

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *LYMNAEA COLUMELLA* POR *FASCIOLA HEPATICA*.

Marlene Tiduko Ueta *

RSPUB9/486

UETA, M. T. *Infecção experimental de Lymnaea columella por Fasciola hepatica.*
Rev. Saúde públ., S. Paulo, 14:43-57, 1980.

RESUMO: Os ovos de *F. hepatica* recolhidos em bilis de boi, fezes e em bilis de coelhos foram incubados a temperatura ambiente, dando origem a miracídios após 9 a 13 dias. Com estes miracídios recém-eclodidos foram infectados experimentalmente 233 exemplares de *L. columella* medindo 5,0 a 11,0 mm de comprimento. Das limneas infectadas apenas 3% sobreviveram até o desenvolvimento completo das cercárias. Houve formação de 190 a 1150 metacercárias entre o 46º ao 54º dia de infecção. Vários camundongos, ratos, cobaias e coelhos foram infectados com metacercárias de diferentes idades, mas somente os coelhos eliminaram ovos nas fezes 78 dias depois. Com a morte dos coelhos foram recuperados vermes adultos.

UNITERMOS: *Infecção de laboratório. Fasciola hepatica. Lymnaea columella.*

INTRODUÇÃO

O papel desempenhado pelos moluscos do gênero *Lymnaea* (Gastropoda, Lymnaeidae) na propagação da fasciolose tem sido discutido por diferentes autores. Vários trabalhos demonstraram a não exclusividade de *Lymnaea truncatula* como única espécie vetora (Taylor³⁵, 1922; Kendall^{14,15}, 1949, 1950; Roberts³², 1950; Boray⁵, 1973; Lang¹⁸, 1977). Outros verificaram experimentalmente (Krull¹⁶, 1933; Briceño-Rossi⁶, 1950; Mazzotti²³, 1955; Boray⁴, 1967) ou pelo achado de infecções naturais (Bacigalupo^{2,3}, 1932; Olsen²⁷, 1944) a maior ou menor suscetibilidade das diferentes espécies e linhagens de *Lymnaea* à *Fasciola hepatica*. Foram observados ainda que determinadas espécies de limneas,

apesar de serem facilmente infectadas, não sobreviviam suficientemente para permitirem o desenvolvimento de cercárias (Hofmann¹¹, 1930). Verificou-se também que algumas raças geográficas de limneideos, embora suscetíveis, não eram hospedeiras intermediárias competentes, o que limitava a distribuição da doença (Boray⁵, 1973).

A eficiência de *Lymnaea columella* como hospedeira intermediária de *F. hepatica* foi comprovada experimentalmente por vários autores (Krull¹⁷, 1933; León-Dancel²⁰, 1970; Rezende e col.³⁰, 1973; Gomes e col.⁹, 1974; Gonzales e col.¹⁰, 1974). Ao lado de infecções experimentais, há referências à infecção natural de *L. columella* por *F.*

* Do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP — Caixa Postal 1170 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

hepatica (Lutz²¹, 1921; Rezende e col.³⁰, 1973; Gonzales e col.¹⁰, 1974).

Neste trabalho são estudados os períodos de desenvolvimento do ovo de *F. hepatica* até a eclosão do miracídio; de desenvolvimento da larva no caramujo; e o tempo necessário para a eliminação de ovos pelas fezes de alguns vertebrados, após contaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a infecção experimental foram utilizados exemplares jovens de *L. columella* criados em laboratório, em água não clorada e alimentados com alface fresca. Foram utilizados caramujos medindo entre 5,0 e 11,0 mm.

Os ovos de *F. hepatica* foram colhidos em bilis de bois infectados naturalmente na região do vale do rio Paraíba do Sul (SP) e de bilis e fezes de coelhos infectados experimentalmente. Estes ovos foram lavados em água e guardados em geladeira até o início das observações.

Para estudo do desenvolvimento dos miracídios, os ovos foram colocados em uma placa de Petri de aproximadamente 9,0 cm de diâmetro contendo cerca de 40 ml de água de torneira, sem cloro, e mantidos a temperatura ambiente. Durante o período de observação foram anotados os valores médios da temperatura ambiente. Diariamente, de manhã e à tarde, as placas eram examinadas à lupa estereoscópica para verificação da eclosão.

As infecções das limneas foram feitas individualmente com 2 a 5 miracídios recém eclodidos. Os pequenos frascos com miracídios e limnea foram colocados sob uma lâmpada de 40 w a 40,0 cm de distância, por um período variável de 3 ou 4 horas. Após esse período de exposição à luz, os caramujos foram colocados em beakers ou pequenos cristalizadores.

