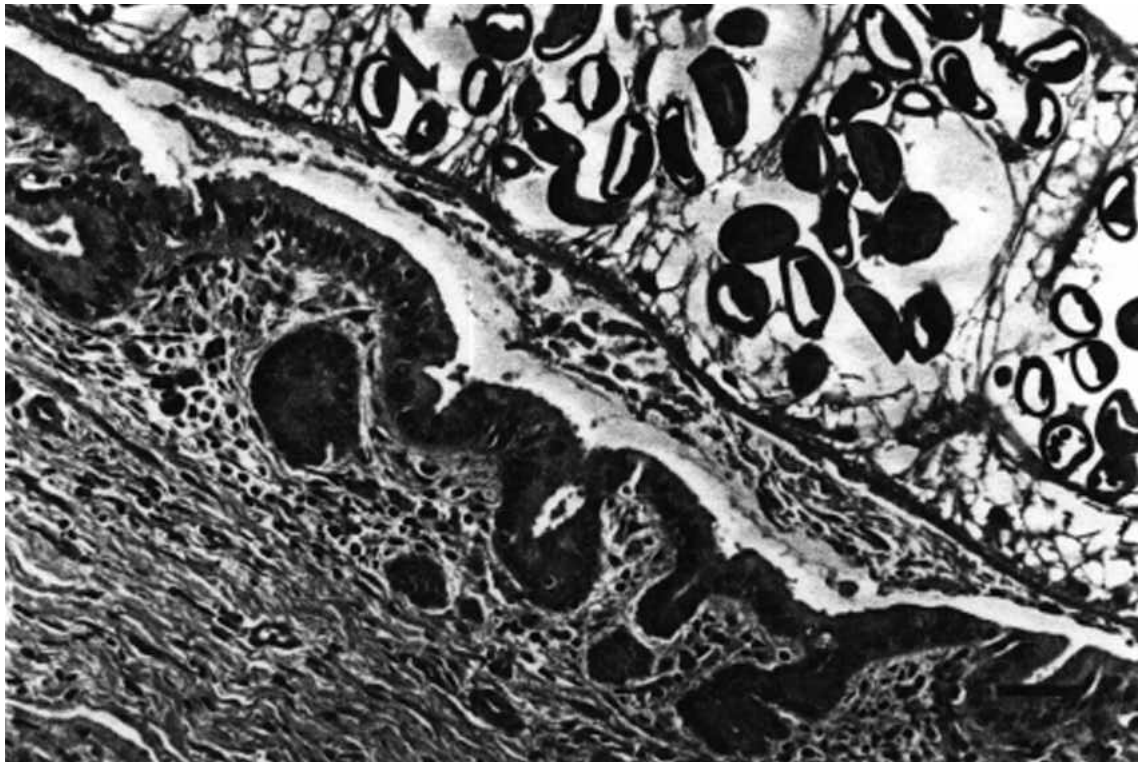


Figura 1.- Detalle de la anterior. Numerosas células caliciformes PAS positivas entre las de revestimiento. PAS. Barra = 125 μ m.



Figura 2.- Conducto biliar septal hiperplásico con numerosos pliegues. Abundante secreción en el citoplasma apical de las células ductales. Plata metenamina. Barra = 325 μ m.

Asimismo hemos realizado una descripción detallada de las alteraciones morfológicas de los conductos biliares intrahepáticos, tanto interlobulillares como septales. La dilatación de los conductos biliares interlobulillares observada por nosotros, ha sido señalada por WOLFF *et al.* (1984). También coincidimos con estos autores en que la proliferación de su epitelio no es un fenómeno constante; de hecho, nosotros sólo lo observamos en 2 corderos infectados con 3.000 metacercarias y sacrificados a los 6 meses p.i., los cuales contenían 495 y 2.063 vermes. En la luz de estos conductos de los espacios porta no llegamos a identificar secciones del parásito o sus huevos, aunque sí en los conductos biliares septales, incluidos los de menor calibre.

La existencia de colangitis crónica en los grandes conductos biliares intrahepáticos, observada por nosotros, ya había sido señalada en ganado ovino por otros autores, que realizaron someras descripciones sobre el aspecto histológico de estos conductos (MAPES, 1951; MARCHAND, 1966; CHENG, 1978; BORCHERT, 1981; MASSOUD, 1981; WOLFF *et al.*, 1984). Las alteraciones detectadas en nuestro estudio, patentes en todos los grupos examinados, afectaban al epitelio, que aparecía hiperplásico, con cambios degenerativos e, incluso, necrótico. En ocasiones, la erosión epitelial afectaba a amplias áreas o llegaba a ser total, hecho que discrepa de lo aportado por RAHKO (1972a), quien considera que *D. dendriticum*, debido a su pequeño tamaño y a que posee un tegumento liso, provoca sólo pequeñas erosiones superficiales en el epitelio ductal. Nosotros hemos comprobado, incluso, afectación del componente glandular situado en la lámina propia, si bien en el conducto hepático. Esta irritación mecánica que produce el parásito puede deberse, en parte, a la acción de su ventosa, hecho que coincide con lo señalado por DHAR & SINGH (1963b). En algunas secciones histológicas, hemos observado cómo dicha ventosa, en íntimo contacto con el epitelio, captaba pequeños fragmentos del mismo.

En relación también con el epitelio de los conductos biliares septales, hemos comprobado un incremento en la actividad secretora de las células de revestimiento y caliciformes, positivas ambas al azul alcían y plata metenamina. En la bibliografía consultada, sólo hemos encontrado que se hace referencia a una mayor secreción en grandes conductos biliares, en el ganado ovino (MAPES, 1951). Con posterioridad, RAHKO (1972b) observó este hecho en los conductos biliares intrahepáticos de la cabra, no sólo en las células caliciformes sino en glándulas simples asociadas a estos conductos. Nosotros únicamente hemos identificado glándulas mucosas en la lámina propia de las vías biliares extrahepáticas.

Los numerosos leucocitos globulares intraepiteliales, observados por nosotros en los conductos biliares septales e, incluso, en los interlobulillares de un animal infectado con 3.000 metacercarias, que albergaba 341 vermes cuando se examinó a los 2 meses p.i., han sido descritos también en pequeños conductos biliares perilobulillares en vacas infectadas, de forma natural, con *D. dendriticum* (RAHKO, 1970) y en todos los conductos biliares, en la cabra (RAHKO, 1972a). Por el contrario, en infecciones naturales o experimentales en el ganado ovino no se ha destacado un mayor número de estas células en grandes conductos biliares, ni tampoco se ha relacionado su presencia con esta parasitosis (WOLFF *et al.*, 1984).



Figura 1.- Conducto biliar septal. Necrosis prácticamente total del epitelio en la zona ocupada por los parásitos. Acúmulos linfoides subepiteliales. Tricrómico de Masson-Golner. Barra = 800 μ m.

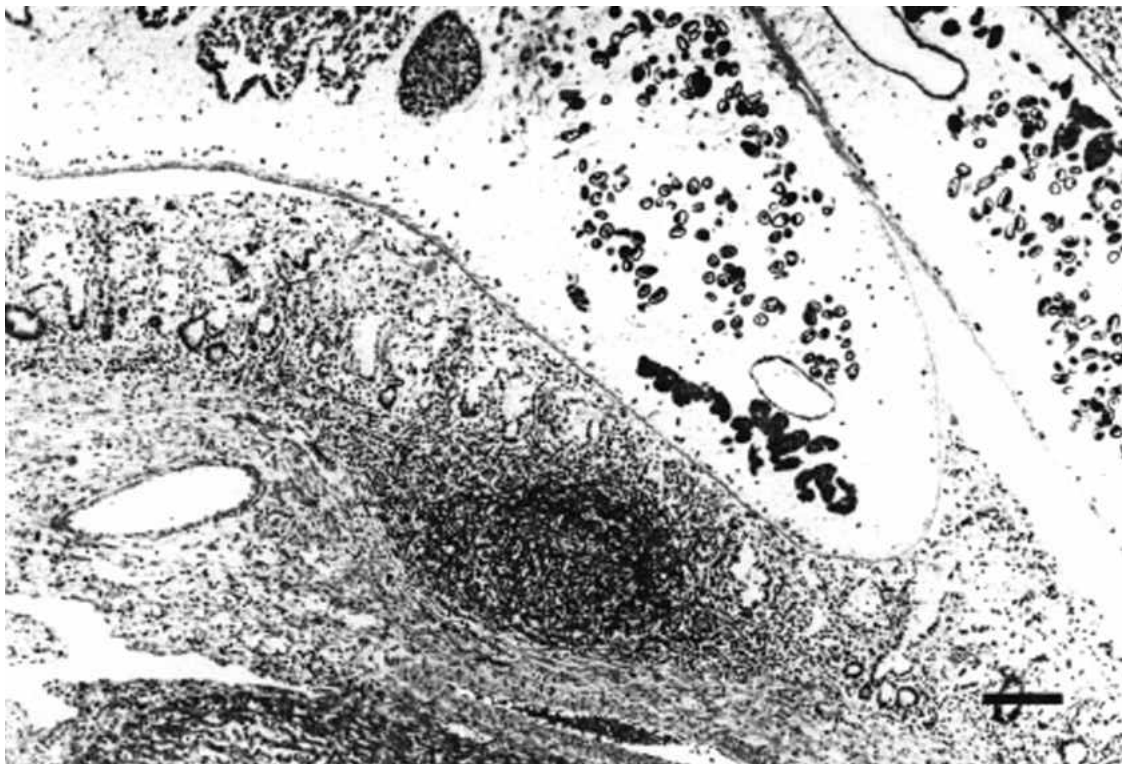


Figura 2.- Conducto biliar septal. Evidente efecto erosivo del parásito sobre el epitelio ductal, preservándose sólo los pliegues. Tricrómico de Masson-Goldner. Barra = 800 μ m.

El origen y función de los leucocitos globulares aún no están suficientemente aclarados. Se ha sugerido que se hallan estrechamente relacionadas con las células cebadas (KAMIYA *et al.*, 1983) pero, investigaciones posteriores, desde el punto de vista microscópico, histoquímico y ultraestructural, han demostrado diferencias entre ambas (AKPAVIE & PIRIE, 1990). Su composición histoquímica, según estos mismos autores, reveló escasa cantidad de mucina carboxilada, mezclada con mucina neutra y gran cantidad de proteína básica. Asimismo, existe la posibilidad de que se trate de un tipo celular específico; de hecho, se han descrito recientemente tumores de estas células en el gato (McPHERRON *et al.*, 1994).

Son numerosos los trabajos en los que se ha tratado de dilucidar el significado de los leucocitos globulares en las infecciones parasitarias. Así, en el ganado ovino, DOUCH *et al.* (1986) señalaron que existe una estrecha asociación entre la resistencia a la infección frente a *Trichostrongylus colubriformis* y la presencia de estas células en la mucosa gastrointestinal. En investigaciones posteriores, DOUCH (1988) confirmó que el número de leucocitos globulares refleja la respuesta individual frente a la inmunización con dicho nematodo. En esta misma línea se ha sugerido que tanto los leucocitos globulares como los eosinófilos y las células cebadas participan en la eliminación de parásitos adultos de *Trichinella spiralis*, en el ratón (KAMIYA *et al.*, 1985). Por último, se ha señalado también una importante respuesta de leucocitos globulares en la mucosa cecal de ratones infectados con *Trichuris muris*, capaces de rechazar al parásito adulto. Esta respuesta, sin embargo, fue mínima en aquellos animales inmunodeprimidos, en los que se desarrolló una infección persistente (JENKINS & WAKELIN, 1994).

En cuanto al infiltrado inflamatorio, asociado a los conductos biliares septales, nuestros resultados son similares a los aportados por otros autores en el ganado ovino (WOLFF *et al.*, 1984), bovino (DHAR & SINGH, 1963b) y caprino (NAKAMURA *et al.* 1984).

Por otra parte, la fibrosis periductal, descrita por WOLFF *et al.* (1984) en corderos y en infecciones adquiridas de forma natural en vaca (DHAR & SINGH, 1963b) y cabra (RAHKO, 1972a; SOMVANSHI *et al.*, 1992) ha sido observada por nosotros junto a una hiperplasia de fibras musculares lisas, esta última en grandes conductos. En nuestro estudio esta lesión fue más acusada en los corderos sacrificados a los 6 meses p.i.

Asociada a la dicroceliosis experimental hemos observado una hepatitis granulomatosa. En trabajos previos sobre esta parasitosis se han descrito focos necróticos, infiltrados por neutrófilos y células mononucleadas, no asociados con la infección, en la vaca (DHAR & SINGH, 1963b), y granulomas ocasionales, formados por macrófagos y células gigantes multinucleadas, en la cabra (RAHKO, 1972a). En el criceto, sin embargo, se han observado granulomas que contenían también células gigantes, organizadas alrededor de los huevos del parásito (PRUNESCU *et al.*, 1979), hallazgo que, según nuestro parecer, no coincide con lo afirmado por otros autores, en cuanto a que los huevos, localizados en las vías biliares, no penetran en el parénquima hepático (DHAR & SINGH, 1963b).

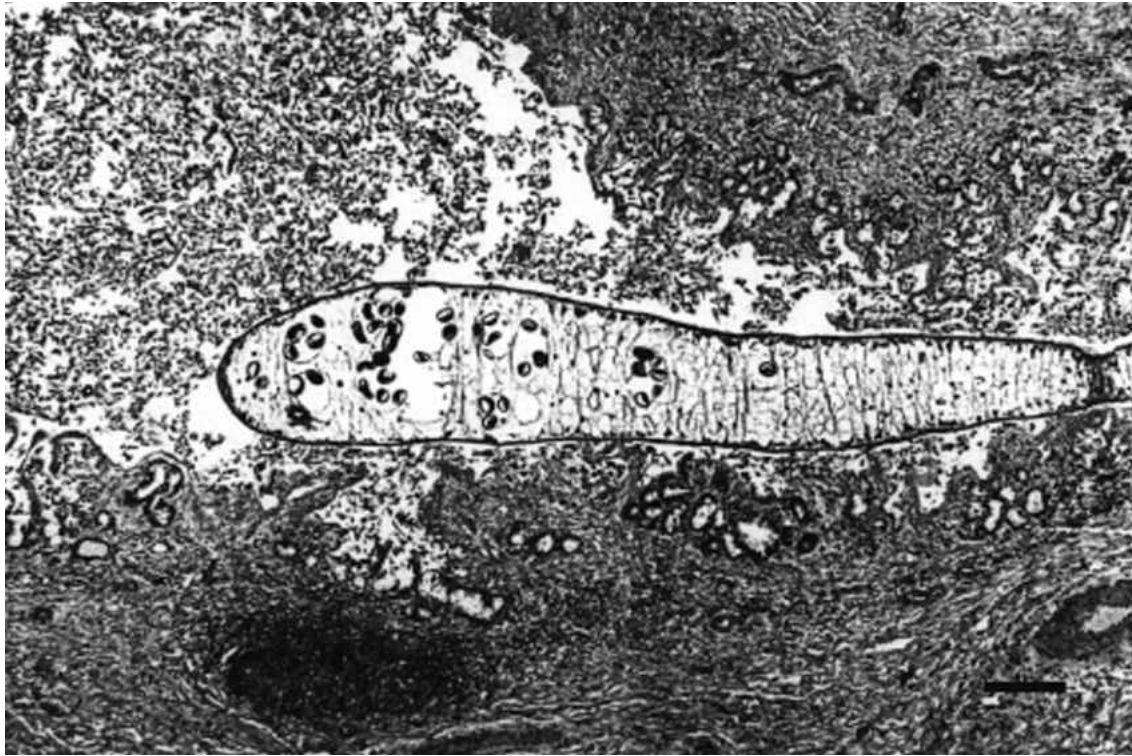


Figura 1.- Conducto hepático. Necrosis y descamación celular intensa. Infiltrado de linfocitos en la lámina propia y fibrosis periductal. H-E. Barra = 800 μ m.

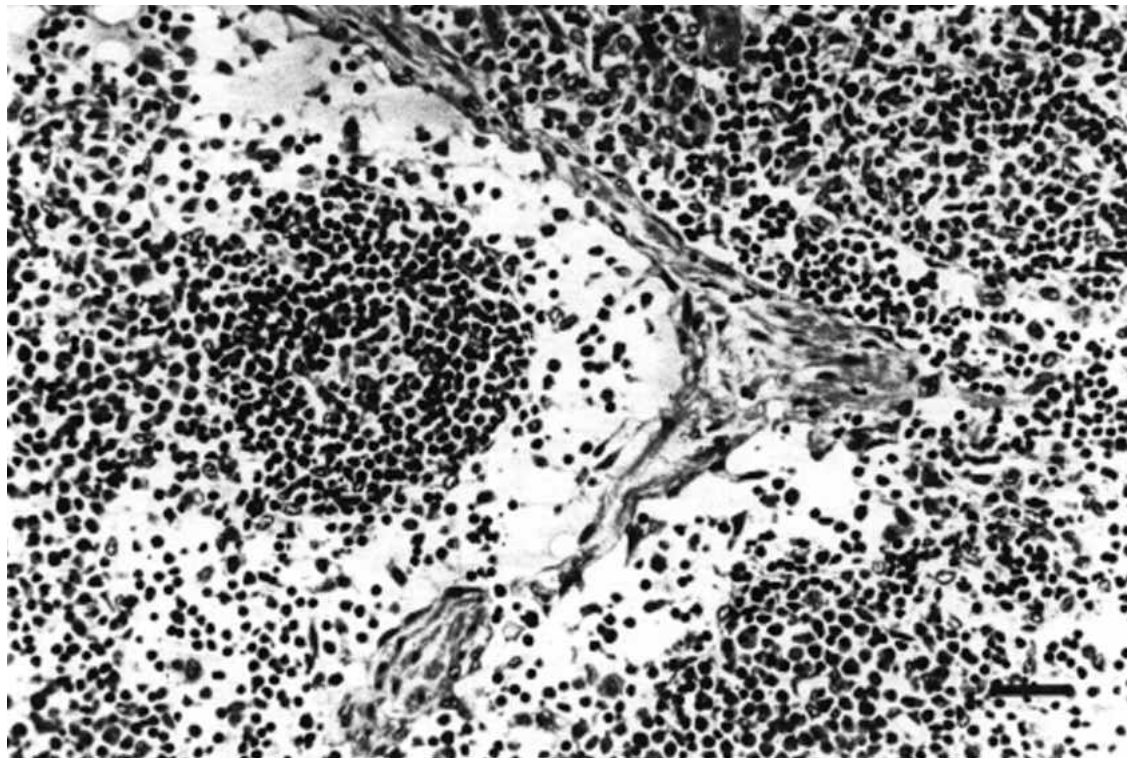


Figura 2.- Ganglio linfático hepático. Edema local y presencia de células plasmáticas y macrófagos en los senos medulares. H-E. Barra = 800 μ m.

En nuestros resultados no hemos identificado restos del parásito y de sus huevos, los cuales podrían desencadenar la reacción granulomatosa. En este sentido, WOLFF *et al.*, (1984), quienes observaron también una cantidad moderada de granulomas en la dicroceliosis experimental ovina e identificado huevos fuera de conductos biliares en un animal, sugirieron que se formaban por rotura de la pared de los pequeños conductos biliares, provocada por este trematodo. De hecho, es conocida la relación existente entre el desarrollo de granulomas y la presencia de conductos biliares alterados (PATRICK & McGEE, 1988). Tampoco podemos descartar la posibilidad de que exista una migración de vermes jóvenes, desde las ramas de la vena porta al parénquima hepático, que serían capaces de desencadenar una reacción celular, como sugirieron BREZA & SVARC (1968) (citado por ROSICKY & GROSCHAFT, 1982).

En cuanto al conducto hepático, no hemos encontrado trabajos previos en los que se describan lesiones asociadas con esta parasitosis. Únicamente WOLFF *et al.* (1984) señalaron la presencia de algunos leucocitos globulares en la mucosa de este conducto, hecho observado por nosotros junto a otras alteraciones similares a las descritas para los conductos biliares septales de gran calibre. A diferencia de estos últimos, el conducto hepático mostraba glándulas biliares, predominantemente mucosas, en la lámina propia, que aparecían hiperplásicas y con procesos degenerativos en sus células, sobre todo en los corderos que recibieron una mayor dosis infectante y se examinaron a los 6 meses p.i. Asimismo, han sido muy escasas las descripciones detalladas del aspecto histológico de la vesícula biliar, en dicha parasitosis. Únicamente SÁNCHEZ (1994) describió, en el criceto, una hiperplasia papilar del epitelio, la presencia de infiltrados inflamatorios y el edema, en este órgano. Sin embargo, nosotros hemos observado necrosis focal de la mucosa, pero no hiperplasia de su epitelio.

En relación con las alteraciones de los ganglios linfáticos hepáticos, únicamente se ha citado la existencia de linfadenitis y perilinfadenitis (ALIEV, 1966; STEELE, 1982) así como una mayor activación de estos órganos linfoides y presencia en los mismos de eosinófilos y macrófagos (WOLFF *et al.*, 1984), en el ganado ovino. En nuestro estudio pudimos observar una linfadenitis granulomatosa, aunque sólo en un animal que recibió 3.000 metacercarias y se examinó a los 2 meses p.i., proceso probablemente provocado por la migración de vermes de *Dicrocoelium*. Además realizamos la descripción histopatológica de otras alteraciones que no han sido citadas por otros autores y pensamos están en relación con esta parasitosis.

Finalmente, debemos señalar que con la valoración ultraestructural hemos confirmado y profundizado en alguno de los hallazgos descritos con el microscopio óptico, tales como las alteraciones degenerativas de los hepatocitos y de los conductos biliares interlobulillares. Además hemos comprobado modificaciones en los canalículos biliares e identificado dos tipos celulares, provistos de gránulos secretores, en los grandes conductos biliares, que probablemente representen un mismo tipo celular, pero en distinta fase secretora. En los trabajos consultados, sólo WOLFF *et al.* (1984) realizaron este tipo de estudios de microscopía electrónica en los que destacaron también la presencia de gránulos intracitoplasmáticos mucosos en las células de revestimiento, aunque diferenciaron otro tipo de célula epitelial en dichos conductos, provista de vacuolas lipídicas que nosotros no hemos llegado a identificar.

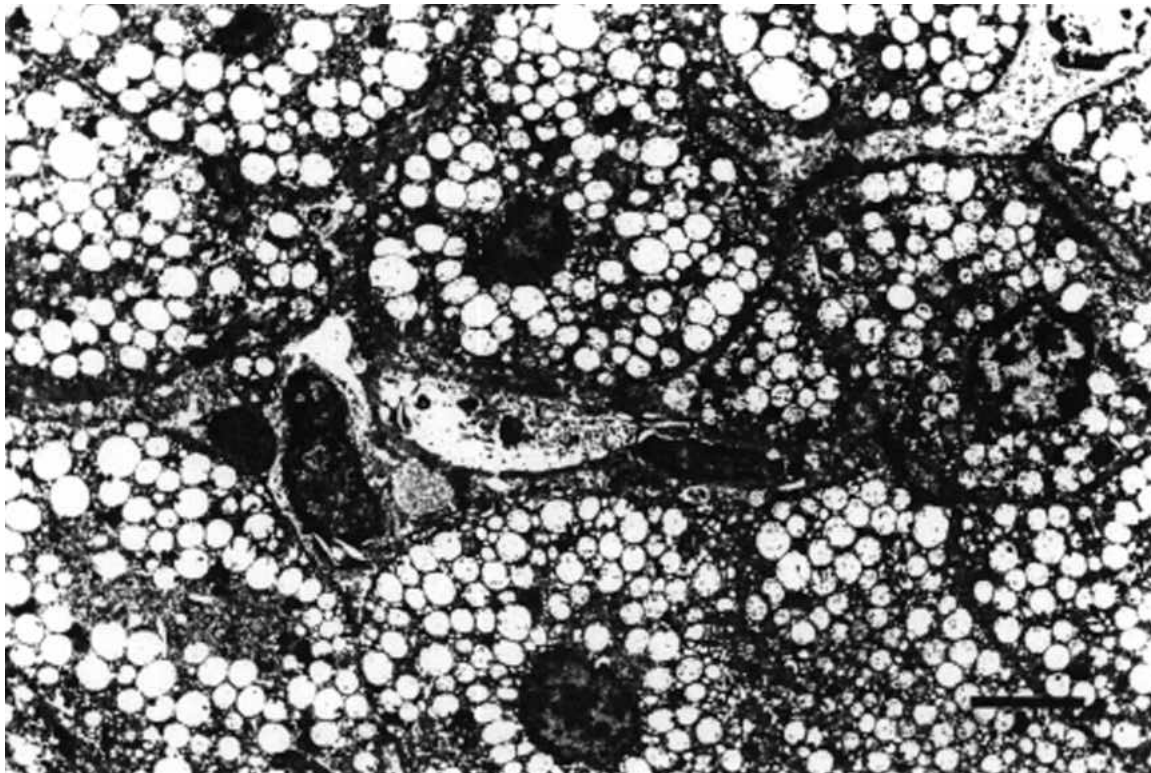


Figura 1.- Hepatocitos con degeneración vacuolar. Se observan mitocondrias dilatadas y con escasa densidad en su matriz. Presencia de células inflamatorias en los sinusoides hepáticos. Barra = 7 μm .

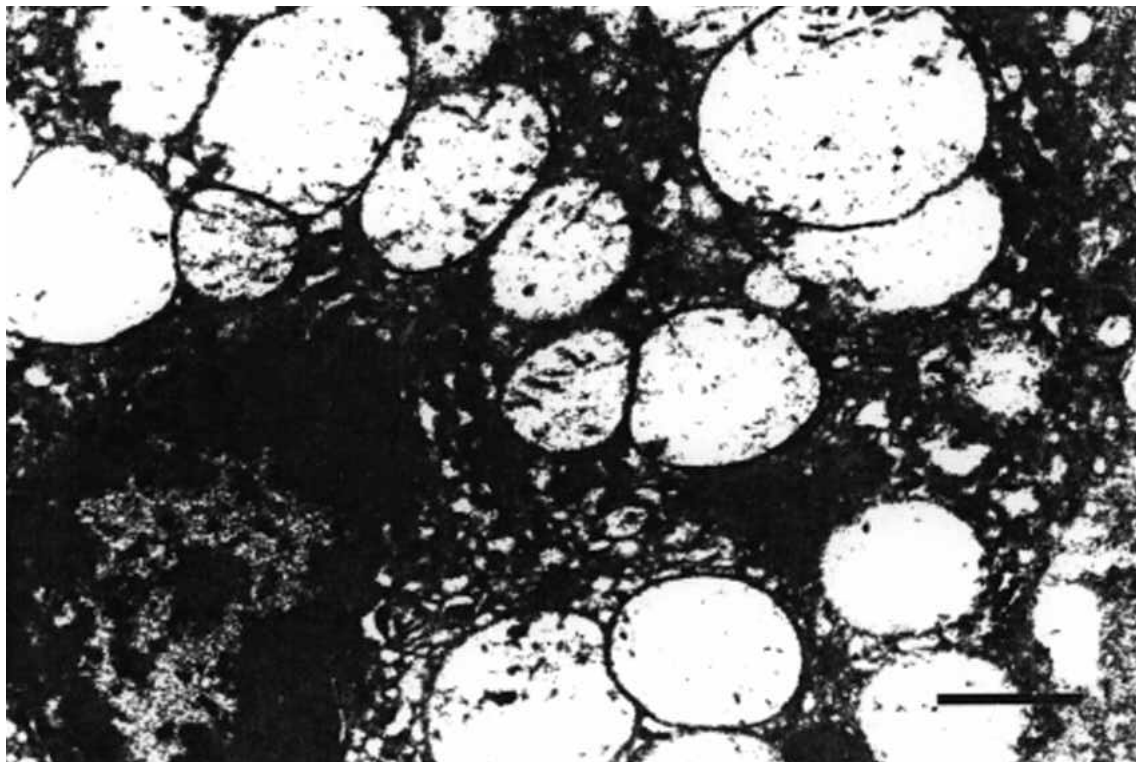


Figura 2.- Detalle de un hepatocito con vacuolización mitocondrial.. Barra = 1 μm .

4.2.8.- VALORACIÓN DEL PESO DE LOS CORDEROS

En el Cuadro 91 se recoge la media del peso, en el día 0 p.i. y en el del sacrificio, de los corderos pertenecientes al grupo de los testigos, de los probados con 1.000 y de los probados con 3.000.

DÍAS P.I.	PESO (Kg) DE LOS CORDEROS					
	TESTIGOS		INFECTADOS CON 1.000		INFECTADOS CON 3.000	
	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango	x ± E.S.	Rango
0	21,56±0,84	17,60-23,20	22,80±0,91	16,00-28,35	22,18±1,27	15,60-30,40
60	26,85±0,78	24,50-29,60	23,68±1,12	20,50-28,00	22,85±0,63	21,00-25,00
180	28,48±1,96	24,40-37,00	30,87±1,25	26,20-35,50	25,30±1,05	22,50-28,90

Cuadro 91.- Peso de los corderos testigos e infectados con cada una de las dosis, el día de la infección y el día del sacrificio.

Al considerar la variación (expresada en porcentaje) del peso medio de los corderos probados con 1.000 y con 3.000 metacercarias, respecto al de los testigos $[(x \text{ infectados} - x \text{ testigos}) / x \text{ testigos}] \times 100$, el mayor descenso del peso se observó, a los 60 días p.i., en los corderos probados con 3.000 (-15%) y con 1.000 (-12%) metacercarias. Aunque también se detectó un descenso a los 180 p.i. en los corderos probados con 3.000 metacercarias (-11%), sin embargo, en los infectados con 1.000 se apreció un incremento (8%).

La ganancia de peso de los corderos a los 60 y 180 días p.i., respecto al día 0, fue más elevada en los testigos que en los infectados, excepto a los 180 días p.i. en el grupo probado con 1.000 metacercarias (Cuadro 92).

Por otra parte, el incremento del peso de todos los corderos infectados, en relación al día 0 p.i., fue menor a los 60 días p.i. que a los 180, llegando, incluso, a disminuir (-0,56 Kg) en el grupo de corderos infectados con 3.000 metacercarias (Cuadro 92).

DÍAS P. I.	VARIACIÓN DEL PESO (Kg) DE LOS CORDEROS		
	TESTIGOS	INFECTADOS CON 1.000	INFECTADOS CON 3.000
	60	5,61 ± 0,89	1,21 ± 1,30
180	6,91 ± 1,80	7,72 ± 0,80	4,36 ± 0,92

Cuadro 92.- Media (± E.S.) del incremento o de la disminución del peso de los corderos, con respecto al día 0 p.i.

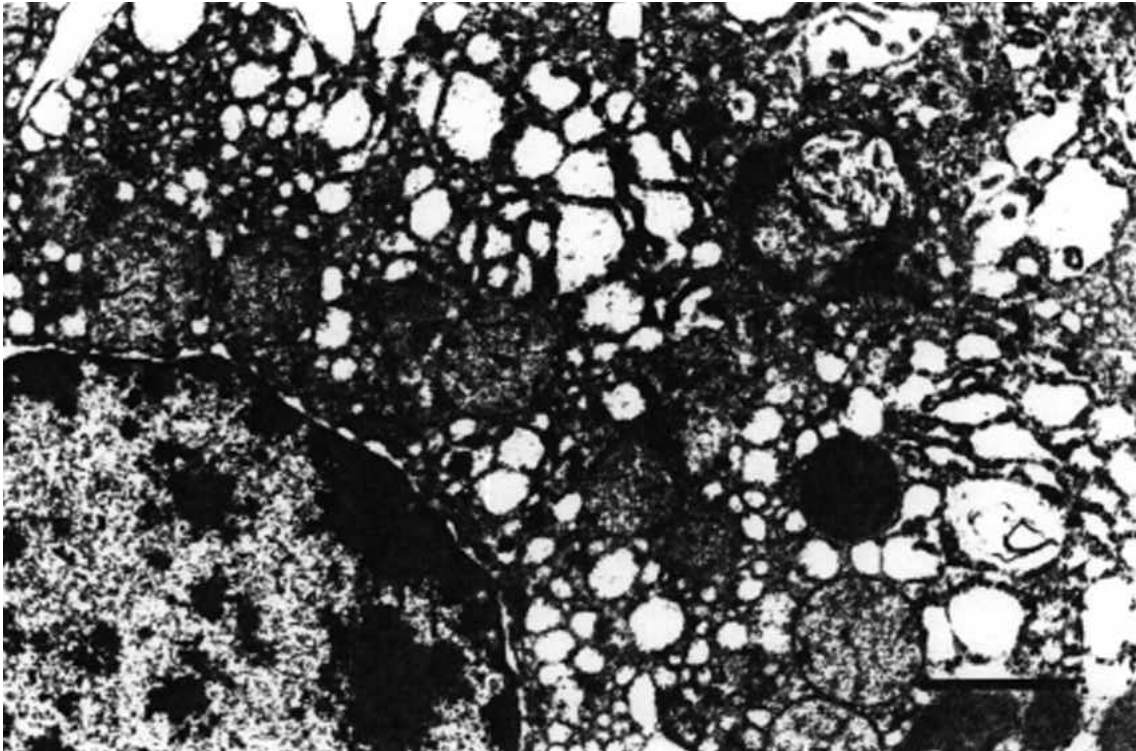


Figura 1.- Dilatación y vesiculación del retículo endoplásmico en las proximidades de un canalículo biliar. Barra = 1 μ m.

