

Identificación taxonómica, estacionalidad y grado de infección con *Fasciola hepatica* de moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios del trematodo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo, México

Taxonomic identification, seasonality and degree of infection with *Fasciola hepatica* of mollusk intermediate hosts and non-hosts of the trematode in the ranch of the Hidalgo Autonomous University in Tulancingo, Hidalgo, Mexico

Irene Cruz Mendoza\*  
Froylán Ibarra Velarde\*  
Edna Naranjo García\*\*  
Ma. Teresa Quintero Martínez\*  
Jorge Lecumberri López\*\*\*

---

Abstract

The aims of the present study were to: Identify intermediate- and non intermediate hosts of *Fasciola hepatica*, find out about their seasonal variation, and determine the percentage of natural infection in intermediate host snails collected in five biotopes of a farm located at the Autonomous University of the State of Hidalgo in Mexico in Tulancingo in the State of Hidalgo. Monthly samples of snails were collected 19 times from five previously selected biotopes. These snails were obtained during a fifteen-minute walk in each biotope, and were taken to the laboratory. Each snail was taxonomically identified, and snail-compression was performed to identify the presence of larval forms of *F. hepatica*. During the study, 5 490 snails were collected, and out of these, 1 673 (30.4%) were identified as *Fossaria humilis* in all biotopes. In november 1997, 843 snails were obtained; out of these, 468 were alive, and 375 dead. The average temperature at the time of the snail collection was of 33°C, relative humidity of 35%, and pH of 7.2. Sporocysts, redia and cercariae were observed at snail-compression. Associated snails to *F. humilis* non intermediate hosts of *F. hepatica* were *Succinea* sp 3 083 (56.3%), *Physa cubensis* 297 (5.2%), *Planorbella (Pierosoma) trivolvis* 346 (6.3%) and *Helix aspersa* 91 (1.6%). It is concluded that only *F. humilis* was identified as the intermediate host of *F. hepatica* at the university farm mentioned above in Tulancingo, Hidalgo; when *F. humilis* was squeezed, it showed different larval stages of the trematode associated to four snail species.

**Key words:** SNAIL IDENTIFICATION INTERMEDIATE HOSTS, ACCOMPANYING FAUNA, *FOSSARIA HUMILIS*, *FASCIOLA HEPATICA*.

---

Recibido el 3 de octubre de 2001 y aceptado el 13 de febrero de 2002.

\* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\* Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\*\* Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

## Resumen

Los objetivos del presente estudio fueron: Identificar los moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica*; conocer su variación estacional y determinar el porcentaje de infección natural de los moluscos intermediarios del trematodo en cinco biotopos del rancho de la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Cada mes y durante 19 ocasiones se colectaron caracoles en los cinco biotopos previamente seleccionados; se recorría durante 15 minutos cada biotopo, para colectar los moluscos, que posteriormente se transportaban al laboratorio. Para la identificación taxonómica, cada molusco fue depositado individualmente en una bolsa de polietileno de 10 cm<sup>2</sup>, la cual contenía tres mililitros de agua. Utilizando una caja de Petri, cada molusco se comprimió con una pinza de disección y se observó en el microscopio para identificar la presencia de formas larvianas de *F. hepatica*. Durante la duración del estudio, de 5 490 caracoles colectados, 1 673 (30.4%) fueron identificados como *Fossaria humilis* en los cinco biotopos analizados. En noviembre de 1997 se obtuvieron 843 caracoles, de los cuales 468 estaban vivos y 375 muertos. La temperatura promedio en la colecta fue de 33°C, la humedad relativa de 35% y el pH de 7.2. En los caracoles comprimidos se encontraron esporoquistes, reñas y cercarias. Los caracoles asociados no huéspedes de *F. hepatica* fueron *Succinea sp.*, 3 083 (56.3%), *Physa cubensis*, 297, (5.2%), *Planorbella (Pierosoma) trivolvis* 346 (6.3%) y *Helix aspersa* 91 (1.6%). Se concluye que el único huésped intermediario de *F. hepatica* identificado en el rancho universitario del estado de Hidalgo es *Fossaria humilis*, el cual, a la compresión, mostró diversos estadios larvianos del trematodo, asociados con otras cuatro especies de caracoles.

**Palabras clave:** IDENTIFICACIÓN DE CARACOLES HUÉSPEDES INTERMEDIARIOS, FAUNA ACOMPAÑANTE, *FOSSARIA HUMILIS*, *FASCIOLA HEPATICA*.

## Introduction

Snails are soft bodied animals that belong to the Phylum Mollusca. The Gastropoda Class, that is involved in the biological cycle of *Fasciola hepatica*, is included in it.<sup>1,2</sup> The shell has characteristics<sup>3,4</sup> that are useful for identification purposes and that help place them in different taxonomic levels.<sup>5-8</sup>

Hubendick<sup>8</sup> recognizes 35 species of snails within the Family Lymnaeidae, some of which have been identified in Mexico such as *Lymnaea humilis*, *L. cubensis*, *L. attenuata*, *L. palustris*, *L. columella*, *L. obrussa*, *L. bulimoides* and *L. truncatula*.<sup>9-16</sup> Nevertheless, little has been published in Mexico in relationship to the taxonomic identification of the intermediate host of *F. hepatica* and the associated malacofauna.

The objectives of this study were the identification of mollusks that are intermediate hosts or not of *Fasciola hepatica*, know their seasonal variation and determine the percentage of natural infection in the intermediate hosts of the trematode, in five biotopes of the ranch of the Autonomous University of the State of Hidalgo.

## Location of the project

This study project was performed in the Ranch of the Autonomous University of the State of Hidalgo (UAH),

## Introducción

Los caracoles son animales de cuerpo blando perteneciente al Phylum Mollusca, en los que se incluyen los de la clase gastrópoda, que a su vez están involucrados en el ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.<sup>1,2</sup> Para su identificación, la concha tiene características,<sup>3,4</sup> útiles para ubicarlos a varios niveles taxonómicos.<sup>5-8</sup>

Hubendick<sup>8</sup> reconoce 35 especies de caracoles dentro de la familia Lymnaeidae, algunas de las cuales han sido identificadas para México como *Lymnaea humilis*, *L. cubensis*, *L. attenuata*, *L. palustris*, *L. columella*, *L. obrussa*, *L. bulimoides* y *L. truncatula*.<sup>9-16</sup> Sin embargo, en México es poco lo que se ha publicado con respecto a la identificación taxonómica de huéspedes intermediarios de *F. hepatica* y la malacofauna asociada con ellos.