Para a obtenção das metacercárias, os caramujos foram colocados em uma placa

de Petri contendo água e pequenos fragmentos de graminea. Vinte e duas horas após o encistamento oferecemos metacercárias aos vertebrados utilizados no experimento. Outras metacercárias foram guardadas em geladeira, para serem posteriormente retiradas algumas horas antes de serem usadas.

Como hospedeiros vertebrados foram utilizados camundongos, ratos, cobaias e coelhos. Trinta e sete camundongos com pesos acima de 12g foram infectados com uma metacercária, excetuando-se 5 camundongos que receberam 2 metacercárias cada um. As metacercárias foram cuidadosamente descoladas do fundo da placa de Petri e com auxílio de uma pipeta depositadas na cavidade bucal do roedor. As idades das metacercárias variaram de 20 horas a 79 dias.

Neste mesmo período e utilizando-se a mesma técnica foram infectados 21 ratos albinos com 3 ou 5 metacercárias com mais de 22 horas. Decorridos cerca de 4 meses da primeira infecção, 10 ratos foram reinfectados com 5 metacercárias de aproximadamente 110 dias.

Dois coelhos, pesando entre 2,0 a 2,5 Kg, foram infectados com 5 metacercárias de 4 dias de idade, presas a gramineas. Como os resultados fossem negativos, após decorridos aproximadamente 6 meses da primeira infecção, reinfectamos os dois coelhos com 10 metacercárias cada um, também de 4 dias de idade. Desta vez foram utilizadas metacercárias obtidas de infecção natural de limnea coletada em Piquete (SP).

Oito cobaias foram infectadas com 3 a 5 metacercárias de 70 a 100 dias de idade por intermédio da ingestão de gramineas contaminadas.

Decorridos 1 a 3 meses do início da ingestão de metacercárias, foram iniciados exames de fezes dos animais infectados para pesquisa de ovos de *F. hepatica*.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão registrados os valores da temperatura ambiente. Estão também assinalados a procedência dos ovos, o período de observação e o número de dias necessários para o início de eclosão dos miracídeos.

Os miracídeos provenientes de ovos colhidos em bilis de bovinos do Vale do Paraíba,

com exceção de um lote, começaram a eclodir, na maioria das vezes, a partir do 9º dia, com eclosão de maior número de miracídeos entre o 10º e 13º dias. Um lote apresentou maior eclosão no 17º dia. A única exceção foi constatada durante as observações iniciadas em maio de 1978, quando os miracídeos começaram a eclodir após 19 dias, atingindo o ápice da eclosão somente no 31º dia. A temperatura ambien-

TABELA 1

Período de desenvolvimento dos ovos e eclosão dos miracídeos de *Fasciola hepatica*.

Período de observação	Média temperatura ambiente (°C) durante o experimento,	Procedência dos ovos	Nº dias para início da eclosão dos miracídeos	Nº dias para eclosão máxima dos miracídeos	Nº total de dias observados
18/11/76 a 03/12/76	26,64	bilis boi	9	12	15
27/05/77 a 16/06/77	23,77	bilis boi	10	10 e 12	20
25/06/77 a 18/07/77	25,37	bilis boi	9	10 e 13	23
24/09/77 a 10/10/77	25,46	fezes coelho	16	—	16
08/10/77 a 12/12/77	26,33	bilis coelho	28	—	65
22/10/77 a 21/11/77	26,82	fezes coelho	—	—	30
05/11/77 a 12/12/77	25,95	bilis coelho	16	—	37
25/11/77 a 10/01/78	25,52	fezes coelho	—	—	46
12/12/77 a 23/12/77	25,24	bilis boi	11	11	11
12/12/77 a 03/01/78	25,16	fezes coelho	16	—	22
19/12/77 a 10/01/78	25,34	bilis coelho	15	15	22
31/03/78 a 25/04/78	25,78	bilis boi	9	11, 12, 17	25
31/03/78 a 26/05/78	25,13	bilis coelho	—	—	56
26/05/78 a 27/07/78	23,56	bilis coelho	—	—	62
26/05/78 a 27/07/78	23,56	bilis boi	19	31	62

te média durante este período foi semelhante a da observação de maio de 1977, ocasião em que os ovos iniciaram a eclosão em 10 dias, com o máximo atingido nos 10º e 12º dias.

Nas quatro tentativas de obtenção de miracídios de *F. hepatica* a partir dos ovos recolhidos de fezes de dois coelhos, duas resultaram infrutíferas e em outras duas os miracídios somente iniciaram a eclosão a partir do 16º dia, apesar da temperatura ambiente média não ter sido muito diferente daquela registrada durante o desenvolvimento dos ovos de bilis de bovinos. Neste caso, aparentemente a idade dos ovos pareceu não ter tido influência na eclosão dos miracídios, pois foram postos a desenvolver ovos com 2 a 4 dias após eliminação nas fezes e outros com cerca de 2 meses e meio. Estes últimos originaram miracídios na mesma época e na mesma proporção dos ovos de 2 dias. As duas tentativas, mal sucedidas, de eclosão de miracídios foram realizadas com ovos encontrados nas fezes de um mesmo coelho, colhidos em épocas diferentes de infecção, havendo quase um mês de intervalo entre as duas coletas de fezes.