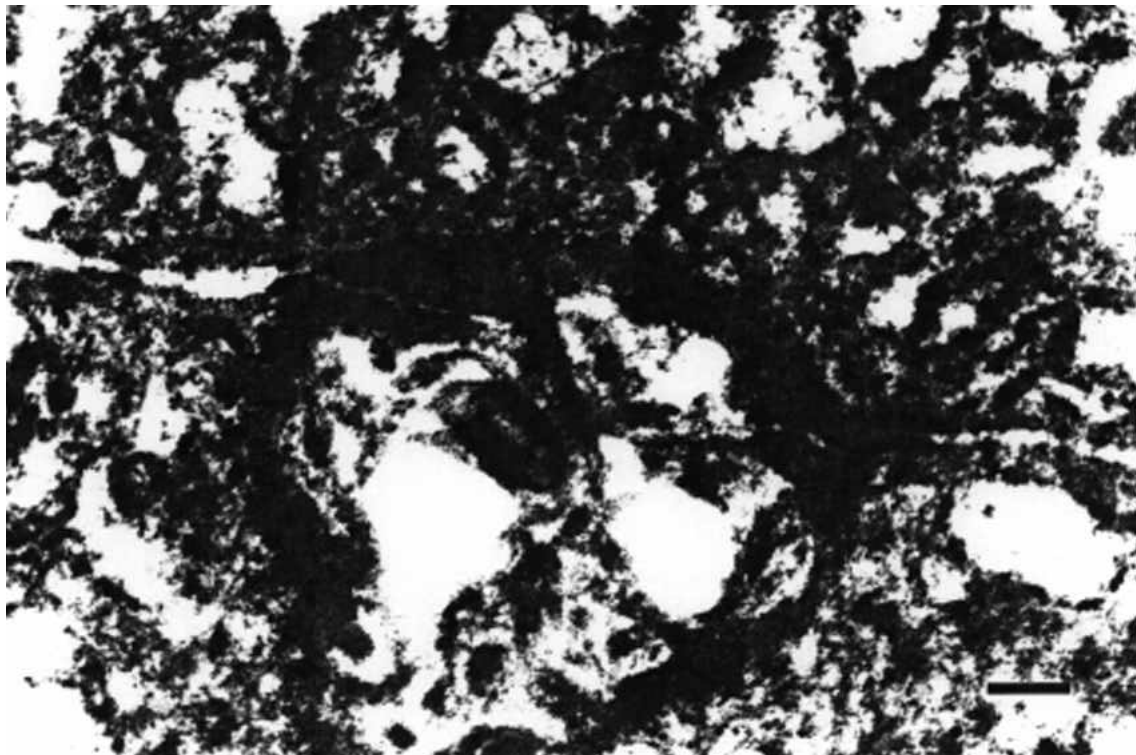


Figura 2.- Canalículo biliar dilatado con pérdida de microvellosidades. Ectasia focal de las cisternas del retículo endoplásmico en los hepatocitos adyacentes. Barra = 200 μ m.

La media del peso, el día 0 y el día del sacrificio, de los corderos testigos y de los infectados pertenecientes a cada grupo establecido en base a la carga parasitaria, se recoge en el Cuadro 93.

Al comparar el peso de los distintos grupos de corderos infectados, establecidos en base al número de vermes recuperados, con el de los testigos (mediante la fórmula mencionada al comienzo de este apartado), no se observó una relación clara entre el peso y la carga parasitaria. El mayor descenso se apreció en todos los grupos de corderos a los 60 días p.i., aunque la pérdida más elevada se detectó en los animales con 401 a 600 vermes (-18%).

El incremento del peso de los corderos de los distintos grupos, en relación al del día 0 p.i., fue menor a los 60 que a los 180 días p.i., y llegó a disminuir (-8,50 Kg) en el grupo del que se recuperaron entre 401 y 600 vermes (Cuadro 94).

Todos los corderos utilizados en el experimento se mantuvieron en una estancia común y recibieron el alimento conjuntamente, por lo que no se controló la dieta ingerida por cada animal. Debido a esto, quizá algunas de las variaciones detectadas en el peso podrían deberse no solo a la presencia del parásito, sino también a la diferente cantidad de alimento ingerida.

Mediante la prueba "t" de Student, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el peso, entre los corderos infectados y testigos el día 0 p.i.

Además, con la "t" de Student (para muestras apareadas), se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los corderos testigos, entre el día 0 y el día 60 p.i. ($t = 7,05$; $p = 0,005$; g.l. = 3) y entre el día 0 y el 180 p.i. ($t = 3,91$; $p = 0,05$; g.l. = 3). Por otra parte, al utilizar esta misma prueba, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso del total de los corderos infectados, entre el día 0 y el 180 p.i. ($t = 7,39$; $p = 0,001$; g.l. = 11) pero no entre el día 0 y 60 p.i. Sin embargo, sí se detectaron en los animales infectados con 3.000 metacercarias, entre el día 0 y el 60 p.i. ($t = 8,77$; $p = 0,001$; g.l. = 5) y entre el día 0 y el 180 p.i. ($t = 4,28$; $p = 0,005$; g.l. = 5), pero no en los infectados con 1.000.



Figura 1.- Conducto biliar interlobulillar. Algunas células epiteliales muestran el hialoplasma claro (edema celular). Barra = 2 μ m.

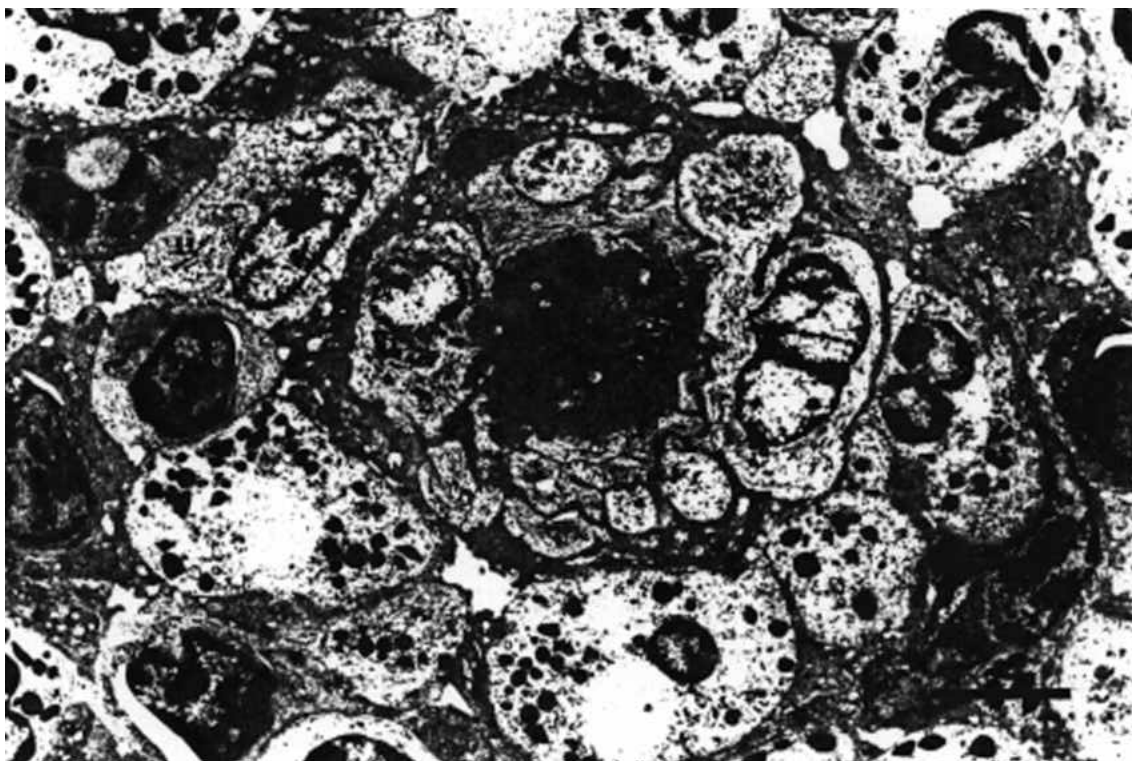


Figura 2.- Espacio porta. Intenso infiltrado periductal en el que destacan los eosinófilos, con núcleo lobulado y granulaciones en su citoplasma. Barra = 5 μ m.

DÍAS	P E S O (Kg) D E L O S C O R D E R O S						
	P. I.	TESTIGOS	INFECTADOS CON DISTINTA CARGA PARASITARIA (N° vermes)				
			< 100 vermes	101 - 200	201 - 300	301 - 400	401 - 600
0	21,56±0,84	21,73 ± 0,67	19,50 ± 1,67	23,23 ± 1,47	19,87 ± 1,39	25,35 ± 1,47	22,50 ± 0,00
60	26,85±0,78	23,28 ± 1,21	23,66 ± 2,24	23,08 ± 1,06	25,00 ± 0,00	21,90 ± 0,00	—
180	28,48±1,96	26,20 ± 0,00	25,10 ± 0,00	27,37 ± 2,62	28,26 ± 3,09	29,60 ± 2,72	27,75 ± 0,00

Cuadro 93.- Peso ($x \pm E.S.$), el día de la infección y el día del sacrificio, de los corderos testigos e infectados, de acuerdo con los vermes recuperados.

DÍAS	V A R I A C I Ó N D E L P E S O (Kg) D E L O S C O R D E R O S						
	P.I	Testigos	< 100 vermes	101-200	201-300	301-400	401-600
60	5,61 ± 0,89	1,46 ± 1,20	3,66 ± 0,36	0,40 ± 2,04	4,50 ± 0,00	- 8,50 ± 0,00	—
180	6,91 ± 1,80	4,70 ± 0,00	7,11 ± 0,00	3,82 ± 1,11	8,60 ± 0,68	5,51 ± 1,67	5,25 ± 0,00

Cuadro 94.- Media ($x \pm E.S.$) del incremento o de la disminución del peso de los corderos con distinta carga parasitaria, con respecto al día 0 p.i.

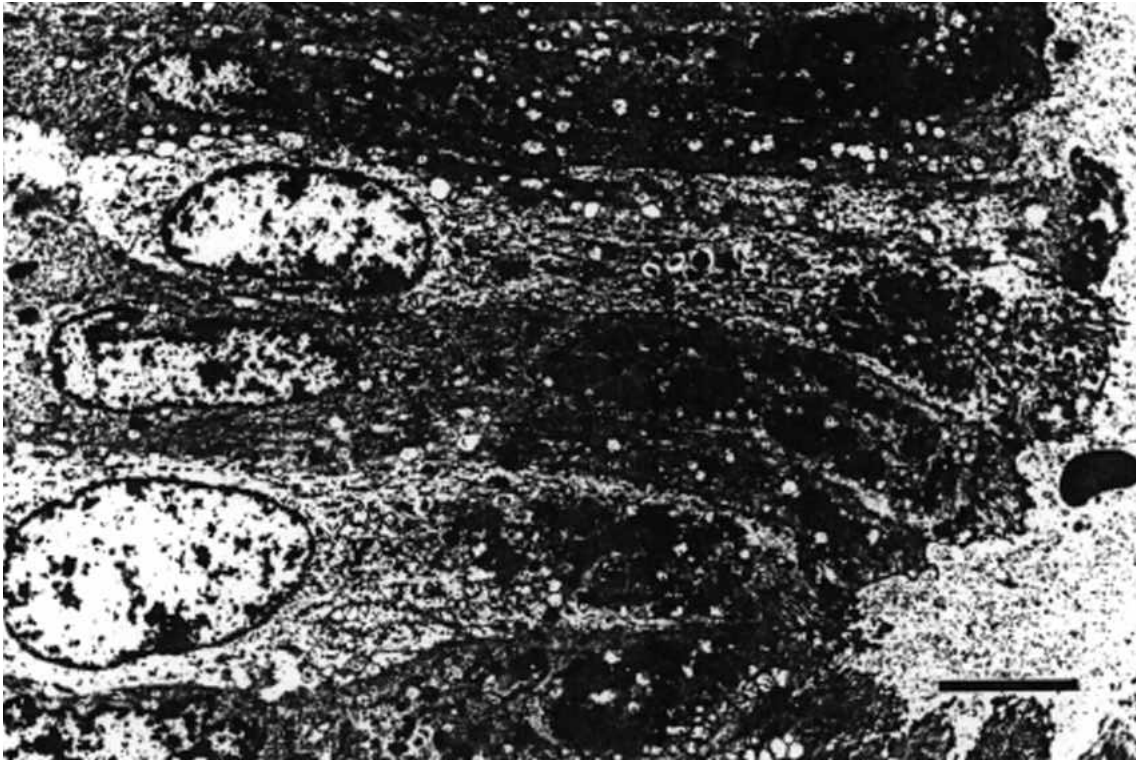


Figura 1.- Gran conducto biliar revestido por un epitelio cilíndrico alto con diferentes tipos celulares.
Barra = 5 μ m.

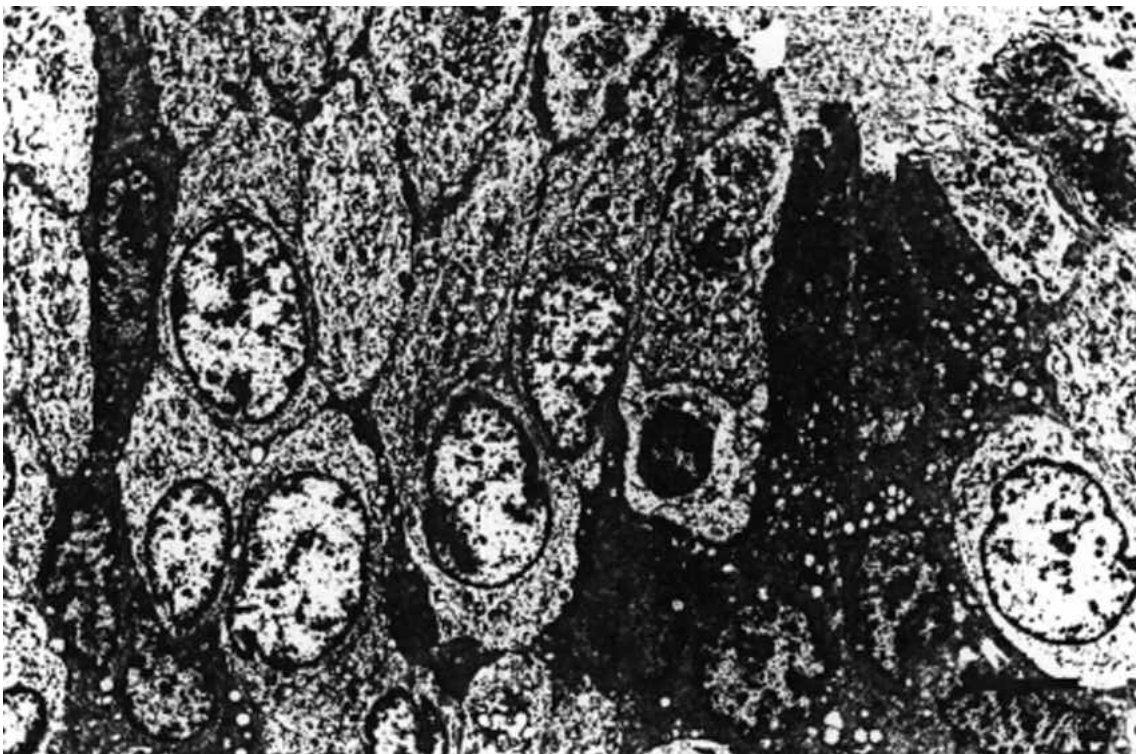


Figura 2.- Células claras y oscuras tapizando un gran conducto biliar. Barra = 7 μ m.

DISCUSIÓN

Nuestras observaciones sobre la tendencia general a la pérdida de peso de los corderos infectados, con respecto a los testigos, parece coincidir con lo señalado por SINCLAIR (1967) y lo observado por ROSEF *et al.* (1985) en corderos infectados naturalmente con *D. dendriticum*, y por HOHORST & LÄMMLER (1962) y SALIMOVA (1972) en infectados de forma experimental. Esta misma tendencia fue detectada también por SÁNCHEZ (1994), en cricetos infectados con 40 metacercarias.

De acuerdo con nuestros resultados, parece que la infección por *D. dendriticum* afecta más negativamente al peso de los animales hasta los 60 días p.i. que hasta los 180, lo que concuerda con lo observado por SALIMOVA (1972) en corderos infectados con 2.500, 5.000 y 10.000 metacercarias, para quien la pérdida de peso fue más acusada hasta que los parásitos alcanzaron la madurez sexual.

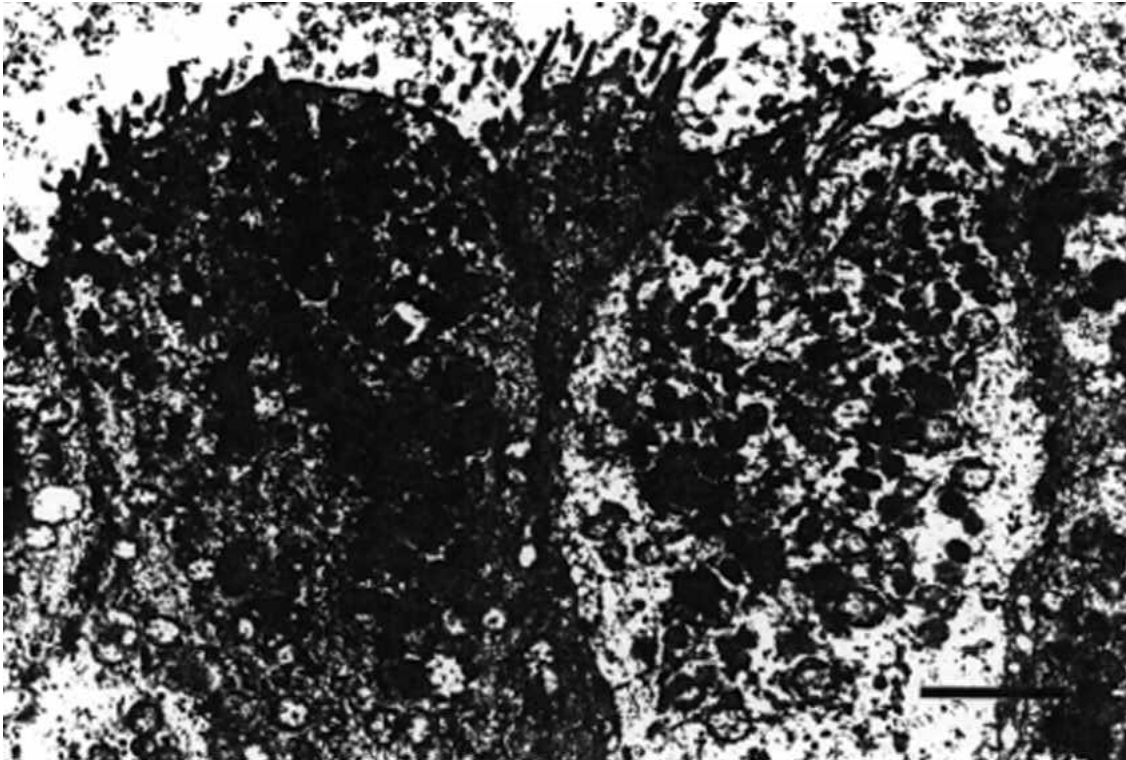


Figura 1.- Porción supranuclear de las células ductales donde se aprecian abundantes mitocondrias y gránulos secretores. Barra = 2 μ m.

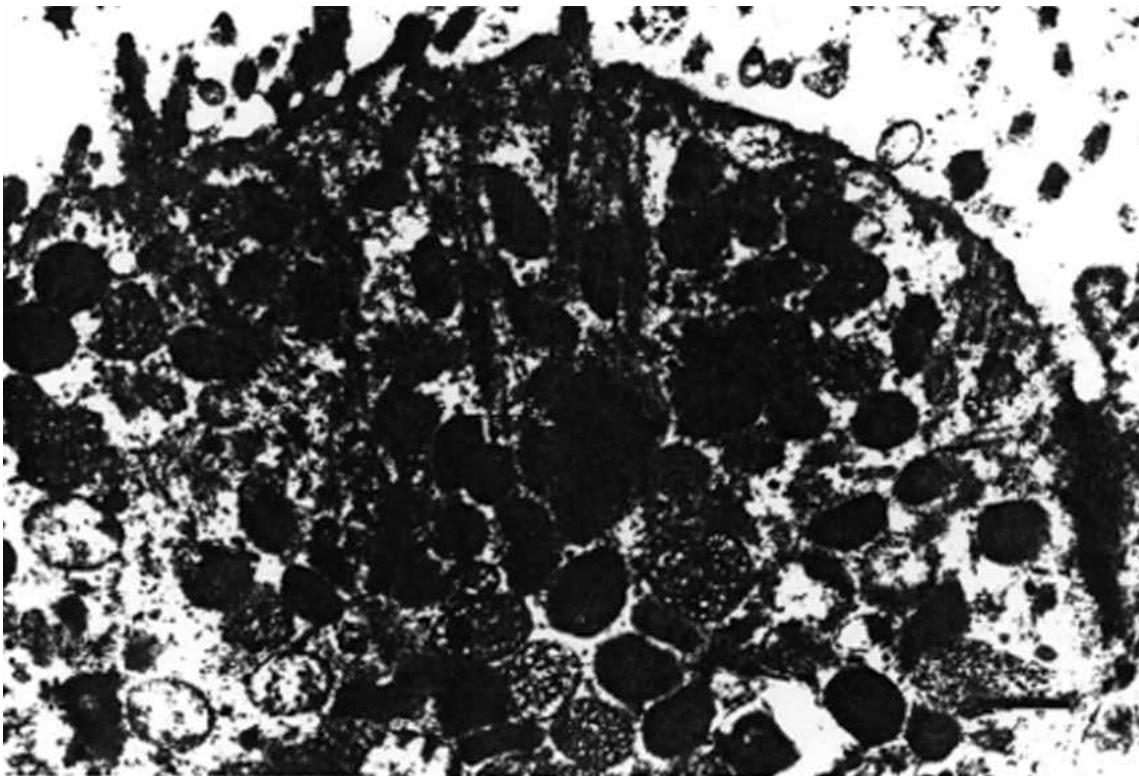


Figura 2.- Célula oscura: detalle de los gránulos citoplasmáticos de diferente densidad. Se identifican escasas microvellosidades apicales y complejos de unión en sus superficies de contacto. Barra = 500 nm.

4.3.- ESTUDIO EN LOS MOLUSCOS

4.3.1.- DESARROLLO LARVARIO DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM* EN LA ESPECIE *CERNUELLA (XEROMAGNA) CESPITUM ARIGONIS* INFECTADA EXPERIMENTALMENTE.

De acuerdo con los análisis individualizados de las heces de los ejemplares de *Cerनुella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Fig. 1 de Lámina XXX) utilizados en el lote A, la eliminación de huevos del parásito cesó a partir del 4º día de iniciada la infección. El porcentaje de caracoles con huevos eclosionados en las heces fue siempre superior al de aquellos que eliminaron huevos no eclosionados (Fig. 31).

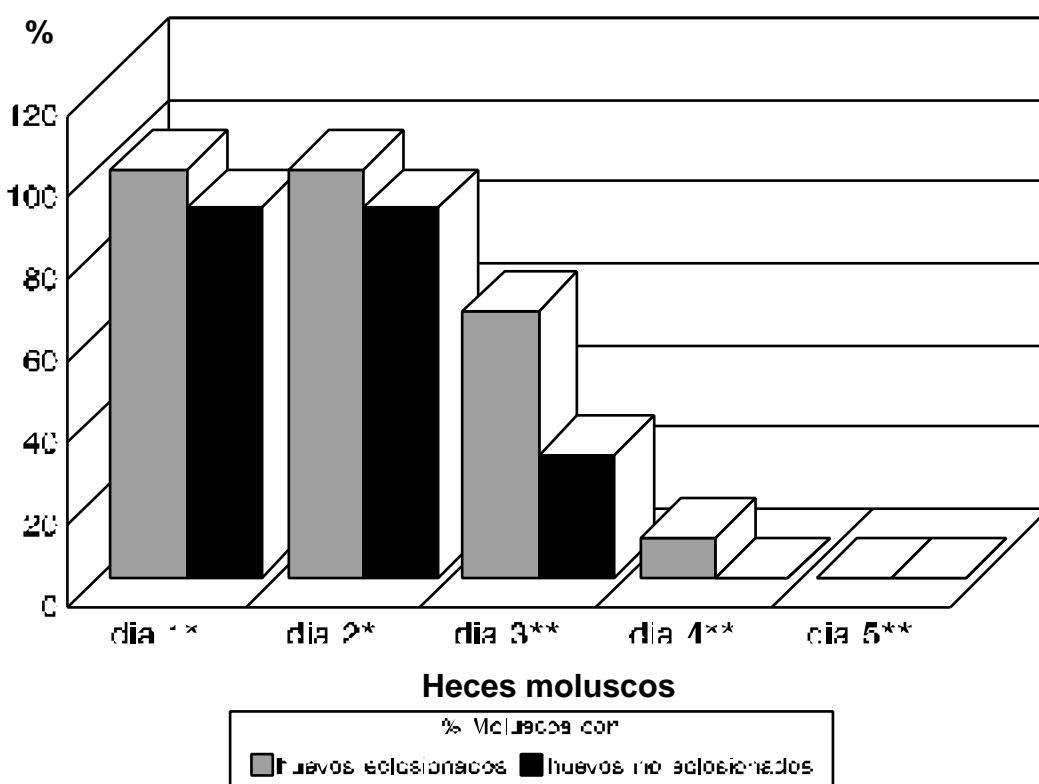


Figura 31.- Porcentaje de moluscos del lote A con huevos de *D. dendriticum* eclosionados y no eclosionados en las heces, durante los 5 primeros días de la experiencia. * En contacto con los huevos; ** Sin material infectante.

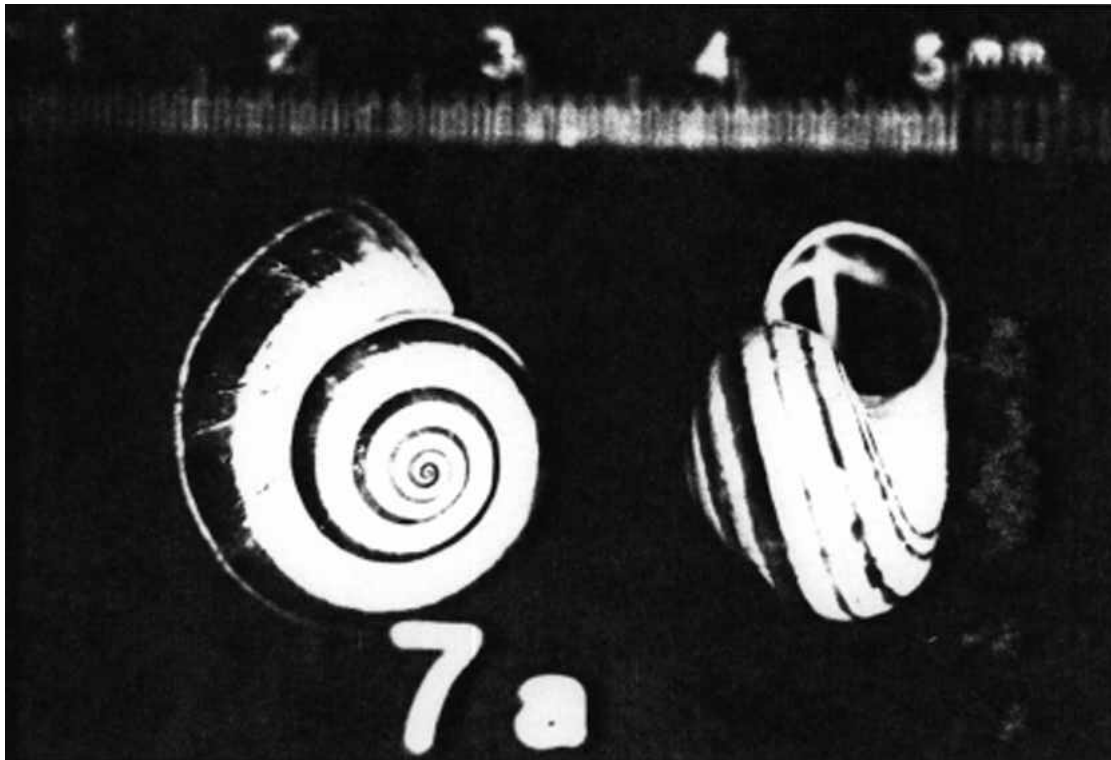


Figura 1.- Ejemplar de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arizonis*, 1er, hospedador, intermediario de *Dicrocoelium dendriticum*. División pequeña de la escala = 0,5 mm.

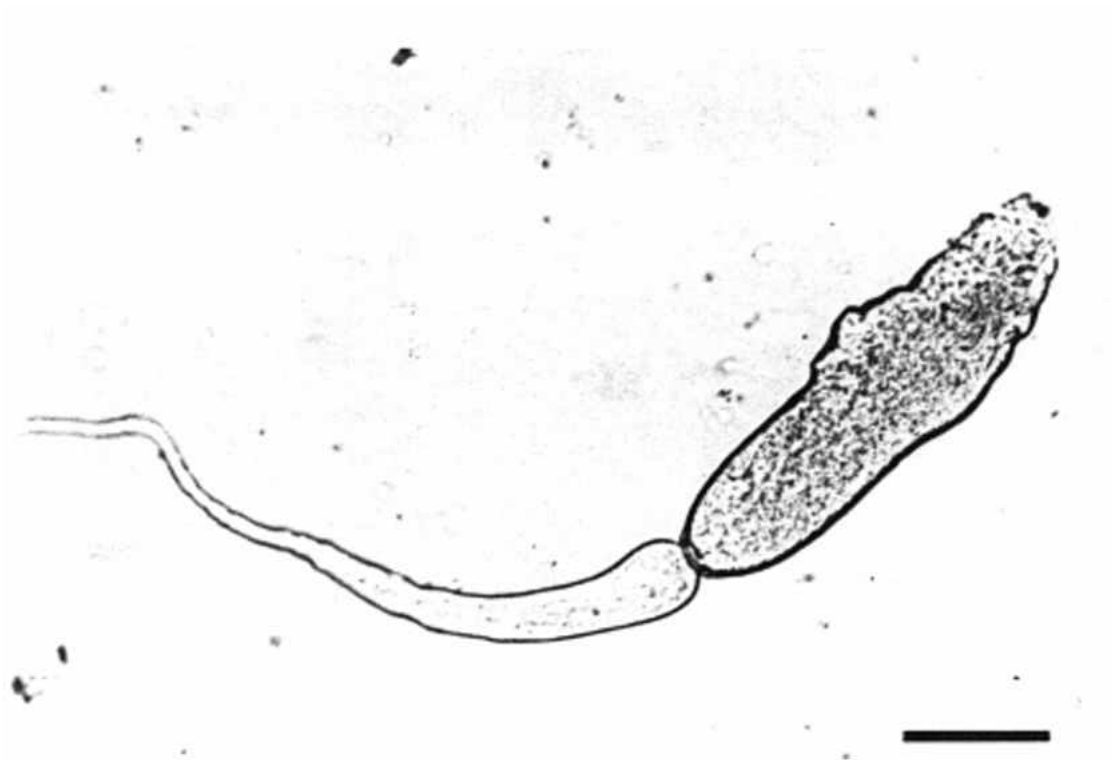


Figura 2.- Cercaria de de *Dicrocoelium dendriticum*. Barra = 0,1 mm

Además, se apreció una disminución gradual del número medio de huevos eclosionados por caracol (Fig. 32) desde el primer día en que los moluscos se mantuvieron en contacto con el material infectante ($x = 9,81 \pm 1,16$) hasta el 4º día ($x = 1$), es decir, el 2º después de finalizada la infección.