Los objetivos del presente estudio fueron: Identificar los moluscos huéspedes y no huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica*; conocer su variación estacional y determinar el porcentaje de infección natural, de los moluscos intermediarios del trematodo, en cinco biotopos del rancho de la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

## Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en el rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo (UAH), localizado en el municipio de Tulancingo, Hidalgo, México.

located in the municipality of Tulancingo, in the State of Hidalgo, Mexico.

## Mollusk collection

For the collection of snails the method described by Manga *et al.*,<sup>17</sup> was used. Five sites or biotopes were chosen and they were observed, walking in circles, during 15 minutes. In each biotope, the following collection sites were established: Places with a large amount of humidity, but where water was not visible; places with stagnant water or slow moving water. These samplings were performed monthly during 19 months. The collection was performed placing the mollusks in plastic bags with water and mud if it was available, and data was taken such as temperature, relative humidity and pH. These samples were transported to the Parasitology Department of the College of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico, and they were processed in the following manner: The snails were placed on trays and classified by morphological groups, and by whether they were dead or alive. After that, they were identified and their shells were measured with a Vernier caliper or with a small ruler under the stereoscopic microscope.

The identification of the snails was done through the dissection of the reproductive apparatus and the shell characteristics, according to the works of Burch and Cruz,<sup>5</sup> Burch<sup>6</sup> and McCraw.<sup>18</sup> The snails were left 24 h in refrigeration, at approximately 4°C and once they were relaxed they were deposited in 70% alcohol using a Petri dish. As dissection instruments the number five watchman's clamps and scalpel were used and the observations were done with the help of a stereoscopic microscope.

## Cercariae emergence

The live snails were placed individually in plastic bags with 80 ml of aerated water so that they would release *Fasciola hepatica* cercariae.<sup>19</sup> The mollusks were subjected immediately to abrupt changes in temperature, placing them in the refrigerator during 5 to 10 minutes and then they were left 24 hours under a 100 watts electric light bulb which was one meter away. Each bag was marked in order to be able to recognize the snails that were liberating cercariae.

The snails that were positive to larval stages of *F. hepatica* were subjected to the method mentioned by Manso *et al.*<sup>20</sup> whereby a 10 cm<sup>2</sup> polyethylene bag with 3 ml of water and a snail in a Petri box is used. After that the mollusk is compressed with the dissection clamp and under the microscope movement and morphology of the larval stages of *F. hepatica* are observed.

Once the monthly samplings were concluded, the collected snails were identified by species groups and

## Colecta de moluscos

Para la colecta de caracoles se siguió el método descrito por Manga *et al.*,<sup>17</sup> en donde se eligieron cinco sitios o biotopos en los cuales se caminó 15 minutos sobre un trayecto circular. En cada biotopo se establecieron los siguientes sitios de colecta: Lugares con gran cantidad de humedad, pero donde no es visible el agua; lugares con agua estancada o de bajo movimiento del agua. Estos muestreos se efectuaron mensualmente durante 19 meses. La colecta se realizó colocando los moluscos en bolsas de plástico con agua y lodo, si lo había, y se tomaron datos como temperatura, humedad relativa y pH. Estas muestras fueron transportadas al Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se trabajaron de la forma siguiente: Los caracoles se colocaron en charolas y se clasificaron por grupos morfológicos además de vivos y muertos. Seguidamente éstos se identificaron y se midieron las conchas con un calibrador (Vernier) o una reglilla bajo el microscopio estereoscópico.

La identificación de los caracoles se llevó a cabo mediante la disección del aparato reproductor y caracteres de la concha, basándose en los trabajos de Burch y Cruz,<sup>5</sup> Burch<sup>6</sup> y McCraw.<sup>18</sup> Los caracoles se dejaron 24 h en refrigeración, aproximadamente a 4°C, y ya relajados se depositaron en alcohol al 70% utilizando una caja de Petri. Como instrumentos de disección se utilizaron pinzas de relojero número cinco, bisturí y las observaciones se realizaron con apoyo de un microscopio estereoscópico.

## Liberación de cercarias

Los caracoles vivos se expusieron a liberar cercarias de *Fasciola hepatica*, colocándose individualmente en bolsitas de plástico con 80 ml de agua aereada.<sup>19</sup> Los moluscos fueron sometidos inmediatamente a cambios bruscos de temperatura, colocándolos en el refrigerador de cinco a diez minutos y, posteriormente, bajo un foco de 100 wats a un metro de distancia durante 24 horas. Se marcó cada bolsa para reconocer los caracoles que estaban liberando cercarias.

A los caracoles que resultaron positivos a estadios larvarios de *F. hepatica* se les aplicó el método mencionado por Manso *et al.*<sup>20</sup> en el cual se utiliza una bolsa de polietileno de 10 cm<sup>2</sup> conteniendo tres mililitros de agua y un caracol en una caja de Petri. A continuación se comprimió el molusco con una pinza de disección y se observó en el microscopio el movimiento y morfología de los estadios larvarios de *F. hepatica*.

Una vez concluidos los muestreos mensuales, se identificaron por grupos las especies de caracoles colectados para cuantificar vivos y muertos, así como obtener porcentajes y totales.

dead and live ones were counted, and percentages and totals were obtained.

In relation to the climatic factors (temperature, relative humidity and pH) these were evaluated by a monthly average obtained in the five biotopes during the 19 sampling months.

## Result analysis

The data of natural infection of the mollusks, intermediate hosts of *F. hepatica* are shown in percentages. In the same manner, the relationship between the number of snails and the temperature, humidity and pH was examined as well as the size of the snails and oviposition according to the time of the year, to determine their sexual maturity. In order to evaluate each of the above parameters a multivariate (ANDEVA) variance analysis was used.<sup>21</sup>

## Mollusk identification

Between march of 1997 and september 1998, a total of 5 490 mollusks were collected from the ranch of the Autonomous University of the State of Hidalgo. In the five biotopes that were studied a total of 1 673 (30.4%) *Fossaria humilis* snails (intermediate host of *F. hepatica*) were found, of these 1 085 were alive (Table 1). In november 1997, the amounts of *F. humilis* collected were larger: 843 (50.3%) while in june of that same year, the amounts of *F. humilis* collected were smaller: 2 (0.11%) (Table 1).

