

BIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE DE *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) A INFECCÕES POR *Fasciola hepatica* EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS¹

SILVIO NUERNBERG², HUGO E.B. DE REZENDE³, NICOLAU M. DA SERRA FREIRE³, PLÍNIO A.C. GOMES⁴ E J.L. DE BARROS ARAUJO³

ABSTRACT.- Nuernberg S., Rezende H.E.B., Serra Freire N.M., Gomes P.A.C. & Araujo J.L.B. 1983. [Biology and susceptibility of *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) to infection with *Fasciola hepatica*.] Biologia e susceptibilidade de *Lymnaea cubensis* (Mollusca, Lymnaeidae) a infecções por *Fasciola hepatica* em condições experimentais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(1):1-10. Inst. Biologia, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro 23460, Brazil.

Using *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 collected in valleys in the municipality of Três Rios, Rio de Janeiro State, generations of this species were reared in the laboratory. Egg laying commenced for *L. cubensis* with 18 days of age at 27-29°C. The number of eggs varied from 3 to 24 per egg-mass with a hatchability index of ca. 100%. *Lymnaea cubensis* eggs and individuals of more than 30 days of age did not resist 40 days of desiccation although one-day-old specimens survived; additionally, the susceptibility and resistance to infection with the miracidium of *Fasciola hepatica* L., 1758 and the development of this trematode were studied. At 25-27°C the incubation period of *F. hepatica* eggs was 11 to 13 days. The individual infection of 3 groups of 80 molluscs with 1-3, 3-5 or 5-10 miracidia of *F. hepatica* indicated that *L. cubensis* did not survive to the emergence of cercariae when more than 5 miracidia were used per mollusc. Cercariae emerged 35-36 days post-infection with environmental temperatures of 27-29°C. The mean number of metacercariae was 78.4 and 108.3 for the groups infected with 1-3 and 3-5 miracidia, less than that observed for *L. columella* Say, 1817, the intermediate host of *F. hepatica* in Rio de Janeiro State.

Experimentally, the prepatent periods for *F. hepatica* in various hosts, were found to be: bovine, 71 days; rabbit, 65 days; rat, 41-44 days; hamster, 33-34 days, and mouse, 32-35 days. In the guinea-pig, adult *F. hepatica* were observed 56 days post infection, with ova in the uterus.

A prevalence of 35.8% for fascioliasis was obtained in 475 cattle examined in the municipality of Três Rios. Fascioliasis was not encountered in seven other municipalities studied.

INDEX TERMS: Fascioliasis, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea cubensis*, biology, experimental infection, cattle.

SINOPSE.- A partir de exemplares de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839, coletados em valas no município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, foram obtidas gerações de moluscos criados em laboratório. *L. cubensis* iniciou postura aos 18 dias de idade à temperatura de 27 a 29°C. O número de ovos variou de 3 a 24 por postura, com índice de eclodibilidade próximo de 100%. Ovos de *L. cubensis* e indivíduos com mais de 30 dias de idade não resistiram a 40 dias de dessecação,

porém exemplares com um dia de idade sobreviveram. Foram também observadas a susceptibilidade e a resistência à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* L., 1758, bem como o desenvolvimento do helminto. Em estufa, a 25-27°C, o período de incubação dos ovos foi de 11 a 13 dias. A infecção individual de três grupos de 80 moluscos com 1 a 3, 3 a 5 e 5 a 10 miracídios de *F. hepatica* mostrou que *L. cubensis* não sobrevive até à emergência de cercária, quando se utilizaram mais de 5 miracídios por molusco. A emergência de cercárias ocorreu com 35 a 36 dias de infecção em temperatura ambiente de 27 a 29°C. O número médio de metacercárias de 78,4 e 108,3 para os grupos infectados com 1 a 3 e 3 a 5 miracídios respectivamente, foi inferior ao observado para *L. columella* Say, 1817, hospedeiro intermediário deste trematódeo no Estado do Rio de Janeiro.

Foi experimentalmente verificado que o período pré-patente de *F. hepatica* em bovino é de 71 dias, em coelho, de 65 dias, em rato, de 41 a 44 dias, em hamster, de 33 a 34 dias, e em camundongos, de 32 a 35 dias; em cobaias com 56 dias de

¹ Aceito para publicação em 15 de junho de 1982.

Trabalho realizado sob os auspícios do CNPq. Apresentado no VII Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, 1 a 4 de julho de 1981.

² DSA-SC, Rua Lacerda Coutinho 6, Florianópolis, Santa Catarina 88000.

³ Instituto de Biologia/DBA/Parasitologia, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23460.

⁴ PESAGRO, Alameda São Boaventura 770, Fonseca, Niterói, RJ 24120.

infectados, foi observada, nas vias biliares, a presença de helmintos com ovos no útero.

A prevalência da fasciolose entre 475 bovinos examinados no foco detectado no município de Três Rios foi de 35,8%. Em sete outros municípios não foi encontrada a fasciolose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Fasciolose, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea cubensis*, biologia, infecção experimental, bovinos.

INTRODUÇÃO

O estudo de *Fasciola hepatica* L., 1758 reveste-se de grande interesse médico-veterinário e econômico, por se tratar de zoonose observada nos cinco continentes.

No Brasil, onde foi mencionada pela primeira vez por Lutz (1921), as maiores atenções estão voltadas para o conhecimento dos prejuízos que causa às criações de ovinos e bovinos, especialmente na Região Sul do País, o que não impede que alguns casos de fasciolose humana tenham sido descritos por Rey (1958), Santos e Vieira (1965/67) e Baranski et al. (1978).

Durante o desenrolar dos trabalhos que constituíram o projeto "Epidemiologia dos nematóides gastro-intestinais de bovinos", desenvolvido no antigo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul - IPEACS, foram encontrados ovos de *F. hepatica* em animais nascidos e criados no município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro. A partir desta observação, dedicou-se maior atenção aos exames, passando-se a utilizar técnica de sedimentação a fim de ampliar o conhecimento sobre este trematódeo no Estado do Rio de Janeiro.