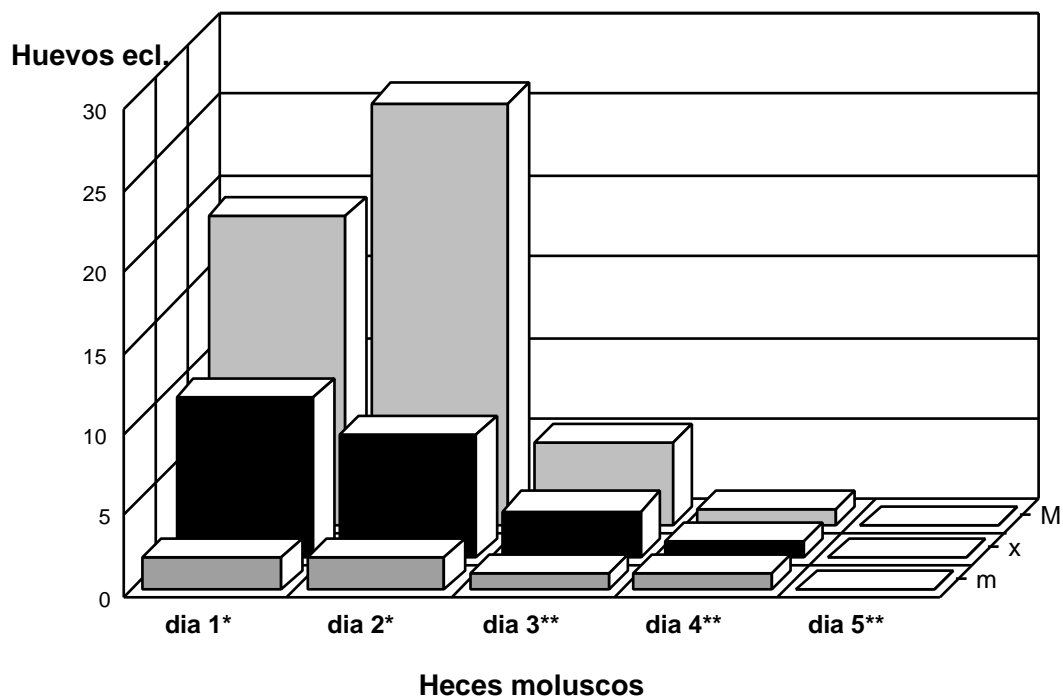


Figura 32.- Máximo (M), mínimo (m) y media (x) de huevos eclosionados (ecl.) de *D. dendriticum* observados en las heces de los moluscos del lote A, durante los 5 primeros días de la experiencia. * En contacto con los huevos; ** Sin material infectante.

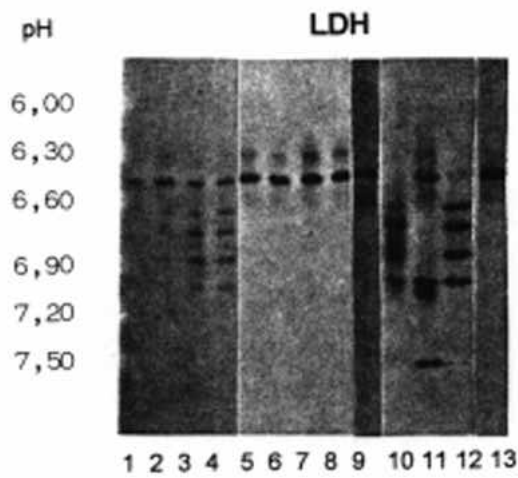


Figura 1.- Bandas de actividad de LDH en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-7); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (8) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (9); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (10-12) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (13) con esporocistos en su interior.

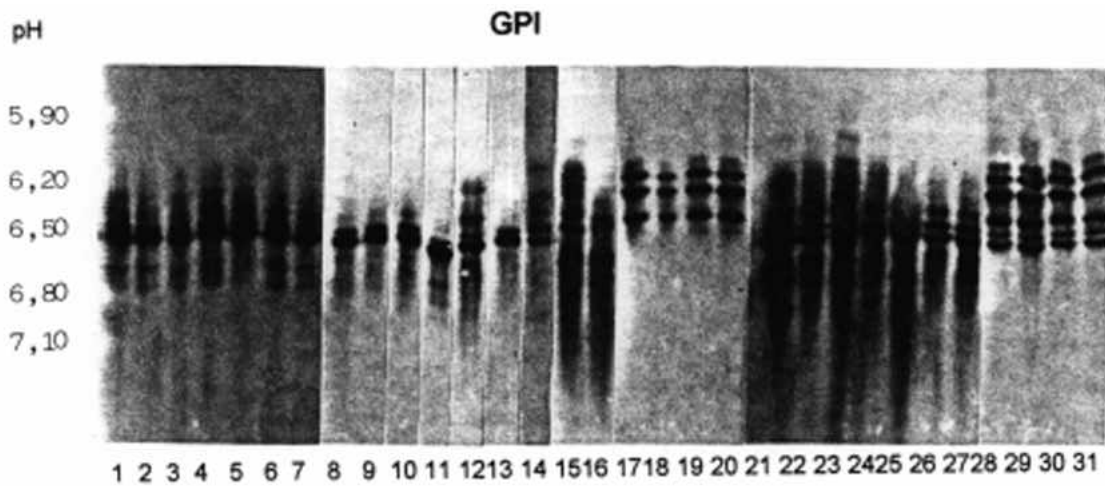


Figura 2.- Bandas de actividad de GPI en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-7); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (8-13) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (14); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (15-16) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (17-20); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (21-27) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (28-31) con esporocistos en su interior.

El porcentaje más elevado de moluscos con huevos eclosionados en las heces fue el del lote A, infectado con la dosis más alta, es decir, 150 huevos/caracol (Fig. 33). Por otra parte, el porcentaje de huevos eclosionados por caracol, sobre la totalidad de los encontrados en las heces, fue: 65,42% en el Lote A (dosis 150); 86,31% en el Lote E (dosis 50); 89,82% en el Lote C (dosis 50); 90,40% en el Lote B (dosis 130); y 82,98% al considerar los cuatro lotes en conjunto.

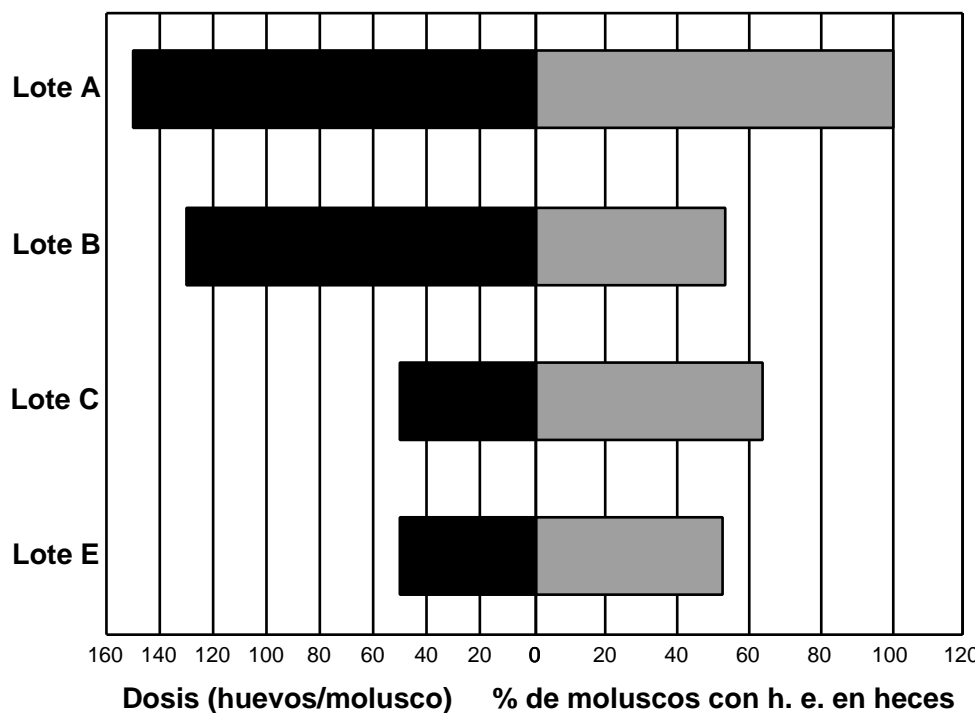


Figura 33.- Porcentaje de moluscos, de cada lote infectado, que eliminaron con las heces huevos eclosionados (h.e.) de *D. dendriticum*, sobre el total de los probados con las distintas dosis.

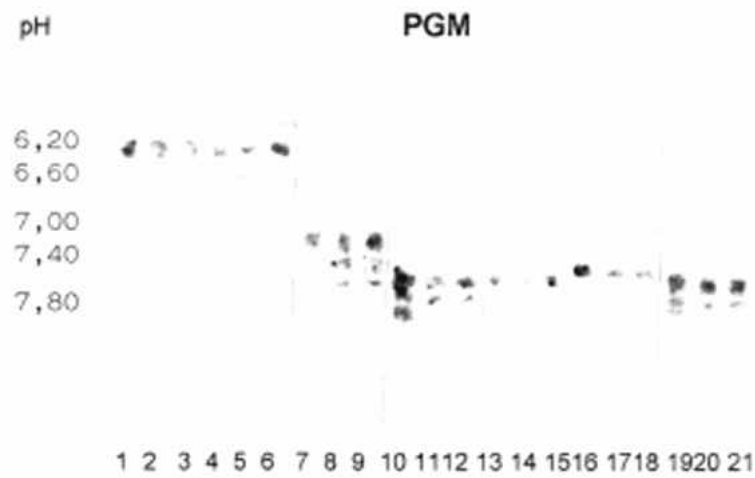


Figura 1.- Bandas de actividad de PGM en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-3); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (4-5) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (6); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (7-9) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (10-15); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (16-18) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (19-21) con esporocistos en su interior.

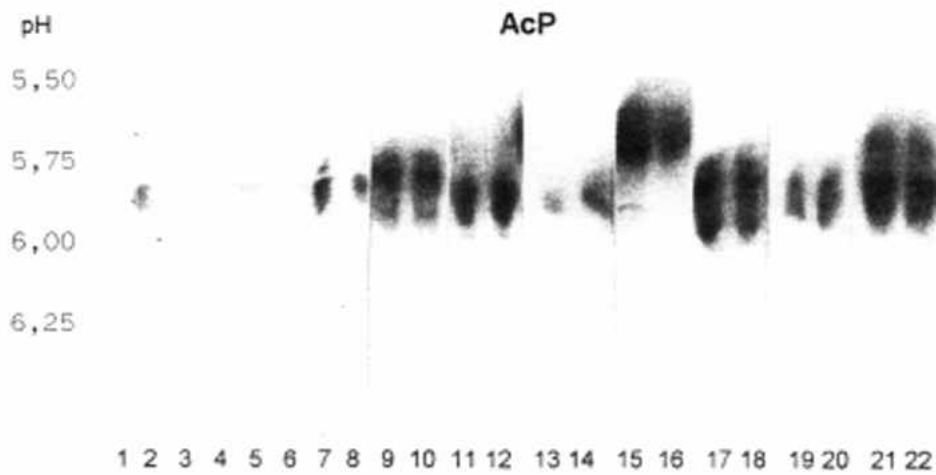


Figura 2.- Bandas de actividad de AcP en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-8); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (9-10) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (11-12); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (13-14) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (15-16); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (17-20) y de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (21-22) con esporocistos en su interior.

El tanto por ciento de caracoles parasitados, sobre el total de los examinados desde el día 50 p.i. (fecha aproximada en que se observó por vez primera el parásito al estéreomicroscopio) hasta el final de cada experiencia, osciló entre 17,53% (lote B) y 75% (lote A) (Fig. 34). Asimismo, el porcentaje de moluscos en los que se detectó infección, sobre el número total de los que eliminaron huevos eclosionados, varió entre los distintos grupos, oscilando entre 19,81% (dosis 130) y 75% (dosis 150), media 38,78% (Fig. 34).

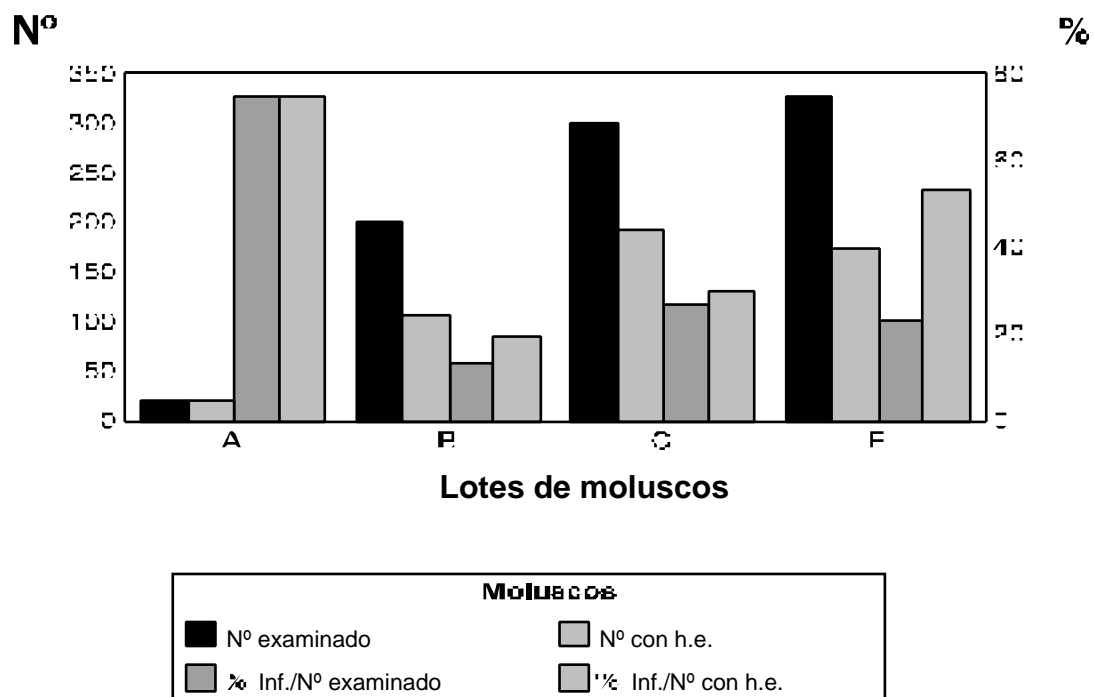


Figura 34.- Porcentaje de moluscos infectados (inf.) en cada lote, sobre el nº total de examinados y sobre el nº total de los que eliminaron huevos eclosionados (h.e.).

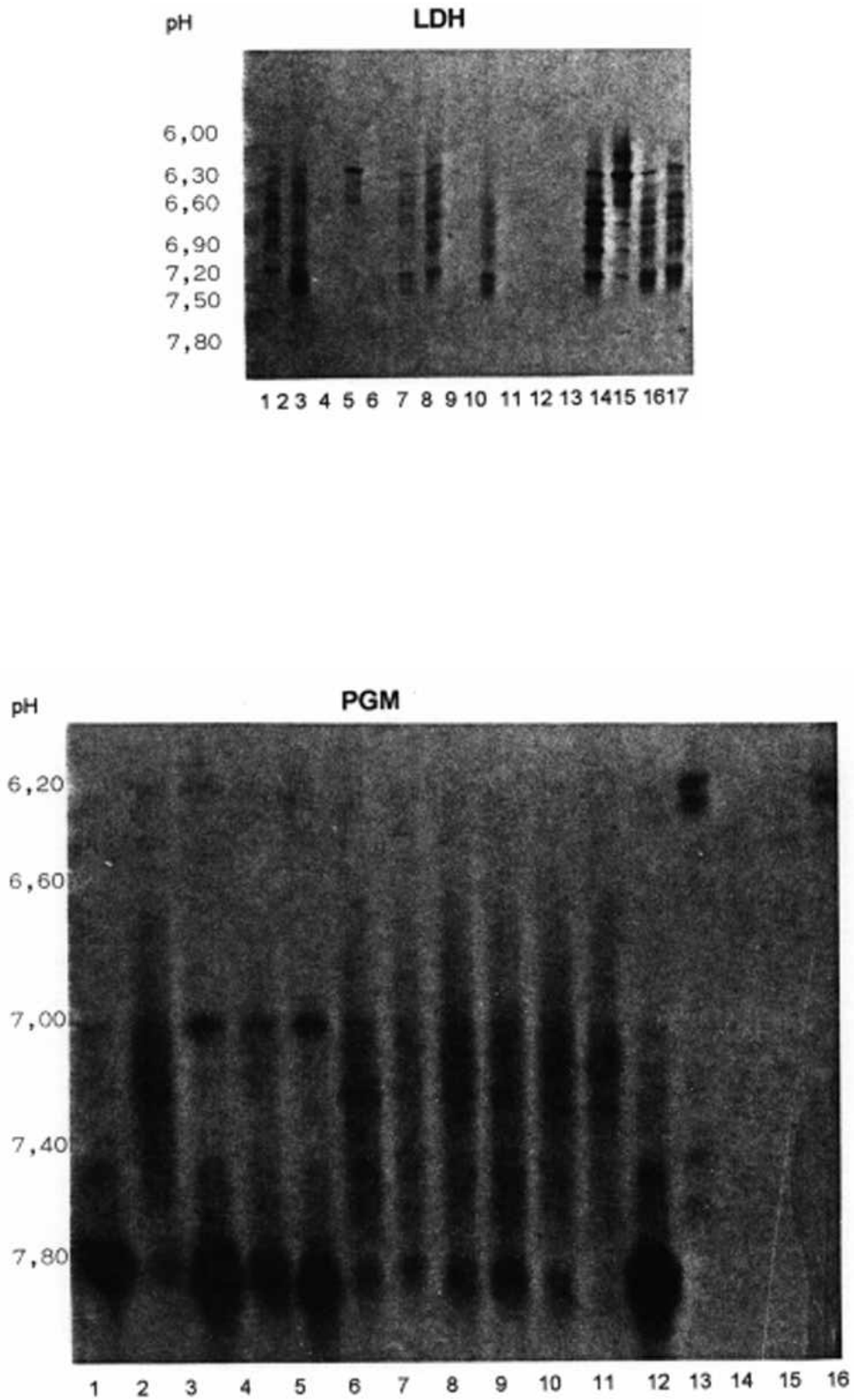


Figura 1.- Patrones enzimáticos de LDH y PGM obtenidos, a los 45 días p.i., al analizar: hepatopáncreas de *Ceruellia (X.) cespitum arizonis* con esporocistos de *D. dendriticum* en su interior (muestras 1-10); hepatopáncreas (11-12); esporocistos (13); y vermes adultos (14-17).

A pesar de que examinamos moluscos hasta el día 217 p.i., sólo los encontramos parasitados hasta el día 189 p.i. Para presentar los resultados obtenidos en los estudios referentes a los porcentajes de parasitación, intensidad y localización de la infección y grado de desarrollo de los parásitos hallados en los moluscos, establecimos intervalos de 20 en 20 días, a partir del día 50 p.i. Aunque el mayor porcentaje de moluscos parasitados se obtuvo entre los días 70 y 129 p.i., no obstante se hallaron caracoles parasitados entre los días 50 y 189 p.i. (Fig. 35).

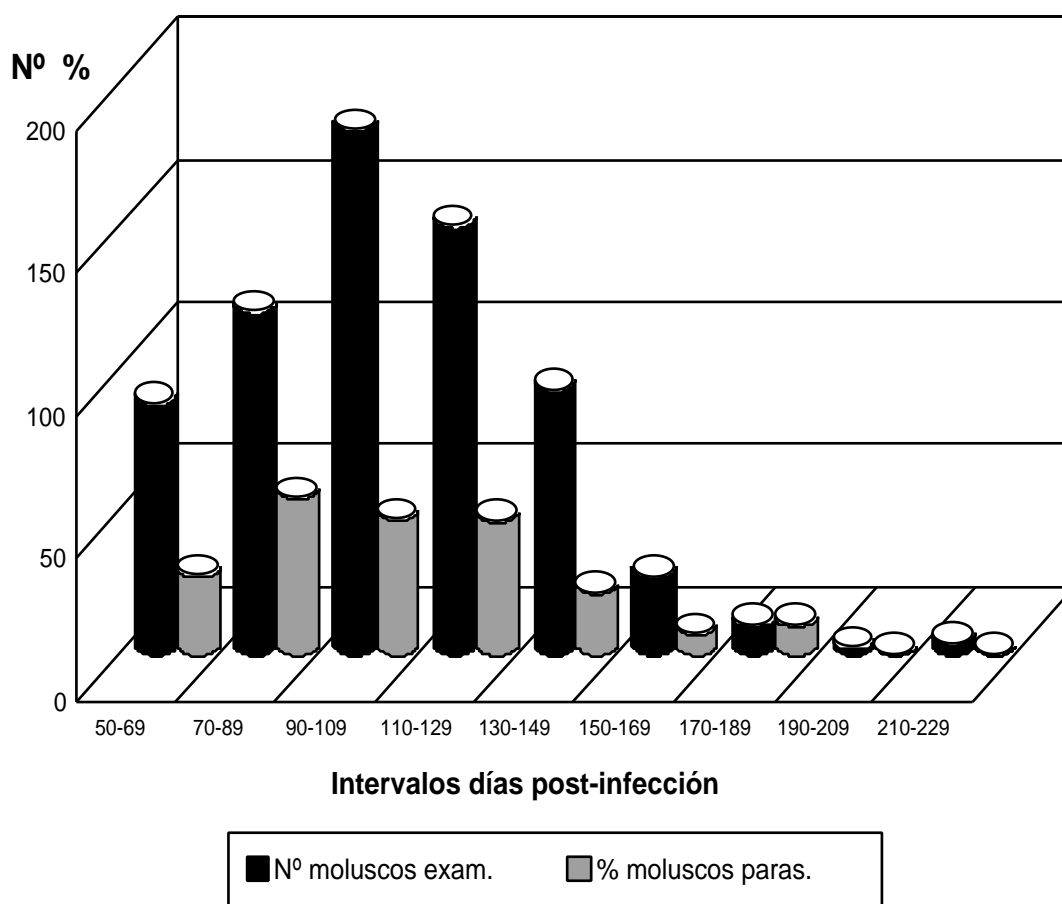


Figura 35.- Porcentaje de moluscos parasitados, sobre el total de los examinados en cada intervalo.

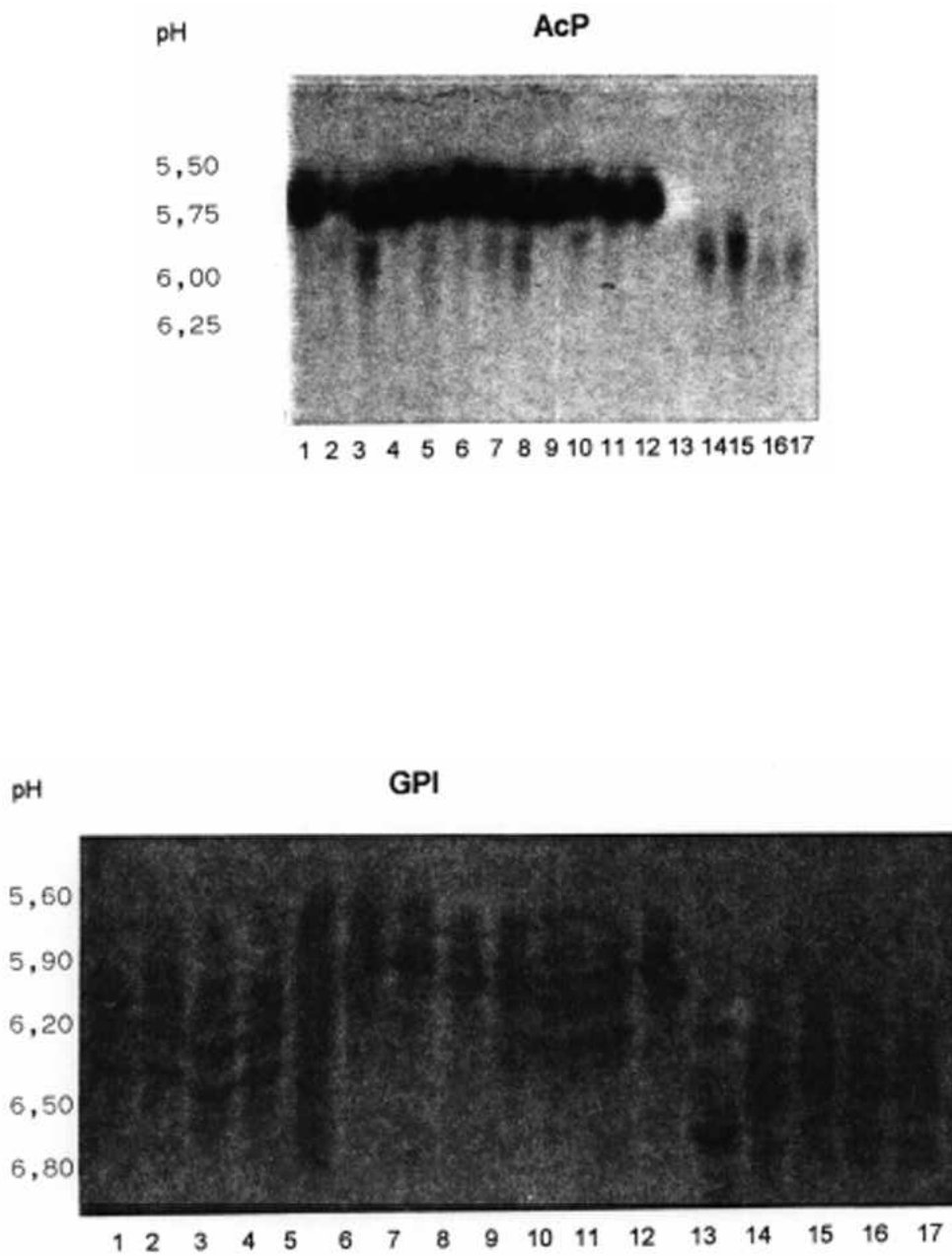


Figura 1.- Patrones enzimáticos obtenidos a los 75 (AcP) y a los 130 días p.i. (GPI), al analizar: hepatopáncreas de *Ceratomyxa (X.) cespitum arizonis* con esporocistos de *D. dendriticum* en su interior (muestras 1-10); hepatopáncreas (11-12); esporocistos (13); y vermes adultos (14-17).

Por otra parte, los moluscos con esporocistos hijos (muy poco desarrollados) concentrados en uno ó varios puntos del hepatopáncreas (tipo A) predominaron hasta el día 90 p.i. y, a partir de esta fecha, los esporocistos hijos (con masas germinales transformándose en cercarias o con cercarias más o menos desarrolladas) comenzaron a migrar e invadir partes más amplias del hepatopancreas (tipo B) o la totalidad del mismo (tipo C) (Fig. 36).

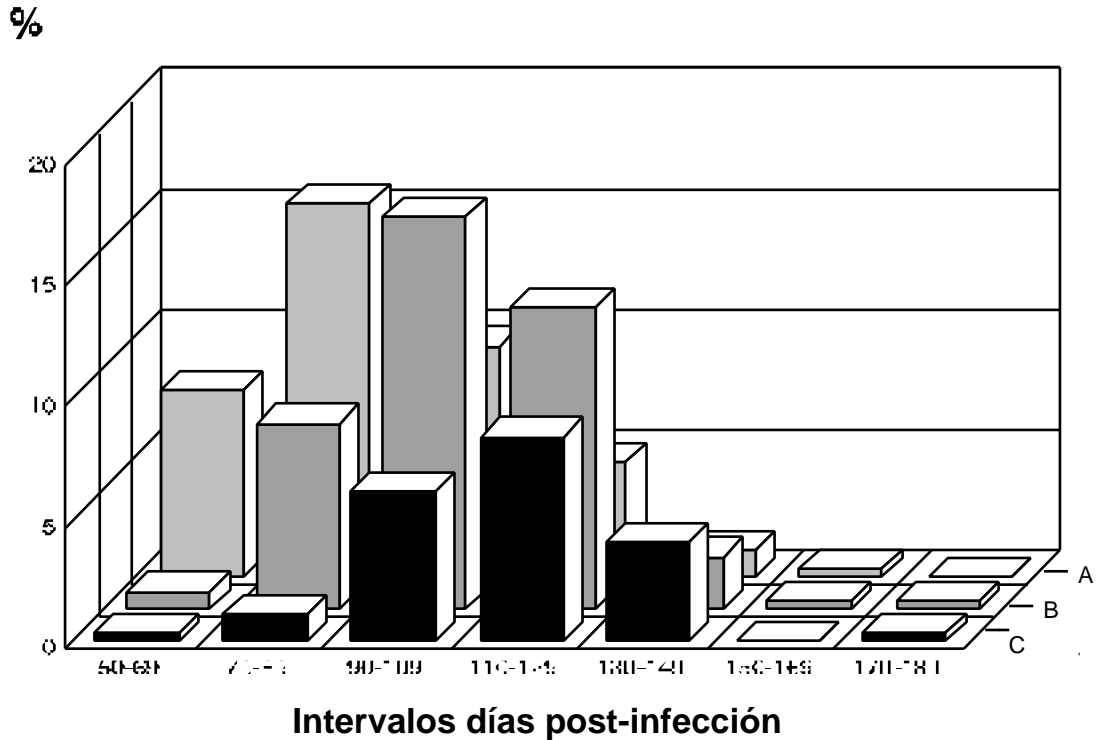


Figura 36.- Porcentaje de moluscos que, dentro de cada intervalo, mostraban en el hepatopáncreas distinta intensidad y localización de los esporocistos: A/ concentrados en uno o varios puntos; B/ ocupando partes amplias; C/ invadiéndolo completamente.

De todos los moluscos en los que detectamos infección, la mayoría albergaban esporocistos hijos con masas germinales de *D. dendriticum* (67,9%). Como puede verse en la Fig. 37, fue entre los días 70 y 90 p.i. cuando se halló el mayor porcentaje de caracoles con el parásito en dicho grado de desarrollo (23,24%). Sin embargo, el porcentaje de moluscos que contenían esporocistos con cercarias desarrolladas (Fig. 2 de Lámina XXX) pero no maduras fue bajo (3,32%), habiéndose observado dicho grado de desarrollo con posterioridad al día 110 p.i. (Fig. 37). Por otra parte, no conseguimos ver bolas de mucus emitidas por los moluscos, con las cercarias del parásito en su interior.

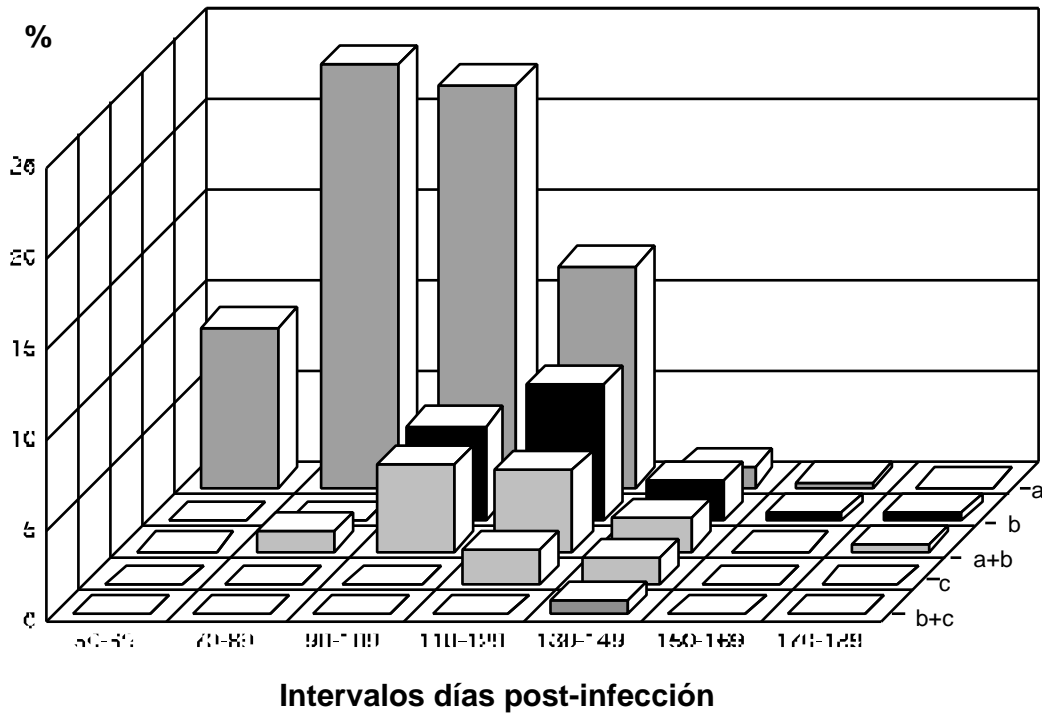


Figura 37.- Porcentaje de moluscos que, en cada intervalo, albergaban *D. dendriticum* en diferente grado de desarrollo: a/ esporocistos con masas germinales indiferenciadas; b/ esporocistos con masas germinales comenzando a diferenciarse o con cercarias muy inmaduras; c/ esporocistos con cercarias desarrolladas pero no maduras.

Mediante la prueba de ji-cuadrado se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes A, B, C y E de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* probados, en cuanto al porcentaje de moluscos con huevos eclosionados ($\chi^2 = 24,66$; $p < 0,005$; g.l. = 3). Además, cuando se aplicaron las tablas de contingencia de 2 x 2 se detectaron diferencias estadísticamente significativas, para $p < 0,005$, entre los grupos: A y B; A y C; A y E; E y C; y, para $p < 0,05$, entre los grupos: B y C.