In relationship to the mollusks associated with *F. humilis*, two land species were obtained: *Succinea* sp, 3 083 (55.9%) and *Helix aspersa*, 91 (1.6%) and two fresh water species: *Physa cubensis*, 297 (5.2%) and *Planorbella (Pierosoma) trivolvis* 346 (6.3%). In general, *Succinea* sp was found in a larger percentage and *Helix aspersa* in a smaller amount during the study (Table 1). The maximum amount of live *Succinea* sp (the dominant species in the ranch) found was 320 during the month of september 1997 and in that same date the maximum amount recorded for *Physa cubensis* was.<sup>13</sup> In the case of *P. trivolvis* and *H. aspersa*, six and eight snails were found in february 1998, respectively.

## Seasonal variation of mollusks intermediate hosts of *F. hepatica*

The presence of *F. humilis* was more evident during the months of march to november 1997, their numbers declining sharply in the following months (Table 1). With relation to the recorded environmental factors, there was no statistically significant relationship found. The average maximum temperature per month was observed in july 1997 and the minimum in april 1998, while the higher relative humidity percentage was re-

Con respecto a los factores climáticos (temperatura, humedad relativa y pH), éstos fueron evaluados con base en los promedios mensuales obtenidos de los cinco biotopos y durante los 19 meses muestreados.

## Análisis de los resultados

Los datos sobre infección natural de los moluscos intermediarios de *F. hepatica* se presentan en porcentajes. Asimismo, se examinó si existía relación entre el número de caracoles, con la temperatura, la humedad y el pH, también se hicieron observaciones sobre el tamaño de los caracoles y la oviposición con respecto a la época del año, para determinar su madurez sexual. Para evaluar cada uno de los parámetros mencionados, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) multivariado.<sup>21</sup>

## Identificación de moluscos

Entre marzo de 1997 y septiembre de 1998 se colectó un total de 5 490 moluscos del rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo. De los cinco biotopos estudiados se identificó a *Fossaria humilis* (huésped intermediario de *F. hepatica*), obteniendo un total de 1 673 (30.4%) moluscos, de los cuales 1 085 estaban vivos (Cuadro 1). En noviembre de 1997 se colectó el mayor número de ejemplares de *F. humilis* 843 (50.3%) y en junio del mismo año se colectó el menor número 2 (0.11%) (Cuadro 1).

Con relación a los moluscos asociados con *F. humilis*, se obtuvieron dos especies terrestres: *Succinea* sp, 3 083 (55.9%) y *Helix aspersa*, 91 (1.6%) y dos dulceacuícolas: *Physa cubensis*, 297 (5.2%) y *Planorbella (Pierosoma) trivolvis* 346 (6.3%). De manera general, *Succinea* sp se presentó en mayor porcentaje y *Helix aspersa* en menor número durante el estudio (Cuadro 1). El número máximo de caracoles vivos de *Succinea* sp (la especie dominante en el rancho) fue de 320 en septiembre de 1997 y en la misma fecha, el máximo número también registrado para *Physa cubensis*.<sup>13</sup> En el caso de *P. trivolvis* y *H. aspersa* se encontraron seis y ocho caracoles en febrero de 1998, respectivamente.

## Variación estacional de moluscos huéspedes intermediarios de *F. hepatica*

La presencia de *F. humilis* se manifestó mayormente en los meses de marzo a noviembre de 1997, declinando bruscamente su hallazgo en los siguientes meses (Cuadro 1). Con respecto a los factores ambientales registrados, no se encontró relación estadísticamente significativa. La máxima temperatura promedio por mes se observó en julio de 1997 y la mínima en abril de 1998, mientras que el máximo porcentaje de humedad relativa se registró en septiembre de 1997, y el mínimo en

corded in september 1997 and the minimum in may 1998. The maximum pH was recorded in march 1997 and the minimum in july of the same year (Table 2).

### Snail measurements

During the measurement of the *F. humilis* specimens (1 511), a relationship was found between the oviposi-

mayo de 1998. El máximo pH se registró en marzo de 1997 y el mínimo en julio del mismo año (Cuadro 2).

### Medición de caracoles

En la medición de ejemplares de *F. humilis* (1 511), se encontró una relación de la oviposición con el tamaño de los caracoles durante las cuatro estaciones del año,

**Cuadro 1**  
 NÚMERO DE MOLUSCOS VIVOS Y CONCHAS CON ORGANISMOS MUERTOS COLECTADOS EN EL RANCHO DE LA UAH\*  
 EN EL MUNICIPIO DE TULANCINGO, HIDALGO, MÉXICO  
 NUMBER OF LIVING MOLLUSKS AND SHELLS CONTAINING DEAD ORGANISMS COLLECTED AT RANCH OF THE UAH  
 AT THE MUNICIPALITY OF TULANCINGO, HIDALGO, MÉXICO

Nombre científico Meses Scientific name Months	Succinea sp		Physa cubensis		Planorbella (Pierosoma) trivolvis		Helix aspersa		Fossaria humilis	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
	Succinea sp		Physa cubensis		Planorbella (Pierosoma) trivolvis		Helix aspersa		Fossaria humilis	
	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
Mar-97	25	60	26	4		2			13	12
Abr	196	123							8	10
May	445	200							15	5
Jun	446	215	2		2		6		2	
Jul	35	100	1		4		2		43	18
Ago	125	90	4	2		5			28	22
Sep	480	320	55	13	20		1		50	202
Oct	4	2				3	2		7	185
Nov	22	3	15		3		2		375	468
Dic										
Ene-98	10	15	30	12	18		6		8	3
Feb	5		20	12	34	6	24	8	8	
Mar					73		13		4	1
Abr	68	78	12	2	114	2			19	12
May	4		17	8					3	1
Jun			30	12						
Jul	12		1		3		4			18
Ago					15		7		2	2
Sep			15	4	38	4	12	4	3	126
Promedio	98.78	63.47	12	3.63	17	1.15	4.15	0.63	30.9	57.1
Porcentaje	34	21.9	4	1.2	5.9	0.4	1.4	0.2	10.7	19.7
Total	1 877	1 206	228	69	324	22	79	12	588	1 085
Gran total	3 083		297		346		91		1 673	

\* = Universidad Autónoma de Hidalgo  
 M = muertos  
 V = vivos  
 \* = Universidad Autonoma de Hidalgo  
 D = Dead  
 A = Alive

tion and the size of the snails during the four year seasons, showing a significant difference with the height and diameter of the snails ( $P = 3.59E-12$ ). In september of 1998, the largest snails had a height of 10.5 mm and a diameter of 5.5 mm; and in november 1997 the smallest mollusks showed a height of 4.9 mm and a diameter of 2.9 mm.

