

Influencia de la edad de los veronicélidos en la infección con *Angiostrongylus costaricensis*

Marta E. Conejo y Pedro Morera

Servicio de Patología, Hospital San Juan de Dios, y Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica

(Rec. 22-VII-1988. Acep. 30-VIII-1988)

Abstract: In Costa Rica, Veronicellid slugs are the most important intermediate hosts for *Angiostrongylus costaricensis*. Apparently, these molluscs develop a resistant mechanism after being exposed to the infection. In naturally infected slugs, the higher infection rates were found in large slugs, but they usually bear few larvae. Large number of larvae were found in medium sized molluscs. Experimental infection in laboratory breed slugs produced an amebocytic reaction around developing larvae; later, the formation of a fibrotic capsule is observed. When there is a second infection, cell reaction is stronger and the larvae show degenerative signs. This cell-mediated resistant mechanism seems to explain why the biggest molluscs, although more probably exposed to infection, bear fewer larvae.

Angiostrongylus costaricensis Morera y Céspedes, 1971a (Nematoda: Angiostrongylidae) [= *Morerastrongylus costaricensis* (Chabaud 1973)], es el agente etiológico de la angiostrongiliasis abdominal (Morera y Céspedes 1971b). Esta parasitosis que afecta principalmente a los niños, se observa con creciente frecuencia en los hospitales y centros de salud de Costa Rica. Además, la enfermedad se ha encontrado desde México hasta el norte de Argentina (Morera, 1987). En algunos países donde no se han encontrado casos humanos, se ha podido demostrar la presencia del parásito en sus huéspedes naturales y otros animales (Tesh *et al.* 1973, Uberlaker y Hall 1979; Malek 1981; Sly *et al.* 1982; Morera *et al.* 1983).

Los roedores son el principal huésped definitivo (Morera 1970, 1973), donde los nemátodos adultos viven en las arterias mesentéricas. Los huevecillos son arrastrados hacia la pared intestinal, donde embrionan y se forma la larva de primer estadio (L_1); posteriormente, éstas pasan a la luz intestinal y llegan al suelo con las heces del roedor. El huésped intermediario, constituido por moluscos, se infecta al ingerir la

materia fecal de la rata. Después de dos mudas, las L_1 se transforman en L_3 , la forma infectante para el mamífero. Los estudios hechos en Costa Rica demuestran que las babosas de la familia Veronicellidae constituyen el huésped intermediario más importante (Morera 1985). Estos moluscos se han encontrado infectados en sitios desde el nivel del mar (Parrita), hasta más de 2.000 m de altura (Moravia de Chirripó). La prevalencia de la infección varía entre 28 y 75%, habiéndose obtenido un promedio de 50% en un estudio realizado en 6.025 babosas provenientes de 20 comunidades de Costa Rica (Morera 1985).

Hay mucha variación en el número de larvas en cada molusco. Sería de esperar que las babosas de mayor peso y por lo tanto de mayor edad, tuvieran más larvas por haber tenido más oportunidades de ingerir heces de ratas infectadas. Sin embargo, se han observado babosas de poco peso con muchas larvas (varios miles) y babosas muy grandes con pocas. Este fenómeno podría deberse a un mecanismo de defensa desarrollado como consecuencia de la infección.

El presente trabajo se propuso establecer si existe asociación entre la intensidad de la infección y el peso de los moluscos infectados naturalmente con *A. costaricensis*. También se discute la posibilidad del desarrollo de un mecanismo de resistencia que explique este fenómeno.