Em algumas propriedades onde se desenvolveram os estudos, teve-se a oportunidade de assinalar, no mesmo habitat, duas espécies de moluscos do gênero *Lymnaea* Lamarck, 1799 como prováveis hospedeiros intermediários de *F. hepatica*. Numa primeira etapa, Rezende et al. (1973) e Gomes et al. (1975) comprovaram que *L. columella* Say, 1817 é hospedeiro intermediário deste trematódeo no Estado do Rio de Janeiro, bem como elucidaram vários aspectos da biologia deste molusco em condições de laboratório. Em etapa subsequente, procurou-se estudar a segunda espécie do gênero *Lymnaea* identificada como *L. cubensis* Pfeiffer, 1839 (Rezende et al. 1973). Esta espécie constitui o assunto deste trabalho, visando esclarecer como ponto de partida, em condições de laboratório, aspectos biológicos e o comportamento do molusco em infecções experimentais com *Fasciola hepatica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Helminto. Ovos de *Fasciola hepatica* foram obtidos da vesícula biliar de *Bos taurus* L., 1758, adulto, nascido e criado em Avelar, Estado do Rio de Janeiro.

Hospedeiros intermediários. Os exemplares de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 foram coletados nas margens de valas de água límpida e corrente, em uma fazenda situada no município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, e transferidos para laboratório, dando origem à população trabalhada.

Hospedeiros vertebrados. a) Bovino: durante o trabalho foram utilizados dois *B. taurus*, fêmeas, com 9 e 2 anos, nascidos e criados em região livre, no município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, respectivamente como doador de ovos de *F. hepatica* e receptor de formas infectantes; b) Animais de laboratório: foram utilizados dois *Orytolagus cuniculi* L., 1758, quatro *Cavia porcellus* L., 1758, seis *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, cinco *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1840 e dez *Mus musculus* L., 1758, todos machos, adultos, nascidos e criados em biotério.

Métodos

Obtenção de ovos: Os ovos de *F. hepatica* foram obtidos de posturas realizadas pelos helmintos nos canais biliares do hospedeiro, do qual se retirou o fígado durante a necropsia. Após isolar a vesícula biliar, a secreção biliar foi diluída em água destilada em cálice de Hoffman de 1.000 ml, homogeneizada e deixada em repouso durante vinte minutos para sedimentação. Findo este período, descartou-se o sobrenadante e diluiu-se o sedimentado em água destilada, permitindo nova sedimentação. Esta operação foi repetida até que o sobrenadante permanecesse límpido, quando então a suspensão de ovos em água destilada foi passada em tamis de bronze com malha maior que 100 μ , para a retirada de fragmentos de cálculos biliares que ocorreram.

Os ovos, assim obtidos, foram transferidos para Erlenmeyer de 500 ml, imersos em 200 ml de água destilada e incubados em estufa à temperatura de 25 a 27°C. Diariamente era trocada a água com o auxílio de sifão, agitando-se em seguida o sedimento para evitar que os ovos aderissem ao fundo do frasco.

A partir do oitavo dia de incubação, envolveu-se o Erlenmeyer em papel negro, mantendo-se escurecido o interior do frasco e não mais se trocando a água até o momento desejado para a eclosão.

Infecção dos hospedeiros invertebrados. Foram separadas 300 *L. cubensis* nascidas em laboratório, com 60 dias de idade, apresentando comprimento de concha entre 5 e 7 mm. Após serem lavadas em água destilada e divididas em três grupos iguais, elas foram distribuídas, individualmente, em compartimentos com 3 ml de água destilada, em uma forma de plástico transparente, e expostas à infecção de miracídios recém-eclodidos por exposição à incidência de luz natural (Quadro 1), de conformidade com as técnicas de Pantelouris (1965).

Durante as duas horas de tentativa de infecção dos moluscos, as formas de plásticos permaneceram em ambiente naturalmente iluminado, em temperatura de 27 a 29°C, cuidando-se que os hospedeiros intermediários permanecessem sempre imersos. Finda a tentativa de infecção, cada grupo de moluscos foi transferido para um viveiro previamente preparado, com comprovada capacidade de manutenção para mais de 100 *L. cubensis*. O desenvolvimento das formas evolutivas de *F. hepatica* foi acompanhado com exames periódicos, individuais, através da concha de alguns moluscos de cada grupo infectado, com auxílio de lupa estereoscópica. De cada grupo foram dissecados 20 moluscos (20%) no 14º dia de infecção.

Obtenção de metacercárias. A partir do 35º dia de penetração dos miracídios nos moluscos, *L. cubensis* que apresentavam cercárias no interior das conchas foram transferidas individualmente para placas de Petri de 8 cm de diâmetro e mergulhadas em água destilada, à temperatura ambiente, provocando a emergência das cercárias, as quais se enquistavam nas paredes e no fundo da placa. Assim permaneceram por 24 horas, no fim das quais se retirou a água e o molusco. As metacercárias formadas foram imersas em água destilada à temperatura ambiente para maturação e mantidas nas placas de Petri tampadas apenas com papel de filtro úmido, sendo guardadas em geladeira para posterior uso em infecções experimentais.

Infecção dos hospedeiros vertebrados. Para testar a viabilidade das metacercárias, elas foram, deslocadas das paredes das placas de Petri com auxílio de estilete e administradas *per os* com pipeta Pasteur a cobaias, rato branco, hamster e camundongo, tendo-se previamente o cuidado de anestésias com éter os receptores. A ingestão do parasito por bovino e coelho foi conseguida colocando-se metacercárias sobre folhas de couve que eram oferecidas aos animais em jejum. Para conhe-

BIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE DE *Lymnaea cubensis* A INFECCÕES POR *Fasciola hepatica*Quadro 1. Condições experimentais da infecção de *Lymnaea cubensis* com miracídios de *Fasciola hepatica*

Condições experimentais	1.º Grupo	2.º Grupo	3.º Grupo
Número de moluscos utilizados expostos à infecção	100	100	100
Dissecados no 14.º dia da infecção	20	20	20
Remanescentes para observações posteriores	80	80	80
Comprimento da concha (mm)	5-7	5-7	5-7
Método de infecção	Individual	Individual	Individual
Número de miracídios por molusco	1-3	3-5	5-10

cimento do período pré-patente de *F. hepatica* em cada espécie infectada, foram realizadas diariamente coletas de fezes pela manhã e à tarde, examinando-se esse material por técnica de sedimentação para pesquisa de ovos. Constatada a presença de ovos de *F. hepatica* nas fezes do hospedeiro, este era sacrificado, coletando-se os helmintos do fígado. Um bovino e os cõbaios fizeram exceção à regra; o primeiro por ter morrido intoxicado por planta tóxica e os demais porque, não eliminando ovos de *F. hepatica* nas fezes, foram sacrificados no 56.º dia da infecção.