In general, the largest *Succinea* sp snails were observed in may 1997 and they had a height of 13.4 mm and a diameter of 8.0 mm; in september, *Physa cubensis* with a height of 13.6 mm and a diameter of 5.6 mm; in november, *Helix aspersa* with a height of 27.5 mm and a diameter of 24.5 mm; the smallest snails *Planorbella*

obteniendo una diferencia significativa relacionada con la altura y diámetro de los caracoles ( $P = 3.59E-12$ ). En septiembre de 1998, los caracoles más grandes tuvieron una altura de 10.5 mm y un diámetro de 5.5 mm; y en noviembre de 1997 los moluscos más pequeños mostraron una altura de 4.9 mm y un diámetro de 2.9 mm.

De manera general, en mayo de 1997 se observaron los caracoles más grandes de *Succinea* sp, los cuales tuvieron una altura de 13.4 mm y un diámetro 8.0 mm, en septiembre de *Physa cubensis* con una altura 13.6 mm y un diámetro 5.6 mm, en noviembre de *Helix aspersa* con altura de 27.5 mm y un diámetro de 24.5 mm, los caracoles más pequeños de *Planorbella*

**Cuadro 2**  
FACTORES AMBIENTALES PROMEDIO EN LOS CINCO BIOTOPOS ESTUDIADOS EN EL RANCHO DE LA UAH<sup>1</sup>  
(MARZO 1997 A SEPTIEMBRE DE 1998)  
AVERAGE ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE FIVE BIOTOPES STUDIED AT THE RANCH OF THE UAH\* (MARCH 1997 TO  
SEPTEMBER 1998)

Meses Months	Temp* Temp*	HR %** RH %**	pH*** pH***	Vegetación Vegetation	Época Season
Mar-97	25.8	38	8.6	Poca	Sequía
Abr	23	36.7	8.5	Abundante	Sequía
May	25.5	36	6.6	Poca	Lluvia
Jun	25.5	43	8.3	Poca	Lluvia
Jul	40.7	36.4	4.7	Abundante	Lluvia
Ago	32.7	51	6	Poca	Lluvia
Sep	27.9	51.5	6.8	Poca	Lluvia
Oct	33.5	42	8.5	Poca	Lluvia
Nov	33	36	7.6	Abundante	Lluvia
Dic	31.5	40	5.7	Poca	Sequía
Ene-98	23	28	5	Muerta	Sequía
Feb	24.3	22	6.3	Muerta	Sequía
Mar	28	18.9	6	Muerta	Sequía
Abr	22	27	5.3	Muerta	Sequía
May	23	28	5	Muerta	Sequía
Jun	23.5	26	5.6	Muerta	Sequía
Jul	24	29	6.3	Muerta	Sequía
Ago	24.6	29	6.4	Muerta	Lluvia
Sep	29	55	7	Abundante	Lluvia

<sup>1</sup> = Universidad Autónoma de Hidalgo

\* Temperatura promedio mensual

\*\* Humedad relativa promedio mensual

\*\*\* pH promedio mensual

<sup>1</sup> = Universidad Autonoma de Hidalgo

\* Temperature monthly average

\*\* Monthly average of relative humidity

\*\*\* ph montly average

(*Pierosoma*) *trivolvis* were observed in march 1998, with a height of 7 mm and a diameter of 6 mm (Table 3).

### Seasonal variation of the non-host mollusks

The presence of *Succinea* sp was manifested during several months, reaching a maximum level (800) in september, with a drastic reduction in the findings of both dead and live snails during the following months (Table 1).

(*Pierosoma*) *trivolvis* se observaron en marzo de 1998, obteniendo una altura de 7 mm y un diámetro de 6 mm (Cuadro 3).

### Variación estacional de moluscos no huéspedes

La presencia de *Succinea* sp se manifestó durante varios meses, alcanzando el máximo (800) en septiembre, y disminuyendo bruscamente el hallazgo de vivos y muertos en los siguientes meses (Cuadro 1).

**Cuadro 3**  
 MEDICIÓN DE MOLUSCOS COLECTADOS CADA MES EN EL RANCHO DE LA UAH\*  
 EN TULANCINGO, HIDALGO, MÉXICO  
 MONTHLY MEASUREMENT OF MOLLUSKS COLLECTED IN THE RANCH OF THE UAH\*  
 AT TULANCINGO, HIDALGO, MÉXICO