Asimismo, mediante χ^2 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes A, B, C, D y E de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* probados, en cuanto al porcentaje de caracoles parasitados ($\chi^2 = 31,12$; $p < 0,005$; g.l. = 4). Cuando se aplicaron las

tablas de contingencia de 2 x 2, se detectaron diferencias estadísticamente significativas, para $p < 0,005$, entre los grupos: A y B; A y C; A y E; B y D; y, para $p < 0,05$, entre los grupos: B y E; C y D; D y E.

DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestros resultados, parece suficiente examinar las heces eliminadas por los moluscos hasta las 48 horas p.i., para controlar la eclosión de los huevos de *D. dendriticum*, ya que, en nuestro estudio, no se detectaron huevos con posterioridad a dicho período. Además, el mayor número se observó en las heces recogidas durante la infección, lo que coincide, en parte, con lo señalado por RACTLIFFE (1968), quien ya halló un 20% de huevos eclosionados en el intestino de ejemplares de *Helicella* sp., a los 20 minutos de iniciado el experimento.

En nuestros experimentos, no observamos una relación clara entre la dosis utilizada y el porcentaje de eclosión de los huevos en los moluscos, puesto que el valor de dicho porcentaje fue superior en los lotes en que se administró una dosis de 50 huevos (86,31%, 89,82%) que en aquellos en que la dosis fue de 150 (65,42%). Este mismo fenómeno fue observado por ALUNDA & ROJO (1982), cuando infectaron 5 lotes distintos de la misma especie de molusco, puesto que con dosis de 6,59 y 6,78 huevos obtuvieron porcentajes de eclosión (80,68%; 81,81%, respectivamente) superiores a cuando utilizaron dosis de 9,5 huevos (74,72%).

De igual forma, no se detectó una estrecha correspondencia entre el porcentaje de moluscos con huevos eclosionados en cada lote y la dosis utilizada, ya que dicho porcentaje fue menor en el lote infectado con 130 huevos (53%) que en el que recibió 50 (64%). Asimismo, ALUNDA & ROJO (1982) obtuvieron un porcentaje de eclosión más bajo cuando la dosis fue de 9,25 (96,29%) que cuando fue de 6,78 y 8 (97,96%; 100%, respectivamente).

En cada lote, el porcentaje de moluscos parasitados fue, en general, inferior al de moluscos con huevos eclosionados, excepto en el lote infectado con 150 huevos en que ambos porcentajes fueron iguales. La experiencia nos demostró que, en las condiciones de nuestro estudio, el parásito no era visible al estereomicroscopio hasta el día 50 p.i., como mínimo, lo que nos hace pensar que el porcentaje de parasitación real debe ser algo más alto.

El hecho de que algunos moluscos que eliminaron huevos eclosionados con las heces no estuvieran parasitados al sacrificarlos, coincide con lo observado por otros autores, cuando intentaron infectar otras especies de moluscos (MAPES, 1951; TARRY, 1969; KALKAN, 1971). No obstante, hay que tener en cuenta que no todas las especies son adecuadas para el desarrollo del parásito y que, a veces, no se utilizan las técnicas adecuadas para su visualización en el molusco.

El porcentaje de caracoles parasitados entre los días 50 y 69 p.i. (27,27%) fue inferior al obtenido por ALUNDA & ROJO (1982) a los 55-60 días p.i. en varios lotes de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados experimentalmente (36,36-77,27%).

El hallazgo de los primeros esporocistos de *D. dendriticum* a los 50 días p.i. coincide con lo observado por NÖLLER (1932b) (citado por DEL RÍO, 1967) en *Zebrina detrita* infectada experimentalmente. Dicho período es ligeramente inferior al señalado por MANGA *et al.* (1995) (60 días p.i.) en ejemplares de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados en el laboratorio en los meses de Junio y Julio, y mantenidos en condiciones controladas de campo en la finca experimental de CSIC (Grulleros, León). Sin embargo es superior al detectado por MAPES (1951) en *Cionella lubrica* (= *Cochlicopa lubrica*) (80 días p.i.) y por MANGA (op. cit.) en los experimentos realizados durante los meses fríos del año (hasta 9 meses p.i.)

Nuestros resultados muestran un desarrollo diacrónico del parásito en el molusco, puesto que a pesar de que la infección se produjo en el mismo día, sin embargo la observación de cada una de las fases de desarrollo tuvo lugar, a veces, en épocas diferentes y, además, en un mismo molusco encontramos, en ocasiones, esporocistos de segundo orden en distinto grado de desarrollo. Así, en los caracoles examinados entre los 110 y 149 días p.i. se observaron desde esporocistos que contenían masas germinales indiferenciadas hasta otros que albergaban cercarias desarrolladas. Estos resultados coinciden, en parte, con los de TIMON-DAVID (1965), quien halló esporocistos con masas germinales y cercarias jóvenes a los 123 días p.i. en *Helicella (Helicopsis) arenosa*, y con los de CHITIASHVILI *et al.* (1977) quienes encontraron esporocistos de segundo orden con cercarias maduras entre los 84 y 151 días p.i. en *Helicella derbentina*, *Stenomphalia ravergeri*, *Helicella schelkovnicovi* y *Zebrina hohenackeri*.

A pesar de haber examinado moluscos parasitados hasta el día 189 p.i. nunca pudimos observar bolas de mucus emitidas por los caracoles conteniendo cercarias, lo que parece indicar que las cercarias más desarrolladas encontradas en nuestros moluscos (110-149 días p.i.) todavía no estaban maduras y que, en las condiciones en que mantuvimos los ejemplares de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, el desarrollo completo del parásito requiere más tiempo. La observación de las cercarias necesitó de 150 a 165 días p.i. en *Bradybaena fruticum* (= *Fruticicola fruticum*), según VERSHININ (1957a); de 165 a 180 días p.i. en *Helicella derbentina*, *Helicella crenimargo* y *Zebrina hohenackeri*, de acuerdo con GRIGORYAN *et al.* (1956); y de 186 días p.i. en *Helicella (Helicopsis) arenosa*, según TIMON-DAVID (1965). Estos plazos contrastan con los 65 días p.i. en *Zebrina hohenackeri*, los 70 días p.i. en *Bradybaena fruticum* y *Euomphalia strigella*, y los 85 días p.i. en *Cochlicopa lubrica*, señalados por TVERDOKHLEBOV (1973) en experiencias realizadas a 30° C.

El desarrollo del parásito puede variar de acuerdo a las condiciones a que están sometidos los moluscos, puesto que VERSHININ (1957a) observó cercarias en *Bradybaena fruticum* (= *Fruticicola fruticum*) a los 150-165 días p.i., mientras que en dicha especie

TVERDOKHLEBOV (1973) vió cercarias a los 87 y a los 70 días p.i., a 25° C y 30° C de temperatura, respectivamente. De igual forma, KRULL & MAPES (1952b) señalaron que los esporocistos no producen cercarias en *Cochlicopa lubrica* (= *Cionella lubrica*) hasta transcurridos tres o más meses, sin embargo TVERDOKLEBOV (1973) las observó a los 85 días p.i., a 30° C, en la misma especie de molusco.

Por otra parte, no podemos olvidar que el tiempo necesario para que el desarrollo del parásito tenga lugar varía de acuerdo con la especie de molusco. Así, GÓMEZ *et al.* (en prensa) observaron que en ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y de *Cernuella (Cernuella) virgata*, infectados al mismo tiempo con *D. dendriticum* y mantenidos en idénticas condiciones, el porcentaje de infección fue más elevado en la primera especie, en la que también el desarrollo de los esporocistos a los 90 días p.i. era más avanzado.

4.3.2.- ESTUDIO ISOENZIMÁTICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS FASES LARVIARIAS DEL PARÁSITO Y SU DETECCIÓN EN LOS MOLUSCOS

4.3.2.1.- Caracterización de esporocistos secundarios de *D. dendriticum* y de moluscos hospedadores intermediarios.

Los modelos enzimáticos detectados en los esporocistos secundarios de *D. dendriticum* y en el hepatopáncreas de los moluscos los denominaremos con el nombre de cada enzima seguido de un número romano con apóstrofo y de una letra mayúscula, respectivamente, para diferenciarlos de los de los adultos y metacercarias. Dichos modelos enzimáticos se realizaron con todas las bandas de actividad observadas. No obstante, dentro de ellas se establecieron 3 categorías: fuertes (■), débiles (▣) y muy débiles (□).

Al analizar, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, un número variable de **esporocistos secundarios** extraídos de 3 ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados **experimentalmente** con *D. dendriticum* (Lote B), observamos actividad de las enzimas LDH, GPI, PGM y AcP. Las bandas de actividad de los tipos enzimáticos detectados (Fig. 38) se situaron en los siguientes valores de pH: 7,08 / LDH-I'; 6,27-6,80 / GPI-I'; 6,20 / PGM-I'; y 5,86 / AcP-I'.

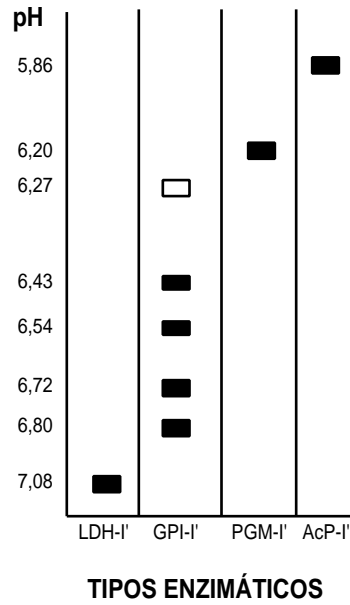


Figura 38.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de *D. dendriticum* aislados de ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados experimentalmente. Intensidad de las bandas: Fuertes (■) y muy débiles (□).

Asimismo, al estudiar con la misma técnica las **fases larvarias** aisladas de 2 especímenes de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, infectados en la **naturaleza** con esporocistos morfológicamente similares a los de *D. dendriticum*, se observó actividad enzimática (Fig. 39; Figs. 1-2 de Lámina XXXI; Figs. 1-2 de Lámina XXXII) en los siguientes valores de pH: 6,30-7,08 / LDH-II'; 6,27-6,80 / GPI-I' y GPI-II'; 6,20-6,60 / PGM-II'; y 5,86 / AcP-I'.

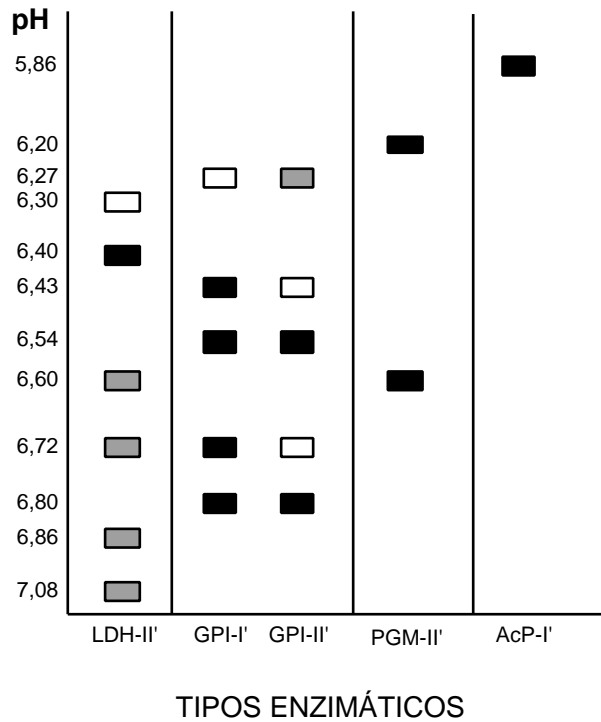


Figura 39.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de *D. dendriticum* aislados de ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados naturalmente. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (■) y muy débiles (□).

De la misma forma, cuando utilizamos dicha técnica para analizar los **esporocistos secundarios** aislados de 5 ejemplares de *Helicella (Helicella) itala* infectados **naturalmente** observamos actividad enzimática (Fig. 40; Figs. 1-2 de Lámina XXXI; Figs. 1-2 de Lámina XXXII) en los siguientes rangos de pH: 6,40-7,08 / LDH-III' y LDH-IV'; 6,27-6,80 / GPI-I' y GPI-III'; 6,20-6,60 / PGM-III' y PGM-IV'; y 5,70-5,92 / AcP-II'.

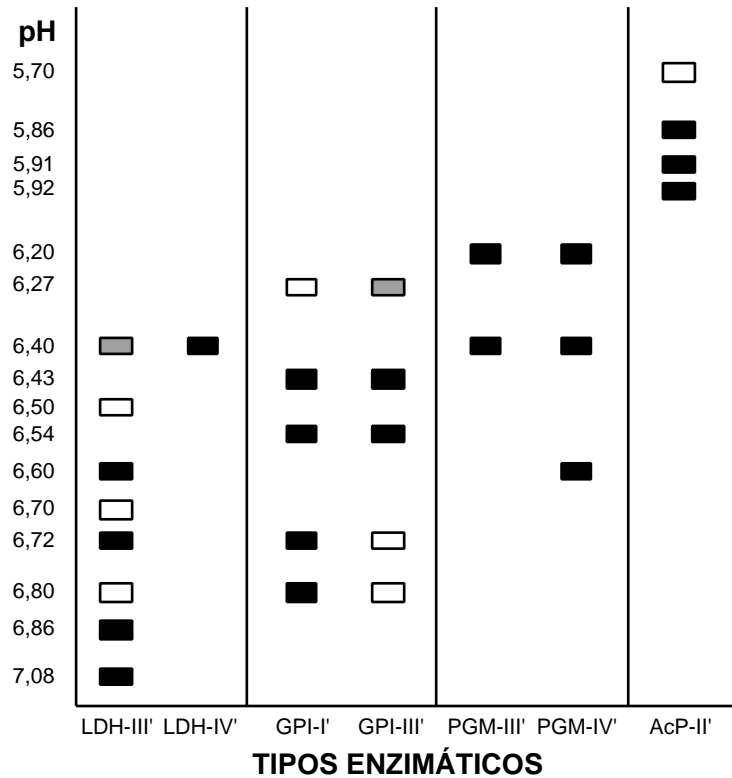


Figura 40.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de *D. dendriticum* aislados de ejemplares de *Helicella (Helicella) itala* infectados naturalmente. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (▒) y muy débiles (□).

Todas las bandas de actividad detectadas en los esporocistos de *D. dendriticum* se han observado también en los esporocistos de moluscos infectados naturalmente y las de éstos, a su vez, en los adultos (Figs. 8-11; Figs. 38-40; Figs. 1-2 de Lámina XXXI; Figs. 1-2 de Lámina XXXII).

De todo lo dicho parece deducirse que los esporocistos extraídos de moluscos encontrados con infección en la naturaleza pertenecen a *D. dendriticum*.

Por otra parte, cuando estudiamos el **hepatopáncreas** de 43 ejemplares de *Ceruellia (Xeromagna) cespitum arigonis* y de 13 de *Helicella (Helicella) itala*, en los que previamente no habíamos detectado infección al estereomicroscopio, se observaron varios modelos de actividad para cada enzima estudiada (Fig. 41; Figs. 1-2 de Lámina XXXI; Figs. 1-2 de Lámina XXXII). En ningún caso se detectó actividad de LDH en el hepatopáncreas sin parasitar de los moluscos analizados, ni en el pie de los mismos. Sin embargo, la actividad del

resto de las enzimas en el hepatopáncreas de *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y de *Helicella (Helicella) itala*, respectivamente, se observó en los siguientes valores de pH: 6,01-6,27 y 6,20-6,80 / GPI; 6,88-7,80 y 6,75-7,35 / PGM; y 5,60-5,64 y 5,64 / AcP. Se obtuvieron distintos modelos enzimáticos en el hepatopáncreas de cada especie de molusco (Fig. 41; Figs. 1-2 de Lámina XXXI; Figs. 1-2 de Lámina XXXII), aunque algunas bandas de actividad de GPI y PGM fueron comunes en ambas. Asimismo, se hallaron diferentes tipos enzimáticos en el hepatopáncreas de ejemplares procedentes de distintas localidades y, a veces, en los recolectados en el mismo lugar.

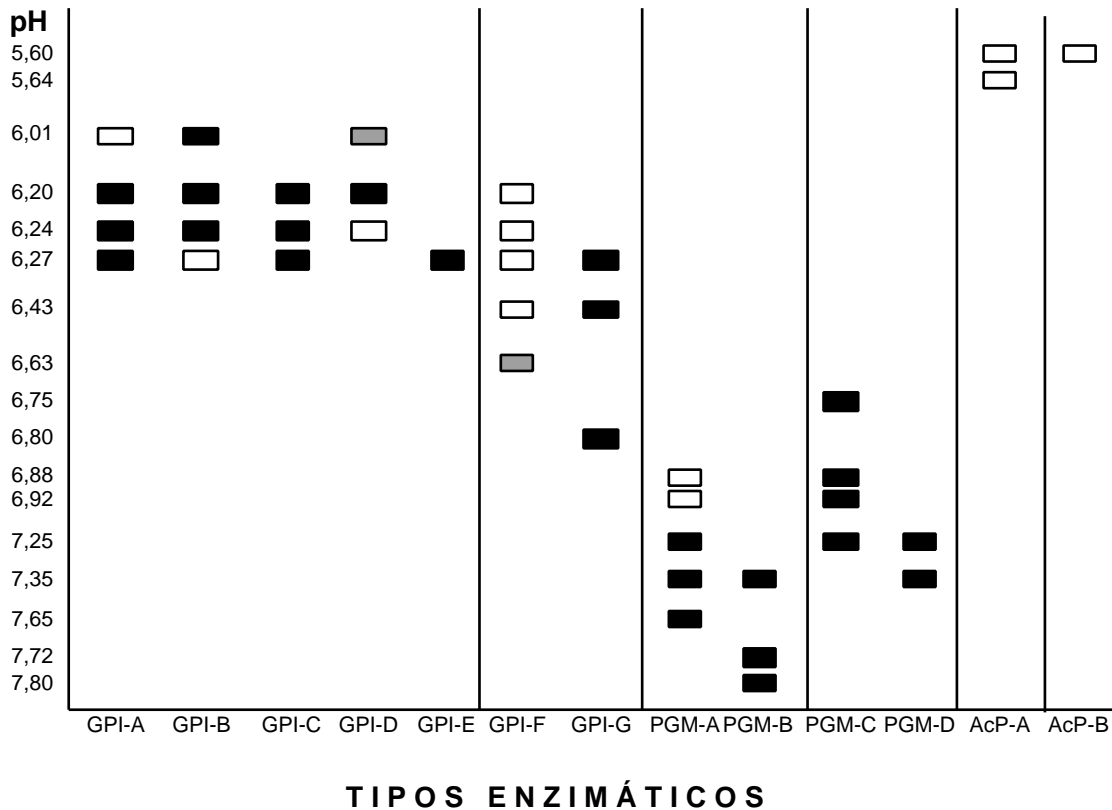


Figura 41.- Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI, PGM y AcP encontrados en el hepatopáncreas de ejemplares de *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (GPI-A, -B, -C, -D, -E; PGM-A, -B; AcP-A) y *Helicella (Helicella) itala* (GPI-F, -G; PGM-C, -D; AcP-B) testigos. Intensidad de las bandas: Fuertes (■), débiles (▒) y muy débiles (□).

Observamos las mismas bandas de actividad en el pie y en el hepatopáncreas de los moluscos testigos, lo que permitió corroborar la ausencia de parasitación por *D. dendriticum* en el hepatopáncreas (órgano en el que normalmente se asientan los esporocistos).

En lo que respecta al resto de las enzimas estudiadas, daremos unos datos más someros, puesto que el material analizado fue escaso. En los esporocistos procedentes de ejemplares de *Helicella (Helicella) itala* infectados en la naturaleza, observamos únicamente actividad de MDH entre pH 8,10 y 9,50. En el hepatopáncreas de testigos de la misma especie de molusco se detectó actividad enzimática en los siguientes rangos de pH: 5,60-6,00 / MDH; 5,70-6,00 / HBDH; y 6,20-6,50 / -GPDH. Asimismo, en el hepatopáncreas de *Cerneuella*

(*Xeromagna cespitum arigonis*) se observó actividad para -GPDH (única enzima estudiada) entre pH 5,80 y 6,30.

A continuación expondremos los resultados obtenidos sobre la actividad de cada sistema enzimático, al analizar el **hepatopáncreas** de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y de *Helicella (Helicella) itala* con **esporocistos** de *D. dendriticum* en su interior.

Las bandas de actividad de LDH, situadas entre pH 6,30 y 7,10, corresponden únicamente al parásito (Fig. 1 de Lámina XXXI) pues, como ya dijimos anteriormente, no se encontró actividad en el hepatopáncreas sin parasitar de las especies de moluscos analizadas. Se observaron diferentes modelos enzimáticos en caracoles parasitados procedentes de distintas localidades y, a veces, en los recolectados en el mismo lugar.

Las bandas de actividad de GPI se detectaron en los siguientes rangos de pH: 6,01-6,80 en *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, y 6,20-6,80 en *Helicella (Helicella) itala*, ambas infectadas naturalmente (Fig. 2 de Lámina XXXI). Los resultados obtenidos en esta última especie no permiten discriminar las bandas de actividad del parásito de las del molusco que lo alberga, puesto que, de acuerdo con los datos previos obtenidos, por separado, para las fases larvarias (Figs. 38-40) y para el molusco (Fig. 41), las bandas de ambos se solapan. Sin embargo, en el caso de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, aunque algunas bandas situadas alrededor de pH 6,25 también pueden solaparse, creemos que las ubicadas a pH más básico corresponden únicamente al parásito.

Las bandas de actividad de PGM se observaron en un rango de pH entre 6,20 y 7,35 en *Helicella (Helicella) itala*, y entre 6,20 y 7,80 en el caso de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Fig. 1 de Lámina XXXII). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las fases larvarias (Figs. 38-40) y para el hepatopáncreas de los moluscos testigos (Fig. 41), creemos que las bandas detectadas entre pH 6,20 y 6,60 corresponden, en las muestras aquí analizadas, a *D. dendriticum* y las situadas entre pH 6,75-7,35 y entre 6,88-7,65 son del hepatopáncreas de *Helicella (Helicella) itala* y del de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, respectivamente. Al analizar el hepatopáncreas de dichas especies de moluscos con esporocistos de *D. dendriticum* en su interior, se observó actividad de AcP en un rango de pH entre 5,64 y 5,92 en *Helicella (Helicella) itala* y de 5,60 a 5,92 en *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Fig. 2 de Lámina XXXII). Aunque las bandas de AcP son difusas, parece que la actividad observada a pH más básico corresponde al parásito, de acuerdo con los resultados hallados anteriormente para las fases larvarias (Figs. 38-40) y para el hepatopáncreas sin parasitar (Fig. 41).

Cuando estudiamos la actividad de HBDH en moluscos parasitados de las especies mencionadas anteriormente, solo observamos bandas de actividad enzimática en *Helicella (Helicella) itala* a pH 5,70-6,00. Dichas bandas corresponden sólo al hepatopáncreas, pues coinciden con las detectadas al analizar previamente este órgano de los moluscos sin infectar. Además, en estudios anteriores, tampoco observamos actividad de esta enzima cuando analizamos esporocistos y adultos de *D. dendriticum* por separado, por lo que consideramos que no es adecuada para la detección del parásito en los moluscos, si bien hay que señalar que el número de muestras examinadas fue escaso.

A pesar de que se examinó un número bajo de moluscos parasitados, observamos bandas de actividad de -GPDH en *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* a pH 5,80-6,30, y en *Helicella (Helicella) itala* a 6,20-6,50. Como en el caso de HBDH, dichas bandas corresponden sólo al hepatopáncreas, ya que no se detectó actividad en el parásito.

Únicamente observamos actividad de MDH, débil y difusa, en *Helicella (Helicella) itala* a pH 5,60-9,50. De acuerdo con los resultados previos obtenidos al analizar, por separado, el hepatopáncreas del molusco y el parásito, este último se detecta entre pH 8,10 y 9,50.

4.3.2.2.- Detección de *Dicrocoelium dendriticum*, en distintos días p.i., en ejemplares de *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados experimentalmente.

A continuación presentamos los resultados de las investigaciones realizadas en un lote de moluscos con el fin de detectar en ellos el parásito, desde las primeras fases larvianas, y determinar cuáles son las enzimas más adecuadas para dicho cometido.

Al estudiar la actividad de LDH en 70 ejemplares de dicha especie de caracol, las fases larvianas de *D. dendriticum* no se pusieron de manifiesto hasta los 45 días p.i. (Fig. 42; Fig. 1 de Lámina XXXIII), a pesar de que los moluscos examinados los días 15 y 30 p.i. estaban parasitados, de acuerdo con los resultados obtenidos para GPI. Además, se detectó actividad de LDH, entre pH 6,40 y 7,13, en el 17,1% de los moluscos analizados. Dicha actividad corresponde únicamente al parásito, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis por separado del hepatopáncreas de moluscos testigos, fases larvianas y adultos de *D. dendriticum*.

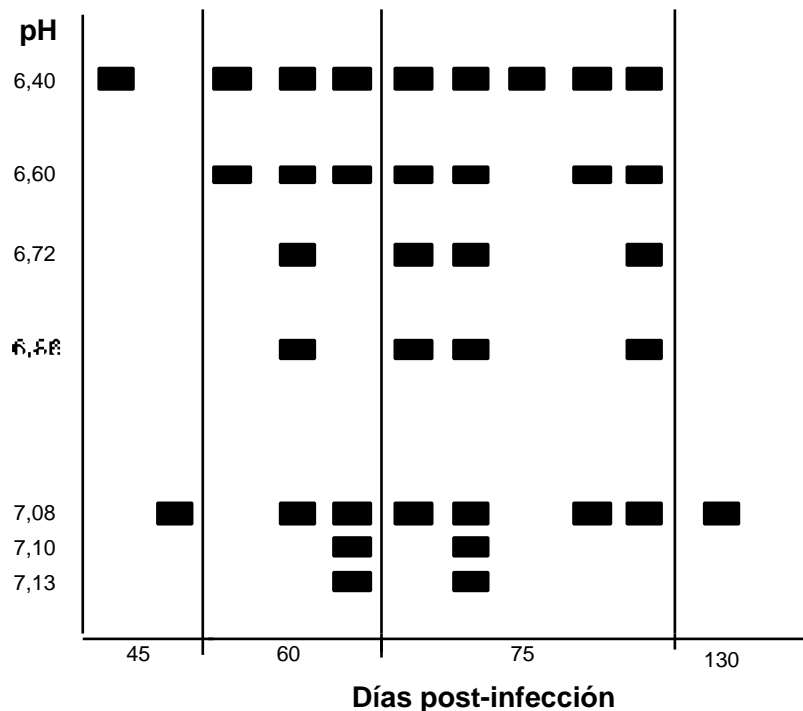


Figura 42.- Actividad (■) de LDH en fases larvianas de *D. dendriticum* detectadas en *Cernuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, en los distintos días post-infección.

Cuando se analizó la actividad de GPI en 80 ejemplares de *Cerquaria (Xeromagna) cespitum arigonis*, se detectó el parásito en 77,5% de los moluscos analizados, entre pH 5,15 y 6,85, y por primera vez a los 15 días p.i. (Fig. 43). Al tener en cuenta los resultados previos obtenidos en las muestras patrón, las bandas situadas alrededor de pH 6,25 no permiten discriminar las fases larvianas del parásito y el molusco, puesto que se solapan. Sin embargo, las detectadas a pH más básico corresponden únicamente al parásito, mientras que las del hepatopáncreas del molusco se sitúan a pH más ácido (Fig. 43; Fig. 1 de Lámina XXXIV).

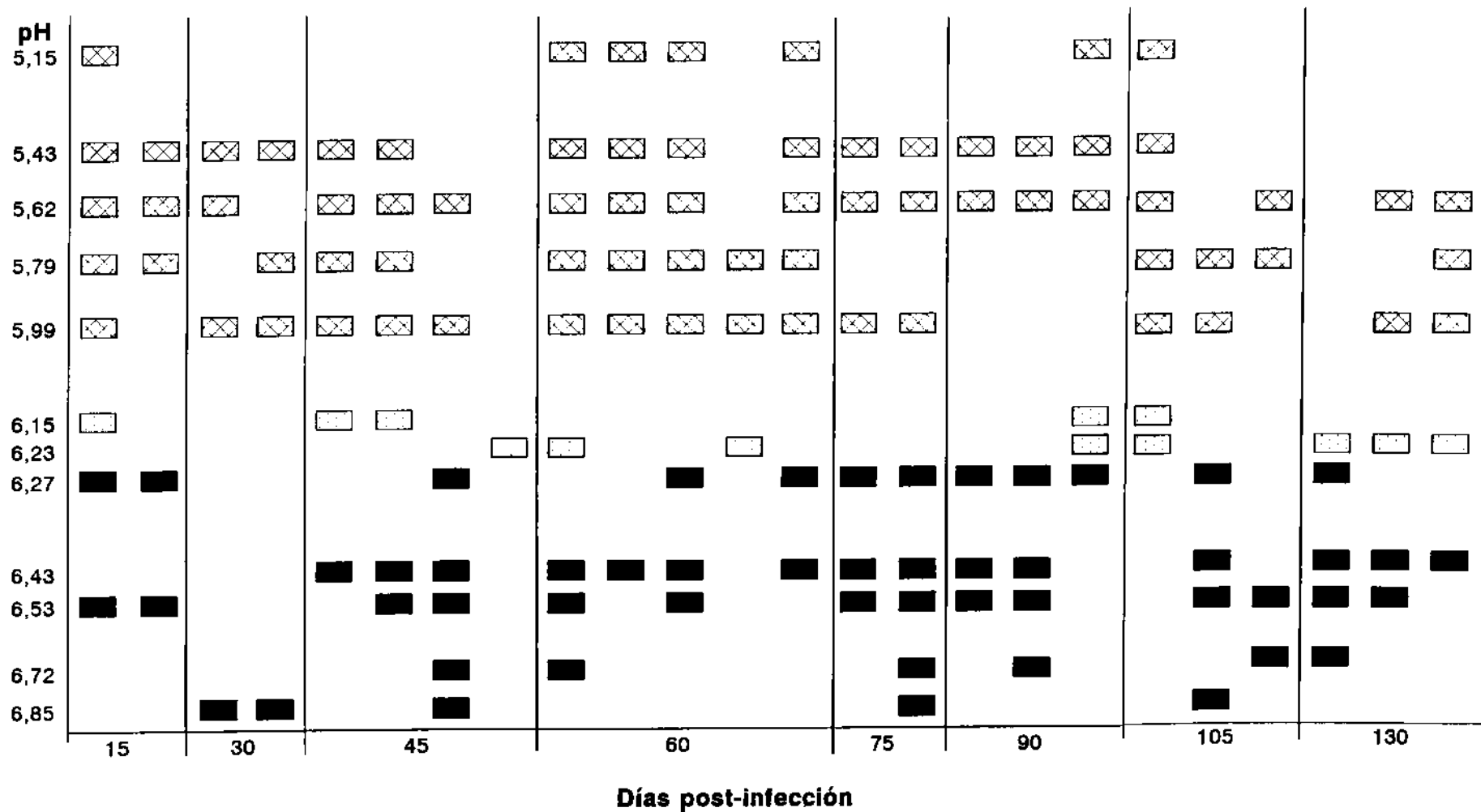


Figura 43.- Bandas de actividad de GPI, en los distintos días p.i., correspondientes a las fases larvianas de *D. dendriticum* (■), al hepatopáncreas de *Ceruella* (X) *cespitem arizonis* (⊠) y a ambos (□).

Al analizar la actividad de PGM en 40 moluscos de la especie mencionada anteriormente (Fig. 1 de Lámina XXXIII), se detectó el parásito en 62,5% de ellos y por primera vez a los 30 días p.i. Las bandas de actividad de PGM (Fig. 44) se observaron entre pH 6,20 y 7,43, situándose a pH 6,20-6,60 las correspondientes al parásito, y a pH 7,11-7,43 las pertenecientes al hepatopáncreas del molusco, de acuerdo con los resultados obtenidos en las muestras patrón.