Da vesícula biliar dos coelhos foram recolhidos ovos que eclodiram ao redor do 15º dia, mas em um lote a eclosão iniciou somente no 28º dia. Os ovos permaneceram viáveis, pelo menos, por 40 dias depois de retirados da vesícula biliar e conservados em geladeira. Os ovos postos para observação após 6 a 8 meses da coleta não eliminaram miracídios, embora os coletados há 6 meses tivessem iniciado a divisão celular. O mesmo não aconteceu com os ovos recolhidos da vesícula biliar há 8 meses, que não mostraram sinais de divisão celular.

Os miracídios de *F. hepatica* nadaram ativamente na água, à temperatura ambiente, por um período de 6 a 7 horas aproximadamente. Após 9 horas a maior parte dos miracídios estava morta e decorridas 11 horas da eclosão somente alguns continuavam em movimento.

Com os miracídios eclodidos de ovos provenientes de bilis de bovinos do Vale do Paraíba, foram infectados 233 *L. columella* em diferentes ocasiões. Desse total de caramujos infectados a maior percentagem de mortos (23%) ocorreu nos primeiros 10 dias do início da infecção. O número de caramujos mortos continuou relativamente grande até o 30º dia de infecção (percentagem variando entre 19% e 17%), diminuiu muito entre o 30º e 40º dias (8%), tornando a aumentar entre o 40º e 50º dias (16%). Este último período correspondeu à época da presença de rédias e cercárias na região do hepatopâncreas do caramujo. A grande maioria das limneas infectadas não sobreviveu tempo suficiente até a eliminação de cercárias, sendo que somente 6 exemplares (3%) forneceram cercárias. A percentagem de limneas mortas em diferentes idades de infecção, antes de se completar o desenvolvimento do parasita, foi de 84%. Alguns caramujos expostos aos miracídios de *F. hepatica* (11%) não apresentaram evidências de infecção após 30 ou 40 dias. Se não se considerar as exposições de limneas a miracídios realizadas de maio a julho de 1978, quando a quase totalidade das limneas não se infectou, a percentagem de caramujos infectados foi de 99%. O insucesso da tentativa de infecção de limneas, levada a efeito entre maio e julho de 1978, poderia ser atribuída a vários fatores, inclusive, talvez, a um fenômeno relacionado com o pequeno poder de penetração dos miracídios oriundos de ovos já colhidos e separados há muito tempo ou devida a suscetibilidades individuais de caramujos e miracídios.

Em decorrência do pequeno número de miracídios obtidos de fezes de coelhos, a infecção foi feita sempre com reduzido número de larvas por molusco. Desse modo foram infectados, com miracídios desta proveniência, somente 4 limneídeos, sendo que um morreu antes de atingir o 30º dia e os outros três não mostraram sinais de infecção mesmo após 35 dias.

Dos ovos colhidos em bilis de coelhos eclodiram vários miracídios, que foram usados para infectar 30 limneas. Dessas limneas, todas que se infectaram morreram antes de dar origem a cercárias, e uma boa parcela, cerca de 33%, não mostrou sinal de infecção, mesmo após 20 dias da exposição.

As cercárias, após saírem das rédias, permaneceram por vários dias na região do hepatopâncreas.

Apesar de constantes exposições à luz depois do 40º dia de infecção, por um período de 2 horas, os caramujos não eliminaram cercárias. As cercárias, em nosso laboratório, não chegaram a ser eliminadas espontaneamente, mas somente conseguiram sair quando os caramujos foram retirados da concha.

A maior parte das cercárias, obtidas entre 46º a 54º dias de infecção, encistou

em menos de 15 minutos no fundo da placa de Petri. Poucos encistaram no ramo de capim colocado na placa.

As metacercárias, logo que se formaram eram brancas e depois tornaram-se gradativamente mais amarelas até adquirirem a cor amarela-alaranjada, ocasião em que a capa protetora da metacercária já estava bem consistente.

O número de metacercárias formadas foi de cerca de 200 em um caramujo infectado com 2 miracídios; de aproximadamente 190, em um exposto a 3 miracídios, e cerca de 1150, em outro exposto a 5 miracídios.

As metacercárias somente começaram a ser usadas para infecção dos roedores e coelhos após cerca de 22 horas do encistamento. Verificou-se, em nosso laboratório, que a viabilidade das metacercárias guardadas em geladeira foi de cerca de 4 meses.