Meses	<i>Succinea</i> sp	<i>Physa</i> cubensis	<i>Planorbella</i> ( <i>Pierosoma</i> ) <i>trivolvis</i>	<i>Helix aspersa</i>	<i>F. humilis</i>
Months	<i>Succinea</i> sp	<i>Physa</i> cubensis	<i>Planorbella</i> ( <i>Pierosoma</i> ) <i>trivolvis</i>	<i>Helix aspersa</i>	<i>F. humilis</i>
Mar-97	85** (9.2-5.3***)	30 (13.5-6.9)	2 (12.0-6.6)		19 (6.9-4.2)
Abr	319 (9.2-5.8)				18 (6.5-3.7)
May	472 (13.4-8.0)				20 (8.5-5.4)
Jun	600 (11.1-6.0)	2 (14.8-9.2)	2 (12.3-9.3)	6 (25-22.4)	2 (5.9-3.2)
Jul	114 (10.6-5.6)	1 (7.9-5.0)	4 (13-7)	2 (11-9)	19 (7.2-4.0)
Ago	220 (10.8-6.7)	6 (12.8-3.9)	5 (10.7-5.5)		49 (10.5-6)
Sep	789 (9.4-6.26)	59 (13.6-5.6)	20 (11.8-9)	1 (27-25)	252 (5-3)
Oct	6 (7.0-4.0)		3 (13.3-7.3)	2 (8.5-6.5)	192 (7-4)
Nov	25 (11.5-7.6)	15 (13.3-7.2)	3 (9-6)	2 (27.5-24.5)	751 (4.9-2.9)
Dic					
Ene-98	25 (5.4-4.9)	39 (11.2-7.2)	18 (10.8-6.0)	6 (23-18.7)	11 (7.6-4.4)
Feb	5 (7.1-4.9)	31 (10.9-6.7)	40 (11.1-8.8)	32 (21-18.8)	8 (8-4.5)
Mar			73 (7-6)	13 (15.5-13.6)	5 (6.16-4.0)
Abr	141 (13.4-7.3)	14 (9.4-4.9)	116 (9.2-7.8)		20 (6.8-4)
May	4 (11.7-7)	25 (10.4-5.7)			4 (8.3-4.3)
Jun		40 (9.8-5.7)			
Jul	10 (8.4-6.2)	1 (20-10.6)	3 (10.6-5.7)	4 (12-10)	18 (5.7-3)
Ago			10 (9.9-5.4)	7 (10.8-8.5)	4 (6-4)
Sep		19 (11-3.9)	41 (9.5-7.9)	16 (7.5-5.7)	119 (10.5-5.50)
Total	2815	282	340	91	1 511

\* = Universidad Autónoma de Hidalgo  
 \*\* = Número total de ejemplares medidos/mes  
 \*\*\* = Altura y diámetro promedio en mm  
 \* = Universidad Autonoma de Hidalgo  
 \*\* = Total number of snails measured/month  
 \*\*\* = Height and average diameter in mm

The snails that were observed in smaller amounts were the two fresh water species mollusks [*Physa cubensis* y *Planorbella (Pierosoma) trivolvis*] and one land snail *Helix aspersa* (Table 1).

### Infection percentage of the mollusks *Fossaria humilis* intermediate hosts of *F. hepatica*

In relation to the number of snails that were brought in from the field and were naturally infected with evolving phases of *Fasciola hepatica*, sometimes, during the collection in august and november, they were found positive with sporocysts, rediae and cercariae, with the following results: In august 1997, 50 snails were collected from the field, 11 were positive to evolving phases of *F. hepatica* (22%); five were positive to rediae (10%) and six to cercariae (12%). In november of the same year 843 mollusks were collected, and 27 were found positive to evolving phases of *F. hepatica* (3.2%), of these seven were positive to

Los caracoles observados en menores cantidades fueron dos especies de moluscos dulceacuicolas [*Physa cubensis* y *Planorbella (Pierosoma) trivolvis*] y una de terrestre *Helix aspersa* (Cuadro 1).

### Porcentaje de infección de los moluscos *Fossaria humilis* intermediarios de *F. hepatica*

Con respecto al número de caracoles traídos del campo que resultaron naturalmente infectados con fases evolutivas de *Fasciola hepatica*, cabe aclarar que sólo en dos ocasiones en colectas llevadas a cabo en agosto y noviembre se les encontró positivos a esporocistes, redias y cercarias, cuyo resultado son los siguientes: En agosto de 1997 se colectaron 50 caracoles traídos del campo, 11 fueron positivos a fases evolutivas de *F. hepatica* (22%), de los cuales cinco caracoles (10%) fueron positivos a redias y seis caracoles (12%) a cercarias. En noviembre del mismo año se colectaron 843 moluscos, encontrándose 27 positivos a fases evolutivas de *F.*

**Cuadro 4**

NÚMERO TOTAL DE CARACOLES *Fossaria humilis* COLECTADOS, NÚMERO DE CARACOLES POSITIVOS A LAS DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE *Fasciola hepatica* Y SU PORCENTAJE  
TOTAL NUMBER OF *Fossaria humilis* SNAILS COLLECTED, NUMBER AND PERCENTAGE OF POSITIVE SNAILS TO A DIFFERENT EVOLUTIVE STAGES OF *Fasciola hepatica*

Mes y año Months and Year	Número de ejemplares colectados Number of snails collected	Número de ejemplares positivos a esporocitos y (%) Number of snails positive to sporocysts and (%)	Número de ejemplares positivos a redias y (%) Number of snails positive to redias and (%)	Número de ejemplares positivos a cercaria y (%) Number of snails positive to cercariae and (%)	Total % Total %
Marzo-97	25	0	0	0	
Abr	18	0	0	0	
May	20	0	0	0	
Jun	2	0	0	0	
Jul	61	0	0	0	
Ago	50	0	5 (10)	6 (12)	11 (22)
Sept	252	0	0	0	
Oct	192	0	0	0	
Nov	843	7 (0.83)	12 (1.42)	8 (0.95)	27 (3.2)
Dic	0	0	0	0	
Ene-98	11	0	0	0	
Feb	8	0	0	0	
Marzo	5	0	0	0	
Abr	31	0	0	0	
May	4	0	0	0	
Jun	0	0	0	0	
Jul	18	0	0	0	
Ago	4	0	0	0	
Sept	129	0	0	0	
Total	1 673	7 (0.42)	17 (1.02)	14 (0.83)	38 (2.27)



sporocysts (0.83%), 12 to rediae (1.42%) and eight to cercariae (0.95%) (Table 4).

When the four species of mollusks that were not intermediate hosts of *F. hepatica* were brought from the field and were subjected to the cercariae liberation test, no larval phases of *F. hepatica* were found.

The presence of *Lymnaea cubensis*, *L. humilis* y *L. bulimoides*<sup>15</sup> in the municipality of Tulancingo, Hidalgo, is well known. Nevertheless, in the ranch of the University of the State of Hidalgo (UAH) and according to the nomenclature by Burch and Cruz,<sup>5</sup> Burch<sup>6</sup> only *Fossaria humilis*, was found as intermediate host of *Fasciola hepatica*.

The associated fauna (non intermediate hosts of *F. hepatica*) found was four genera and species of mollusks *Succinea* sp. *Physa cubensis*, *Planorbella* (*Pierosoma*) *trivolis* y *Helix aspersa*. These results are in agreement with the works by Contreras<sup>16</sup> and Rangel<sup>22</sup> in relation to the fact that the *Succinea* species mollusks are associated to a *F. hepatica* transmitting limneid, and also a variety of fresh water and land mollusks.