MATERIAL Y METODOS

En un estudio previo se estableció que en la zona de Bijagua de Upala (Costa Rica) las babosas son muy abundantes durante casi todo el año. Esta es una zona de bosque húmedo premontano transición a basal, dedicada principalmente a la ganadería, y también a la siembra de frijoles (*Phaseolus vulgaris*), planta por la que tienen especial atracción estos moluscos (Coto 1983). El material se colectó después de las 21:30 en un sembradío donde los restos de las plantas de frijol se habían acumulado en gruesas capas, que sirven de refugio a los moluscos durante el día. Se recogieron todos los ejemplares observados sobre tierra, paja u otros vegetales. Se hizo un total de cuatro visitas a la zona de estudio, durante los meses de marzo, junio, agosto y setiembre; en cada colecta participaron dos personas y se hicieron durante dos noches seguidas, tres horas cada noche. Los moluscos se transportaron al laboratorio en baldes plásticos con vegetación. Debido a que se ha demostrado que las larvas salen con la secreción mucosa de los moluscos, éstos se mantuvieron un máximo de tres semanas en el terrario, alimentados con lechuga. Se limpió y pesó cada individuo antes de extraer la masa visceral, que no contiene larvas. Los tejidos fibro-musculares del pie y del manto se licuaron con 100 ml de jugo gástrico artificial. Después de 90 minutos a máxima velocidad, el material se pasó a un Erlenmeyer (20 ml) tapado, con parafilm® y se colocó en estufa a 37°C durante 3 horas. Se usó un aparato de Baermann (Wallace & Rosen 1969) y se sedimentó toda la noche. El contenido del fondo del embudo se pasó a cajas de Petri de 5 cm de diámetro y se examinó con microscopio estereoscópico (24X) y se contaron todas las larvas presentes. Al azar, se tomaron grupos de larvas de babosas infectadas y se inocularon en ratas (*Sigmodon hispidus*) para identificar el adulto.

Dos grupos de 15 babosas adultas nacidas en el laboratorio se alimentaron durante cuatro días con pequeños trozos de lechuga cubiertos con una capa de materia fecal de ratas infectadas. Al segundo grupo, veinte días después de la última

dosis se le repitió la operación por nueve días. Esto último se hizo también con moluscos no infectados. Dos babosas de cada grupo se fijaron en formalina al 10% a los 5, 12 y 54 días después de la última infección. Tres babosas sanas se prepararon por el mismo procedimiento, como control. Los tejidos fueron incluidos en parafina. Se cortó a seis micras y se tiñó con hematoxilina-eosina, PAS e impregnación argéntica de Laidlaw.

RESULTADOS

Se examinaron 856 individuos, que pesaron $\bar{x} \pm 1.87 \pm DS. = 1.04$ g.

Se encontraron larvas infectantes (L₃) de *A. costaricensis* en 593 babosas (69.3%); de éstas, 269 (45.4%) tenían entre 1 y 10 larvas (grupo 1); 124 (20.9%) entre 11 y 50 (grupo 2); 79 (13.3%) entre 51 y 100 (grupo 3) y 121 (20.4%) más de 100 larvas (grupo 4).

El cuadro 1 muestra la relación entre el grado de infección y el peso de las babosas. La agrupación por peso se hizo con base en el valor de la media aritmética (1,87). Así, en la categoría II están los moluscos cuyo peso varió entre 1,4 y 2,4 g. es decir, 1,87 más/menos 0,52 (DS/50). La categoría III constituye las babosas que pesaron entre el valor del límite máximo de las de la categoría II más el valor de la DS. Las categorías I y IV están formadas por las babosas cuyo peso está por debajo y por encima de las categorías anteriores, respectivamente.

En el cuadro 2 se agruparon las babosas que tenían menos de 50 L₃ (grupo A: grupos 1 y 2 del cuadro 1) y las que tenían más de 50 L₃ (grupo B: grupos 3 y 4 del cuadro 1).

En la figura 1 se puede observar la relación entre los porcentajes de babosas correspondientes a los grupos A y B por categorías de peso. También se puede observar los porcentajes del total de babosas y de aquellas infectadas, distribuidas por categoría de peso.