Criação de moluscos em laboratório. Para a criação de *L. cubensis* em laboratório foi adotada, com modificações, a metodologia de Taylor e Mozley (1948). Amostras peneiradas de terra vegetal foram colocadas em recipientes metálicos com capacidade para 20 litros, adicionando-se água de bica até que o material ficasse totalmente imerso; em seguida a mistura foi submetida à fervura. Após permanecer em completo repouso, para sedimentação e resfriamento, descartou-se o sobrenadante e a massa pastosa que compunha o sedimento foi espalhada em caixas de 80 x 80 x 11 cm, de madeira, forradas com folha de plástico flexível fixada somente nos bordos superiores. Durante 3 a 6 dias, as caixas eram mantidas em posição horizontal favorecendo a formação de uma massa de terra, com espessura de 8 cm, endurecida pela evaporação da água. Com uma espátula abriu-se uma cova quadrada de 20 cm de lado, equidistante das laterais da caixa; nessa cavidade colocava-se água destilada para manter a umidade necessária ao meio.

Amostras de algas verdes coletadas no campo, sem nenhum critério especial de seleção, lavadas por sedimentação em água destilada, foram espalhadas na superfície da massa de terra. Assim formados, os viveiros foram mantidos próximo a locais bem iluminados, de forma indireta pelo sol da manhã. A temperatura ambiente de 27 a 29°C favoreceu o bom desenvolvimento das algas. Quando os viveiros já estavam ocupados por lotes de moluscos, utilizaram-se paralelamente, como fonte suplementar de alimento, folhas de *Hibiscus sp.*, cozidas, colocadas duas vezes por semana sobre o meio criatório. Para observação detalhada das diversas fases do ciclo biológico de *L. cubensis*, especialmente quanto à reprodução e à resistência à dessecação, foram preparados viveiros menores, com 10 cm de diâmetro por 5 cm de profundidade e de 40 x 25 x 8 cm, obedecendo às mesmas etapas de preparação já descritas.

As posturas usadas nos testes de dessecação foram conseguidas a partir da ovoposição realizada por adultos durante seis dias consecutivos, findos os quais foram removidos estes moluscos, permanecendo os ovos nos mesmos viveiros.

Prevalência. Para se conhecer o percentual de bovinos infectados, dentre os nascidos e criados nas propriedades estudadas no Estado do Rio de Janeiro, foram coletadas e examinadas pelo método de sedimentação de Watanabe et al. (1953) amostras de fezes diretamente da ampola retal de bovinos, no município de Itaguaí e Distrito de Santa Cruz, na zona fisiográfica da Baixada do Rio Guandu, municípios de Parafba do Sul, Piraf e Três Rios, na zona fisiográfica de Resende, município de Silva Jardim, na zona fisiográfica do Rio São João, e município de Areal, na região fisiográfica do Alto da Serra.

Todos os bovinos utilizados neste levantamento eram meio sangue de raça holandês, tanto da linhagem preto e branco, como da vermelho e branco, mantidos em regime semi-extensivo. De dia pastavam em piquetes, onde existiam passagens de água corrente, e à noite permaneciam presos recebendo, no cocho, capim e cana picada, ração balanceada e sais minerais como suplemento alimentar.

RESULTADOS

Infecção dos hospedeiros invertebrados

Em estufa a 25-27°C, o período de incubação dos ovos de *F. hepatica* foi de 11 a 13 dias. Os miracídios eclodiam imediatamente após a exposição à fonte luminosa e mostraram-se muito ativos, com fototropismo positivo durante as duas horas de contato com os moluscos.

Nos 20 moluscos de cada grupo dissecados com 14 dias de infectados, foi observado aumento gradativo da quantidade de moluscos infectados e de rédias geradas, paralelamente, ao aumento do número de miracídios a que ficaram expostos (Quadro 2).

As outras 80 *L. cubensis* de cada grupo, que foram acompanhadas periodicamente até o 35.º dia de infecção, revelaram capacidade de sobrevivência à infecção com 3-5 miracídios de *F. hepatica*, sendo também crescente o número médio de metacercárias produzidas por molusco (Quadro 3). É importante frisar que o tempo máximo observado para enquistamento de qualquer cercária após abandonar o hospedeiro

Quadro 2. Resultados da dissecação de 20 moluscos por grupo de *L. cubensis*, 14 dias após infecção experimental

N.º de ordem	1.º grupo (1-3 miracídios/molusco)		2.º grupo (3-5 miracídios/molusco)		3.º grupo (5-10 miracídios/molusco)	
	Resultado ^(a)	N.º de rédias	Resultado ^(a)	N.º de rédias	Resultado ^(a)	N.º de rédias
1	N	-	N	-	P	7
2	N	-	P	1	P	9
3	N	-	N	0	P	4
4	N	-	P	3	P	6
5	P	3	P	3	P	3
6	N	-	P	5	N	-
7	N	-	P	5	P	3
8	P	1	P	5	P	4
9	P	1	N	-	P	9
10	P	1	P	1	P	5
11	P	1	P	5	P	2
12	N	-	P	2	P	1
13	N	-	N	-	P	5
14	P	2	P	2	P	8
15	P	1	P	2	N	-
16	N	-	P	4	P	6
17	P	1	N	-	P	7
18	N	-	N	-	N	-
19	N	-	N	-	N	-
20	N	-	P	1	P	4
N.º totais	8	11	13	39	16	81
p %	40	-	65	-	80	-

^(a) N= negativo, P = positivo.

deiro invertebrado foi de 15 minutos, e que todos os moluscos morreram após a emergência das cercárias.