The ranch of the Autonomous University of Hidalgo is located in a region of highly seasonal template climate, it is cold in the winter months, with rains during summer. The mollusks in these highly seasonal environments hibernate during the dry spell. *L. humilis* was found active in the UAH ranch during the month of November (dry season) of 1997, and this is explained by the fact that irrigation was performed during this season and therefore the mollusks responded to the water availability. The greater density of *L. humilis* was observed between September and November (1997). The data partially agrees with what was reported by Rangel<sup>23</sup> who recorded the greater densities in November and February, possibly due to the climatic differences of both regions.

In relation to the snail populations that were found associated with *Fossaria humilis*, their presence probably promotes the establishment of competition phenomena that may have direct effect on their densities due to the fact that they occupy the same microhabitat,<sup>16</sup> or perhaps they act as predators, creating a natural biological control, for example, in reducing the *F. humilis* populations and therefore reducing the infection by *Fasciola hepática*.<sup>22</sup> De Puga *et al.*<sup>24</sup> in a study project developed in Cuba mentioned the biological control of *Fossaria cubensis*, intermediate host of *Fasciola hepatica*, in two sites with different control agents, *Helisoma duryi* y *Tarebia granifera*, that apparently have biological and ecological advantages over the majority of the mollusks. They observed that there was an effective control with reduction of the density of *Fossaria cubensis* intermediate host of *Fasciola hepatica* once those snails were introduced.

*hepatica* (3.2%), de ellos siete fueron positivos a esporoquistes (0.83%), 12 a redias (1.42%) y ocho a cercarias (0.95%) (Cuadro 4).

En relación con los moluscos no huéspedes intermediarios de *F. hepatica* traídos del campo y sometidos a la prueba de liberación de cercarias, no se observaron fases larvianas de *F. hepatica* en ninguna de las cuatro especies colectadas.

En el municipio de Tulancingo, Hidalgo, se tiene conocimiento de la presencia de *Lymnaea cubensis*, *L. humilis* y *L. bulimoides*.<sup>15</sup> Sin embargo, en el rancho de la Universidad de Hidalgo (UAH) y de acuerdo a la nomenclatura de Burch y Cruz,<sup>5</sup> Burch<sup>6</sup> se encontró únicamente a *Fossaria humilis*, como huésped intermediario de *Fasciola hepatica*.

Con respecto a la fauna asociada (huéspedes no intermediarios de *F. hepatica*) se encontraron cuatro géneros y especies de moluscos *Succinea* sp, *Physa cubensis*, *Planorbella* (*Pierosoma*) *trivolis* y *Helix aspersa*. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Contreras<sup>16</sup> y Rangel<sup>22</sup> en lo referente a que una especie de *Succinea* está asociada con el limneido transmisor de *F. hepatica*, además de una variedad de moluscos dulceacuícolas y terrestres.

El rancho de la Universidad Autónoma de Hidalgo se localiza en una región de clima altamente estacional templado, frío en los meses invernales y con lluvias en verano. Los moluscos en esos ambientes altamente estacionales hibernan en la época de sequía. *L. humilis* se encontró activo en el rancho de la UAH durante el mes de noviembre (época de sequía) de 1997, y esto se explica en virtud del regadío que se realizó en esa temporada y por ende los moluscos respondieron a la disponibilidad de agua. La mayor densidad de *F. humilis* se observó entre septiembre y noviembre (1997), datos que concuerdan parcialmente con los de Rangel,<sup>23</sup> quien registró las mayores densidades entre noviembre y febrero, esto posiblemente debido a las diferencias climáticas de ambas regiones.

Con respecto a las poblaciones de caracoles encontrados asociados con *Fossaria humilis*, su presencia probablemente provoca que se establezcan fenómenos de competencia, que pueden tener efectos directos sobre sus densidades debido a que se encuentran estas especies ocupando un mismo microhábitat,<sup>16</sup> o bien actuar como depredadores, ejerciendo un control biológico natural; por ejemplo, para reducir las poblaciones de *F. humilis* y por lo consiguiente la reducción de la infección de *Fasciola hepatica*.<sup>22</sup> Al respecto, De Puga *et al.*<sup>24</sup> en Cuba en un trabajo de control biológico de *Fossaria cubensis*, huésped intermediario de *Fasciola hepatica*, en dos localidades con diferentes agentes de control, *Helisoma duryi* y *Tarebia granifera*, mencionan que poseen ventajas biológicas y ecológicas sobre la mayoría de los moluscos. Observó un control efectivo al disminuir las densidades de *Fossaria*

Due to the fact that the UAH ranch is located in a region of marked seasonality with dry spells and rain<sup>25</sup> the distribution of the mollusks during the two main seasons of the year was not as expected, particularly in relation to the species *Succinea* sp (an amphibious snail) and *H. aspersa* (land snail), from which one would expect estival and hibernation behavior during the dry and low temperature seasons.<sup>6</sup> Nevertheless, they sporadically show up during the dry season and occasionally in large numbers, situation that could be attributed to the irrigation that is performed in this ranch during the dry season.

The height of the *Fossaria humilis* shell was measured and the greatest heights were observed during May and August of 1997. During those months the snails were ovipositing, to produce a small number of egg capsules. The largest snails were found in February, May and September of 1990 possibly because during this time of year there was a greater availability of food. The young snails obtained during July had a height of 5.7 mm and a diameter of 3 mm.