El desarrollo de las formas larvales de *A. costaricensis* se realiza en los tejidos del tegumento del molusco y muy excepcionalmente en las vísceras. En el grupo control se observa el tegumento, constituido por un tejido fibromuscular tapizado en la parte externa por un epitelio cilíndrico, relativamente bajo. En el epitelio del pie se observan gran cantidad de células caliciformes que se colorean fuertemente con el PAS. Hacia la parte interna, el tegumento rodea la cavidad celomática; en esta zona la dis-

CUADRO 1

Distribución de las babosas por categorías de peso según la cantidad de larvas

Grado de Infección	Categorías de peso en gramos				Totales
	I 0,4 - 1,3	II 1,4 - 2,4	III 2,5 - 3,5	IV 3,6 - 6,0	
Negativos	131 (49,8)	77 (29,3)	45 (17,1)	10 (3,8)	263 (30,7)
Grupo 1	86 (32,0)	79 (29,4)	71 (26,4)	33 (12,3)	269 (45,4)
Grupo 2	48 (38,7)	38 (30,6)	25 (20,2)	13 (10,5)	124 (20,9)
Grupo 3	18 (22,8)	38 (48,1)	18 (22,8)	5 (6,3)	79 (13,3)
Grupo 4	37 (30,6)	60 (49,6)	18 (14,9)	6 (5,0)	121 (20,4)
Sub-total (positivas)	189 (59,0)	215 (73,6)	132 (74,1)	57 (85,1)	593 (69,3)
Totales	320 (37,4)	292 (34,1)	177 (20,7)	67 (7,8)	856

Grupo 1 = de 1 a 10 L₃ Grupo 3 = de 51 a 100 L₃
 Grupo 2 = de 11 a 50 L₃ Grupo 4 = más de 100 L₃

CUADRO 2

Distribución de las babosas por categorías de peso según el grado de infección

Grado de Infección	Categorías de peso en gramos				Totales
	I 0,4 - 1,3	II 1,4 - 2,4	III 2,5 - 3,5	IV 3,6 - 6,0	
Negativos	131 (49,8)	77 (29,3)	45 (17,1)	10 (3,8)	263 (30,7)
A	134 (70,9)	117 (54,4)	96 (72,7)	46 (80,7)	393 (66,3)
B	55 (29,1)	98 (45,6)	36 (27,3)	11 (19,3)	200 (33,7)
Sub-Total	189 (59,0)	215 (73,6)	132 (74,1)	57 (85,1)	593 (69,3)
Totales	320 (37,4)	292 (34,1)	177 (20,7)	67 (7,8)	856

Grupo A = de 1 a 50 L₃
 Grupo B = más de 50 L₃

posición de las fibras es más densa; la impregnación argéntica demuestra que las fibras reticulares son muy abundantes y tienen una disposición circular. En el manto se observan gran cantidad de acinos mucosos provistos de conductos excretores recubiertos de un epitelio cúbico bajo simple. Estos conductos excretores se habren hacia la superficie. El estroma está constituido por fibras reticulares y musculares, que se dis-

ponen radial y longitudinalmente. Entre este tejido fibro-muscular se observan filetes nerviosos, algunas veces relacionados con grupos de células ganglionares. En las babosas infectadas no se observó alteración del patrón anterior, pero si cambios importantes alrededor de las larvas.

En las babosas con infección única se observaron los siguientes cambios: a los 5 días aparecen masas de amebocitos alrededor de las larvas