O período de evolução de *F. hepatica* em *L. cubensis*, à temperatura ambiente de laboratório entre 27 a 29°C, foi de 35 a 36 dias (Quadro 9).

Infecção dos hospedeiros vertebrados

A determinação do período pré-patente de seis diferentes espécies de mamíferos sensíveis a *F. hepatica*, em infecções experimentais, evidenciou que o maior e o menor período

de pré-patência couberam a bovinos e camundongos, respectivamente. A comparação dos números de helmintos adultos oriundos das metacercárias ingeridas pelos diferentes receptores revelou que foram os coelhos que apresentaram os maiores números de parasitos (Quadro 4).

Criação de moluscos em laboratório

Pela necessidade de criar sucessivas gerações de *L. cubensis*, que seriam utilizadas em infecções experimentais de animais de campo e de laboratório na tentativa de se fechar o ciclo evolutivo de *F. hepatica*, tendo *L. cubensis* como hospedeiro intermediário, foram observados aspectos da biologia do molusco, utilizando-se a técnica de Taylor e Mozley (1948), modificada.

De viveiros com moluscos de 60 dias de idade, foram examinadas 100 posturas, ao acaso, observando-se que o maior número de ovos foi de 24 e o menor foi de três, com média de 8,65 ovos por postura, sendo que o diâmetro das posturas variou entre 3 e 6 mm.

Duas placas de Petri foram preparadas com papel umedecido com água destilada, sendo colocadas 10 posturas em cada uma delas. A primeira placa foi incubada em estufa a 25-27°C, enquanto a segunda permaneceu em temperatura ambiente. Diferença significativa foi observada no resultado, com o índice de eclodibilidade próximo de 100% (Quadro 5). Foi, ainda, acompanhado o desenvolvimento de 26 moluscos desde a eclosão até o 31º dia de vida, em viveiro com 40 x 25 x 8 cm, cujos resultados são mostrados no Quadro 6.

Testes de resistência à dissecação foram realizados, preparando-se quatro viveiros nos quais foram colocados: no 1º, somente posturas de moluscos com mais de 60 dias de idade; no 2º, moluscos com um dia de vida; no 3º, moluscos com 30 dias de vida, e no 4º, moluscos com 60 a 90 dias de idade. Em seguida, retirou-se toda a água, mantendo-se a alimentação em todos os viveiros que assim permaneceram por 40 dias,

Quadro 3. Resultados da infecção individual de três grupos de *L. cubensis*, com 80 exemplares cada grupo, com miracídios de *F. hepatica*

Aspectos observados	1.º grupo (1-3 miracídios/molusco)	2.º grupo (3-5 miracídios/molusco)	3.º grupo (5-10 miracídios/molusco)
Mortalidade (%)	63,7	71,2	100
Moluscos infectados sobreviventes			
Total	29	23	0
Número de positivos	11	12	-
Porcentagem	37,9	52,1	-
Número de metacercárias 35 a 36 dias após infecção	862	1299	-
Número médio de metacercária por molusco	78,4	108,3	-

BIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE DE *Lymnaea cubensis* A INFEÇÕES POR *Fasciola hepatica*

Quadro 4. Resultados do teste para determinação do período pré-patente nos diferentes hospedeiros vertebrados

Animais utilizados		Pré-patência (dias)	Número de metacercárias administradas por hospedeiro
Espécie	Número		
Bovino	1	71	120
Coelho	2	65	15 a 30
Cobaio	4	56 ^(a)	10 a 15
Rato branco	6	41 a 44	10 a 15
Hamster	5	33 a 34	5 a 10
Camundongo	10	32 a 35	1 a 3

(a) Necropsiado com 56 dias de infectado.

Quadro 5. Resultados do teste de incubação e eclodibilidade de ovos de *L. cubensis* em estufa e ao ambiente

Condições experimentais e aspectos observados	Incubação em estufa a 25-27°C	Incubação ao ambiente a 27-29°C
Número de posturas	10	10
Número de ovos contados	80	96
Período de incubação (dias)	9-11	9-13
Número de filhotes	80	94
Eclodibilidade (%)	100	97,9

tempo suficiente para dessecação total do meio criatório. Findo o período, umidificaram-se totalmente os viveiros e colocaram-se folhas cozidas de *Hibiscus sp.*; os resultados são apresentados no Quadro 7. Também foram realizados testes de sensibilidade de *L. cubensis* a *F. hepatica*. Para isto, moluscos com 60 dias de idade foram expostos coletivamente a grande quantidade de miracídios recém-eclodidos. Com exceção de um molusco que não se infectou e de oito outros que morreram antes de 14 dias de infectados, todos os demais revelaram-se portadores de formas evolutivas do trematódeo, calculando-se um percentual de infectividade de 98,9%, com média de 18,8 rédias/molusco no 14^o dia.

Prevalência

Os 695 animais examinados para determinação de prevalência de fasciiose bovina eram fêmeas adultas e somente dois deles eram machos. Os resultados obtidos dos exames de 10% do plantel de cada fazenda escolhida ao acaso dentre as que dispunham de acesso por via rodoviária, revelaram que somente no município de Três Rios se encontraram bovinos parasitados, e a prevalência foi de 35,8% nos 475 animais estudados neste município.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Infecção dos hospedeiros invertebrados

O período de incubação dos ovos de *F. hepatica* observado em estufa a 25-27°C está de acordo com os resultados apresentados por outros autores nas Américas (Quadro 8).