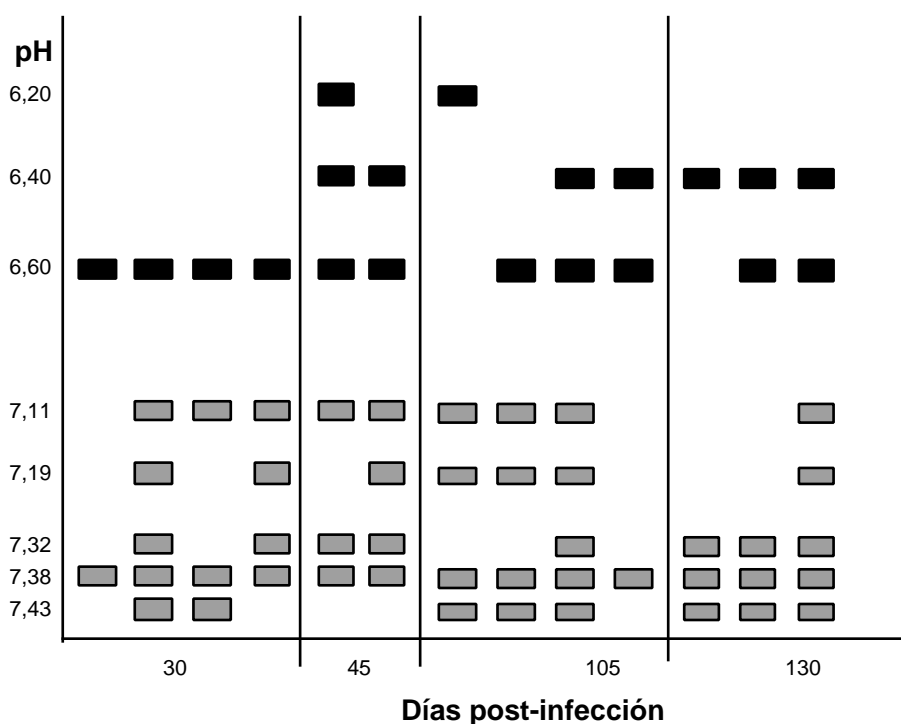
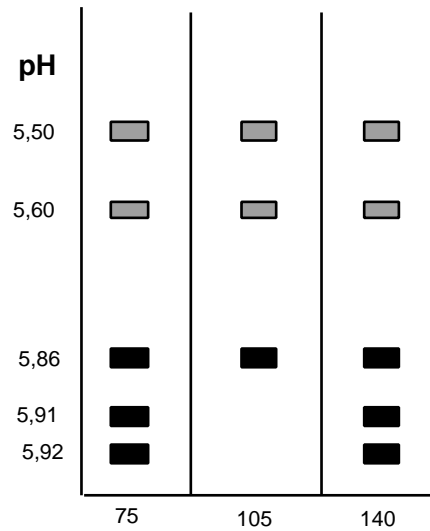


Figura 44.- Bandas de actividad de PGM, en los distintos días p.i., correspondientes a fases larvianas de *D. dendriticum* (■) y al hepatopáncreas de *Cernuella (X.) cespitum arigonis* (■).

Cuando se estudió la actividad de AcP en 50 moluscos, se detectó el parásito en 16% de ellos y por primera vez a los 75 días p.i. (Fig. 45). Se detectó actividad, difusa, de esta enzima (Fig. 1 de Lámina XXXIV) entre pH 5,50 y 5,92. Al tener en cuenta los resultados obtenidos en las muestras patrón, parece que las bandas observadas a pH 5,86-5,92 corresponden al parásito y las situadas a 5,50-5,60 pertenecen al hepatopáncreas del molusco.



Días post-infección

Figura 45.- Bandas de actividad de AcP, en los distintos días p.i., correspondientes a fases larvarias de *D. dendriticum* (■) y al hepatopáncreas de *Cermeuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (□).

En resumen, a nuestro juicio, GPI es un buen marcador enzimático porque detectó el parásito en una fase precoz y en un número elevado de moluscos, a pesar de que algunas bandas no permiten discriminar el parásito del molusco; LDH lo es también por revelar únicamente las bandas de *D. dendriticum*; PGM, aunque en menor grado, lo es por poner de manifiesto el parásito en un número elevado de moluscos. En nuestra opinión, AcP es la enzima menos adecuada para alcanzar los objetivos que nos habíamos propuesto en este estudio.

4.3.3.- RELACIÓN ENTRE LOS MODELOS ISOENZIMÁTICOS OBSERVADOS EN LOS ESPOROCISTOS, LAS METACERCARIAS Y LOS ADULTOS DE *DICROCOELIUM DENDRITICUM*.

Al comparar entre sí los resultados obtenidos del análisis de la actividad de LDH, GPI, PGM y AcP en los esporocistos, metacercarias y adultos de *D. dendriticum*, parece que todas las bandas de actividad que forman los modelos de las fases larvarias se corresponden con las de alguno de los encontrados en el adulto. Además, algunos modelos observados para cada enzima fueron comunes en las 3 fases de desarrollo del parásito, es decir, en esporocistos, metacercarias y adultos o en 2 de ellas (Fig. 46). En general, se detectó un número menor de bandas de actividad en las fases larvarias que en los adultos.

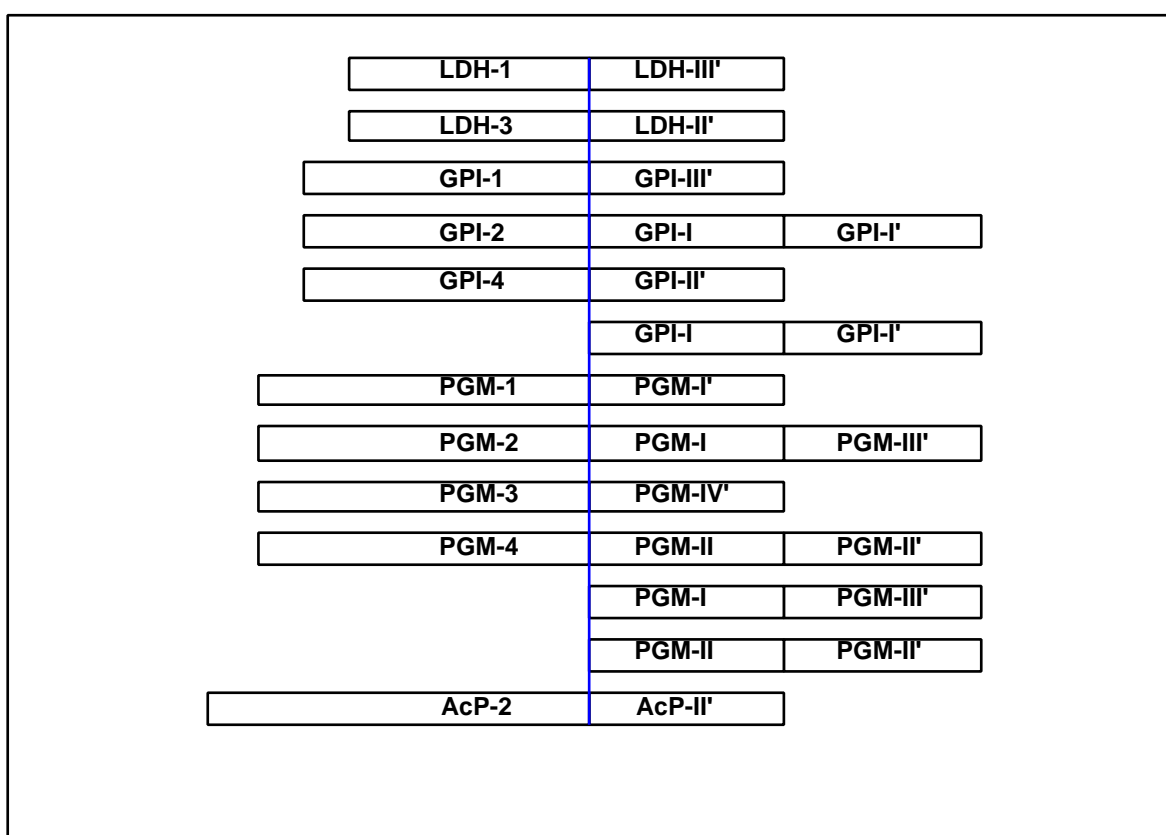


Figura 46.- Modelos enzimáticos de LDH, GPI, PGM y AcP comunes en adultos (1, 2, 3, 4), metacercarias (I, II) y esporocistos (I', II', III', IV') de *D. dendriticum*.

DISCUSIÓN

Las enzimas que mostraron actividad en el hepatopáncreas de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* y en *Helicella (Helicella) itala* fueron GPI, PGM, -GPDH, HBDH, AcP y MDH, aunque las más adecuadas para su caracterización fueron las 4 primeras. MANGA & ROLLINSON (1986), en un estudio que realizaron con la misma técnica para determinar las 7 especies de *Helicella* de la provincia de León, también detectaron actividad en las enzimas anteriormente mencionadas, a excepción de -GPDH que no la analizaron. Dichos autores señalan que las enzimas tipo identificadas para MDH y GPI permiten diferenciar las especies de *Helicella*. Asimismo, WRIGHT & ROLLINSON (1981) y ROLLINSON & WRIGHT (1984), en sus estudios realizados sobre moluscos del complejo *Bulinus tropicus/truncatus* y *Bulinus cernicus*, respectivamente, observaron actividad en las mismas enzimas que nosotros, aunque no examinaron -GPDH.

Por otra parte, en el caso de *D. dendriticum* detectamos actividad en GPI, PGM, LDH, AcP y MDH, aunque fueron las 3 primeras enzimas las mejores para su caracterización. El que HBDH no mostrara actividad en el adulto y en las fases larvianas de *D. dendriticum* coincide con lo observado por WRIGHT *et al.* (1979a), en los estadios larvianos de las especies *Schistosoma haematobium*, *Echinostoma revolutum*, *Paramphistomum microbothrium*, entre otras. Dichos autores tampoco encontraron actividad de PGM en las fases larvianas de los parásitos mencionados, aunque sí en los adultos de *Schistosoma haematobium* y *Echinostoma revolutum*.

Las bandas de actividad de LDH, GPI, PGM y AcP, obtenidas al analizar los esporocistos secundarios aislados de ejemplares de *Helicella (Helicella) itala* infectados en la naturaleza y de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* infectados natural y experimentalmente, se observaron, para cada enzima, en un rango de pH similar. ZDARSKA & PANIN (1977), mediante estudios histoquímicos, detectaron en los esporocistos de *D. dendriticum* actividad de fosfatasa ácida en el extremo en que se sitúa el tocostoma, de dicha enzima y de esterasa no específica en las células de las glándulas cistógenas de las cercarias, y de colinesterasa en el ganglio cerebral y cordones nerviosos de las mismas.

A la vista de los resultados obtenidos por nosotros al analizar por separado el hepatopáncreas de las dos especies de *Cerņuella* y *Helicella* y los esporocistos de *D. dendriticum*, así como los moluscos con los esporocistos en su interior, creemos que los mejores sistemas enzimáticos para la detección del parásito en dichos moluscos son LDH y PGM, ya que no se encontró actividad de la primera enzima en el hepatopáncreas del molusco, y las bandas de PGM correspondientes al parásito se situaron en un rango de pH distinto a aquél en que se observaron las del hepatopáncreas del molusco. Sin embargo, los resultados obtenidos con GPI no permitieron discriminar las bandas de actividad del parásito de las de *Helicella (Helicella) itala*, ni de algunas de *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, ya que se solapan. A nuestro juicio, AcP tampoco es una enzima muy adecuada para la detección del parásito porque, a pesar de que diferencia la actividad del parásito de la del

molusco, hecho que no ocurre en *Bulinus senegalensis* infectado con *Schistosoma haematobium* (WRIGHT *et al.*, 1979a), sus bandas son difusas. Por último, los sistemas enzimáticos HBDH y -GPDH no deben utilizarse para la detección del parásito en los moluscos, puesto que no presentan actividad en el parásito.

Como es de suponer, el número de bandas de actividad enzimática detectado en los caracoles infectados con *D. dendriticum* fue superior al hallado en los testigos, hecho también observado por WRIGHT *et al.* (1979a) al estudiar *Bulinus senegalensis* parasitado por *Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium*, *Paramphistomum microbothrium*, *Echinostoma revolutum*, entre otros.

En nuestros estudios las bandas de actividad de GPI, MDH y AcP en el parásito se situaron a pH más alcalino que las de los moluscos, mientras que ocurrió lo contrario con las de PGM. Lo observado por nosotros en las 3 primeras enzimas se asemeja a lo obtenido por WRIGHT *et al.* (1979a), cuando analizó la actividad de GPI y MDH en *Bulinus senegalensis* infectado con los mismos parásitos mencionados en el párrafo anterior, y por ROLLINSON & WRIGHT (1984), cuando estudiaron GPI en *Bulinus cernicus* infectado con *Schistosoma intercalatum*.

De acuerdo con nuestros resultados, parece que las bandas de actividad de LDH, GPI, PGM y AcP que forman los modelos de las fases larvianas, se corresponden con las de alguno de los encontrados en el adulto aunque, en general, se detectó un número menor de bandas en las fases larvianas que en los adultos. Esto último coincide con lo observado por WRIGHT *et al.* (op. cit.), para quien, además, las bandas de los adultos son más intensas.

Por otra parte, algunos modelos observados por nosotros para cada enzima fueron comunes en las 3 fases de desarrollo del parásito, es decir, en esporocistos, metacercarias y adultos, o en 2 de ellas, lo que no parece concordar con lo señalado por FERGUSON (1980), para quien los modelos isoenzimáticos de las distintas fases del ciclo vital de un animal pueden diferenciarse entre sí.

Como se indicó en el apartado 4.3.1., el período post-infección mínimo para observar al estereomicroscopio las fases larvianas de *D. dendriticum* en *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* fue 50 días. Sin embargo, con la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida fue posible la detección del parásito en los moluscos a los 15 días p.i. con GPI, a los 45 y 30 días con LDH y PGM, respectivamente, y a los 75 días con AcP. Por tanto, la detección precoz de *D. dendriticum* utilizando dicha técnica permitirá obtener datos sobre la prevalencia de parasitación de los moluscos más ajustados a la realidad. Además, mediante las enzimas mencionadas pudimos detectar el parásito antes de que los esporocistos secundarios albergaran cercarias desarrolladas. En este sentido, WRIGHT *et al.* (1979a) señalaron que para obtener un modelo enzimático reconocible de un parásito no es necesaria la presencia de cercarias activas en el molusco, y sugirieron que la técnica de isoelectroenfoque puede valer para la identificación de algunas infecciones inmaduras.

5. CONCLUSIONES

1.- La especie de hormiga *Formica rufibarbis* (Formicidae) actúa como segundo hospedador intermediario de *Dicrocoelium dendriticum* en zonas situadas en la cuenca baja del Bernesga y Porma, y en las proximidades de la confluencia de dichos ríos con el Esla. Ejemplares de esta especie pueden permanecer en fase de tetania entre Mayo y Octubre a temperatura comprendida entre 16° y 28° C.

2.- Los valores de los parámetros bioquímicos de los animales infectados con *D. dendriticum* prácticamente no se alteraron con respecto a los de los testigos, sin embargo sí se incrementaron, en general, los de las enzimas marcadoras hepáticas, sobre todo los de AST y ALT en los corderos probados con 3.000 metacercarias. El incremento de los valores medios de ambas enzimas fue significativo a los 60 días p.i. en los corderos probados con 1.000 metacercarias, y a los 30 días, para ALT, en los infectados con 3.000. En los animales sacrificados a los dos meses sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas, con respecto a los testigos, en los valores de AST y ALT, y en los sacrificados a los seis en los de GGT.

3.- Las cifras de leucocitos, neutrófilos y eosinófilos fueron superiores en los corderos infectados con *D. dendriticum* que en los testigos, mientras que las de linfocitos fueron inferiores. Los valores de eritrocitos, hematócrito, hemoglobina e índices eritrocíticos de los animales infectados no difirieron, en general, de los de los testigos. No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la media de VCM, a los 90 días p.i., en los corderos probados con 1.000 metacercarias. Asimismo, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de eosinófilos, eritrocitos y hemoglobina de los corderos sacrificados a los dos meses, y en los de esta última en los sacrificados a los seis.

4.- No se observó una relación clara entre la carga parasitaria y, por una parte, la actividad de las enzimas marcadoras hepáticas y, por otra, los parámetros hemáticos, aunque en el animal con mayor número de vermes se detectaron los valores más altos de AST, ALT, GGT, leucocitos y neutrófilos, y los más bajos de linfocitos.

5.- Los valores medios de AST, ALT, LDH, GGT y neutrófilos de los animales infectados con *D. dendriticum* fueron superiores antes de la primera eliminación de huevos en las heces que después de dicha fecha, mientras que ocurrió lo contrario con los de FA, leucocitos, linfocitos, monocitos y eosinófilos.

6.- El período de prepatencia de la dicroceliosis en los corderos osciló entre 49 y 79 días p.i. El número medio de hpg eliminado por los corderos en la tarde fue más elevado que el de la mañana, y el de los animales infectados con 3.000 metacercarias fue superior que el de los probados con 1.000. En términos generales, se observó un incremento en dicho número al aumentar los días p.i. y la carga parasitaria.

7.- Todos los corderos probados, incluso en los que no se detectaron huevos de *D. dendriticum* antes de su sacrificio a los 2 meses, contenían vermes en el hígado y, a veces, en la vesícula biliar, cuando fueron sacrificados. El número medio de parásitos recuperados de los corderos infectados con 3.000 metacercarias fue más elevado que el obtenido de los probados con 1.000, y el de los sacrificados a los 6 meses p.i. fue superior que el de los matados a los 2. El porcentaje de metacercarias que llegaron a establecerse como vermes en el total de los corderos infectados fue ligeramente inferior al 25%, pero, en general, fue mayor en los probados con 1.000 que en los infectados con 3.000, tanto en los sacrificados a los 2 meses p.i. como en los matados a los 6.

8.- El tamaño de los vermes recuperados de los corderos sacrificados a los 2 meses p.i. fue, en términos generales, inferior al de los obtenidos de los sacrificados a los 6, y la proporción de vermes con mayor grado de desarrollo, de acuerdo con la maduración de los huevos, se detectó en este último grupo.

9.- Las lesiones macroscópicas observadas en el hígado, vías biliares extrahepáticas, vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos fueron cualitativamente similares en los diferentes grupos de animales infectados con *D. dendriticum* y variaron cuantitativamente en los corderos sacrificados a los seis meses postinfección, como consecuencia de la cronicidad del proceso, y en aquellos infectados con mayor número de metacercarias de *D. dendriticum*.

10.- La localización de *D. dendriticum* en los conductos biliares septales y conducto hepático provoca hiperplasia, incremento de la actividad secretora así como atrofia y necrosis marcadas del epitelio ductal, debidas a la irritación mecánica del propio parásito y efecto erosivo de su ventosa. En relación con estos conductos, se ha comprobado la presencia de leucocitos globulares y un infiltrado inflamatorio, fundamentalmente de acúmulos nodulares de linfocitos, relacionados con la respuesta inmune al parásito.

11.- La dicroceliosis experimental ovina cursa además, desde el punto de vista anatomopatológico, con hepatitis portal y con fibrosis, portal, septal y, en ocasiones, perisinusoidal, sobre todo en aquellos animales de los que se recuperaron más vermes, y no se observaron, sin embargo, alteraciones compatibles con una cirrosis hepática.

12.- En los corderos infectados se han descrito otras lesiones histopatológicas secundarias, asociadas a esta parasitosis, tales como cambios degenerativos en los hepatocitos, alteraciones de los vasos sanguíneos, incluyendo la localización heterotópica de

D. dendriticum en las venas, hepatitis granulomatosa y, finalmente, alteraciones en la vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos.

13.- Mediante el estudio ultraestructural de las muestras de los corderos infectados con *D. dendriticum* se ha profundizado en el conocimiento de las modificaciones de los hepatocitos, canalículos biliares, conductos biliares interlobulillares del espacio porta y grandes conductos biliares.

14.- El mayor descenso del peso de los corderos infectados, respecto al de los testigos, se observó a los 60 días p.i., y fue ligeramente más acusado en los probados con 3.000 metacercarias que en los infectados con 1.000. Además, no se observó una relación clara entre el peso y la carga parasitaria, aunque la pérdida más elevada se detectó en el grupo de animales con 401 a 600 vermes.

15.- En las condiciones de nuestro trabajo, parece suficiente examinar las heces eliminadas por los moluscos de la especie *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* durante la infección y 48 horas después de la misma, para poder controlar los huevos de *D. dendriticum* que eclosionaron. No parece existir relación entre la dosis utilizada y el porcentaje de moluscos con huevos eclosionados. Asimismo, la observación de huevos eclosionados en las heces no garantiza el posterior desarrollo del parásito.

16.- La infección no fue visible, al estereomicroscopio, en los moluscos hasta el día 50 p.i., al menos, fecha en que los parásitos, situados en áreas muy reducidas del hepatopáncreas, se hallaban en fase de esporocistos secundarios con masas germinales indiferenciadas. Por otra parte, a pesar de haber examinado moluscos parasitados hasta el día 189 p.i. y observado en los mismos esporocistos con cercarias desarrolladas, entre los días 110 y 149 p.i., no pudimos ver bolas de mucus emitidas por los caracoles conteniendo cercarias, lo que parece indicar que las cercarias observadas por nosotros todavía no estaban maduras y que, en las condiciones del experimento, el desarrollo completo del parásito en *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* requiere un período más largo. En general, *D. dendriticum* mostró un desarrollo diacrónico en el molusco.

17.- Los sistemas enzimáticos más adecuados para la caracterización de los adultos, esporocistos y metacercarias de *D. dendriticum*, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, fueron LDH, GPI y PGM. Las bandas de actividad de dichas enzimas detectadas en las fases larvarias se corresponden con las de alguno de los modelos encontrados en el adulto. Ciertos tipos enzimáticos fueron comunes en las tres fases de desarrollo del parásito o en 2 de ellas. El grado de variabilidad genética observado al estudiar la actividad de LDH y GPI sirve para poner de manifiesto variaciones intraespecíficas en *D. dendriticum*.

18.- Para detectar las fases larvarias del parásito en los moluscos los mejores sistemas enzimáticos fueron: LDH, por no presentar actividad en el molusco; GPI, por evidenciar el parásito en una fase precoz de la infección y en un número elevado de moluscos (aunque existe solapamiento de algunas bandas); y PGM, por discriminar las bandas de actividad del parásito de las del caracol y detectarlo en un número elevado de moluscos.

6. RESUMEN

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el proceso de transmisión del Digenea hepático *Dicrocoelium dendriticum* (RUDOLPHI, 1819) LOOSS, 1899, se han abordado estudios sobre el comportamiento del parásito tanto en sus hospedadores intermediarios (moluscos y hormigas) como definitivos (corderos). Asimismo, se han investigado diversos aspectos de la relación parásito/hospedador.

Estudios realizados en hormigas

Se recolectaron 1.273 ejemplares de *Formica rufibarbis* en fase de tetania, en los meses de Mayo a Octubre, 814 de los cuales se diseccionaron para la obtención de las 48.000 metacercarias de *D. dendriticum* utilizadas en la infección experimental de los corderos. Del resto de las hormigas recolectadas se consiguieron las metacercarias que sirvieron de base en los estudios morfológicos e isoenzimáticos. El número de metacercarias albergadas en el abdomen de cada hormiga varió entre 1 y 240 ($x 59,85 \pm 1,51$), sin embargo, en el ganglio subesofágico sólo encontramos una larva. La longitud de las metacercarias enquistadas osciló entre 336 y 460,8 μm , la anchura entre 240 y 368,8 μm y el grosor de la pared del quiste entre 9,6 y 24 μm .

Estudios realizados en corderos

Con las metacercarias obtenidas de las hormigas se infectaron 2 lotes de corderos, uno con una dosis de 1.000 metacercarias/cordero y otro con 3.000 metacercarias/cordero. Cada uno de estos lotes, constituido por 12 animales de raza Churra y 4 meses de edad, junto con otros 2 lotes testigos (de 4 animales cada uno) se mantuvieron aislados en las dependencias de la Estación Agrícola Experimental. La mitad de dichos animales se sacrificaron a los 2 meses post-infección (p.i.) y la otra mitad a los 6.

Para la detección y posterior seguimiento de la eliminación de huevos de *D. dendriticum* en las heces de los corderos, se inició la recogida de las mismas del recto de los animales al mes y medio p.i., continuando con muestreos quincenales a primeras horas de la mañana y a últimas de la tarde, hasta el final de la experiencia. Todos los corderos probados

comenzaron la eliminación de huevos de *D. dendriticum* entre los 49 y 79 días p.i., excepto cuatro de ellos, que no eliminaron antes de los 2 meses, fecha en que se sacrificaron 3 de los mismos, mientras que el otro murió. Dichos huevos medían entre 33,32 y 45,22 μm de longitud y entre 21,42 y 28,56 μm de anchura. La eliminación de huevos por gramo (hpg) más elevada se observó por la tarde.

El número de hpg eliminado por la totalidad de los corderos infectados osciló entre 33,33 y 2.266,44 (x 274,81 \pm 23,79) y el de los infectados con 3.000 metacercarias (966,53 \pm 147,54) fue superior al de los infectados con 1.000 (240,11 \pm 45,69).

En general, se produjo un incremento en el número de hpg eliminado por los corderos al aumentar los días p.i. y la carga parasitaria. Asimismo se observó relación ($r= 0,65$) entre los vermes recuperados de cada uno de los corderos y el número medio de hpg eliminado a lo largo de todo el experimento. Dicha relación se intensificó cuando consideramos sólo los hpg eliminados entre los 4 y 6 meses p.i.

Además, en todos los corderos se efectuaron sangrías quincenales, desde el día 0 p.i., para el estudio de enzimas y parámetros, posibles indicadores de alteraciones en la funcionalidad del hígado. En general, los valores de las enzimas marcadoras hepáticas (AST, ALT, LDH, FA y GGT) y los de leucocitos y fórmula leucocitaria obtenidos en los corderos infectados difirieron de los de los testigos. Sin embargo, los de los parámetros bioquímicos (proteínas totales, albúmina, bilirrubina total y glucosa) y del resto de los hemáticos (eritrocitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM y CHCM) no se alteraron. El mayor incremento se detectó en los valores de AST (+ 38%) y de ALT (+47%) de los corderos probados con 3.000 metacercarias, con respecto a los testigos. Además, dicho aumento en los valores de ambas enzimas fue significativo a los 60 días p.i., en los corderos infectados con 1.000 metacercarias, y a los 30 días p.i., para ALT, en los probados con la dosis más alta. No se observó una relación clara entre la carga parasitaria y, por una parte, la actividad de las enzimas marcadoras hepáticas y, por otra, los parámetros hemáticos, aunque en el animal con mayor número de vermes se detectaron los valores más altos de AST, ALT, GGT, leucocitos y neutrófilos, y los más bajos de linfocitos.

Después de efectuar la necropsia de los corderos, se realizaron estudios macroscópicos, estructurales y ultraestructurales de los órganos afectados por el parásito. Las lesiones macroscópicas observadas en el hígado, vías biliares extrahepáticas, vesícula biliar y ganglios linfáticos hepáticos fueron cualitativamente similares en los diferentes grupos de animales infectados, aunque más intensas en los sacrificados a los 6 meses p.i. y en los probados con la dosis más alta. Por otra parte, la localización de *D. dendriticum* en los conductos biliares septales y conducto hepático provocó hiperplasia, incremento de la actividad secretora, así como atrofia y necrosis marcadas del epitelio ductal, debidas a la irritación mecánica del propio parásito y al efecto erosivo de su ventosa. Además, la dicroceliosis experimental ovina cursa con hepatitis portal y con fibrosis portal septal y, en ocasiones, perisinusoidal, sobre todo en aquellos animales que albergaban más vermes, pero no se observan, sin embargo, alteraciones compatibles con una cirrosis hepática.

El mayor descenso de peso, con respecto a los testigos, se observó, a los 60 días p.i., en los dos grupos de corderos infectados, y la pérdida más elevada se detectó en los animales con 401 a 600 vermes.

El número de parásitos recuperado de hígado y vesícula biliar de cada cordero osciló entre 110 y 2.063 en los probados con 3.000 metacercarias, y entre 30 y 437 en los infectados con 1.000. El tamaño y el grado de maduración de los vermes a los 2 meses p.i. fue, en general, inferior al de los obtenidos a los 6 meses.

Estudios realizados en moluscos

Previo ayuno de 4 días, se probaron 948 ejemplares de *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (SCHMIDT, 1853), distribuidos en 5 lotes, con dosis individualizadas de 50 a 150 huevos de *D. dendriticum*, procedentes de un cordero infectado experimentalmente por nosotros. Después de la infección, dichos moluscos junto con los testigos se mantuvieron en una cámara de simulación ambiental a 20° C de temperatura y 50% de humedad relativa. De acuerdo con los resultados de los análisis individualizados de las heces de los moluscos, recolectadas diariamente, la eliminación de huevos de *D. dendriticum* cesa a las 48 horas después de finalizada la infección. Para seguir el desarrollo larvario del parásito, se sacrificaron al menos 6 moluscos, cada 20 días, desde el primer día p.i. La infección no fue visible, al estereomicroscopio, al menos hasta el día 50 p.i., fecha en la que se observaron esporocistos hijos con masas germinales indiferenciadas, que ocupaban porciones muy reducidas del hepatopáncreas. A partir de dicha fecha los esporocistos comenzaron a emigrar e invadir otras partes del hepatopáncreas, y sólo después de los 110 días p.i. encontramos esporocistos con cercarias más o menos desarrolladas, aunque no vimos bolas de mucus emitidas por los caracoles conteniendo cercarias, a pesar de haber examinado moluscos parasitados hasta el día 189 p.i.

Estudios isoenzimáticos de *D. dendriticum*

Con el fin de caracterizar las diferentes fases de *D. dendriticum*, estudiar la posible variabilidad genética de las mismas y establecer los correspondientes modelos isoenzimáticos, analizamos, mediante la técnica de isoelectroenfoque en gel de capa fina de poliacrilamida, 2.846 adultos, 1.608 metacercarias y un número variable de esporocistos, procedentes de 25 moluscos infectados. De acuerdo con nuestros resultados, los sistemas enzimáticos más adecuados para la caracterización de *D. dendriticum* fueron LDH, GPI y PGM. Algunos de los modelos enzimáticos fueron comunes en los adultos, las metacercarias y los esporocistos de *D. dendriticum* o en 2 de dichas fases de desarrollo.

Parece que existe cierta relación entre algunos tipos enzimáticos detectados en los adultos de *D. dendriticum*, la raza de los animales de los que dichos parásitos proceden y el lugar de origen de los mismos.

Por otra parte, los mejores sistemas enzimáticos para la detección de *D. dendriticum* en los moluscos fueron: LDH, ya que no presenta actividad en el tejido de los moluscos,

aunque no detectó el parásito hasta los 45 días p.i.; GPI, por evidenciar el parásito ya a los 15 días p.i. (a pesar de que existe solapamiento de algunas bandas con las del hepatopáncreas del caracol); y PGM, pues las bandas del parásito se sitúan en un rango de pH distinto de las del molusco y permitió detectar el parásito a los 30 días p.i.

7. SUMMARY

In order to look into the transmission process of the liver Digenea *Dicrocoelium dendriticum* (RUDOLPHI, 1819) LOOSS, 1899, in greater depth, studies of parasite behaviour in their intermediate (molluscs and ants) as well as their definitive hosts (lambs) were carried out. Some aspects of the parasite / host relationship were likewise studied.

Studies carried out on ants

We collected 1,273 specimens of *Formica rufibarbis* at the tetanic stage between May and October. Of these 814 were dissected to obtain 48,000 *D. dendriticum* metacercariae used to experimentally infect lambs. The rest of the collected ants were dissected and the metacercariae thus obtained were used as a basis for the morphological and isoenzymatic studies. The number of metacercariae harboured in the abdomen of each ant varied from 1 to 240 ($x = 59.85 \pm 1.51$). However, only one larva was found in the subesophageic ganglion. Metacercariae length varied between 336 and 460.8 μm , width between 240 and 368.8 μm and cyst wall between 9.6 and 24 μm .

Studies carried out on lambs

Two groups of lambs were infected with the metacercariae obtained from the ants, one with a dose of 1,000 and the other with 3,000 metacercariae / lamb. Each of these groups, consisting of 12 four-month-old Churra breed lambs, together with 2 control groups (4 lambs in each) were kept isolated on Agricultural Research Station premises. Half the animals were slaughtered 2 months post-infection (p.i.), and the other half six months p.i.

Faeces were collected from the animals' rectums from 1_ months p.i. in order to detect *D. dendriticum* eggs and then follow their elimination. Fortnightly sampling early in the morning and in the late afternoon continued until the study ended. All the animals tested began *D. dendriticum* egg elimination between 49 and 79 days p.i., except one which did not eliminate until 2 months p.i. when it died. The eggs were 33.32 μm - 45.22 μm long and 21.42 - 28.56 μm wide. Highest eggs/gram (epg) elimination was observed in the afternoons.

The number of epg eliminated by all the infected lambs varied between 33.33 and 2,266.44 ($\times 274.81 \pm 23.79$) and that of lambs infected with 3,000 metacercariae (966.53 ± 147.54 epg) was higher than that of those infected with 1,000 (240.11 ± 45.69).

In general the number of epg eliminated by lambs increased as days p.i. and parasite burden did. A relation ($r = 0.65$) was also observed between the worms recovered from each lamb and the average number of epg eliminated throughout the experiment. That relation was intensified when only epg eliminated between 4 and 6 months p.i. were considered.

In addition blood samples were taken from all the lambs at fortnightly intervals from day 0 p.i. to study enzymes and parameters as possible indicators of alterations in liver function.