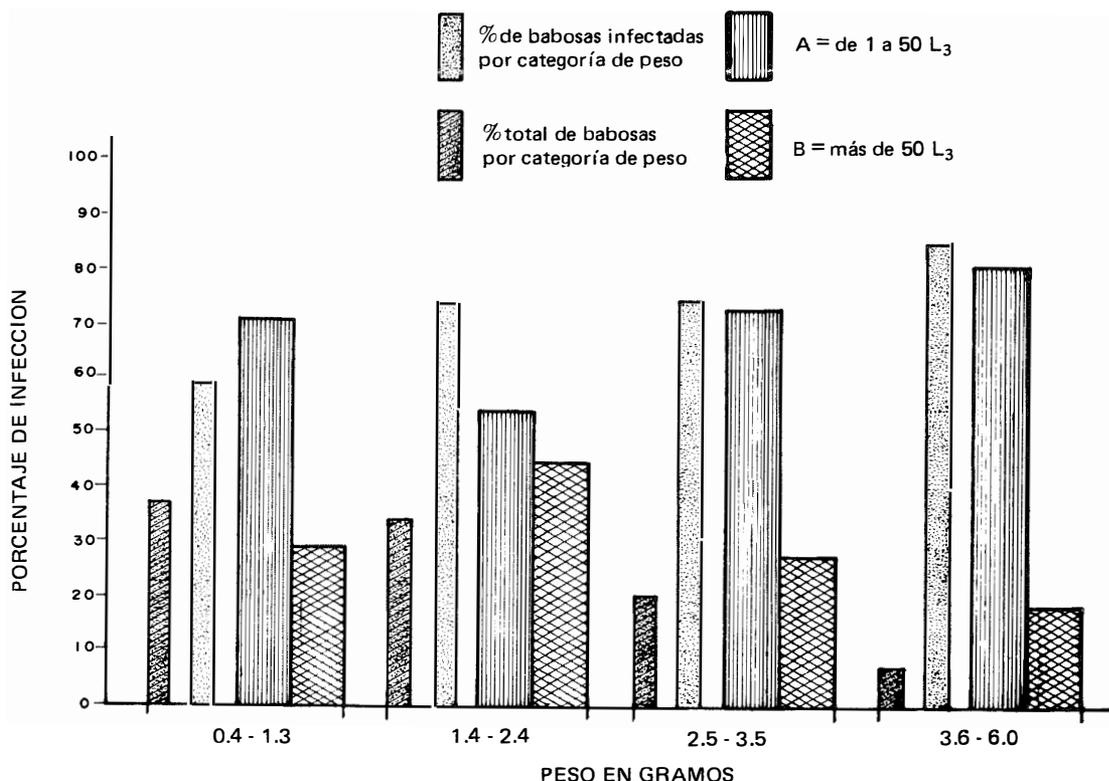


Fig. 1. El porcentaje de la población total de moluscos disminuye conforme aumenta el peso, pero aquel de las babosas infectadas con cualquier número de larvas aumenta. Sin embargo, el porcentaje más bajo de moluscos con más de 50 L_3 se encuentra entre las babosas más pesadas y el más alto entre aquellas de peso mediano.