É bastante evidente que há uma influência direta da temperatura sobre o tempo necessário para a formação e eclosão do miracídio. Sobre este aspecto, Gajardo et al. (1950) divulgaram ser de 25 a 30°C a temperatura ideal de desenvolvimento dos miracídios, situando-se entre 10 a 37°C a faixa de temperatura em que pode ocorrer desenvolvimento embrionário nos ovos. Para este intervalo de temperatura o período de incubação variou entre 9 e 45 dias.

Parecem discrepantes os resultados de Bacigalupo (1942) que, incubando ovos de *F. hepatica* à temperatura de 20 a 25°C, próxima à faixa ideal, verificou um período de incubação de 15 a 25 dias. A discordância fica mais evidente quando se comparam estes resultados com as observações de Rey (1957), que, utilizando quase a mesma faixa de temperatura (22 a 25°C), constatou período de incubação de 9 a 15 dias,

Quadro 6. Resultados do teste de postura e viabilidade dos ovos de *L. cubensis* a partir de 26 moluscos recém-eclodidos

Início da postura (dias)	Número de posturas	Número de ovos férteis	Número de ovos inférteis	Total de ovos por dia
1 a 17	0	—	—	—
18	3	0	6	6
19	3	0	6	6
20	7	9	7	16
21	10	14	14	28
22	10	47	4	51
23	5	14	0	14
24	11	44	7	51
25	4	15	1	16
26	5	17	7	24
27	9	24	12	36
28	10	1	36	37
29	4	10	17	27
30	4	12	6	18
31	6	20	4	24
Totais	91	227	127	—

Quadro 7. Resultado do teste de resistência a dessecação de *L. cubensis*

Número de moluscos	Idade (dias)	Duração da prova (dias)	Sobreviventes	
			Número	Porcentagem
200	1	40	120	60
213	30	40	37	14
200	60-90	40	0	0
Posturas	1-6	40	0	0

concordantes com a maioria dos trabalhos.

A infecção experimental de três grupos de 80 moluscos com 1 a 3, 3 a 5 e 5 a 10 miracídios evidenciou que apenas o primeiro e o segundo grupos resistiram à infecção. Dos infectados com 1 a 3 e 3 a 5 miracídios, houve uma emergência de cercárias com 35 a 36 dias, e o número médio de metacercárias foi de 78,4 a 108,3, respectivamente. São poucos os trabalhos na América do Sul que comentam a capacidade de resistência do hospedeiro intermediário, infectado com um número conhecido de miracídios.

Os resultados obtidos com *L. cubensis*, no Estado do Rio de Janeiro, podem ser melhor comparados com os dados de outros autores no Quadro 9.

É interessante notar que determinados resultados agora apresentados, de possível utilização em estudos epidemiológicos, até agora não houvessem sido descritos; eles se constituem, portanto, nas primeiras observações para esta espécie de hospedeiro intermediário de *F. hepatica*. Pode-se estabelecer comparação quanto à sobrevivência dos moluscos à infecção do miracídio de *F. hepatica* com os resultados de Leon-Dancel (1970) e de Gomes et al. (1974). Como estes autores trabalharam com *L. columella*, o confronto dos resultados serve para a comparação das duas espécies de moluscos já descritas por Rezende et al. (1973) como hospedeiras intermediárias de *F. hepatica* no Estado do Rio de Janeiro.

De acordo com os trabalhos de Leon-Dancel (1970),

BIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE DE *Lymnaea cubensis* A INFECÇÕES POR *Fasciola hepatica*Quadro 8. Relação entre período de incubação e temperatura para ovos de *F. hepatica* apresentada por diversos autores em diferentes países

Autor	Ano	País	Faixa de temperatura (°C)	Período de incubação (dias)
Bacigalupo	1938	Argentina	10-12	18-25
Bacigalupo	1942	Argentina	22-24	25
			20-25	15-20
Tagle	1943	Chile	23-27	11
			24-26	13
Ramires Villamediana & Vergani	1949	Venezuela	26	13
Gajardo et al.	1950	Chile	10-37	9-45
Rey	1957	Brasil	11-18	20-40
Leon-Dancel	1970	Porto Rico	26-28	10-13
Ueno et al.	1973	República Dominicana	21-32	9
Gomes et al.	1974	Brasil	27-29	9-12
Presente trabalho		Brasil	25-27	11-13

94% de *L. columella* sobrevivem à infecção individual de 4 a 6 miracídios/molusco e 93% resistem a infecções coletivas de até 16 miracídios/molusco. Para Gomes et al. (1974), 84% foram, os índices de sobrevivência de *L. columella* em infecções individuais de 2 a 5 e 5 a 8 miracídios/molusco, e nenhum sobrevivente foi encontrado em infecções individuais ou coletivas com oito ou mais miracídios/molusco. E como 37,9% foi o percentual de sobrevivência de *L. cubensis* a infecções com 1 a 3 miracídios/molusco, sendo que infecções com mais de cinco miracídios/molusco não deixaram sobreviventes, fica evidenciado que *L. cubensis* é mais sensível que *L. columella* ao desenvolvimento de formas evolutivas de *F. hepatica*.

Como 52,1% foi o maior índice de sobrevivência conseguida com *L. cubensis* infectadas por *F. hepatica* com produção de 108,3 metacercárias/molusco, e para *L. columella* a menor taxa de sobrevivência encontrada por Gomes et al. (1974) foi de 84%, para infecção com 2 a 5 miracídios/molusco, e a menor média de metacercárias/molusco foi a de 298,0 citada por Leon-Dancel (1970) para infecções com 4 a 6 miracídios/molusco, pode-se sugerir que *F. hepatica* esteja mais adaptada a *L. columella*.

As diferenças observadas quanto ao tempo necessário para emergência das cercárias em *L. columella* (Quadro 9) são possíveis de explicação com base na temperatura em que permaneceram os moluscos infectados. Entretanto, as observações de *L. cubensis* mostraram que este período é bem mais curto, mesmo considerando o maior número de dias já referidos em literatura (Ramires Villamediana & Vergani 1949), que é de 41 dias à temperatura de 26°C.