In general values of the hepatic marker enzymes (AST, ALT, LDH, ALP and GGT) and of leucocytes and leucocytic formula obtained from infected lambs differed from those of the control animals. Nevertheless, those of the biochemical parameters (total proteins, albumin, total bilirubin and glucose) and the rest of the haematic ones (erythrocytes, haematocrit, haemoglobin, MCV, MCH and MCHC) did not alter. Maximum increase, when compared to the controls, was detected in AST (+38%) and ALT (+47%) values of lambs infected with 3,000 metacercariae. Moreover, this increase in the values of both enzymes was significant 60 days p.i. in lambs infected with 1,000 metacercariae, and 30 days p.i. for ALT in those infected with the higher dose. No clear relation was observed between the parasitic burden and, on the one hand, hepatic marker enzyme activity and, on the other, the haematic parameter. Yet the highest values for AST, ALT, GGT, leucocytes and neutrophils and the lowest for lymphocytes were recorded in the animal with the highest number of worms.

After carrying out lamb necropsy macroscopic, structural and ultrastructural studies of the organs affected by the parasite were carried out. The macroscopic lesions observed in the liver, extrahepatic bile ducts, gall bladder and hepatic lymph ganglions were qualitatively similar in the different infected animal groups, though more intense in those slaughtered 6 months p.i. and those infected with the higher dose. On the other hand, the location of *D. dendriticum* in the septal bile and hepatic ducts caused hyperplasia and an increase in secretory activity as well as marked atrophy and necrosis of the duct epithelium due to mechanical irritation of the parasite itself and the erosive effect of its sucker. Moreover, experimental ovine dicroceliosis follows a course of portal hepatitis and portal, septal and, occasionally, perisinusoidal fibrosis, above all in those animals which were host to more worms, but alterations compatible with hepatic cirrhosis were not observed.

The greatest weight loss, when compared to the controls, was observed in the 2 groups of infected lambs 60 days p.i. and the highest loss was recorded in animals with 401 to 600 worms.

The number of worms recovered from the liver and gall bladder of each lamb varied between 119 and 2,063 in those infected with 3,000 metacercariae and between 30 and 437 in those infected with 1,000. The size and degree of development of the worms 2 months p.i. was generally inferior to that of those recovered 6 months p.i.

Studies carried out on molluscs

After not eating for 4 days 948 specimens of *Ceratomyxa (Xeromagna) cespitum arigonis* (SCHMIDT, 1853), divided into 5 groups, were infected with individual doses of 50 to 150 *D. dendriticum* eggs obtained from an experimentally infected lamb. After infection these molluscs and the control animals were kept in environmental simulation chambers at a temperature of 20° C and relative humidity of 50%. According to the results of individual analyses of mollusc faeces collected daily, elimination of *D. dendriticum* eggs ceased 48 hours after infection finished. In order to follow the larval development of the parasite at least 6 molluscs were killed at 20 - day intervals from day 1 p.i. Infection was not visible by stereomicroscope, at least until 50 days p.i. when daughter sporocysts with non-evolved germinal mass, which filled very small parts of the hepatopancreas, were observed. From that date sporocysts began to emigrate and invade other parts of the hepatopancreas and only after 110 days p.i. were sporocysts with more or less evolved cercariae found. Slime balls containing cercariae of *D. dendriticum* emitted by the molluscs were not observed despite examining infected molluscs until 189 days p.i.

D. dendriticum isoenzymatic studies

In order to characterize the different stages of *D. dendriticum*, study their possible genetic variability and establish the corresponding isoenzymatic models, the isoelectric focusing in thin layer polyacrylamide gel technique was used to analyze 2,846 worms, 1,608 metacercariae and a variable number of sporocysts from 25 infected molluscs. According to our results LDH, GPI and PGM were the most appropriate enzymatic systems to characterize *D. dendriticum*. Some of the isoenzymatic models were common in *D. dendriticum* adults, metacercariae and sporocysts or in 2 of these development stages.

A certain relation seems to exist between some enzymatic models detected in *D. dendriticum* adults, the animal breed from which the parasites come and their place of origin. On the other hand, the best enzymatic systems for the detection of *D. dendriticum* in molluscs were: LDH, since it presents no activity in mollusc tissue although the parasite was not detected until 45 days p.i.; GPI, because the parasite is already observed 15 days p.i. (despite overlapping of some bands with those of the snail hepatopancreas); and PGM, as parasite bands are situated in a pH range different from those of the molluscs and allowed parasite detection 30 days p.i.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABALIKHIN, B.C. (1982a). [Changes in the microflora of the bile and intestine of Romanov sheep during experimental dicrocoeliasis]. *Sbornik Nauchnykh Trudov Moskovskoi Veterinarnoi Akademii (Profilaktika i lechenie infektsionnykh i invazionnykh boleznei skota v usloviyakh kontsentratsii zhivotnovodstva)*, 124: 58-62. En: *Helminth. Abstr.* (1985), 54 (8), n° 2959.
- ABALIKHIN, B.C. (1982b). [Dynamics of enterokinase and alkaline phosphatase activities in the intestine of Romanov sheep with experimental dicrocoeliasis]. *Sbornik Nauchnykh Trudov Moskovskoi Veterinarnoi Akademii (Profilaktika i lechenie infektsionnykh i invazionnykh boleznei skota v usloviyakh kontsentratsii zhivotnovodstva)*, 124: 46-48. En: *Helminth. Abstr.* (1985), 54 (8), n° 2960.
- AKBAEV, M.Sh. (1979). Epidemiology and intermediate hosts of *Dicrocoelium* infection in sheep in the Karachaevo Cherkesskoi autonomous region. *Trudy Moskovskoi Veterinarnoi Akademii*, 54: 167-179.
- AKPAVIE, S.O. & PIRIE, H.M. (1990). Morphological, histochemical and ultrastructural features of the globule leukocyte of the bovine respiratory tract. *Anatomia Histologia Embryologia*, 19: 164-180.
- ALIEV, S.Y. (1966). [Some problems on the pathogenesis of dicrocoeliasis]. *Veterinariya*, 43 (12): 41-42.
- ALIEV, S.Y. (1968). [Pathomorphological changes during dicrocoeliosis]. *Materiali k nauknoi Konferentsii Vsesoiusnovo Obchestva Gelmintologov, Part I*: 20-26.
- ALIEV, S.Yu. & DEMIDOV, N.V. (1971). [Immunity in dicrocoeliasis]. *Trudy Uzbekskogo Instituta Veterinarii (Bolezni Sel'skokhozyaistvennykh Zhivotnykh, Kniga I, Invazionnye Bolezni)*, 19: 90-93. En: *Helminth. Abstr.* (1973), 42 (9), n° 3383.
- ALUNDA, J.M. (1984). *Ecología de Dicrocoelium dendriticum en León*. Institución "Fray Bernardino de Sahagún". Excma. Diputación de León, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CECEL), iii + 89 pp.

- ALUNDA, J.M. & MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1982). Susceptibility of some species of the genus *Helicella* Férussac, 1821 (Gastropoda, Helicidae) to the infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *Malacología*, 22 (1-2): 51-54.
- ALUNDA, J.M. & ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1982). Susceptibility of some populations of *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Schmidt, 1875) (Gastropoda, Helicidae) from the Douro Basin (Iberian Peninsula) to the infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *Malacología*, 22 (1-2): 39-43.
- ALUNDA, J.M. & ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1983). Effect of infection rate and host age on the intramolluscan development of *Dicrocoelium dendriticum*. *Helminthología*, 20 (4): 251-258.
- ALUNDA, J.M. & ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1984). Some new molluscan hosts of *Dicrocoelium dendriticum* in Spain. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59 (1): 57-62.
- ALVAREZ NOGAL, R.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; GONZÁLEZ LANZA, C. & DEL POZO CARNERO, P. (1992). Preliminary study on *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). First larval stages in experimentally infected *Cerņuella (Xeromagna) cespitum arigonis* (Mollusca). *Vith European Multicolloquium of Parasitology*, The Hague, The Netherlands, September 7-11: 163.
- ALZIEU, J. P. & DUCOS DE LAHITTE, J. (1991). La dicroceliose chez les bovins. *Bulletin des G.T.V.*, 6: 135-146.
- AMBROSI, M. (1991). La diagnostica coprologica nelle elmintiasi di allevamento: caso delle distomatosi dei ruminanti. *Praxis veterinaria (Milano)*, 12 (3): 17-20.
- AMBROSI, M.; BALDELLI, B.; FIORETTI, D.P.; POLIDORI, G.A.; GRELLONI, V.; MORETTI, A. & PRINCIPATO, M. (1980). Dicroceliosi ovina: insorgenza e decorso della infezione da *Dicrocoelium dendriticum* studiati con metodi parassitologici e sierologici (ELISA) in quattro gruppi di ovini di Traccia. *Rivista di Parassitología*, 41 (3): 299-307.
- ANGELOVSKI, T. & ILIEV, A. (1975). The species of ants and their role in biology of *Dicrocoelium dendriticum* in SR Macedonia. *Proceedings of the 2nd European Multicolloquy of Parasitology*, Trogir, Yugoslavia, September 1-6: 163-166.
- ANOKHIN, I.A. (1966). [The daily rhythm in ants infected with *Dicrocoelium dendriticum* metacercariae]. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 166: 757-759. En: *Helminth. Abstr.* (1966), 35, n° 1060.
- ANÓNIMO (1986). Analytical electrofocusing in ampholine pH gradients. En: *LKB 2117 Multiphor Electrophoresis System Laboratory Manual*, pp. 51-69.
- AVISE, J.C. (1974). Systematic value of electrophoretic data. *Systematic Zoology*, 23: 465-481.
- AYALA, F.J. (1975). Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary Biology*, 8: 1-78.

- AYUPOV, KH.V. (1967). [Migration, localization and life span of *Dicrocoelium dendriticum* in the final host (sheep)]. *Trudy bashkirskogo sel'skokhozyaistvennogo instituta*, 13 (2): 38-42. En: *Helminth. Abstr.* (1970), 39, n° 802.
- BADIE, A. (1978). La dicrocoeliose ovine: incidence des facteurs climatiques et contribution à la mise au point d'une méthode de prévision. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53 (4): 373-385.
- BADIE, A. (1979). La petite douve *Dicrocoelium lanceolatum* ou *Dicrocoelium dendriticum* ses hôtes intermédiaires. *Pâtre*, 268: 51-54.
- BADIE, A. & RONDELAUD, D. (1990). *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi: Premières données sur la charge sporocystaire chez *Cochlicopa lubrica* Müller au cours d'une infestation expérimentale. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (1): 107-110.
- BADIE, A.; HOURDIN, P. & RONDELAUD, D. (1992). L' infestation de *Cochlicopa lubrica* Müller par *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi. A propos de quelques observations histopathologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 10 (1): 51-57.
- BADIE, A.; VINCENT, M.; MOREL-VAREILLE, C. & RONDELAUD, D. (1973). Cycle de *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) en Limousin. Ethologie des fourmis parasitées par les métacercaires. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 167 (5): 725-727.
- BARNWELL, S.G.; LOWE, P.J. & COLEMAN, R. (1984). The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochemical Journal*, 220: 723-731.
- BENGTSSON, E.; HÄSSLER, L.; HOLTENIUS, P.; NORDBRING, F. & THORÉN, G. (1968). Infestation with *Dicrocoelium dendriticum* - the small liver fluke - in animals and human individuals in Sweden. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 74 (1): 85-92.
- BERNARD, F. (1968). *Les Fourmis (Hymenoptera, Formicidae) d'Europe Occidentale et Septentrionale*, Masson et Cie. éditeurs, Paris, 409 pp.
- BOCH, J. & SUPPERER, R. (1982). *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, 627 pp.
- BONO, G. DEL (1958). Infestione da *Dicrocoelium lanceolatum* (Rudolphi 1803) nella cavia. *Rivista de Patologia Comparata*, 31 (2): 3-7.
- BORAY, J.C. (1985). Flukes of domestic animals. En: *Parasites, pests and predators. (World Animal Sciences, B2)*. Gaafar S.M., Howard W.E. & Marsh R.E. (Eds.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 179-185.
- BORCHERT, A. (1981). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, 745 pp.

- BOURGAT, R.; SEGUIN, D. & BAYSSADE-DUFOUR, C. (1975). Données nouvelles sur *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907: Anatomie de l' adulte et cycle évolutif. Note préliminaire. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 50 (6): 701-714.
- BRANGHAM, A.N. (1960). Notes of ant vectors in the life-cycle of a trematode. *Entomologist's Monthly Magazine*, 96: 54-56.
- BREZA, M. & SVARC, R. (1968). Eine einfache methode zur bestimmung der eierzahl gastroinestinaler bronchilaten aus dem faeces der Wiederkauer. *Studia Helminthologica*, 2: 89
- BULGIN, M.S.; ANDERSON, B.C.; HALL, R.F. & LANG, B.Z. (1984). Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in cattle with induced fascioliasis. *Research in Veterinary Science*, 37: 167-171.
- CABANAS DÍAZ, E. (1995). *Estudio del ciclo biológico de Dicrocoelium dendriticum (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 en condiciones naturales*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León, 362 pp.
- CABANAS DÍAZ, E.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y. & GONZÁLEZ LANZA, M.C. (1989). Eliminación mensual de huevos de *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) por ovinos marcados de los montes Cántabro-Leoneses. *Actas del VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología*, Cáceres, 25-29 Septiembre: 126.
- CABANAS DÍAZ, E.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y. & GONZÁLEZ LANZA, C. (1990). Dynamics of the natural infection of land molluscs by trematode Dicrocoeliidae in the León mountain region (NW Spain). *VII Congrès International de Parasitologie*, París, Août 20-24: 1170.
- CALAMEL, M. & GIAUFFRET, A. (1976). Interprétation des résultats dans le diagnostic coproscopique de la dicrocoliose. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 152 (2): 99-104.
- CALAMEL, M.; VILLEMEN, P. & LEIMBACHER, F. (1979). Efficacité du diamphénétide dans le traitement de la dicrocoeliose ovine. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 155 (1): 37-46.
- CAMERON, T.W.M. (1931). Experimental infection of sheep with *Dicrocoelium dendriticum*. *Journal of Helminthology*, 9 (1): 41-44.
- CAMPO, R.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; GONZÁLEZ LANZA, C. & DÍEZ BAÑOS, N. (1993) Infestación experimental de corderos con *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda): Eliminación de huevos y carga parasitaria. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1, Supl. 1: 2.
- CAMPO, R; SÁNCHEZ CAMPOS, S.; FERRERAS, M. C.; GONZÁLEZ, P; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ GALLEGU, J. & MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1994). Estudios preliminares sobre diversos aspectos de la dicroceliosis experimental en el hamster dorado (*Mesocricetus auratus*). *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, Barcelona-Sitges, 23-24 Septiembre: 69.

- CARLTON, W.W. & McGAVIN, M.D. (1995). Liver, biliary system and exocrine pancreas. En: *Thomson's special veterinary pathology*. Maclachlan, N.J. & Cullen, J.M. (Eds.). Ed. Mosby-Year Book Inc, St. Louis, pp. 81-115.
- CARNEY, W.P. (1969). Behavioral and morphological changes in carpenter ants harboring *Dicrocoeliid* metacercariae. *The American Midland Naturalist*, 82 (2): 605-611.
- CAVANI, C.; LOSI, G., MANFREDINI, M.; PAVONCELLI, R.M.; PIETROBELLI, M. & RESTANI, R. (1982). Ricerche sull'influenza della *Dicrocoeliasis* sulle caratteristiche quantitative e qualitative della produzione di latte in pecore. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 3, 59-63. En: *Helminth. Abstr.* (1983), 52 (3), n° 1444.
- COLEMAN, R. (1987). Biochemistry of bile secretion. *Biochemical Journal*, 244: 249-261.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M.; CASTAÑÓN ORDÓÑEZ, L. & REGUERA FEO, A. (1994). *Índice-Catálogo de Zoonosis Ibéricas*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de León, León, 650 pp.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; DÍEZ BAÑOS, P. & CHATON SCHAFFNER, M. (1982). Efficacité de l'albendazole contre une infestation naturelle a *Dicrocoelium dendriticum* chez le mouton. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 133 (1): 41-49.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; ALUNDA, J.M.; HIDALGO ARGÜELLO, M. R.; REGUERA FEO, A. & CASTAÑÓN ORDOÑEZ, L. (1985). *Las parasitosis de los rumiantes en pastoreo en España. 2. Aspectos geográficos y climáticos, y problemas parasitarios del ganado ovino de la provincia de León*. Comunicaciones INIA. Serie: Higiene y Sanidad Animal, 11, Madrid, pp. 9-16.
- CORNELIUS, C.E.; BISHOP, J.; SWITZER, J. & RHODE, E.A. (1959). *Cornell Veterinarian*, 49: 116-126.
- CHANDRA, G. (1973). First detection of *Dicrocoelium* eggs in the faeces of experimentally infected lambs, guinea pigs and pigs. *Haryana Agricultural University Journal of Research*, 3 (1): 31-34.
- CHANDRA, G. & POLJAKOVA-KRUSTEVA, O. (1974). [Studies on experimental *Dicrocoeliasis* in lambs, pigs and guinea-pigs. II. Histochemical investigation of the enzymes in the liver of guinea pigs infected with *Dicrocoelium dendriticum*]. *Izvestiya na Tsentralnata Khelmitologichna Laboratoriya*, 17: 153-160. En: *Helminth. Abstr.* (1975), 44 (10), n° 4797.
- CHENG, T.C. (1978). *Parasitología general*. Ed. AC, Madrid, xxii + 965 pp.
- CHITIASHVILI, B.G. (1982). [Effect of temperature and relative humidity on the activity of infected ants]. *Nauchnye Trudy, Gruzinskii Zootekhnicheskoy-Veterinarnyi Institut*, 127 (46): 32-34. En: *Helminth. Abstr.* (1983), 52 (12), n° 5578.

- CHITIASHVILI, B.G.; CHUBABRIYA, I.T.; STEPANOV, A.V. & RAZMADZE, E.D. (1977). [Development times of *Dicrocoelium lanceolatum* larvae in the first and second intermediate host]. *Sbornik Nauchnykh Trudov, Moskovskaya Veterinarnaya Akademiya (Vazhneishie issledovaniya po izucheniyu zabolevanii Sel'skokhozyaistvennykh Zhivotnykh)*, 90: 78-80.
- DE BONT, J.; VERCRUYSSSE, J.; SOUTHGATE, V.R.; ROLLINSON, D. & KAUKAS, A. (1994): Cattle schistosomiasis in Zambia. *Journal of Helminthology*, 68 (4): 295-299.
- DE BONT, J.; VERCRUYSSSE, J.; Van AKEN, D.; WARLOW, A.; SOUTHGATE, V.R. & ROLLINSON, D. (1991). Use of enzyme electrophoresis for differentiating *Schistosoma nasale* and *S. spindale* infections of *Indoplanorbis exustus* in Sri Lanka. *Systematic Parasitology*, 20: 161-164.
- DEL RIO LOZANO, J. (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León*, 4: 163-237.
- DEMENT'EV, I.S. (1968). [Epizootiology of dicrocoeliasis of sheep in South-eastern Kazakhstan]. *Materiali Seminara-Soveshchaniya po Borbe s Gel'mintozami Sel'.-Khoz. Zhivotnykh v Chimkente, Alma-Ata*: 56-58.
- DEMENT'EV, I.S. (1979). [The role of abiotic ants from the genus *Formica* in the epizootiology of dicrocoeliasis]. *Materialy respublikanskogo seminara po bor'be s parazitarnymi boleznyami sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh, posvyashchennogo 100-letiyu so dnya rozhdeniya Akademika K.I. Skryabina. Alma-Ata, USSR*: 42-47.
- DEMENT'EV, I. S. & KARABAEV, D.K. (1968). [Infection of terrestrial molluscs and ants by *Dicrocoelium dendriticum* larvae in southeastern Kazakhstan]. *Vestik sel'skokhozyaistvennoi Nauki, Alma-Ata*, 12: 51-55. En: *Helminth. Abstr.* (1970), 39, n° 2640.
- DEMENT'EV, I.S.; SERIKBAEVA, B.K. & KARABAEV, D.K. (1978). [The effect of vitamin C and cobalt chloride on the pathological process in dicrocoeliasis in sheep]. *Trudy Kazakhskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Veterinarnogo Instituta (Voprosy veterinarnoi parazitologii v Kazakhstane)*, 17: 79-81. En: *Helminth. Abstr.* (1982), 51, n° 103.
- DENEV, Y.; STOIMENOV, K.; DONEV, A.; PETROV, P. & KASABOV, R. (1970). [Dicrocoeliasis in north-eastern Bulgaria. I. Geographical and seasonal incidence]. *Veterinarnomeditsinski Nauki, Sofia*, 7 (9): 21-29. En: *Helminth. Abstr.* (1972), 41, n° 1755.
- DENEV, I.; SAVOVA, S.; STOIMENOV, K.; TAHIROV, B.; DONEV, A.; KASSABOV, R. & PETKOV, P. (1970). [An investigation into the dicrocoeliosis in north-eastern Bulgaria. II. On the intermediary and additional hosts of *Dicrocoelium dendriticum* (Stiles et Hassal, 1896)]. *Veterinarnomeditsinski Nauki, Sofia*, 7 (8): 23-31.
- DENEV, I.; STOIMENOV, K.; SAVOVA, S.; DIMITROVA, M.; DONEV, A.; PETKOV, P. & KASABOV, R. (1973) [Dicrocoeliosis in farm animals]. *Bulgarskata Akademiya Naukite, Sofia, Bulgaria*: 119. En: *Veterinary Bulletin*, (1973), n° 3451.

- DESOWITZ, R.S. (1980). *Ova and Parasites. Medical Parasitology for the Laboratory Technologist*. Harper & Row, publishers, 307 pp.
- DHAR, D.N. & SINGH, K.S. (1963a). Histochemical studies on liver in dicrocoeliasis. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 33 (3): 142-151. En: *Helminth. Abstr.* (1964), 33, n° 2198.
- DHAR, D.N. & SINGH, K.S. (1963b). Pathology of liver in dicrocoeliasis. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 33 (4): 200-210. En: *Helminth. Abstr.* (1965), 34, n° 293.
- DOUCH, P.G.C. (1988). The response of young Romney lambs to immunization with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *International Journal of Parasitology*, 18 (8): 1035-1038.
- DOUCH, P.G.C.; HARRISON, G.B.L.; ELLIOTT, D.C.; BUCHANAN, L.L. & GREER, K.S. (1986). Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 20 (4): 315-331.
- DRABICK, J.J.; EGAN, J.E.; BROWN, S.L.; VICK, R.G.; SANDMAN, B.M. & NEAFIE, R.C. (1988). Dicroceliasis (lancet fluke disease) in an HIV seropositive man. *Journal of the American Medical Association*, 259 (4): 567-568.
- DUJARDIN, F. (1845). *Histoire Naturelle Des Helminthes Ou Vers Intestinaux*. Paris, Rovet, pp. 388, 391-392.
- DUNN, A.M. (1978). *Veterinary Helminthology*. Ed. William Heinemann Medical Books Ltd., London, 323 pp.
- ECKERT, J. & HERTZBERG, H. (1994). Parasite control in transhumant situations. *Veterinary Parasitology*, 54: 103-125.
- EUZEBY, J.A. (1958). La dicrocoeliose des ovins. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 50: 356-374.
- FASHUYI, S.A. & ADEOYE, G.O. (1986). The possible snail intermediate hosts of *Dicrocoelium hospes* in Nigeria. *Acta Veterinaria Brno*, 55 (1/2): 85-88.
- FAUST, E.C.; RUSSELL, P.F. & JUNG, R.C. (1974). *Craig y Faust. Parasitología clínica*. Ed. Salvat Editores, S.A., Barcelona, 888 pp.
- FERGUSON, A. (1980). *Biochemical Systematics and Evolution*. Ed. Blackie, Glasgow and London, 194 pp.
- FERRE, I. (1994). *Estudios sobre fasciolosis ovina*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 123 pp.
- FRANK, W.; LUCIUS, R. & ROMIG, R. (1984). Studies on the Biology, Pathology, Ecology and Epidemiology of *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 in West Africa (Ivory Coast). En: *Recent German Research on Problems of Parasitology, Animal Health and Animal Breeding in the Tropics and Subtropics*. Ed. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, and the Institute for Scientific Co-operation, Tübingen, Federal Republic of Germany, pp. 38-58.

- FRIGATO, A. (1961). Dicroceliasis della lepre. *La Nuova Veterinaria*, 37 (2): 29-31.
- FROMUNDA, V.; PARASCHIVESCU, D. & POPESCU, S. (1965). [Investigation concerning complementary hosts for *Dicrocoelium lanceatum* in the Socialist Republic Romania]. *Lucrarile ICVB Pasteur*, 4 (1/2): 269-280.
- FROMUNDA, V.; POPESCU, S. & PARASCHIVESCU, D. (1973). Contributions à la connaissance des formes larvaires et pré-imago du trematode *Dicrocoelium lanceatum* (Stiles et Hassal, 1896). *Archiva Veterinaria*, 10 (1): 85-91.
- GALTIER, P.; LARRIEU, G.; TUFENKJI, A.E. & FRANC, M. (1986). Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 14: 137-141.
- GARCÍA PÉREZ, A. L. & JUSTE JORDAN, R.A. (1987a). Helmintos parásitos de la oveja en el País Vasco. *Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extraordinario*: 105-113.
- GARCÍA PÉREZ, A.L. & JUSTE JORDÁN, R.A. (1987b). Observaciones sobre la prevalencia de los helmintos parásitos del ganado vacuno en la C.A.V. *II Jornadas sobre Producción Animal*, Zaragoza, 12-14 Mayo: 262-265.
- GIGITASHVILI, M.S. (1962). Three cases of *Dicrocoelium* infection in man in the Georgia S.S.R. *MeditSinkaya Parazitologiya i Parazitarnie Boleznie Moscow, S.S.R.*, 31 (5): 561-562.
- GÓMEZ, B.I.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; ANGULO, E. & GONZÁLEZ LANZA, C. (En prensa). Alteraciones histopatológicas producidas por *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) en dos especies de *Cerquaria* (Mollusca) sacrificadas a los tres meses post-infestación.
- GONZÁLEZ GALLEGO, J.; FERNÁNDEZ, C.; MARIÑO, E.; MORALES, A. & JIMÉNEZ, R. (1989). Biliary excretion and choleric effect of cefmetazole in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1970-1974.
- GONZÁLEZ LANZA, C.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y. & DEL POZO CARNERO, P. (1993). Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in Leon Province, Northwest Spain. *Parasitology Research*, 79 (6): 488-491.
- GONZÁLEZ LANZA, C.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; DEL POZO CARNERO, P.; CAMPO, R.; HIDALGO ARGÜELLO, R. & DÍEZ BAÑOS, N. (1994). Infestación experimental de *Cerquaria* (*Xeromagna*) *cespitem arigonis* (Mollusca) por *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, Barcelona-Sitges*, 23- 24 Septiembre: 23.
- GRIGORYAN, G.A. & AKOPYAN, V.D. (1960). [Experimental data on the biology of *Dicrocoelium lanceolatum* Stiles & Hassall, 1896]. *Trudi Armyanskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zhivotnovodstva i Veterinariii*, 4: 247-254. En: *Helminth. Abstr.*, (1962), 31, nº 2800.

- GRIGORYAN, G.A.; KHANBERGYAN, R.A. & OBANESYAN, A.S. (1956). [The biology of *Dicrocoelium lanceatum* Stiles & Hassall, 1896. (Preliminary report)]. *Trudi Armyanskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zhivotnovodstva i Veterinarii, Veterinariya*, 9: 119-127. En: *Helminth. Abstr.* (1956), 25, n° 861e.
- GROSCHAFT, J. (1961). [Ants, the complementary intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi 1819)]. *Ceskoslovenská Parasitologie*, 8: 151-165.
- GRUS, I.J. (1970). [A contribution to the knowledge of the biology of *Dicrocoelium lanceolatum*, with special reference to pathomorphological changes and therapy of sheep]. *Acta Veterinaria Belgrade*, 20 (1): 59-67 En: *Helminth. Abstr.* (1972), 41, n° 3774.
- GUNDLACH, J.L.; FURMAGA, S.; UCHACZ, S. & SADZIKOWSKI, A. (1982). [A case of sheep dicrocoeliosis and attempts of its treatment]. *Medycyna Weterynaryjna*, 38 (5): 204-206.
- HENKEL, H. (1931). Untersuchungen zur Ermittlung des Zwischenwirtes von *Dicrocoelium lanceatum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 3 : 664-712.
- HOHORST, W. (1962). Die Rolle der Ameisen im Entwicklungsgang des Lanzettegels (*Dicrocoelium dendriticum*). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 22 (2): 105-106.
- HOHORST, W. & LÄMMLER, G. (1962). Experimentelle Dicrocoeliose-Studien. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 13 (4): 377-397.
- ILIEV, A. & ANGELOVSKI, T. (1981). Dicrocoeliosis of sheep in SR Macedonia. *II Conferencia Mediterránea de Parasitología*, Granada, 29 Septiembre-20 Octubre: 152.
- JENKINS, D. & WAKELIN, D. (1994). Immunoepidemiology of intestinal helminth infections. 4. Immunopathology in trichuriasis: lessons from the mouse model. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88 (3): 269-273.
- JOLIVET, G.; LAFAY, E. & NICOLAS, J.A. (1994). Action du diamphénétide sur *Dicrocoelium lanceolatum*. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, 47: 303-308.
- JONLIJA, R.; CANKOVIC, M. & ROZMAN M. (1972). [Examination of ants, the second intermediary hosts of *Dicrocoelium lanceatum* in Bosnia and Herzegovina, I]. *Veterinaria*, 21 (3): 317-322.
- JONLIJA, R.; ROZMAN, M. & CANKOVIC, M. (1973). Ispitivanje infestiranosti puzeva i mrava razvojnim oblicima *Dicrocoelium lanceatum* u Bosni i Hercegovini. II. *Veterinaria Sarajevo*, 22 (4): 449-470.
- KAJUBIRI, V. (1982). Studies on the pathogenicity of *Dicrocoelium* in a model definitive host *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839). *Dissertationen Universitaet Hohenheim (FRG)*.
- KAJUBIRI, V. & HOHORST, W. (1977). Increasing incidence of *Dicrocoelium hospes* (Looss, 1907) (Trematoda: Digenea) in Uganda. *Journal of Helminthology*, 51: 212-214.

- KALKAN, A. (1971). *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in Turkey. I. Field studies of intermediate and final hosts in the South Marmara region, 1968. *British Veterinary Journal*, 127 (2): 67-75.
- KALKAN, A. (1976). [*Dicrocoelium dendriticum* in Turkey. 2. Observations on second intermediary hosts (ants) in the South Marmara Region]. *Etlik Veteriner Bakteriyolaji Enstitüsü Dergisi*, 4 (5/10): 111-137. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (4), n° 151.
- KAMIYA, M.; OKU, Y.; FUKUMOTO, S. & OONI, H. (1983). Preliminary observation on the absence of globule leucocytes in mast cell deficient W/W anaemic mice after *Trichinella spiralis* infection. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 31: 133-140.
- KARABAEV, D.K. & DEMENT'EV, I.S. (1966). [On the second intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum* in south-eastern Kazakh SSR]. *Vestnik sel'skokhozyaistvennoi Nauki, Alma-Ata*, 5: 44-46. En: *Helminth. Abstr.* (1969), 38, n° 283.
- KARANFILOVSKI, G. (1983). [Economic losses caused by fascioliasis and dicrocoeliasis to livestock production in Pljevlja and surrounding area]. *Veterinaria Jugoslavia*, 32 (3): 253-260.
- KELLER, H. (1978). [The activities of GLDH and gamma-GT in the serum of healthy and liver-fluke infected cattle]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 120 (4): 189-193. En: *Helminth. Abstr.* (1979), 48 (3), n° 121.
- KIRKWOOD, A.C. & PEIRCE, M.A. (1971). The longevity of *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Research in Veterinary Science*, 12: 588-589.
- KITANI, K.; OHTA, M. & KANAI, S. (1985). Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *American Journal of Physiology*, 248: G407-G417.
- KLESOV, M.D. & POPOVA, Z.G. (1956). [Prophylactic measures against *Dicrocoelium lanceatum* infestation in sheep]. *Veterinariya*, 33 (6): 36-39. En: *Helminth. Abstr.* (1956), 25 (4), n° 305.
- KLESOV, M.D. & POPOVA, Z.G. (1958). [The biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Stiles et Hassall, 1896) -the agent of dicrocoeliasis- in ruminants]. *Zoologicheski Zhurnal*, 37: 504-510.
- KLESOV, M.D. & POPOVA, Z.G. (1959). [Study of the biology of *Dicrocoelium* and the epizootiology of dicrocoeliasis in ruminants]. *Nauchnie Trudi Ukrainski Nauchno-Issledovatel'ski Institut Eksperimentalnoi Veterinarii.*, 25: 5-18. En: *Helminth. Abstr.* (1960), 29, n° 1499.
- KOPP, H. (1975). *Untersuchungen über die Eianscheidung von Fasciola hepatica und Dicrocoelium dendriticum bei schaf und Rind im Verlauf eines Jahres.* Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität, München, 52 pp.
- KOTLAN, A. (1960). *Helminthologie. Die Helminthosen der Haus- und Nutztiere unter Berücksichtigung der Helminthosen des Menschen.* Akadémiai Kiadó. Budapest, 631 pp.