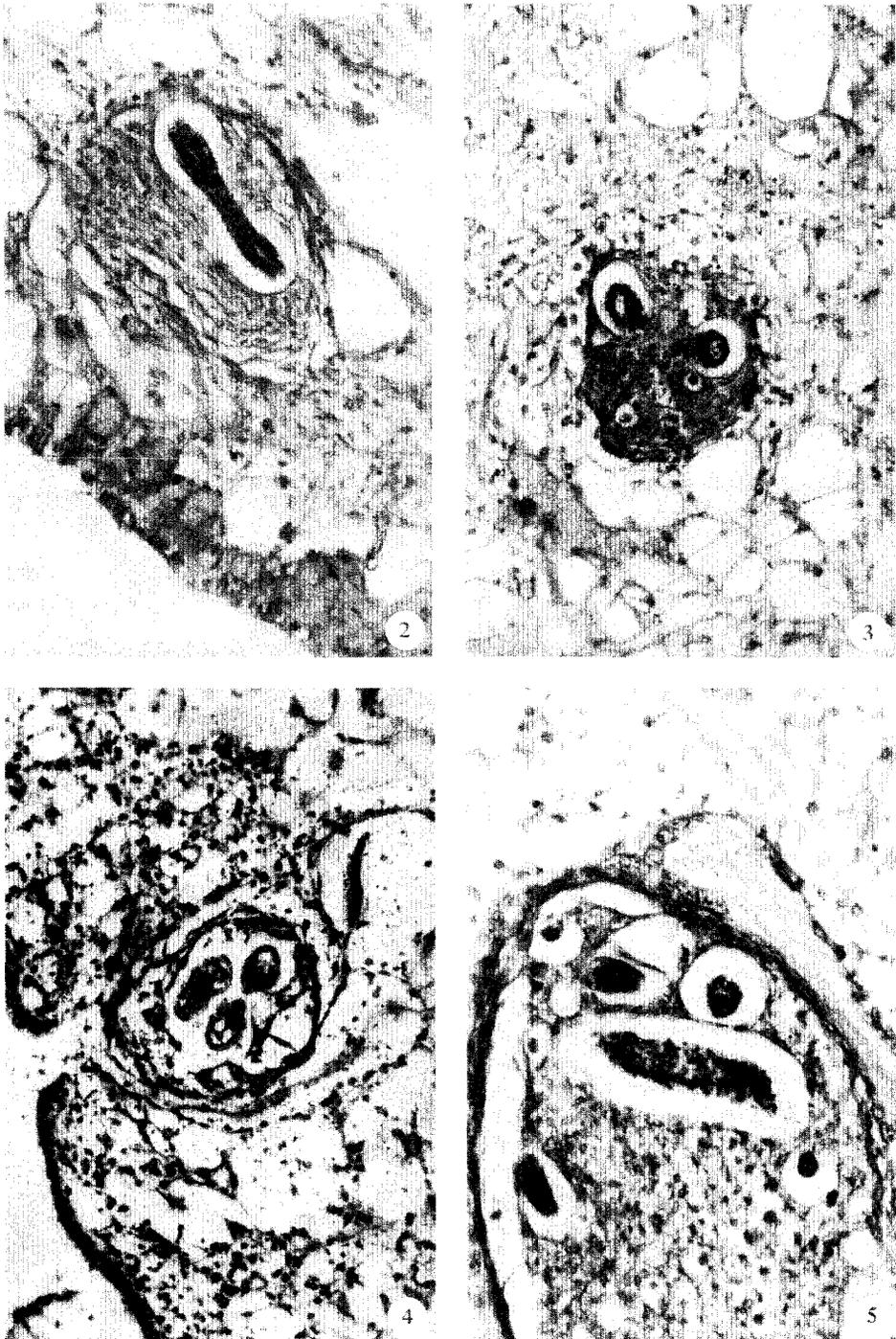
y un ligero aumento de fibras reticulares alrededor de la masa celular (Fig. 2). A los 12 días, las larvas están transformándose en L_3 , pero aún están inmaduras; las masas de amebocitos son similares a las anteriores pero se nota un ligero aumento de las fibras reticulares (Fig. 3). Cincuenta y cuatro días después hay pocos amebocitos pero las larvas están rodeadas por una cápsula de tejido fibroso (Fig. 4).

En los moluscos con dos infecciones, 5 días después de terminada la segunda, hay L_3 de la primera infección y L_2 de la segunda; estas últimas rodeadas de grandes masas de amebocitos y algunas presentan signos de degeneración. A los 12 días las L_3 de la segunda infección están rodeadas por grandes masas de amebocitos y algunas se ven degeneradas o muertas (Fig. 5), pero las de la primera infección tienen apariencia normal y están rodeadas de cápsulas fibrosas. A los 54 días se observan restos de larvas rodeadas de amebocitos y fibras reticulares, junto con aquellas de aspecto normal que se supone son de la primera infección.