Ainda é importante salientar que as poucas observações feitas com *L. viatrix* foram com infecções coletivas, com mui-

tos miracídios, verificando-se período de emergência de cercárias variável de 37 a 80 dias.

Em relação ao tempo necessário para o enquistamento de cercárias de *F. hepatica*, parece não haver influência do hospedeiro intermediário. Bacigalupo (1942) trabalhou com *L. viatrix*, verificando que o enquistamento se deu entre 15 a 20 minutos. O mesmo período foi apresentado por Leon-Dancel (1970) utilizando *L. columella*, e nesta mesma espécie Gomes et al. (1974) referiram ser de 20 a 25 minutos o tempo de enquistamento. Ramires Villamediana e Vergani (1949), trabalhando com *L. cubensis*, indicaram 20 minutos como o tempo gasto para enquistamento das cercárias. Para esta mesma espécie observou-se, no Estado do Rio de Janeiro, um período de 15 minutos. Ramires Villamediana e Vergani (1949) citaram ser de 8 a 10 o número de rédias encontradas por dissecação em cada *L. cubensis*, porém, estes autores trabalharam com infecção experimental coletiva. No presente trabalho, com número conhecido de miracídios por molusco, observou-se que de 1 a 3 miracídios/molusco foram produzidas 1 a 3 rédias por *L. cubensis*; de 3 a 5 miracídios/molusco, foram produzidas 1 a 5 rédias/molusco, e de 5 a 10 miracídios/molusco, produziram-se 1 a 9 rédias/molusco (Quadro 2). Confrontando-se estes resultados, e considerando a afirmação de Ramires Villamediana e Vergani (1949) de que aproximadamente 50% dos moluscos morreram em consequência da infecção coletiva a que foram submetidos, é possível dizer que a quantidade máxima de miracídios capaz de infectar e de desenvolver-se em *L. cubensis* sem morte do molusco é de 3 a 5 miracídios/hospedeiro. Infecções com 5 a 10 miracídios/molusco podem formar de 1 a 9 rédias, porém não chegam a emergir cercárias em consequência da morte prematura do molusco.

Quadro 9. Resultados obtidos por diversos autores em infecção de hospedeiro intermediário de *F. hepatica* com diferentes quantidades de miracídios em alguns países da América do Sul e Central

Referência			Molusco		Método de Infecção	N.º de miracídios/molusco	Moluscos sobreviventes			Emergência de cercárias (dias)	N.º médio de metacercárias
Autor	Ano	País	Espécie	N.º			Total	Positivo	%		
Leon-Dancel	1970	Porto Rico	<i>L. columella</i>	100	Individual	2-4	80	70	87,0	57-60	312
				100	Individual	4-6	59	56	94,0	57-60	292
				100	Individual	6-10	0	-	-	-	-
				100	Coletivo	10	90	65	72,0	-	-
				100	Coletivo	16	66	63	93,0	-	-
Ueno et al.	1973	República Dominicana	<i>L. cubensis</i>	muitos	Individual	3-5	-	-	-	34-37	-
				muitos	Individual	10-15	-	-	-	34-37	-
Gomes et al.	1974	Brasil	<i>L. columella</i>	100	Individual	2-5	85	72	84,0	44-58	325
				100	Individual	5-8	69	60	86,0	44-58	303
				100	Individual	8-12	9	0	0	-	-
				100	Coletivo	12	0	-	-	-	-
				100	Coletivo	16	0	-	-	-	-
Presente trabalho		Brasil	<i>L. cubensis</i>	80	Individual	1-3	29	11	37,9	35-36	78,4
				80	Individual	3-5	23	12	52,1	35-36	108,3
				80	Individual	5-10	0	-	-	-	-

Infecção dos hospedeiros vertebrados

As observações sobre o período pré-patente de *F. hepatica* em diferentes espécies de mamíferos foram conseguidas no decorrer do estudo do ciclo evolutivo, tendo *L. cubensis* como hospedeiro intermediário.

O número de dias necessário para o encontro de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos mamíferos infectados experimentalmente variou muito de espécie para espécie.

Como todos estes hospedeiros vertebrados foram mantidos nas mesmas condições ambientes em que vinham sendo criados, as variações de pré-patência inerentes a cada espécie não devem ter sido modificadas por fatores extrínsecos.

Comparando o período pré-patente observado nas infecções experimentais com metacercárias oriundas de *L. cubensis* (Quadro 4) com os dados encontrados em literatura para os diferentes hospedeiros intermediários (Quadro 10), observa-se uma quase identidade de resultados. As pequenas diferenças que aparecem não podem ser explicadas com segurança sem que novos experimentos sejam conduzidos com cada espécie de hospedeiro vertebrado.

Fica bem destacado, entretanto, que os períodos pré-patentes apresentados por Bacigalupo (1937) para cobaios está fora do consenso geral. A infecção de 5 cobaios com 25 a 130 metacercárias de *F. hepatica* realizada por Hoffman (1930) matou todos os receptores entre 23 e 33 dias de infectados e com marcada degeneração hepática. Os ensaios biológicos de Ueno et al. (1975), infectando cobaios com metacercárias coletadas na natureza, permitiram a obtenção de formas jovens de *F. hepatica* destes animais, necropsiados ao 25º dia da infecção. A demonstração experimental de liberação de formas imaturas migratórias de *F. hepatica* em cobaios que ingeriram "quistos maduros e úmidos" de *F. hepatica*,

realizada por Lutz (1921), causou a morte destes cobaios com peritonite sero-hemorrágica. Os trabalhos experimentais de Bacigalupo (1932, 1937) com infecção de cobaios, sem encontro de ovos de *F. hepatica* nas fezes destes mamíferos que morreram entre 27 e 45 dias, todos com intensas lesões hepáticas e um número variável de formas jovens do trematódeo, justificam bem a dúvida anteriormente exposta.

Na presente pesquisa conseguiu-se coletar, do fígado de cobaios infectados experimentalmente, helmintos adultos com ovos no útero. Nos 56 dias de observação, com exames de fezes de 12 em 12 horas, não se constatou a presença de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos hospedeiros. Em vista deste resultado, é possível que a pré-patência de 90 a 97 dias referida por Bacigalupo (1938, 1942) não corresponda exatamente ao início da produção de ovos pelo trematódeo nos cobaios.