In relation to the average monthly temperature, it varied between 23°C and 33°C; nevertheless during the month of July the maximum recorded temperatures were 40.7°C (Table 2). Rangel<sup>23</sup> mentions that high temperatures cause a reduction of humidity, facilitating the dehydration of the snails and the desiccation of the soil, thus inhibiting the development of green algae, that are the main food source for these snails. In this study, the dry period caused a reduction in humidity (Table 2), with a relative low humidity (18.9% to 55%), and this probably influenced the finding of a lower percentage of snails. As far as recorded pH levels are concerned (4.7 to 8.6) during the 19 sampling months, there was an agreement with that which was found during a study performed in 1986 for *L. bulimoides*, *L. cubensis* and *L. humilis* of Tulancingo, Hidalgo, Mexico, where the average pH that was obtained was 6.8.<sup>26</sup>

It is important that we mention that even though the Tulancingo, Hidalgo, area is identified as a highly endemic zone for fascioliasis, in this study the percentage of infected snails that released cercariae of *F. hepatica* was low. In this respect, in 1997, this particular area of Hidalgo had a strong draught during several months and after that in the same year there was a great flood, altering the seasonality behavior pattern of this parasite, which could be the reason for the results that were obtained. In relationship to this, Manga *et al.*<sup>17</sup> found in the province of Leon, Spain, a prevalence of infection between 11% and 41% in 5 486 snails of *Lymnaea truncatula* examined in two years. On the other hand, Rangel<sup>23</sup> observed in several ranches of the state of Tabasco, *Fossaria viatrix* snails infected with *F. hepatica* with infections of 0.29% a

*cubensis* huésped intermediario de *Fasciola hepatica* a partir de la introducción de los caracoles mencionados.

En virtud de que el rancho de la UAH está localizado en una región con estacionalidad marcada, de sequía y lluvia,<sup>25</sup> la distribución de los moluscos durante las dos principales épocas del año mostró no ser normal, particularmente en las especies *Succinea* sp y *H. aspersa*, caracol anfibio el primero y terrestre el segundo, por lo que se esperaba que los moluscos estibarán e hibernarán en la época de sequía y bajas temperaturas.<sup>6</sup> No obstante, éstos aparecen esporádicamente en la época de sequía y ocasionalmente en grandes números, situación que puede atribuirse al regadío que se lleva a cabo en el rancho precisamente en la época de sequía.

*Fossaria humilis* se midió de acuerdo a la altura de concha, los mayores tamaños se observaron en 1997, particularmente en mayo y agosto. En estos meses los caracoles estuvieron ovipositando, para producir un número pequeño de cápsulas de huevos. En febrero, mayo y septiembre de 1998 se encontraron los caracoles de mayor talla, posiblemente debido a que en esta época del año la disponibilidad de alimento fue mayor. Los caracoles jóvenes obtenidos en julio tuvieron una altura de 5.7 mm y un diámetro de 3 mm.

Con respecto a la temperatura promedio mensual, ésta osciló entre 23°C y 33°C; sin embargo, se registraron temperaturas máximas de 40.7°C en el mes de julio (Cuadro 2). Rangel<sup>23</sup> menciona que altas temperaturas ocasionan una disminución en la humedad y provocan la deshidratación de caracoles y desecación del suelo, evitando de esta manera el desarrollo de algas verdes, que son el alimento primordial de estos caracoles. En este estudio, la sequía ocasionó una disminución en la humedad (Cuadro 2), con humedad relativa muy baja (18.9% a 55%), lo que posiblemente influyó en el hallazgo de un menor porcentaje de caracoles. Con respecto a las fluctuaciones del pH registrados (4.7 a 8.6) durante los 19 meses de muestreo, se observó concordancia con lo mencionado para *L. bulimoides*, *L. cubensis* y *L. humilis* de Tulancingo, Hidalgo, México, en donde el pH promedio obtenido en un estudio en 1986 fue de 6.8.<sup>26</sup>

Importante de mencionar es que aun cuando el área de Tulancingo, Hidalgo, es identificada como altamente endémica de fasciolosis, en este estudio el porcentaje de infección de caracoles liberadores de cercarias de *F. hepatica* fue bajo. A este respecto, en 1997 esta área particular de Hidalgo, sufrió una fuerte sequía durante varios meses y posteriormente en el mismo año sobrevino una gran inundación, alterando el patrón de estacionalidad de esta parasitosis, posible razón de los resultados obtenidos. A este respecto Manga *et al.*<sup>17</sup> determinaron en la provincia de León, España, entre 11% y 41% de prevalencia de infección en 5 486 caracoles *Lymnaea truncatula* examinados en dos años. Por otro lado, Rangel<sup>23</sup> observó en varios ranchos del esta-

1.51%, which would indicate that, due to several different factors, the degree of infection of the mollusks may vary year to year.

*Fasciola hepatica* can develop in an ample range of vertebrate hosts such as sheep, goats, bovines, swine, equines, rabbits and in wild animals such as deer, hares and occasionally man. They act as definitive hosts contaminating their environment with eggs in the faeces dropped in wet media such as puddles, grasslands that get flooded, slow moving water canals, which is necessary for the continuance of their development (the production of eggs of *F. hepatica* has been estimated at 20 000 to 50 000 per day during up to 11 years in sheep). During the rainy season, the hatching of the miracidia from the eggs is enhanced, as well as, when they are deposited in water. For their continuous development, the presence of the intermediate host such as the amphibious snail *F. humilis* is necessary for the development of the evolving phases (sporocysts, rediae and cercariae). The amount of cercariae originating from one only miracidium may reach 600, that actively swim in order to become metacercariae and encyst themselves in the surrounding plants where they are. The infections are achieved by the ingestion of food or water contaminated with metacercariae.<sup>27</sup>

In this ranch, the environmental climatic conditions (rainfall) together with the irrigation play an important role in the increase or reduction of the snails *F. humilis* and therefore, in the infection and transmission of fascioliasis to the definitive hosts.

Therefore, it is concluded that in the premises of the university ranch in Tulancingo, Hidalgo, *Fossaria humilis* was identified as the only intermediate host of *Fasciola hepatica*, associated with other four snail genera and species, and it was observed that the months of higher mollusk infection were september, october and november of 1997.

do de Tabasco, a caracoles *Fossaria viatrix* infectados con *F. hepatica* con infecciones de 0.29% a 1.51%, lo cual indica que debido a diversos factores, el grado de infección de los moluscos puede variar año con año.