DISCUSION

El porcentaje de moluscos infectados es muy alto (69,3%), y el número de individuos disminuye al aumentar el peso. Al contrario, el porcentaje de moluscos infectados aumenta con el peso: 59,9%, 73,6%, 74,5% y 85,1% para las categorías I, II, III y IV respectivamente. Estos datos indicarían entonces que conforme aumenta el peso y por lo tanto la edad, cada individuo habría tenido más oportunidades de infectarse. Sin embargo, si se considera el número de larvas por individuo, las de mayor tamaño son las que tienen menos larvas. Los más altos porcentajes de babosas con poca infección (grupo A, con menos de 50 L_3) están en las categorías I, III y IV (70,9%, 72,7% y 80,7% respectivamente). En el grupo B, (moluscos con más de 50 L_3) se observa el mayor porcentaje (45,6%) en la categoría II y el más bajo (19,3 %) en la IV. (Cuadro 2, Fig. 1).

Era de esperar que las babosas de la categoría I tuvieran el más bajo porcentaje de infec-



Figs. 2-5. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. 2. Larva inmadura rodeada por una masa de amebocitos en una babosa con una sola infección. 3. Larvas de tercer estadio rodeadas por amebocitos; obsérvese que están rodeadas por ascinos glandulares. 4. Larvas de tercer estadio alrededor de las cuales ha disminuido notablemente la masa de amebocitos pero se ha comenzado a formar una cápsula fibrosa. 5. Cortes de larvas de segundo estadio en una babosa que había sido infectada previamente; la masa de amebocitos es más grande que en los moluscos con una sola infección y en el corte longitudinal de una de las larvas se puede observar signos de degeneración.

ción (59,0%) y también que la mayoría tuvieron infecciones leves (menos de 10 L₃); este hecho se podría explicar porque siendo babosas pequeñas y por lo tanto más jóvenes, han tenido menos oportunidades de infectarse. Sin embargo, llama la atención el hecho de que si bien entre las babosas más viejas se presenta la más alta prevalencia de infección (85,1%), el porcentaje de individuos con más de 50 larvas es el más bajo de todos (19,3%). Esta tendencia es significativa (X^2 , $p < 0.01$). Este fenómeno se podría explicar si los moluscos son capaces de desarrollar un mecanismo de defensa contra el parásito, como sugiere el estudio histológico.

En los moluscos que se infectaron una sola vez, se produce proliferación de amebocitos alrededor de las larvas; éstas sin embargo, no presentan evidencia de agresión y maduran normalmente; con el tiempo, los amebocitos disminuyen y se forma una cápsula fibrosa alrededor de las larvas. La ausencia de reacción celular en los tejidos vecinos podría indicar que se ha logrado un equilibrio en la relación huésped-parásito. Es probable entonces, que la salida de larvas infectantes con la baba del molusco sea un fenómeno accidental y mecánico; en el tegumento hay gran cantidad de acinos glandulares mucosos; debido a que las larvas se localizan cerca de la superficie del molusco, a menudo están en estrecho contacto con estas glándulas y sus conductos excretores. Existe entonces la posibilidad de que las contracciones musculares puedan producir ruptura de las cápsulas fibrosas, liberando las larvas a través de los conductos, junto con la baba. La salida de larvas con este material ha sido comprobada y probablemente constituye el principal mecanismo por el cual se infecta el hombre (Morera 1985).

En las babosas re infectadas, las larvas de la segunda infección provocan también acumulación rápida de amebocitos, aparentemente en mayor cantidad y en algunos casos se observan signos de degeneración del parásito. En las babosas estudiadas 54 días después de la segunda infección, este fenómeno es más evidente, observándose aún presencia de amebocitos (en menor cantidad que en aquellas con una sola infección). Muchas veces en la vecindad se pueden ver larvas con morfología normal y cápsula fibrosa; éstas serían las L₃ de la primera infección que lograron madurar normalmente pues

supuestamente no se había desarrollado todavía el mecanismo de resistencia.