Com relação à maior ou menor receptividade de cada espécie trabalhada a *F. hepatica* são necessários estudos complementares nas Américas do Sul e Central.

Criação de moluscos em laboratório

Nas condições laboratoriais, com temperatura ambiente de 27 a 29°C, a média do número de ovos (8,7) e o tamanho da postura (3 a 6 mm de diâmetro) de *L. cubensis* não coincidiu totalmente com os dados (3 a 5 mm) apresentados por Vergani (1955), na Venezuela. Embora a espécie de molusco tenha sido a mesma e ambas as criações tenham sido efetuadas em condições ambientes, não há concordância entre a faixa de variação e entre as médias do número de ovos por postura.

A média (15 ovos) citada por Vergani (1955) é quase o dobro da observada aqui (8,7). Entretanto, as posturas, que

BIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE DE *Lymnaea cubensis* A INFECÇÕES POR *Fasciola hepatica*Quadro 10. Resultados obtidos por diversos autores para o período pré-patente de *F. hepatica* em diferentes mamíferos

Hospedeiro vertebrado		Pré-patência (dias)	Autor, ano	Localidade	Hospedeiro intermediário
Nome científico	Nome vulgar				
<i>Bos taurus</i>	Vaca	71	Presente trabalho	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Orytolagus cuniculi</i>	Coelho	54-65	Bacigalupo, 1942	Argentina	<i>L. viatrix</i>
		54-56	Tagle, 1943	Chile	<i>L. viatrix</i>
		65	Presente trabalho	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Cavia porcellus</i>	Cobaio	97	Bacigalupo, 1942	Argentina	<i>L. viatrix</i>
<i>Rattus norvegicus</i>	Rato	51	Leon-Dancel, 1970	Porto Rico	<i>L. columella</i>
		41-44	Presente trabalho	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Mesocricetus auratus</i>	Hamster	33-34	Presente trabalho	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Mus musculus</i>	Camundongo	31	Leon-Dancel, 1970	Porto Rico	<i>L. columella</i>
		33	Gomes et al., 1974	Brasil	<i>L. columella</i>
		32-35	Presente trabalho	Brasil	<i>L. cubensis</i>

tendem a ter forma ovóide, são de tamanhos idênticos. Embora se tenha conhecimento de que o tamanho das posturas e o número de ovos são geneticamente determinados, outros fatores interferem nas posturas, e como Vergani (1955) não referiu a temperatura nem a idade dos moluscos, fica difícil explicar as diferenças nas massas de ovos.

Comparando as posturas de *L. columella*, estudadas por Leon-Dancel (1970) e Gomes et al. (1974), com as de *L. cubensis*, observaram-se diferenças tanto na forma como no tamanho da massa ovígera. Segundo estes autores, *L. columella* tem postura de forma alongada e com 4 a 12 por 3 a 5 mm.

A média de ovos por postura deixa claro que *L. columella* tem maior prolificidade que *L. cubensis*, sendo iguais os índices de eclodibilidade, e que os períodos de incubação são muito semelhantes e influenciados da mesma forma pela temperatura.

A temperatura constante da estufa parece ter sido fator responsável pelo menor espaço de tempo para eclosão dos moluscos (Quadro 4).

Os 18 dias necessários para a maturidade de *L. cubensis*, caracterizada pelo início da postura, embora os ovos só sejam férteis a partir do 20º dia, não concorda com os resultados obtidos por Gretillat (1967) em Martinica (34 dias) e por Vergani (1955) na Venezuela (20 a 25 dias).

Para *L. columella* (Gomes et al. 1974), a maturidade sexual é alcançada entre 19 a 24 dias, coincidindo com os resultados obtidos com *L. cubensis* também no Estado do Rio de Janeiro,

enquanto que Leon-Dancel (1970) observou ser de 21 a 23 dias, em Porto Rico. É válido ressaltar que *L. cubensis* iniciou a postura de ovos férteis no terceiro dia do início da postura (Quadro 5).

São poucas as referências encontradas, na América do Sul, sobre testes de resistência de moluscos e dessecação. Vergani (1955) expôs ovos e moluscos de tamanhos diferentes à dessecação, observando que alguns espécimes de *L. cubensis* foram capazes de sobreviver por 235 dias, ao passo que os ovos foram incapazes de resistir por mais de dois dias.

É importante que se destaque a correspondência entre os resultados de Vergani (1955) e os agora observados. Para os autores ficou explícito que ovos e adultos de *L. cubensis* com mais de 60 dias de idade não resistiram 40 dias de dessecação. Os 60% de moluscos de um dia de idade e os 14% com 30 dias de idade que sobreviveram ao teste, possivelmente, correspondem aos que Vergani (1955) reportou terem resistido por 235 dias. É bem provável que a reunião destes resultados esteja indicando serem os jovens de *L. cubensis* capazes de sobreviver em ambiente ressecado por mais ou menos 8 meses. Trabalhos posteriores poderão validar ou não esta hipótese. Também Leon-Dancel (1970) e Gomes et al. (1974) divulgaram que são os jovens de *L. columella* as únicas formas capazes de resistir a mais de 30 dias de dessecação. Entretanto, não se conhece ainda a capacidade máxima de sobrevivência desta espécie, bem como o percentual de indivíduos, por faixa etária, que continuam o desenvolvimento mesmo em ambiente ressecado.

Como se observou, *L. cubensis* é mais sensível à infecção por *F. hepatica*, porém o tempo para a emergência de cercárias é muito curto. É espécie bastante exigente quanto às condições ambientais (águas frias e límpidas) e, por isso, de distribuição geográfica restrita no Estado do Rio. Por outro lado, *L. columella*, em que o trematódeo evolui em mais tempo até a emergência de cercárias, apresenta elevado índice de sobrevivência às infecções por este helminto, tem larga distribuição geográfica, é pouco exigente quanto às condições ambientais, constituindo-se, por estas razões, no hospedeiro intermediário mais importante de *F. hepatica* no Estado do Rio de Janeiro.