*Fasciola hepatica* se desarrolla en una amplia variedad de huéspedes vertebrados, tales como ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos y conejos, además de algunos animales silvestres como venados, liebres y ocasionalmente el hombre. Actúan como huéspedes definitivos contaminando en el medio exterior con huevos en heces en un medio hídrico para continuar su desarrollo (la producción de huevos de *F. hepatica* se ha calculado de 20 000 a 50 000 por día y hasta 11 años en ovinos), como en charcos, potreros inundables, canales de curso lento. En la época de lluvias la eclosión de los huevos a miracidio se ve favorecida o bien cuando las heces han sido depositadas en agua, para su desarrollo continuo es necesario un huésped intermediario como el caracol anfibio *F. humilis*, donde se desarrollan las fases evolutivas (esporoquiste, redias y cercarias). La cantidad de cercarias originadas de un solo miracidio puede llegar a 600, las cuales nadan activamente para enquistarse a las plantas aledañas y se convierten en metacercarias. La infección se realiza por medio de la ingestión de alimentos o agua contaminados con metacercarias.<sup>27</sup>

En este rancho las condiciones climáticas (precipitación pluvial), además del regadío, juegan un papel preponderante en el aumento o disminución de los caracoles *F. humilis* y, por consiguiente, en la infección y transmisión de la fasciolosis a los huéspedes definitivos.

Se concluye que en el predio del rancho universitario de Tulancingo, Hidalgo, se identificó a *Fossaria humilis* como único huésped intermediario de *Fasciola hepatica*, asociado con otros cuatro géneros y especies de caracoles, observando que los meses de mayor infección de moluscos fueron septiembre, octubre y noviembre de 1997.

## References

1. Booloottian RA. Fundamentos de zoología. México (DF): Limusa, 1985.
2. Yong CM, De Puga PG. Estudio de la morfología externa e interna de los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*. Rev Cub Med Trop 1991;1:13-16.
3. Boray JCT. The potential impact of exotic *Limnaea* spp of fasciolosis in Australia. Vet Parasitol 1978;4:217-224.
4. Yong CM, Perera de Puga G, López FRJ. Identificación conquiología de moluscos hospederos de *Fasciola hepatica* en Cuba. Rev Cub Med Trop 1991;3/43:202-203.
5. Burch JB, Cruz RA. Clave taxonómica para la identificación de géneros de gasterópodos de agua dulce en México. Clave genérica para la identificación de gasterópodos de agua dulce en México. México (DF): Instituto de Biología; Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
6. Burch JB. How to know. The eastern land snails. Dubuque (Io): Brown Company Publishers, 1962.
7. Malek EA. Snail transmitted parasitic diseases. Boca Raton (FL): CRC Press, 1980.
8. Hubendick B. Recent Lymnaeidae. Their variation morphology taxonomy. Nomenclature and distribution. Kungl Svenska Akad Handl 1951;3:126-133.
9. Mazzotti L. *Lymnaea humilis* (Say) huésped intermediario de *Fasciola hepatica*. Rev Inst Salud Enf Trop 1956;16:21-23.
10. Landeros MA, Ibarra V, Escudero CJL, Milián SF. Determinación de algunos hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en la cuenca lechera de Tulancingo, Hidalgo. Téc Pecú Méx 1981;40:47-51.
11. Castro LT, Cruz LA. Gasterópodos pulmonados dulceacuícolas (identificación) e importancia en el ciclo biológico de *Fasciola hepatica* en el estado de Puebla. 2ª Reunión Anual de Parasitología Veterinaria; 2 y 3 abril 1981; Villahermosa (Tabasco). México (DF): Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A.C., 1981:13-14.
12. Castro LT, Mata RE, González OA, García V. Estudio integrado de fasciolosis bovina en el estado de Durango. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México; noviembre y diciembre 1983; México (DF). México (DF): Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Universidad Nacional Autónoma de México, 1983:254-257.
13. Castro LT. Huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica* y tremátodos paramfistomidos en México. Curso Internacional de Enfermedades Helmínticas de Importancia Sanitaria y Económica; 20-22 agosto 1997; México (DF). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1997:53-58.
14. Santos VC. Datos preliminares sobre la prevalencia de *Fasciola hepatica* en dos especies de caracoles de Atlangatepec, Tlaxcala. V Reunión Anual de Parasitología Veterinaria, 23-25 mayo 1984; Toluca (Edo. de México). México (DF): Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A.C., 1984:89-90.
15. Vera MRY. Evaluación de diferentes dietas alimenticias para cultivo en condiciones de laboratorio de *Lymnaea bulimoides*, *L. cubensis* y *L. humilis* (tesis de licenciatura). México (DF) México: Escuela Nacional de Estudios Profesionales de Iztacala. UNAM, 1985.
16. Contreras AA. Caracoles dulceacuícolas (*Mollusca: Gastropoda*) de la subcuenca San Juan, Tributario del Río Bravo, Noreste de México (tesis de licenciatura). Monterrey (NL): Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, 1991.
17. Manga GY, Gonzalez LC, Otero CB. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Parma Basin, León, NW Spain. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). J Parasitol 1991;88:15-27.
18. McCraw BC. Studies on the anatomy of *Lymnaea humilis* Say. Can J Zool 1995;35:751-767.
19. Endeje MS. Evaluación de diversos parámetros en la relación parásito (*Fasciola hepatica*) hospederos intermediarios (*Lymnaea columella*) proveniente de dos localidades (tesis licenciatura). México (DF) México: Facultad de Ciencias. UNAM, 1986.
20. Manso OE, Monteagudo MA, Pérez SH, Alberto BE. Obtención de metacercarias de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea cubensis* y la relación parásito-hospedero en ratas Wistar y ratones Balb/c. Vet Méx 1999;30:109-115.
21. Johnson AR, Wichon WD. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. Englewood Cliff (NJ): Prentice Hall, 1998.
22. Rangel RJL. Estudio poblacional de la fasciolosis en el estado de Tabasco (tesis doctoral). México (DF) México: Facultad de Ciencias. UNAM, 1995.
23. Rangel RJL. Seasonal variation in *Fossaria viatrix* in the municipality of Teapa, Tabasco, México. Malacol Rev 1999;28:71-79.
24. De Puga PG, Cong YM, Lopez FJR. Control biológico de *Fossaria cubensis*, hospedero intermediario de *Fasciola hepatica*, en 2 localidades con diferentes agentes de control. Rev Cub Med Trop 1991;43:17-20.
25. García ME. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª ed. México (DF): Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 1981.
26. Escudero CJL, Flores CR. Hospederos intermediarios. En: Fasciolosis. Volumen conmemorativo del centenario del descubrimiento del ciclo de *Fasciola hepatica*. Thomas y Leuckart 1983. México. México (DF): Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 1986:55-90.
27. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México (DF): Limusa, 1986.