Estas observaciones permiten proponer la siguiente secuencia hipotética: poco tiempo después de que una babosa sana se infecta, las larvas son rodeadas por grupos de amebocitos (mecanismo de defensa natural); posteriormente hay proliferación de fibras, que van sustituyendo a las células y aislan el parásito de los tejidos de huésped; en esta forma se establece un equilibrio en la relación huésped-parásito. Sin embargo, en una segunda infección los amebocitos ya han "aprendido" a agredir al parásito (mecanismo de defensa adquirido), llegando eventualmente a impedir su maduración. El hallazgo de pocas larvas en las babosas de mayor tamaño podría explicarse así. Por un lado, las larvas de las primeras infecciones que lograron madurar se irían eliminando mecánicamente; luego, el mecanismo de defensa adquirido podría contribuir a que una parte de las larvas de infecciones posteriores no llegue a madurar.

El origen y el estímulo que provocan la proliferación de amebocitos alrededor de un cuerpo extraño en los moluscos, se ha tratado de explicar de varias maneras. Lie *et al.* (1975) y Kinoti (1971) describieron un órgano productor de amebocitos localizado en el pericardio, en *Biomphalaria glabrata* y en *Bulinus* spp. Sin embargo en *Lymnaea stagnalis* no se observó una estructura similar y hay amebocitos aislados o en pequeños grupos en todos los tejidos (Brown 1978). En las babosas infectadas y no infectadas que estudiamos tampoco se observó una estructura similar. Se podría pensar que en estos moluscos existen elementos similares a las células reticulares de los vertebrados, que siendo muy "jóvenes" desde el punto de vista ontogénico, tienen capacidad de seguir diversas líneas de desarrollo, dando lugar a estirpes celulares diversas como los macrófagos y los fibroblastos, de acuerdo a las necesidades del momento. Estas células constituyen el sistema retículo-endotelial de los vertebrados y junto con las fibras reticulares, forman el estroma de los órganos linfáticos y la médula ósea. Si un citotipo equivalente existe en los moluscos, se podría explicar su rápida proliferación y diferenciación en amebocitos y fibroblastos. Es más, podríamos pensar que después de un primer contacto, estas células podrían adquirir la información para actuar más efectivamente frente al parásito en una segunda exposición.

La rápida aparición de masas de amebocitos alrededor de larvas de parásitos es explicada por Cheng (1966) por la existencia de un estímulo que pone en marcha este mecanismo; este estímulo sería, en el caso de *Angiostrongylus cantonensis*, un líquido que se libera en el tejido alrededor de las larvas al producirse las mudas. Sin embargo, está bien establecido que en *A. cantonensis* (Mackerras & Sandars 1955) y en *A. costaricensis* (Morera 1973), las cubiertas de la primera y segunda muda se retienen hasta que la larva es liberada. Pensamos que siendo las larvas elementos vivos, aunque su metabolismo sea muy bajo por razones de economía, siempre llevan a cabo funciones vitales y por lo tanto debe haber algún tipo de intercambio con el exterior (huésped). Los productos de excreción/secreción podrían ser entonces el factor que estimula la proliferación de amebocitos y la formación de cápsulas. Varios autores han observado este mismo fenómeno en los tejidos de moluscos infectados con los tres tipos de helminto, a saber: tremátodos (Lie *et al.* 1975; Lie & Heyneman 1976a, 1976b, 1976c), céstodos (Rifkin y Cheng 1968) y nemátodos (Cheng 1966).

A pesar de que en los moluscos no se han encontrado mecanismos de inmunidad humoral como los conocidos en los mamíferos (formación de inmunoglobulinas), si se han encontrado algunas sustancias que tienen acción contra elementos extraños. No sabemos si en el fenómeno de resistencia que observamos en las babosas infectadas con *Angiostrongylus costaricensis* interviene algún mecanismo humoral, pero las observaciones parecen indicar que los mecanismos celulares tienen un papel preponderante en la resistencia de las mismas.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Arnoldo Castro A. su valiosa ayuda técnica.