- KRULL, W.H. (1937). Rearing terrestrial snails. En: *Culture Methods for Invertebrate Animals*. Galtsoff, P.S., Ithaca, N.Y., Comstock Pub. Co.
- KRULL, W.H. (1956). Experiments involving potential definitive hosts of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899: Dicrocoeliidae. *Cornell Veterinarian*, 46 (4): 511-525.
- KRULL, W.H. (1958). The migratory route of the metacercaria of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 in the definitive host: Dicrocoeliidae. *Cornell Veterinarian*, 48 (1): 17-24.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1952a). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). III. Observations on the slimeballs of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Veterinarian*, 42 (2): 253-276.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1952b). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). IV. Infection experiments involving definitive hosts. *Cornell Veterinarian*, 42 (2): 277-285.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1952c). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). V. Notes on infection of *Dicrocoelium dendriticum* in *Cionella lubrica*. *Cornell Veterinarian*, 42 (3): 339-351.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1952d). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). VII. The second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum*. *Cornell Veterinarian*, 42 (4): 603-604.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1953a). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). VIII. The cotton-tail rabbit, *Sylvilagus floridanus mearnsi*, as a definitive host. *Cornell Veterinarian*, 43 (2): 199-202.
- KRULL, W.H. & MAPES, C.R. (1953b). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica*. (Müller). IX. Notes on the cyst, metacercaria, and infection in the ant, *Formica fusca*. *Cornell Veterinarian*, 43 (3): 389-410.
- LAPAGE, G. (1982). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Continental, S.A. de C.V., México, 790 pp.
- LA RUE, G.R. (1957). Parasitological Reviews. The classification of Digenetic Trematoda: A Review and a new system. *Experimental Parasitology*, 6: 306-349.
- LEÓN, P.; HERMOSO, R. & MONTEOLIVA, M. (1986). Isoenzymes of lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) in *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* (Trematoda). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 83 (1): 159-161.

- LEÓN, P.; MONTEOLIVA, M. & SÁNCHEZ MORENO, M. (1988). *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*: Isoenzyme patterns of malate dehydrogenase and Malic enzyme. *Angewandte Parasitologie*, 29 (3): 173-177.
- LEÓN, P.; MONTEOLIVA, M. & SÁNCHEZ MORENO, M. (1989). Isoenzyme patterns of phosphatases and esterases in *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*. *Veterinary Parasitology*, 30 (4): 297-304.
- LEUCKART, R. (1886-1901). *Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden krankheiten*. Leipzig: C. F. Winter. Bd. 1, Abt. 2: 379-399.
- LEWIS, P.D.Jr. (1974). Presence of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Dicrocoeliidae) in western Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 52 (5): 662-663.
- LOOSS, A. (1899). Weitere Beiträge zur Kenntniss der Trematoden-Fauna Aegyptens zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus *Distomum* Retzius. *Zoologische Jahrbücher Systematik.*, 12: 632-635.
- LOOS-FRANK, B. (1976). Ameisen im Entwicklungszyklus von *Dicrocoelium dendriticum*. Fra verhalten und Veränderungen der Haemolymphproteine. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 50: 193-194.
- LOOS-FRANK, B. (1978). Zum Verhalten von Ameisen der Gattung *Formica* (Hymenoptera: Formicidae) gegenüber Schleimballen des Kleinen Leberegels *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea: Dicrocoelidae) und über infektionsbedingte Veränderungen ihrer Hämolymphe. *Entomologica Germanica*, 4 (1): 12-23.
- LUCIUS, R. (1981). *Untersuchungen zur Biologie, Pathologie und Ökologie von Dicrocoelium hospes Looss, 1907 (Trematodes, Dicrocoeliidae)*. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften vorgelegt der Fakultät II (Biologie) der Universität Hohenheim, 106 pp.
- LUCIUS, R. & FRANK, W. (1978). Beitrag zur Biologie von *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Trematodes, Dicrocoeliidae). *Acta Tropica*, 35 (2): 161-181.
- LUKIN, A.K. (1980). [The prevalence and economic loss due to dicrocoeliasis in ruminants]. *Trudy Saratovskoi Nauchno-Issledovatel'skoi veterinarnoi Stantsii*, 14: 76-79. En: *Helminth. Abstr.* (1984), 53 (1), n° 40.
- MACCHIONI, G.; MARCONCINI, A.; TASSI, P. & WIDENHORN, O. (1978). Efficacia del trattamento terapeutico con tiabendazolo (2-(4'tiazolil)-benzimidazolo) nell'infestione da *Dicrocoelium dendriticum* negli ovini. *La clinica veterinaria*, 101 (4): 185-190.
- MACKO, J.K. & PACENOVSKY, J. (1987). On the variability of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) in domestic and free-living animals. II. On individual variability of the cattle (*Bos taurus* -race locale-) dicrocoeliids in Algeria. *Helminthologia*, 24 (2): 111-118.
- MALEK, E.A. (1980a). Occurrence of *Dicrocoelium hospes* in Mali and Senegal, West Africa. *Journal of Helminthology*, 54: 45-46.
- MALEK, E.A. (1980b). *Snail-transmitted parasitic diseases*. Ed. CRC Press Inc., Florida, Vol. I: 334 pp., Vol. II: 324 pp.

- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1982). Infestación natural por trematodos de varias especies de *Helicella* (Mollusca, Stylommatophora). *III Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, Madrid: 100.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1983). *Los Helicidae (Gastropoda, Pulmonata) de la Provincia de León*. Institución "Fray Bernardino de Sahagún". Excma. Diputación Provincial de León. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CECEL), 394 pp.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1987). Some aspects of the biology and helminthofauna of *Helicella (Helicella) itala* (Linnaeus, 1758) (Mollusca). Natural infection by Dicrocoeliidae (Trematoda). *Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extraordinario*: 131-148.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1991). Helicidae (Mollusca) species as first intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum* in the province of León (NW Spain). *The British Society for Parasitology, Spring Meeting*, Liverpool, UK: 41.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1992). Some land mollusc species involved in the life cycle of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in the wild in the province of Leon (NW Spain). *Abstracts of the 11th International Malacological Congress*, Siena, Giusti & Manganelli (Edit.): 248-249.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y. & ROLLINSON, D. (1986). Preliminary observations on the use of isoelectric focusing of enzymes for the identification of *Helicella* species (Mollusca, Stylommatophora) from León Province (Spain). *Iberus*, 6: 155-165.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; GONZÁLEZ LANZA, C. & DEL POZO CARNERO, P. (1991a). Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in the Porma basin (León, NW Spain). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66 (2): 57-61.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; GONZÁLEZ LANZA, C.; ESPADALER, X. & OTERO MERINO, C. (1991b). Datos preliminares sobre la infestación por *Dicrocoelium dendriticum* de las hormigas (2º hospedador intermediario) de la cuenca del Porma (León, España). *Resúmenes del I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología, ICASEP I*, Valencia, 1-5 Julio: 256.
- MANGA GONZÁLEZ, M.Y.; GONZÁLEZ LANZA, C.; DEL POZO CARNERO, P. & CAMPO, R. (1995). Studies on experimental infection by *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) of *Cerquaria (Xeromagna) cespitum arigonis* (Mollusca) specimens in a natural environment. *Abstracts of Twelfth International Malacological Congress*, Vigo (Pontevedra), 3-8 Septiembre: 456-457.
- MAPES, C.R. (1950). The lancet fluke, a new parasite of the woodchuck. *Cornell Veterinarian*, 40 (4): 346-349.
- MAPES, C.R. (1951). Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Loos, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). I. A study of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium* infection. *Cornell Veterinarian*, 41 (4) : 382-432.

- MAPES, C.R. (1952). *Cionella lubrica* (Müller), a new intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Journal of Parasitology*, 38 (1): 84.
- MAPES, C.R. & BAKER, D.W. (1950). The white-tailed deer, a new host of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Cornell Veterinarian*, 40 (2): 211-212.
- MARCHAND, A. (1966). *La dicrocoeliose*. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire D' Alfort, 77 pp.
- MARCHAND, A. (1975). La dicrocoeliosi dei ruminanti europei. *Le Point Veterinaire*, 2 (7): 677-678.
- MASSOUD, J. (1981). Histopathology of liver in Iranian sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 75 (3): 293-298.
- MATTES, O. (1936). Der Entwicklungsgang des Lanzettegels *Dicrocoelium lanceatum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 8 (4): 371-430.
- MEHLHORN, H. & WALLDORF, V. (1988). Life cycles. En: *Parasitology in Focus. Facts and Trends*. Mehlhorn, H. (Ed.), Berlin: Springer-Verlag, 148 pp.
- McPHERRON, M.A.; CHAVKIN, M.J.; POWERS, B.E. & SEIM, H.B. (1994). Globule leukocyte tumor involving the small intestine in a cat. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 204 (2): 241-245
- MITTERER, K.E. (1975). Untersuchungen zum Schlüpfen der Miracidien des Kleinen Leberegels *Dicrocoelium dendriticum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 48 (1): 35-45.
- MOULINIÉ, J.J. (1856). De la reproduction chez les trématodes endoparasites. *Mémoires de l'Institut National Genevois*, 3: 31-44.
- NAKAMURA, T.; NAKAHARI, J.; MACHIDA, N.; KIRYU, K. & MACHIDA, M. (1984). Dicroceliasis in the wild Japanese serow, *Capricornis crispus*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 46 (3): 405-408.
- NAKASHIMA, O.; WATANABE, J.; TAGUCHI, J.; OKUDAIRA, S.; NAKASHIMA, Y.; YASUNAGA, M.; IHA, H.; KOJIRO, M.; TANAKA, M.; MAJIMA, Y.; TANIKAWA, K.; TANIWAKI, S.; SAITSU, H. & NAKAYAMA, T. (1994). Clinicopathologic study on necrotic nodules in the liver. *Acta Hepatologica Japonica*, 35 (7): 527-535.
- NEUHAUS, W. (1936). Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Lanzettegel-Cercarie (*Cercaria vitrina*) und Klarstellung des Infektionsvorganges beim Endwirt. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 8 (4): 431-473.
- NEUHAUS, W. (1938). Der invasionsweg der Lanzettegelcercariae bei der Infektion des Endwirtes und ihre Entwicklung zum *Dicrocoelium lanceatum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 10 (4): 476-512.
- NOKUBO, M. (1987). Effect of lecithin on the release of 5'-Nucleotidase from liver plasma membrane of rat by bile acids. *Lipids*, 22: 41-48.

- NÖLLER, W. (1929). Befunde bei Schnecken von Thüringer Schafweiden in einem Lanzettegelgebiete. *Tierärztliche Rundschau*, 35: 485-489.
- NÖLLER, W. (1932a). Weitere Untersuchungen über Parasitenbefunde bei Landschnecken von Thüringer Schafweiden in einem Lanzettegelgebiete. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* (13): 3-62.
- NÖLLER, W. (1932b). Über die Rolle der Wildkaninchen als Lanzettegelträger in einem Thüringer Lanzettegelgebiete. *Thierärztliche Rundschau*, 38 (12): 190-191.
- NÖLLER, W. & KORKHAUS, R. (1929). Das Verhalten von Eiern des Lanzettegels in Schnecken von Thüringer Schafweiden. *Tierärztliche Rundschau*, 35: 677-680.
- ODENING, K. (1969). Der Lanzettegel oder Kleine Leberegel (*Dicrocoelium dendriticum*). *Merckblätter über angewandte Parasitenkunde und Schädlingsbekämpfung*, 16: 265-281.
- ODHNER, T. (1901). Nordafrikanische Trematoden grösstenteils von Weissen Nil: I. Fascioliden. En: *Results of the Swedish Zoological Expedition to Egypt and the White Nile*, Royal University, Uppsala.
- OLSEN, O.W. (1977). *Parasitología Animal*. II. *Platelmintos, acantocéfalos y nematelmintos*. Ed. Aedos, Barcelona, 721 pp.
- ONAR, E. (1986/1987) [Dicrocoeliasis in sheep in the Marmara region of Turkey in 1967-1987 and the numbers of *Dicrocoelium dendriticum* in these cases.] *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Arastırma Enstitüsü Dergisi*, 18 (1-2): 37-44. En: *Helminth. Abstr.* (1988), 57 (10), n° 2851.
- ORTIZ CERVANTES, A.S. (1990). *Isoelectroenfoque y sistemática de las supertribus Cicindelitae, Carabidae, Scaritidae y Pterostichidae (Coleóptera, Carabidae) de la Península Ibérica*. E. T. D., S.A., Barcelona, 149 pp.
- OXFORD, G.S. & ROLLINSON, D. (1983). *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. The Systematics Association. Special Volume n° 24. Academic Press, London, 405 pp.
- PARASCHIVESCU, D. (1976). [Dynamics of tetany in ants in some pastures infested with *Dicrocoelium* in Romania]. *Studii si Comunicari, Muzeul de Stiintele Naturii Bacau*, 9: 65-77.
- PARASCHIVESCU, D. (1978). Dynamics of formicids (Hym., Formicidae) in tetany in some meadows with dicrocelioza in Romania. *Travaux du Muséum d'Histoire Naturelle 'Grigore Antipa'*, 19: 321-323.
- PARASCHIVESCU, D. (1981a). Etho-ökologische Untersuchungen an einigen Formiciden-Arten als Zwischenwirte von *Dicrocoelium dendriticum*. *Waldhygiene*, 14 (3/4): 65-72.
- PARASCHIVESCU, D. (1981b). [Studies on artificial infection of lambs with *Dicrocoelium dendriticum* via the intermediate host *Formica pratensis*]. *Waldhygiene*, 14 (3/4): 73-78.

- PARASCHIVESCU, D. & RAICEV, C. (1980). Experimental ecological investigations on the tetany of the species *Formica pratensis* complementary host of the trematode *Dicrocoelium dendriticum*. *Travaux du Muséum d'Histoire Naturelle 'Grigore Antipa'*, 22 (1/2): 299-302.
- PARASCHIVESCU, D.; HURGHISIU, I. & POPESCU, S. (1975). Bioecologic and biochemical research upon Formicidae complementary hosts of the *Dicrocoelium lanceatum* fluke (Stiles and Hassal, 1896). *Archiva Veterinaria*, 11/12: 159-178.
- PATRICK, R.S. & MCGEE, J.O'D. (1988). *Biopsy pathology of the liver*. Chapman and Hall Ltd, London, 373 pp.
- PAVLOV, P. (1941). *Helicella obvia* Ziegler, ospite intermedio del *Dicrocoelium lanceatum* Stiles and Hassall, 1896. *Rivista di Parasitologia* (Roma), 5: 253.
- PEGREFFI, G. (1957). La distomatosi epatica da *Dicrocoelium dendriticum*. *Veterinaria Italiana*, 8 (2): 123-135.
- PETROV, Yu.F. & ABALIKHIN, B.G. (1983). [Biochemical indicators and the microflora of the bile and intestinal contents in sheep with dicrocoeliasis]. *Veterinariya Moscow, USSR*, 3: 45-47.
- PIANA, G.P. (1882). Le cercarie nei molluschi studiate in rapporto colla presenza del Distoma epatico e del Distoma lanceolato nel fegato del ruminanti domestici. *Clinica Veterinaria Milano*, 5 (7): 306-314.
- POLJAKOVA-KRUSTEVA, O. (1974). Pathogenesis of liver fascioliasis and dicrocoeliasis. Proceedings of *Third International Congress of Parasitology*. Munich, August 25-31, Vol. 1: 514-515. En: *Helminth. Abstr.* (1975), 44 (6), n° 2510.
- POLJAKOVA-KRUSTEVA, O.; CHANDRA, G. & SVILENOV, D. (1974). [Studies on experimental dicrocoeliasis in lambs, pigs and guinea-pigs. IV. Morphological changes in the liver of lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum*]. *Izvestiya na Tsentralnata Khelmitologichna Laboratoriya*, 17: 101-110. En: *Helminth. Abstr.* (1975), 44 (10), n° 4822.
- POLOZHENTSEVA, A.A. (1968). [Observations of *Dicrocoelium* in the hepatic veins of sheep]. *Veterinariya Moscow*, 45 (1): 59-60.
- PRICE, E.W. & CHILD, P.L. (1971). Dicroceliasis (Distomiasis, Lancet Fluke Disease). En: *Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases*. Marcial-Rojas, R.A. Ed. Williams and Wilkins Baltimore, 498 pp.
- PRUNESCU, C.; PRUNESCU, P.; FROMUNDA, V.; PARASCHIVESCU, D. & POPESCU, S. (1979). [Histopathological changes of the liver in hamsters with experimental dicroceliasis]. *Archiva Veterinaria*, 14: 83-91.
- QUIROZ ROMERO, H.; CAMPO, R.; VEGA, R. & MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1995). Dinámica de la eliminación de huevos de *Dicrocoelium dendriticum* por ganado ovino tratado con albendazol y mantenido en pastoreo. *Resúmenes del IV Congreso Ibérico de Parasitología*, Santiago de Compostela, 24-28 Julio: 243.

- RACTLIFFE, L.H. (1968). Hatching of *Dicrocoelium lanceolatum* eggs. *Experimental Parasitology*, 23: 67-78.
- RAHKO, T. (1970). Globule leukocyte and mast cell in bile ducts of cattle naturally infected with liver flukes. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 11 (2): 219-227.
- RAHKO, T. (1972a). Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. I. The histopathology of the liver and bile ducts. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13 (4): 554-562.
- RAHKO, T. (1972b). Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. II. The histochemistry of bile ducts mucosubstances. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13 (4): 563-574.
- RAHKO, T. (1972c). Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. III. The histochemistry of mast cells and globule leucocytes. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 13 (4): 575-584.
- RANQUINI, J.H. (1946). Formación del huevo en *Dicrocoelium dendriticum* Rudolphi, con el estudio citológico de los procesos madurativos y de la fecundación. *Revista Ibérica de Parasitología*, 6 (2): 89-110.
- RANUCCI, S.; MUGHETTI, L.; AMBROSI, M. & GRELLONI, V. (1981) Rilievi ematochimici, anatomo-istopatologici e parassitologici in ovini infetti da dicroceliosi. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria*, 9 (3): 173-175.
- RANUCCI, S. & GROL-RANUCCI, H. (1978). Ricerche ematochimiche in ovini con lesioni parassitaire del fegato. *Clinica Veterinaria*, 101 (6): 324-333.
- REINA, D.; NAVARRETE, I.; HERNÁNDEZ RODRIGUEZ, S. & HABELA, M. (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. *Revista Ibérica de Parasitología*, Vol. Extraordinario: 85-90.
- REINHARDT, P. (1978). Untersuchungen zur medikamentellen Metaphylaxe bei der Dikrozöllose des Schafes. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 33 (23): 898-901.
- ROCHE, P.J.L. (1948). Human dicrocoeliasis in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 41 (6): 819-820.
- ROJO VÁZQUEZ, F.A.; CASTAÑO ROSADO, M. & RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, M. (1989). Patología y clínica de la fasciolosis. *Tratado de Veterinaria Práctica Bovis*, 31: 35-45.
- ROJO VÁZQUEZ, F.A.; CORDERO DEL CAMPILLO, M.; DIEZ BAÑOS, P. & CHATON SCHAFFNER, M. (1981). Relation existant entre le nombre d'oeufs dans les feces et la charge parasitaire lors des infestations naturelles a *Dicrocoelium dendriticum* chez les ovins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 132 (8/9): 601-607.
- ROJO VÁZQUEZ, F.A.; MEANA, A.; TARAZONA, J.M. & DUNCAN, J.L. (1989). The efficacy of netobimin, 15 mg/Kg, against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Record*, 124 (19): 512-513.

- ROLLINSON, D. (1980). Enzymes as a Taxonomic Tool: a Zoologist's View. En: *Chemosystematics: Principles and Practice*. Bisby, F.A.; Vaughan, J.G. & Wright, C.A. (Eds.). Systematics Association. Special Volume n° 16. Academic Press, London, pp. 123-146.
- ROLLINSON, D. & WRIGHT, C.A. (1984). Population studies on *Bulinus cernicus* from Mauritius. *Malacologia*, 25 (2): 447-463.
- ROLLINSON, D. & SOUTHGATE, V.R. (1985). Schistosome and snail populations: genetic variability and parasite transmission. En: *Ecology and genetics of host parasite interactions*. Rollinson, D. & Anderson, R.M. (Eds.), Academic Press, London, pp. 91-109.
- ROLLINSON, D.; WALKER, T.K. & SIMPSON, J.G. (1986). The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology*, 91: S53-S71.
- ROMIG, T.; LUCIUS, R. & FRANK, W. (1980). Cerebral larvae in the second intermediate host of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Trematodes, Dicrocoeliidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63 (3): 277-286.
- ROSEF, O.; SKJERVE, E. & GRODUM, A. (1985). [Liver flukes in ruminants in the county of Aust-Agder, Norway. The influence of liver flukes on the weight of lamb carcasses]. *Norsk-Veterinaertidsskrift*, 97 (11): 733-737. En: *Helminth. Abstr.* (1986), 55, n° 1102.
- ROSICKY, B. & GROSCHAFT, J. (1982). Dicrocoeliosis. En: *CRC handbook series in zoonoses. Section C: parasitic zoonoses. Volume III*. Hillyer, G.V. & Hopla, C.E. (Eds.), Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, Ind., pp. 33-52.
- ROSS, G.C. (1976). Isoenzymes in *Schistosoma* spp: LDH, MDH and acid phosphatases separated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 55 B: 343-346.
- ROSS, G.C. (1977). Analysis by isoelectric focusing of phosphoglucose isomerases in *Schistosoma* species and their snail hosts. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*: 76-79.
- ROSS, G.C.; SOUTHGATE, V.R. & KNOWLES, R.J. (1978). Observations on some isoenzymes of strains of *Schistosoma bovis*, *S. mattheei*, *S. margrebowiei* and *S. leiperi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 57: 49-56.
- ROSS, G.C.; BAYSSADE-DUFOUR, Ch.; SOUTHGATE, V.R.; ALBARET, J.L.; NGENDAHOYO, L.D. & CHABAUD, A.G. (1987). Relationships between cercarial indices of *Schistosoma haematobium*, *S. bovis* y *S. curassoni* from Senegal and the isoenzyme genotypes of the adult worms. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 62 (6): 507-515.
- RUDOLPHI, C.A. (1803). Neue Beobachtungen ver die Eingeweiderwrmer. *Archiv für Zoologie und Zootechnie*, 3: 1-32.
- RUDOLPHI, C.A. (1819). *Entozoorum synopsis*. Berlin: Author, pp. 92-93.

- SALIMOV, B. (1972a). [A study on experimental dicrocoeliasis in calves]. *Helminthologia Bratislava*, 14 (1/4): 357-360. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (8), n° 3651.
- SALIMOV, B. (1972b). [Sex variation in the infectibility of calves with *Dicrocoelium*]. *Gel'minty pishchevykh produktov. Tezisy dokladov mezhrespublikanskoi nauchnoi konferentsii, 22-25 Dekabrya goda*. Samarkand, USSR: 143-144. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (7), n° 292.
- SALIMOV, B. (1972c). [The migration paths of *Dicrocoelium* in the final host]. *Gel'minty pishchevykh produktov. Tezisy dokladov mezhrespublikanskoi nauchnoi konferentsii, 22-25 Dekabrya goda*. Samarkand, USSR: 139-140. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (7), n° 3093.
- SALIMOV, B. (1972d). [Susceptibility of various animals to *Dicrocoelium* infection]. *Veterinariya Moscow*, 49 (5) : 67-68. En: *Helminth. Abstr.* (1973), 42 (1), n° 142.
- SALIMOV, B. (1972e). [Study of experimental dicrocoeliasis in various animals]. *Trudy Uzbekskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Veterinarnogo Instituta (Bolezni Sel'skokhozyaistvennykh Zhivotnykh)*, 20: 153-154. En: *Helminth. Abstr.* (1976), 45 (3), n° 1163.
- SALIMOV, B.S. (1981). Ecological bases of struggle against fascioliasis and dicrocoeliosis. *9th International Conference of World Association of Animal Parasitology*, Budapest: 165.
- SALIMOV, B. & SALIMOVA, M. (1972). [Vitamin A content in the liver of sheep with chronic dicrocoeliasis and in the parasite]. *Gel'minty pishchevykh produktov. Tezisy dokladov mezhrespublikanskoi nauchnoi konferentsii, 22-25 Dekabrya 1972 goda*. Samarkand, USSR: 53. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (7), n° 3047.
- SALIMOV, B.S. & KUPRIYANOVA, A.V. (1974). [Morphological characteristics of *Dicrocoelium dendriticum* from sheep and goats]. *Trudy Uzbekskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Veterinarnogo Instituta (Bolezni Sel'skokhozyaistvennykh Zhivotnykh)*, 22: 83-87. En: *Helminth. Abstr.* (1979), 45 (4), n° 1812.
- SALIMOVA, M. (1972). [Experimental dicrocoeliasis of Karakul lambs]. *Trudy VII Vsesoyuznoi konferentsii po Prirodnoi Ochagovosti Boleznei i Obshchim Voprosam Parazitologii Zhivotnykh, 14-18 Oktyabrya 1969, Samarkand*, 6 (2). Tashkent, USSR: Izdatel'stvo "FAN" Uzbekskoi SSR: 155-157. En: *Helminth. Abstr.* (1974) 43 (12), n° 4850.
- SALIMOVA, M. & SALIMOV, B. (1972). [Changes in vitamin A content in the serum of lambs with experimental *Dicrocoelium* infection]. *Gel'minty pishchevykh produktov. Tezisy dokladov mezhrespublikanskoi nauchnoi konferentsii, 22-25 Dekabrya 1972 goda*. Samarkand, USSR: 93. En: *Helminth. Abstr.* (1978), 47 (7), n° 3049.
- SÁNCHEZ CAMPOS, S. (1994). *Efectos de la dicroceliosis experimental sobre la secreción biliar y los procesos de biotransformación hepática en el criceto (Mesocricetus auratus)*. Tesina de Licenciatura, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 97 pp.

- SÁNCHEZ CAMPOS, S.; LÓPEZ, P.; CAMPO, R.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ, P.; MANGA GONZÁLEZ, M.Y. & GONZÁLEZ GALLEGÓ, J. (1994). Impairment of drug metabolizing system in experimental dicrocoeliosis. *Journal of Hepatology*, 21: S168.
- SANZ, F.; TARAZONA, J.M.; JURADO, R.; FRÍAS, J.; TARAZONA, J.V. & DUNCAN, J.L. (1987). An evaluation of the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Record*, 17: 57-58.
- SCHRANK, F.V.P. (1790). Frotekning pa nagra hittils obeskrigene intestinal-krak. *Kongl. Nya Handl.*, 11: 118-126.
- SCHRÖDER, L. (1980). Experimental dicrocoeliasis in the golden hamster: Studies on the isolation of a functional *D. dendriticum*-antigen from adult liver flukes. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt.* Ref. 267: 306. (Abstract from 9th meeting of the "Deutsche Gesellschaft für Parasitologie", 26/3-29/3 in D-6300 Gießen).
- SCHRÖDER, L. & GEYER, E. (1976). Experimentelle Dicrocoeliose: Bildung humoraler Antikörper beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) Waterhouse. *Behring Institute Mitteilungen Parasitologie*, 60: 24-37.
- SCHUSTER, R. (1987). Ein geschichtlicher Überblick zur Namensgebung des Lanzettegels *Dicrocoelium dendriticum*. *Angewandte Parasitologie*, 28: 205-206.
- SCHUSTER, R. (1991). Factors influencing the metacercarial intensity in ants and the size of *Dicrocoelium dendriticum* metacercarial cysts. *Journal of Helminthology*, 65 (4): 275-279.
- SCHUSTER, R. (1992). Zur Beeinflussung von *Helicella obvia* durch *Dicrocoelium*-Parthenitae. *Angewandte Parasitologie*, 33 (1): 61-64.
- SCHUSTER, R. & NEUMANN, B. (1988). Zum jahreszeitlichen Auftreten von *Dicrocoelium dendriticum* in Zwischenwirten. *Angewandte Parasitologie*, 29 (1): 31-36.
- SELANDER, R.K. & KAUFMAN, D.W. (1975). Genetic structure of populations of the brown snail *Helix aspersa*. 1. Microgeographic variation. *Evolution*, 29: 385-401.
- SIDDIKOV, B.Kh. (1986). O viiavlenii eliminacionnoi sposobnosti nekotorich nasekomich (Coleoptera, Orthoptera) iaic trematodi *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassal (1896). *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*, 1: 46-49.
- SIGUIER, F.; FELD, P.M.; WELTI, J.J. & LUMBROSO, P. (1952). Tribulations neurologiques d'un jeune berger atteint de distomatose cérébrale à *Dicrocoelium lanceatum*. *Bulletin et Mémoires de la Société de Médecine des Hôpitaux de Paris*, 9/10: 353.
- SINCLAIR, K.B. (1962). Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *British Veterinary Journal*, 118: 37-53.
- SINCLAIR, K.B. (1967). Pathogenesis of *Fasciola* and other liver flukes. *Helminthological Abstract*, 36: 115-134.

- SLESINGR, L. (1970). [Changes in blood serum in sheep with distomiasis]. *Veterinárni Medicina*, 43 (9): 545-550.
- SOMVANSHI, R. & KOUL, G.L. (1989). Dicrocoeliasis in Pashmina goats. *Indian Veterinary Medicine Journal*, 13: 42-43.
- SOMVANSHI, R.; VAID, J.; BISWAS, J.C. & JITHENDRAN, K.P. (1992). Clinicopathological observations on dicrocoeliasis in goats. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 16 (2): 112-114.
- SOULSBY, E.J.L. (1965). *Textbook of Veterinary Clinical Pathology. Vol. I. Helminths*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, xxxii + 1120 pp.
- SOULSBY, E.J.L. (1988). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Nueva Editorial Interamericana, México D.F., xxii + 823 pp.
- SOUTHGATE, V.R.; ROLLINSON, D.; ROSS, G.C.; KNOWLES, R.J. & VERCRUYSSSE, J. (1985a). On *Schistosoma curassoni*, *S. haematobium* and *S. bovis* from Senegal: development in *Mesocricetus auratus*, compatibility with species of *Bulinus* and their enzymes. *Journal of Natural History*, 19: 1249-1267.
- SOUTHGATE, V.R.; HOWARD, G.W.; ROLLINSON, D.; BROWN, D.S.; ROSS, G.C. & KNOWLES, R.J. (1985b). *Bulinus tropicus*, a natural intermediate host for *Schistosoma margrebowiei* in Lochinvar National Park, Zambia. *Journal of Helminthology*, 59: 153-155.
- SPINDLER, E. M.; ZAHLER, M.; LOOS-FRANK, B. (1986). Behavioural aspects of ants as second intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72 (5): 689-692.
- SRIVASTAVA, G.C. (1974). Total egg count in a *Dicrocoelium dendriticum* obtained from different hosts. *Haryana Agricultural University Journal of Research*, 4 (4): 277-280. En: *Helminth. Abstr.* (1976), 45 (11), n° 5787.
- SRIVASTAVA, G.C. (1975). The intensity of infection in naturally infected *Formica pratensis* with the metacercariae of *Dicrocoelium dendriticum* in relation to their size. *Journal of Helminthology*, 49 (1): 57-64.
- SRIVASTAVA, G.C.; KOLEV, G. & GEORGIEV, M. (1978). A surgical approach to trace the route of migration of *Dicrocoelium dendriticum* in the laboratory animals. *Rivista di Parassitologia*, 39 (2/3): 131-137.
- STEELE, J.H. (1982). *Handbook series in Zoonoses*. Section C: Parasitic Zoonoses Volume III. Hillyer, G.V. & Hopla, C.E. (Eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 337 pp.
- STILES, C.W. & HASSALL, A. (1896). Notes on parasites. *Veterinaria Magiar*, 3: 151-161.
- SVADZHYAN, P.K. (1951). [Contribution to the study of the snails serving as intermediate hosts of *Dicrocoelium lanceatum*]. *Izvestiya Akademii Nauk Armyanskoi SSR*, 4 (7): 649-656.
- SVADZHYAN, P.K. (1954). Dynamics of an infection of terrestrial mollusc in Armenian SSR by parthenogenetic stages of *Dicrocoelium lanceatum* and factors influencing the expulsion of slime balls. *Rabot. Gelmintol 75 Let Skrjabin*: 642-648.