Em relação aos índices de fasciolose bovina a campo no Brasil, nota-se uma grande deficiência de publicações, dificultando o conhecimento real da situação desta parasitose.

A observação de 35,8% de animais doentes entre 475 vacas leiteiras examinadas vivas, no foco estudado no município de Três Rios, através do exame de fezes pela técnica de Watanabe et al. (1953), parece ser a primeira citação da prevalência de fasciolose em animais a campo. Por isto mesmo, é necessário que se diferencie dos achados de França (1969), que encontrou 10,1% entre 941 bovinos do Vale do Paraíba abatidos no Matadouro Municipal de Taubaté, Estado de São Paulo, e de Rey (1957) que encontrou 2,24% em 714.545 bovinos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

- Bacigalupo J. 1932. Hallazgo en la ciudad de Buenos Aires de *Lymnaea viatrix* d'Orb., infectada espontaneamente com cercárias, de *Fasciola hepatica* L. *Revta Soc. Argent. Biol.* 8(7-8):511-513.
- Bacigalupo J. 1937. *Lymnaea viatrix* d'Orb. infectée par des cercaires de *Fasciola hepatica*, a Buenos Aires. *C. R. Seances Soc. Biol., Paris*, 111:828.
- Bacigalupo J. 1938. *Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo. *Revta. Med. Cubana* 4(4):203-206.
- Bacigalupo J. 1942. *Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo en la Republica Argentina. *Distomatosis hepatica. An. Fac. Vet. Uruguay* 4(1): 9-34.
- Baranski M.C., Silva R.F., Carneiro F^o M., Amaral D.F., Silveira H.B. & Magni N.R. 1978. Novo caso autóctone de fasciola hepatica humana no Brasil. XIV Congr. Soc. Med. Trop., III Congr. Soc. Bras. Parasitol., p. 388.
- França I. 1969. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. *Boletim do Campo* 230:21-22.
- Gajardo R.T., Apablaza H., Uribe P., Benavides I., Vargas A., Cepeda A., Rojas E., Zeldis A., Lucchini A. & Fuente J. 1950. Nuevos casos de distomatosis hepatica producidos por *Fasciola hepatica*. *Hosp. Vina del Mar* 6(4):71-121.
- Gomes P.A.C., Nuernberg S., Pimentel Neto M., Oliveira G.P., Rezende H.E.B., Araujo J.L.B. & Mello R.P. 1974. Infecção experimental de *Lymnaea columella* Say, 1817, com *Fasciola hepatica* L. 1758, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro. *Arqs Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro* 4(1):35-38.
- Gomes P.A.C., Nuernberg S., Pimentel Neto M., Oliveira G.P., Rezende H.E.B., Araujo J.L.B. & Mello R.P. 1975. Biologia da *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). *Arqs Mus. Nac., Rio de J.*, 55:67-70.
- Gretillat M.S. 1967. Prospections malacologiques aux Antilles françaises. Observations sur l'écologie et l'élevage au laboratoire de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer. *Rev. Elev. Vét. Pays Trop.* 20(2):279-289.
- Hoffman W.A. 1930. The intermediate host of *Fasciola hepatica*, in Porto Rico. *Puerto Rico J. Publ. Hlth* 6:89-90.
- Leon-Dancel D. 1970. Life history of *Lymnaea columella* (Say), and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.). *J. Agric. Univ. P. Rico* 54(2):297-305.
- Lutz A. 1921. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Bolm Inst. Oswaldo Cruz, Rio de J.*, 1(1):9-13.
- Pantelouris E.M. 1965. The commom liver-fluke *Fasciola hepatica* in New Zealand. Part. I. A spreading parasite in sheep and cattle. *N.Z. Vet. J.* 20:69-72.
- Ramires-Villamediana J.J. & Vergani F. 1949. Contribucion al estudio del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepatica* en Venezuela. *Revta Grancolomb.* 3(10-11-12):817-826.
- Rey L. 1957. *Fasciola hepatica* no gado, no Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. *Revta Bras. Malariol.* 9(4):473-483.
- Rey L. 1958. Primeiro encontro de ovos de *F. hepatica* em inquérito helmintológico de populações brasileiras (Campo Grande, Mato Grosso). *Revta Paulista Med.* 53:60.
- Rezende H.E.B., Araujo J.L.B., Gomes P.A.C., Nuernberg S., Pimentel Neto M., Oliveira G.P. & Mello R.P. 1973. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamarck, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). *Arqs Univ. Fed. Rural Rio de Janeiro* 3(1):21-23.
- Santos L. & Vieira T.F. 1965/67. Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana encontrados no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Revta Inst. Adolfo Lutz, S. Paulo*, 25/27:95-109.
- Tagle I. 1943. Observaciones sobre la evolucion de la *Fasciola hepatica* L. 1758. Comprobacion del huesped intermediario en Chile. *Revta Chil. Hist. Nat.* 46/47:232-241.
- Taylor E.L. & Mozley A. 1948. A culture method for *Lymnaea truncatula*. *Nature, London*, 161:894.
- Ueno H., Alvarez J.W.V., Mergen A.M.R. & Sanchez V.M. 1973. Observation on the prevalence of parasitic diseases in cattle, especially fascioliasis in the Dominican Republic. *Natl Inst. Anim. Hlth Quart.* 13:59-68.
- Ueno H., Arandia R.C., Morales G.L. & Medina G.M. 1975. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the Altiplano, region of Bolivia. *Natl Inst. Anim. Hlth Quart.* 15:61-67.
- Vergani F. 1955. Dados biológicos experimentales sobre el caracol, *Lymnaea (Galba) cubensis* P., 1911. *Bolm Inst. Invest. Vet., Caracas*, 7(23):34-55.
- Watanabe S., Nagayama F. & Iwata K. 1953. Simple detection technique for *Fasciola* ova. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 6:176-177.