RESUMEN

En Costa Rica, las babosas de la familia Veronicellidae constituyen el huésped intermedio más importante de *Angiostrongylus costaricensis*. A pesar de que las tasas de infección más altas se encontraron en los moluscos más grandes, los de tamaño mediano mostraron el mayor número de larvas por ejemplar. La infección experimental de babosas nacidas y criadas en el la-

boratorio demostró acumulación de amebocitos al principio, y luego la formación de una cápsula fibrosa. En babosas con doble infección la reacción celular fue algo más acentuada la segunda vez y se observó cierto grado de agresión a los parásitos, lo que parece demostrar la aparición de un mecanismo de resistencia después de la primera infección.

REFERENCIAS

- Brown, D. S. 1978. In Vera Fretter & J. Peake. Pulmonates. Vol 2A Systematics, Evolution and Ecology. Academic Press. X + 540 pp.
- Coto, T. D. 1983. Combate de la babosa *Diplosolenodes occidentale* Guilding (Soleolifera: Veronicellidae) con extractos de plantas. Tesis de Grado, Centro Regional del Atlántico. Universidad de Costa Rica.
- Chabaud, A. 1972. Description de *Stefankostromyulus dubosti* sp. parasite du Potamogale et asai de classification des Nematodes Angiostrongylineae. Ann. Parasit. Hum. Comp. 47: 735-744.
- Cheng, T. C. 1966. Perivascular leucytosis and other types of cellular reactions in the oyster. *Crassostrea virginica* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*. J. Invertebr. Pathol. 8: 52-58.
- Kinoti, G. K. 1971. Observations on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mattheei*. II. The mechanism of resistance to the infection. Parasitology 62: 161-170.
- Lie, K. J., D. Heyneman & P. Yau. 1975. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 61: 574-576.
- Lie, K.J. D. Heyneman. 1976a. Studies on resistance of snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 62: 51-58.
- Lie, K. J. & D. Heyneman. 1976b. Studies on resistant *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 62: 292-297.
- Lie, K. J. & D. Heyneman. 1976c. Studies on resistance of snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. J. Parasitol. 62: 298-302.
- Malek, E. 1981. Presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 81-83.
- Mackerras, E. A. & D. F. Sandars. The life history of the lung-worm *Angiostrongylus cantonensis*

- Cheng, (Nematoda: Metastrongyloidea). Aust. J. Zool. 3: 1-2.
- Morera, P. 1970. Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971. Bol. Chileno Parasitol. 25: 133-134.
- Morera, P. & R. Céspedes. 1971a. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea) a new lung worm occurring in man in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 18: 173-185.
- Morera, P & R. Céspedes. 1971b. Angiostrongyliasis Abdominal. Una nueva parasitosis del hombre. Acta Médica Cost. 14: 159-153.
- Morera, P. 1973. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 612-621.
- Morera, P., R. Lazo, J Urquiza & M. Llaguno. 1983. First Record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 1460-1461.
- Morera, P. 1985. Angiostrongyliasis Abdominal. Transmisión y observaciones sobre su posible control In: Control and eradication of Infectious Diseases: An International Symposium. PAHO Copubl. Ser. N° 1, Pan American Health Organization. 230-235.
- Morera, P. 1987. Abdominal Angiostrongyliasis. In: Baillier's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. Intestinal Helminthic Infections. 2(3): 744-753.
- Rifkin, E. & T. C. Cheng. 1968. The origin, structure and histochemical characterization of encapsulating cysts in the *Crassostrea virginica* parasitized by the cestode *Tylocephalum* sp. J. Invertebr. Pathol. 19: 65-69.
- Sly, D. L., J. D. Toft, G. H. Gardiner & W. T. London. 1982. Spontaneous occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in marmosets (*Saguinus mystax*). Lab. Anim Sci. 32: 286-288.
- Tesh, R., L. Ackerman, W. Dietz & J. Williams. 1973. *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and Pathological Changes in Wild Rodents Infected with the Parasite. Am. J. Trop. Med. Hyg. 22: 348-356.
- Uberlaker, J. E. & N. M. Hall. 1979. First Report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in the United States. J. Parasitol. 65: 387.
- Wallace, G. D. & L. Rosen. 1969. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. Malacologia 7: 427-483.