- SVADZHYAN, P.K. (1956). [Experimental infection of definitive hosts with metacercariae of *Dicrocoelium dendriticum* Stiles & Hassall, 1896 (Trematoda, Dicrocoeliidae)]. *Izvestiya Akademii Nauk Armyanskoi SSR. Biologicheskie i Selskohozyaistvennie Nauki*, 9 (7): 89-93. En: *Helminth. Abstr.* (1956), 25 (5), n° 428c.
- SVADZHYAN, P.K. (1959). Puti migracii metacerkarii *Dicrocoelium lanceatum* Stiles et Hassall, 1896 v organizme okonchatel'nogo joziaina. *Veterinariya*, 36 (4): 45-48.
- SVADZHYAN, P.K. (1960). [The development of metacercariae of *Dicrocoelium dendriticum* in the second intermediate host- the ant]. *Zoologische Zhurnal*, 39 (10): 1568-1571.
- TARRY, D.W. (1969). *Dicrocoelium dendriticum*: the life cycle in Britain. *Journal of Helminthology*, 43 (3/4): 403-416.
- TEGELSTRÖM, H.; NILSSON, G. & WYONI, P.I. (1983). Lack of species differences in isoelectric focused proteins in the *Formica rufa* group (Hymenoptera, Formicidae). *Hereditas*, 98: 161-165.
- THEODORIDIS, Y.; DUNCAN, J.L.; MACLEAN, J.M. & HIMONAS, C.A. (1991). Pathophysiological studies on *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 39 (1-2): 61-66.
- TIMON-DAVID, J. (1962). Fourmis et "Petite Douve". Nouvelle découvertes et progrès de la question. *L'Entomologiste*, 18 (4): 69-72.
- TIMON-DAVID, J. (1965). Infestation expérimentale d'une hélicelle par huit espèces de trématodes digénétiques appartenant à quatre familles différentes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 40 (2): 149-154.
- TOHMÉ, G. (1969). *Répartition géographique des Fourmis du Liban*. Thèse, Université Toulouse, 242, 77p.
- TOHMÉ, H. & TOHMÉ, G. (1977). Les hôtes intermédiaires du cycle évolutif de la petite Douve du foie du mouton au Liban et en Syrie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 52 (1): 1-5.
- TSUI, W.M.S; YUEN, R.W.S; CHOW, L.T.C & TSE, C.C.H. (1992). Solitary necrotic nodule of the liver: parasitic origin. *Journal of Clinical Pathology*, 45 (11): 975-978.
- TSVETAeva, N.P. (1975). [Pathogenic effect of *Dicrocoelium* on the golden hamster]. *Trudy Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im K.I. Skryabina (Teoreticheskie Problemy Veterinarnoi Gel'mintologii)*, 22: 185-191. En: *Helminth. Abstr.* (1977), 46, n° 4908.
- TVERDOKHLEBOV, P.T. (1973). [Biological basis for the forecasting of *Dicrocoelium* infections]. *Trudy Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im K.I. Skryabina*, 20: 185-191. En: *Helminth. Abstr.* (1976), 45, n° 5655.
- TVERDOKHLEBOV, P.T. (1984). [Morphology of the cyst wall and excystment mechanisms of *Dicrocoelium lanceatum* metacercariae]. En: Sonin, M.D. (Ed.) *Gel'minty sel's kokhozyaistvennykh i okhotnich'e-promyslovykh zhivotnykh*. Moscow, USSR, Nauka: 189-198. En: *Helminth. Abstr.* (1985), 54 (3), n° 771.

- URQUHART, G.M.; ARMOUR, I.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M. & JENNINGS, F.W. (1987). *Veterinary Parasitology*. Longman Scientific & Technical, 286 pp.
- VASALLO MATILLA, F. (1971). Hallazgo de huevos de *Dicrocoelium dendriticum* en heces de procedencia humana. *Medicina tropical*, 47 (2): 134-142.
- VASIL'EVA (1974). [Changes in the haematocrit values during *Dicrocoelium* infection in sheep]. *Byulleten' Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im. K.I. Skryabina*, 13: 44-46.
- VEGA, R.; CAMPO, R.; QUIROZ ROMERO, H. & MANGA GONZÁLEZ, M.Y. (1994). Ensayos sobre las épocas idóneas del año para tratar el ganado ovino contra *Dicrocoelium dendriticum*. *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, Barcelona-Sigtes, 23-24 Septiembre: 40.
- VERMEIL, C.; LE CLOITRE, M.L.; BEAUPÈRE, J. & REHEL, H. (1964). Un nouveau cas de distomatose humaine a *Dicrocoelium dendriticum*. A propos des distomatoses humaines observées a Nantes. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 57 (5): 946-949.
- VERSHININ, I.I. (1957a). [Epizootiology of *Dicrocoelium* infections of sheep and its biology in the Kaluga region]. *Trudy Moskovskoy Veterinarnoi Akademii*, 19 (2): 3-15. En: *Helminth. Abstr.* (1962), 31, n° 555.
- VERSHININ, I.I. (1957b). [Survival of *Dicrocoelium dendriticum* eggs in natural conditions]. *Trudy Moskovskoy Veterinarnoi Akademii*, 19 (2, Pt. 1): 16-20. En: *Helminth. Abstr.* (1962), 31, n° 549.
- VERSHININ, I.I. (1958). Pathological changes in the liver of sheep infested with *Dicrocoelium* in relation to the intensity infection. *Trudy Moskovskoy Veterinarnoi Akademii*, 27: 70-84.
- VESELINOV, G. D. (1962). [Investigations on the development of *Dicrocoelium lanceatum* (Stiles et Hassal, 1896) in Bulgaria]. *Izvestiya na Tsentralnata Khelmitologichna Laboratoriya*, 7: 127-135.
- VOGEL, H. (1929). Beobachtungen über *Cercaria vitrina* und deren Beziehung zum Lanzettegelproblem. *Archiv für Schiffs- u. Tropenhygiene*, 33 (9): 474-489.
- VOGEL, H. & FALCAO, J. (1954). Über den Levenzyklus des Lanzettegels *Dicrocoelium dendriticum* in Deutschland. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 5 (3): 275-296.
- VON LINSTOW, D. (1887). Helminthologische Untersuchungen, *Cercaria vitrina* n. sp. *Zoologische Jahrbücher Systematik.*, 3: 105-106.
- VON VILLEMOS-SUHM, R. (1871). Zur Entwicklungsgeschichte des kleinen Leberegels. *Ztschr. f. Wiss. Zool.*, 21: 175-179.
- VUJIC, B. (1972). [Biology of *Dicrocoelium lanceolatum* (Rudolphi 1803) in some mountainous and flat areas in Serbia (II)]. *Veterinarski Glasnik*, 26 (11): 827-833.
- WOLFF, K.; HAUSER, B. & WILD, P. (1984). Dicrocoeliose des Schafes: untersuchungen zur Pathogenese und zur Regeneration des Leber nach Therapie. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 97 (10): 378-387.

- WRIGHT, C.A. & ROLLINSON, D. (1979). Analysis of enzymes in the *Bulinus africanus* group (Mollusca: Planorbidae) by isoelectric focusing. *Journal of Natural History*, 13: 263-273.
- WRIGHT, C.A. & ROLLINSON, D. (1981). Analysis of enzymes in the *Bulinus tropicus/truncatus* complex (Mollusca: Planorbidae). *Journal of Natural History*, 15: 873-885.
- WRIGHT, C.A.; ROLLINSON, D. & GOLL, P.H. (1979a). Parasites in *Bulinus senegalensis* (Mollusca: Planorbidae) and their detection. *Parasitology*, 79: 95-105.
- WRIGHT, C.A.; SOUTHGATE, V.R. & ROSS, G.C. (1979b). Enzymes in *Schistosoma intercalatum* and the relative status of the Lower Guinea and Zaire strains of the parasite. *International Journal of Parasitology*, 9: 523-528.
- ZARNIK, B. (1910). Über den entwicklungszyklus von *Dicrocoelium lanceatum* (*Distomum lanceolatum*). *Sitzungsberichte der Physikalisch-medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, 2: 27-31.
- ZDARSKA, Z. & PANIN, V.Ya. (1977). Activity of some enzymes in the sporocysts and cercariae of *Dicrocoelium lanceatum* and *Eurytrema pancreaticum*. *Folia Parasitologica*, 24 (2): 117-121.

9. INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y LÁMINAS

9.1.- ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.-	Esquema del ciclo biológico de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	27
Cuadro 2.-	Dosis infectante de <i>D. dendriticum</i> utilizada, período de prepatencia y carga parasitaria recuperada en distintas especies de animales	29
Cuadro 3.-	Parámetros cuyos valores se incrementan o descienden en los animales infectados experimentalmente con distintas dosis de <i>D. dendriticum</i>	39
Cuadro 4.-	Parámetros cuyos valores se incrementan o descienden en los animales infectados naturalmente con distinta carga parasitaria de <i>D. dendriticum</i>	43
Cuadro 5.-	Huevos de <i>D. dendriticum</i> eliminados en las heces de distintos animales infectados experimentalmente, con diferentes dosis de metacercarias	46
Cuadro 6.-	Tamaño de adultos y huevos de <i>D. dendriticum</i> procedentes de distintas especies de hospedadores	52
Cuadro 7.-	Número de metacercarias de <i>D. dendriticum</i> enquistadas por hormiga (en orden ascendente) y tamaño de las mismas procedentes de distintas especies de Formicidae	69
Cuadro 8.-	Metacercarias de <i>D. dendriticum</i> estudiadas para cada sistema enzimático	80
Cuadro 9.-	Esquema de los experimentos realizados en los corderos infectados con <i>Dicrocoelium dendriticum</i> y en los testigos	82
Cuadro 10.-	Ejemplares adultos de <i>D. dendriticum</i> estudiados para cada sistema enzimático	89
Cuadro 11.-	Algunas características de la infección de los moluscos con huevos de <i>D. dendriticum</i>	92
Cuadro 12.-	Esquema de las investigaciones realizadas en el molusco <i>Ceratomyxa arizonensis</i> con <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	93
Cuadro 13.-	Ejemplares de moluscos infectados con <i>D. dendriticum</i> y testigos, estudiados para cada sistema enzimático	96
Cuadro 14.-	Hormigas diseccionadas para la obtención de las metacercarias utilizadas en la infección de cada uno de los corderos	102
Cuadro 15.-	Tamaño de 25 metacercarias enquistadas de <i>D. dendriticum</i> procedentes de <i>Formica rufibarbis</i>	106
Cuadro 16.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias	111
Cuadro 17.-	Valores (x ± E.S.) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	113
Cuadro 18.-	Valores (x ± E.S.) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	114
Cuadro 19.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de proteínas totales , obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias	115
Cuadro 20.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de albúmina , obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias	115
Cuadro 21.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de LDH , obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias	115
Cuadro 22.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias	116
Cuadro 23.-	Valores (x ± E.S.) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	117

Cuadro 24.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	119
Cuadro 25.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de albúmina , obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	120
Cuadro 26.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test (LSD) en los valores de bilirrubina , obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	120
Cuadro 27.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de glucosa , obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias...	120
Cuadro 28.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de FA , obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias.....	120
Cuadro 29.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados.....	122
Cuadro 30.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.....	123
Cuadro 31.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.....	124
Cuadro 32.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros bioquímicos y enzimas marcadoras hepáticas de corderos testigos e infectados, con distinta dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i.	127
Cuadro 33.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias.....	130
Cuadro 34.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos e infectados con 1.000 metacercarias	131
Cuadro 35.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	132
Cuadro 36.-	Valores ($x \pm E.S.$) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.....	133
Cuadro 37.-	Valores ($x \pm E.S.$) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 1.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	134
Cuadro 38.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de neutrófilos obtenidos de los corderos infectados con 1.000 metacercarias	135
Cuadro 39.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias.....	136
Cuadro 40.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos e infectados con 3.000 metacercarias	137
Cuadro 41.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	138
Cuadro 42.-	Valores ($x \pm E.S.$) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia.....	139
Cuadro 43.-	Valores ($x \pm E.S.$) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.) con 3.000 metacercarias, a lo largo de la experiencia	140
Cuadro 44.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de eritrocitos obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	141
Cuadro 45.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de leucocitos obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	141
Cuadro 46.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de hematócrito obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	141
Cuadro 47.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de hemoglobina obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	142
Cuadro 48.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de VCM obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	142
Cuadro 49.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de CHCM obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias....	143
Cuadro 50.-	Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de neutrófilos obtenidos de los corderos infectados con 3.000 metacercarias	143
Cuadro 51.-	Media (x), mínimo y máximo (rango) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados.....	145
Cuadro 52.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.....	146
Cuadro 53.-	Valores ($x \pm E.S.$) de índices eritrocíticos de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia.....	147

Cuadro 54.- Valores ($x \pm E.S.$) de los componentes de la fórmula leucocitaria de corderos testigos (Test.) e infectados (Inf.), a lo largo de la experiencia	148
Cuadro 55.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de hemoglobina obtenidos de los corderos testigos	149
Cuadro 56.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de CHCM obtenidos de los corderos testigos.....	149
Cuadro 57.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de eritrocitos obtenidos de los corderos infectados	150
Cuadro 58.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de hematócrito obtenidos de los corderos infectados.....	150
Cuadro 59.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de hemoglobina obtenidos de los corderos infectados.....	150
Cuadro 60.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de VCM obtenidos de los corderos infectados.....	151
Cuadro 61.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de HCM obtenidos de los corderos infectados.....	151
Cuadro 62.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de CHCM obtenidos de los corderos infectados	152
Cuadro 63.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en los valores de neutrófilos obtenidos de los corderos infectados.....	152
Cuadro 64.- Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de corderos testigos e infectados, con distinta dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i.....	154
Cuadro 65.- Período de prepatencia en cada uno de los animales probados con distintas dosis de metacercarias.....	157
Cuadro 66.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de huevos por gramo (hpg) eliminados por los corderos infectados con distinta dosis, en la mañana y en la tarde.....	159
Cuadro 67.- Media (x), mínimo y máximo (rango) de huevos por gramo (hpg) de heces eliminados por los corderos infectados, en los distintos días p.i.	162
Cuadro 68.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado por todos los corderos probados	163
Cuadro 69.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado por todos los corderos probados con 1.000 metacercarias	163
Cuadro 70.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado por todos los corderos probados con 3.000 metacercarias	163
Cuadro 71.- Valor medio de huevos por gramo (hpg) eliminados, en la mañana y en la tarde, por los corderos infectados, en los distintos días p.i.	164
Cuadro 72.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado en la mañana por todos los corderos probados	165
Cuadro 73.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado en la tarde por todos los corderos probados.....	165
Cuadro 74.- Valores ($x \pm E.S.$) de huevos por gramo de heces (hpg) de corderos infectados con distintas dosis de metacercarias, sacrificados a los 2 y 6 meses p.i.	167
Cuadro 75.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado por todos los corderos probados al considerar, conjuntamente, los días p.i. y el momento de recogida de las heces.....	168
Cuadro 76.- Días p.i. entre los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test LSD) en el nº de hpg eliminado por todos los corderos probados al considerar, conjuntamente, los días p.i. y la dosis probada	168
Cuadro 77.- Número de vermes recuperado de cada cordero infectado con 1.000 ó 3.000 metacercarias y sacrificado a los 2 ó a los 6 meses p.i.....	171
Cuadro 78.- Tamaño de los vermes recuperados de los corderos sacrificados en distintas épocas.....	174
Cuadro 79.- Grado de maduración de los vermes recuperados en distintas épocas de sacrificio	175
Cuadro 80.- Frecuencias corregidas para LDH, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador.....	178
Cuadro 81.- Frecuencias corregidas para LDH, con respecto a la raza del hospedador	178
Cuadro 82.- Frecuencias corregidas para GPI, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador.....	180
Cuadro 83.- Frecuencias corregidas para GPI, con respecto a la raza del hospedador	180
Cuadro 84.- Frecuencias corregidas para PGM, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador.....	181
Cuadro 85.- Frecuencias corregidas para PGM, con respecto a la raza del hospedador.....	182
Cuadro 86.- Frecuencias corregidas para AcP, con respecto a la localidad de procedencia del hospedador.....	183
Cuadro 87.- Frecuencias corregidas para AcP, con respecto a la raza del hospedador.....	183

Cuadro 88.-	Valores de hpg eliminados por los corderos en la mañana, en la tarde y en ambos casos, de acuerdo con los vermes recuperados al sacrificio.....	186
Cuadro 89.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunas enzimas marcadoras hepáticas de los siguientes grupos de corderos: A/ < 100 vermes; B/ 101-200; C/ 201-300; D/ 301-400; E/ 401-600; F/ 2.063....	201
Cuadro 90.-	Valores ($x \pm E.S.$) de algunos parámetros hemáticos de los siguientes grupos de corderos: A/ < 100 vermes; B/ 101-200; C/ 201-300; D/ 301-400; E/ 401-600; F/ 2.063.....	202
Cuadro 91.-	Peso de los corderos testigos e infectados con cada una de las dosis, el día de la infección y el día del sacrificio.....	253
Cuadro 92.-	Media ($x \pm E.S.$) del incremento o de la disminución del peso de los corderos, con respecto al día 0 p.i.	253
Cuadro 93.-	Peso ($x \pm E.S.$), el día de la infección y el día del sacrificio, de los corderos testigos e infectados, de acuerdo con los vermes recuperados.....	257
Cuadro 94.-	Media ($\pm E.S.$) del incremento o de la disminución del peso de los corderos con distinta carga parasitaria, con respecto al día 0 p.i.	257

9.2.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de LDH encontrados en las metacercarias de <i>D. dendriticum</i>	108
Figura 2.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI encontrados en las metacercarias de <i>D. dendriticum</i>	108
Figura 3.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de PGM encontrados en las metacercarias de <i>D. dendriticum</i>	110
Figura 4.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de AcP encontrados en las metacercarias de <i>D. dendriticum</i>	110
Figura 5.-	Huevos por gramo (hpg) de <i>D. dendriticum</i> eliminados por cada cordero, en todo en período de muestreo	160
Figura 6.-	Valores de hpg (x) de <i>D. dendriticum</i> eliminados en la mañana y en la tarde, por cada cordero, a lo largo de toda la experiencia.....	160
Figura 7.-	Vermes de <i>D. dendriticum</i> recuperados y porcentaje de metacercarias establecidas en el hígado de cada cordero.....	172
Figura 8.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de LDH encontrados en los adultos de <i>D. dendriticum</i> ..	176
Figura 9.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI encontrados en los adultos de <i>D. dendriticum</i> ..	179
Figura 10.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de PGM encontrados en los adultos de <i>D. dendriticum</i> ..	181
Figura 11.-	Diagrama de los tipos enzimáticos de AcP encontrados en los adultos de <i>D. dendriticum</i> ..	182
Figura 12.-	Vermes recuperados de los animales sacrificados a los 6 meses p.i., en relación con el número de hpg (x) eliminado a lo largo de todo el experimento y durante los días p.i. 49-79, 80-119 y 120-180.....	187
Figura 13.-	Huevos por gramo (x hpg) eliminados por cada cordero a lo largo de toda la experiencia, en relación con el número de vermes recuperados al sacrificio	187
Figura 14.-	Huevos por gramo (x hpg) eliminados por cada cordero desde el día 120 p.i. hasta el final de la experiencia, en relación con el número de vermes recuperados al sacrificio.....	189
Figura 15 (a, b).-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de AST (a) y ALT (b) obtenidos en un cordero infectado con 2.063 vermes.....	192
Figura 16 (a, b).-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos (a) y GGT (b) obtenidos en un cordero infectado con 2.063 vermes	193
Figura 17.-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de ALT obtenidos en un cordero infectado con 495 vermes	194
Figura 18 (a, b).-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de FA (a) y leucocitos (b) obtenidos en un cordero infectado con 495 vermes.....	195
Figura 19.-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de FA obtenidos en un cordero infectado con 313 vermes	196
Figura 20.-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 313 vermes.....	196
Figura 21 (a, b).-	Relación del número de huevos por gramo con los valores de ALT (a) y LDH (b) obtenidos en un cordero infectado con 282 vermes	197
Figura 22.-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 282 vermes	198
Figura 23 (a, b).-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de AST (a) y LDH (b) obtenidos en un cordero infectado con 68 vermes.....	199
Figura 24.-	Relación del número de huevos por gramo (hpg) con los valores de leucocitos obtenidos en un cordero infectado con 68 vermes.....	200

Figura 25.- Valores medios de AST obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria	203
Figura 26 (a, b).- Valores medios de ALT (a) y LDH (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.	204
Figura 27 (a, b).- Valores medios de FA (a) y GGT (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria.....	205
Figura 28.- Valores medios de leucocitos obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria	206
Figura 29 (a, b).- Valores medios de linfocitos (a) y monocitos (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria	207
Figura 30 (a, b).- Valores medios de neutrófilos (a) y eosinófilos (b) obtenidos antes y después de la 1ª eliminación de huevos por los corderos de los grupos establecidos de acuerdo con la carga parasitaria	208
Figura 31.- Porcentaje de moluscos del lote A con huevos de <i>D. dendriticum</i> eclosionados y no eclosionados en las heces, durante los 5 primeros días de la experiencia	261
Figura 32.- Máximo (M), mínimo (m) y media (x) de huevos eclosionados de <i>D. dendriticum</i> observados en las heces de los moluscos del lote A, durante los 5 primeros días de la experiencia.....	263
Figura 33.- Porcentaje de moluscos, de cada lote infectado, que eliminaron con las heces huevos eclosionados de <i>D. dendriticum</i> , sobre el total de los probados con las distintas dosis.....	265
Figura 34.- Porcentaje de moluscos infectados (inf) en cada lote, sobre el n° total de examinados y sobre el n° total de los que eliminaron huevos eclosionados (h.e.).....	267
Figura 35.- Porcentaje de moluscos parasitados, sobre el total de los examinados en cada intervalo	269
Figura 36.- Porcentaje de moluscos que, dentro de cada intervalo, mostraban en el hepatopáncreas distinta intensidad y localización de los esporocistos.....	271
Figura 37.- Porcentaje de moluscos que, en cada intervalo, albergaban <i>D. dendriticum</i> en diferente grado de desarrollo.....	272
Figura 38.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de <i>D. dendriticum</i> aislados de ejemplares de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i> infectados experimentalmente.....	276
Figura 39.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de <i>D. dendriticum</i> aislados de ejemplares de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i> infectados naturalmente.....	276
Figura 40.- Actividad enzimática detectada en esporocistos secundarios de <i>D. dendriticum</i> aislados de <i>Helicella (H.) itala</i> infectados naturalmente.....	277
Figura 41.- Diagrama de los tipos enzimáticos de GPI, PGM y AcP encontrados en el hepatopáncreas de ejemplares de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i> y <i>Helicella (H.) itala</i> testigos.....	278
Figura 42.- Actividad de LDH en fases larvarias de <i>D. dendriticum</i> detectadas en <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i> , en los distintos días post-infección	280
Figura 43.- Bandas de actividad de GPI, en los distintos días p.i., correspondientes a las fases larvarias de <i>D. dendriticum</i> , al hepatopáncreas de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i> y a ambos.....	282
Figura 44.- Bandas de actividad de PGM, en los distintos días p.i., correspondientes a fases larvarias de <i>D. dendriticum</i> y al hepatopáncreas de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i>	283
Figura 45.- Bandas de actividad de AcP, en los distintos días p.i., correspondientes a fases larvarias de <i>D. dendriticum</i> y al hepatopáncreas de <i>Cerņuella (x.) cespitum arigonis</i>	284
Figura 46.- Modelos enzimáticos de LDH, GPT, PGM y AcP comunes en adultos (1, 2, 3, 4), metacercarias (I, II) y esporocistos (I', II', III', IV') de <i>D. dendriticum</i>	285

9.3.- ÍNDICE DE LÁMINAS

LÁMINA I

Figura 1.- Ejemplar de <i>Formica rufibarbis</i> , 2º hospedador intermediario de <i>D. dendriticum</i> , en fase de tetania	104
Figura 2.- Metacercaria de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	104

LÁMINA II

Figura 1.- Ejemplos de patrones enzimáticos obtenidos en las metacercarias de <i>D. dendriticum</i>	109
--	-----

LÁMINA III

Figura 1.- Huevo de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	158
Figura 2.- Adulto de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	158

LÁMINA IV		
Figura 1.-	Ejemplos de patrones enzimáticos obtenidos en vermes adultos de <i>D. dendriticum</i>	177
LÁMINA V		
Figura 1.-	Hígado. Cara diafragmática con áreas congestivas y pequeños focos necróticos.....	211
Figura 2.-	Hígado. Escasos tractos blanquecinos en la cara visceral del lóbulo izquierdo	211
LÁMINA VI		
Figura 1.-	Hígado en el que alternan zonas rojizas con áreas de color pardo en la cara diafragmática .	213
Figura 2.-	Hígado. Nódulos amarillentos en la cara visceral, preferentemente en el lóbulo cuadrado y repleción de la vesícula biliar	213
LÁMINA VII		
Figura 1.-	Cordones blanquecinos en la cara visceral, más evidentes en el lóbulo hepático izquierdo .	214
Figura 2.-	Hígado. Superficie de sección mostrando vías biliares engrosadas y ectásicas	214
LÁMINA VIII		
Figura 1.-	Hígado. Conductos biliares con un contenido amarillento y parásitos	216
Figura 2.-	Cisura portal. Ganglios linfáticos hepáticos aumentados de tamaño.....	216
LÁMINA IX		
Figura 1.-	Hepatocitos con degeneración vacuolar	219
Figura 2.-	Acúmulos focales de células inflamatorias en los sinusoides hepáticos	219
LÁMINA X		
Figura 1.-	Espacio porta. Presencia de abundantes eosinófilos, macrófagos y linfocitos. Picnosis nuclear en las células epiteliales del conducto biliar interlobulillar.....	222
Figura 2.-	Rama de la vena porta con vacuolización del endotelio.....	222
LÁMINA XI		
Figura 1.-	Conducto biliar septal ectásico. Sección del parásito y necrosis del epitelio de revestimiento. Atrofia del parénquima hepático adyacente	224
Figura 2.-	Efecto erosivo de la ventosa del parásito sobre el epitelio de revestimiento ductal.....	224
LÁMINA XII		
Figura 1.-	Congestión de los sinusoides en localización centrolobulillar.....	226
Figura 2.-	Fibrosis portal y septal	226
LÁMINA XIII		
Figura 1.-	Fibrosis perisinusoidal	228
Figura 2.-	Conducto biliar interlobulillar desembocando en un pequeño conducto biliar septal con células caliciformes	228
LÁMINA XIV		
Figura 1.-	Conducto biliar septal con abundantes leucocitos globulares.....	230
Figura 2.-	Granuloma en un espacio porta.....	230
LÁMINA XV		
Figura 1.-	Hepatitis granulomatosa. Zona amplia de necrosis, numerosas células gigantes y acúmulos nodulares de linfocitos.....	232
Figura 2.-	Detalle del granuloma anterior donde destaca una célula gigante multinucleada y abundantes linfocitos	232
LÁMINA XVI		
Figura 1.-	Tinción positiva de los hepatocitos periportales. Conducto biliar septal ectásico con la luz ocupada por el parásito y restos celulares. El tejido fibroso forma una amplia franja alrededor del conducto	234
Figura 2.-	Hepatocitos y polo apical de las células epiteliales de un conducto biliar septal teñidos con plata metenamina	234

LÁMINA XVII

- Figura 1.-** Hepatitis portal, proliferación de estructuras ductulares biliares y engrosamiento de la pared de la rama de la vena porta 236
- Figura 2.-** Conducto biliar septal. Abundantes leucocitos globulares y fibrosis periductal. Discreta congestión sinusoidal en el parénquima hepático adyacente 236

LÁMINA XVIII

- Figura 1.-** Mucosa de la vesícula biliar. Necrosis parcial del epitelio de revestimiento y de las unidades secretoras de la lámina propia, edema y linfangiectasia 238
- Figura 2.-** Linfadenitis crónica. Abundantes células plasmáticas en los senos medulares 238

LÁMINA XIX

- Figura 1.-** Linfadenitis crónica. Senos medulares dilatados con voluminosos macrófagos 240
- Figura 2.-** Linfadenitis granulomatosa. Granulomas calcificados en la corteza de un ganglio linfático 240

LÁMINA XX

- Figura 1.-** Vena conteniendo el parásito, abundantes glóbulos rojos y leucocitos 242
- Figura 2.-** Pequeño conducto biliar septal ectásico con descamación celular y numerosos leucocitos globulares intraepiteliales 242

LÁMINA XXI

- Figura 1.-** Conducto biliar septal. Intensa hiperplasia epitelial 244
- Figura 2.-** Conducto biliar septal con el parásito en su luz. Moderada necrosis y descamación celular. Acúmulo nodular de linfocitos en localización subepitelial. 244

LÁMINA XXII

- Figura 1.-** Detalle de la anterior. Numerosas células calciformes PAS positivas entre las de revestimiento. 246
- Figura 2.-** Conducto biliar septal hiperplásico con numerosos pliegues. Abundante secreción en el citoplasma apical de las células ductales 246

LÁMINA XXIII

- Figura 1.-** Conducto biliar septal. Necrosis prácticamente total del epitelio en la zona ocupada por los parásitos. Acúmulos linfoides subepiteliales 248
- Figura 2.-** Conducto biliar septal. Evidente efecto erosivo del parásito sobre el epitelio ductal, preservándose sólo los pliegues 248

LÁMINA XXIV

- Figura 1.-** Conducto hepático. Necrosis y descamación celular intensa. Infiltrado de linfocitos en la lámina propia y fibrosis periductal 250
- Figura 2.-** Ganglio linfático hepático. Edema local y presencia de células plasmáticas y macrófagos en los senos medulares 250

LÁMINA XXV

- Figura 1.-** Hepatocitos con degeneración vacuolar. Se observan mitocondrias dilatadas y con escasa densidad en su matriz. Presencia de células inflamatorias en los sinusoides hepáticos 252
- Figura 2.-** Detalle de un hepatocito con vacuolización mitocondrial 252

LÁMINA XXVI

- Figura 1.-** Dilatación y vesiculación del retículo endoplásmico en las proximidades de un canalículo biliar 254
- Figura 2.-** Canalículo biliar dilatado con pérdida de microvellosidades. Ectasia focal de las cisternas del retículo endoplásmico en los hepatocitos adyacentes 254

LÁMINA XXVII

- Figura 1.-** Conducto biliar interlobulillar. Algunas células epiteliales muestran el hialoplasma claro (edema celular) 256
- Figura 2.-** Espacio porta. Intenso infiltrado periductal en el que destacan los eosinófilos, con núcleo lobulado y granulaciones en su citoplasma 256

LÁMINA XXVIII

- Figura 1.-** Gran conducto biliar revestido por un epitelio cilíndrico alto con diferentes tipos celulares 258
- Figura 2.-** Células claras y oscuras tapizando un gran conducto biliar 258

LÁMINA XXIX

- Figura 1.-** Porción supranuclear de las células ductales donde se aprecian abundantes mitocondrias y gránulos secretores 260
- Figura 2.-** Célula oscura: detalle de los gránulos citoplasmáticos de diferente densidad. Se identifican escasas microvellosidades apicales y complejos de unión en sus superficies de contacto 260

LÁMINA XXX

- Figura 1.-** Ejemplar de *Cerneuella (Xeromagna) cespitum arigonis*, primer hospedador intermediario de *D. dendriticum* 262
- Figura 2.-** Cercaria de *Dicrocoelium dendriticum* 262

LÁMINA XXXI

- Figura 1.-** Bandas de actividad de LDH en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-7); esporocitos aislados de *Helicella (H.) itala* (8) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (9); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (10-12) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (13) con esporocistos en su interior 264
- Figura 2.-** Bandas de actividad de GPI en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-7); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (8-13) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (14); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (15-16) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (17-20); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (21-27) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (28-31) con esporocistos en su interior 264

LÁMINA XXXII

- Figura 1.-** Bandas de actividad de PGM en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-3); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (4-5) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (6); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (7-9) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (10-15); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (16-18) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (19-21) con esporocistos en su interior 266
- Figura 2.-** Bandas de actividad de AcP en: adulto de *D. dendriticum* (muestras 1-8); esporocistos aislados de *Helicella (H.) itala* (9-10) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (11-12); hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (13-14) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (15-16); y hepatopáncreas de *Helicella (H.) itala* (17-20) y de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* (21-22) con esporocistos en su interior 266

LÁMINA XXXIII

- Figura 1.-** Patrones enzimáticos de LDH y PGM obtenidos, a los 45 p.i., al analizar: hepatopáncreas de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* con esporocistos de *D. dendriticum* en su interior (muestras 1-10); hepatopáncreas (11-12); esporocistos (13); y vermes adultos (14-17)..... 268

LÁMINA XXXIV

- Figura 1.-** Patrones enzimáticos obtenidos a los 75 (AcP) y a los 130 días p.i. (GPI, al analizar: hepatopáncreas de *Cerneuella (x.) cespitum arigonis* con esporocistos de *D. dendriticum* en su interior (muestras 1-10); hepatopáncreas (11-12); esporocistos (13); y vermes adultos (14-17) 270