TABELA 2

Animais infectados experimentalmente com metacercárias de *Fasciola hepatica*.

Data da infecção	animais	nº de animais	nº de metacercárias	vias de ingestão das metacercárias	idade das metacercárias
12/01/77	ratos	5	3	água	22 h
12/01/77	camundongos	5 (12 — 14 g)	1	água	22 h
12/01/77	camundongos	5 (16 — 18 g)	1	água	23 h
14/01/77	ratos	5	3	água	3 dias
19/01/77	coelhos	2	5	capim	4 dias
21/01/77	ratos	5	5	água	10 dias
21/01/77	camundongos	5 (12 — 14 g)	1	água	6 dias
21/01/77	camundongos	5 (16 — 18 g)	1	água	3 dias
31/01/77	camundongos	5 (12 — 14 g)	1	água	20 dias
31/01/77	camundongos	5 (16 — 18 g)	1	água	15 dias
31/01/77	camundongos	5 (> 18 g)	2	água	13 dias
11/03/77	ratos	6	3	alface	52 dias
29/03/77	cobaias	4	3 e 5	alface	70 dias
07/04/77	camundongos	2 (12 — 14 g)	1	água	79 dias
03/05/77	cobaias	4	5	alface	105 dias
10/05/77	ratos	10 (reinfecção)	5	alface	112 dias
05/07/77	coelhos	2 (reinfecção)	10	capim	4 dias

A Tabela 2 registra o número de animais usados para infecção, bem como o número de metacercárias ingeridas.

As fezes dos camundongos que ingeriram metacercárias, começaram a ser examinadas entre o 34º e 38º dias, apresentando-se sempre negativas. Alguns camundongos eliminaram ovos muito semelhantes aos de *F. hepatica*, mas sem embrião, entre o 70º e 73º dias.

Entre o 28º e 35º dias morreram 3 camundongos, e os restantes foram sacrificados posteriormente. Examinando-se as vísceras desses camundongos não foram constatados quaisquer sinais de infecção.

Os primeiros ratos foram sacrificados após quase 4 meses, com resultados negativos no fígado e nas fezes.

A partir de aproximadamente 3 meses foram feitos exames nas fezes dos demais ratos, cobaias e coelhos, sendo todos negativos para ovos de *F. hepatica*.

Cerca de 5 meses e meio após a ingestão das metacercárias, todos os animais, exceto os coelhos, estavam mortos ou sacrificados. Em nenhum destes animais foram encontrados ovos nas fezes, ou fascíolas no fígado.

Os coelhos que foram reinfetados com metacercárias oriundas de molusco naturalmente infectado estavam eliminando ovos nas fezes após 78 dias. Um dos coelhos morreu com pouco menos de 3 meses de reinfecção, sendo recuperados 6 vermes no fígado. Estes vermes eram grandes, medindo em média 23,4 por 7,9 mm, com a glândula vitelínica de cor clara. O outro coelho morreu cerca de 5 meses e meio após a reinfecção, obtendo-se somente 2 vermes bem desenvolvidos, com um deles eliminando ovos, espontaneamente, em solução fisiológica. Estes vermes eram maiores que os obtidos no primeiro coelho, medindo em média 24,7 por 10,0 mm, com coloração escura da glândula vitelínica.

Do total de 68 animais que ingeriram metacercárias, somente dois coelhos mostraram-se positivos na reinfecção.

DISCUSSÃO

O início de eclosão de miracídio de *F. hepatica* em nossa experiência, ocorreu entre 9º e 16º dias, com temperatura ambiente de 23,8º a 26,6ºC, coincidindo com as observações de vários autores (Roberts³², 1950; Briceño-Rossi⁶, 1950; Rey³¹, 1957; León-Dancel²⁰, 1970; Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, 1963; Gomes e col.⁹, 1974; Gonzales e col.¹⁰, 1974; Nice e Wilson²⁴, 1974; Whitlock e col.³⁶, 1976). Nossos ovos não foram incubados em estufa a uma temperatura constante, nem foram colocados no escuro.

Para temperaturas médias que variaram de 26,3º a 23,5ºC o início da eclosão dos miracídios, em um lote, registrou-se a partir do 28º dia para ovos colhidos em bilis de coelho, e o ápice de eclosão de miracídios em um lote de ovos provenientes de bilis de boi foi verificada no 31º dia. No entanto, a literatura cita valores semelhantes apenas para temperaturas mais baixas como 17ºC (Roberts³², 1950) e 11º e 18ºC (Rey³¹, 1957).

Briceño-Rossi⁶ (1950) verificou que, nas mesmas condições, foi variável o número de dias requeridos para o início da eclosão dos miracídios de *F. hepatica* provenientes de fígado de boi e de fezes de pacientes. Referiu ainda que houve diferença de viabilidade de ovos de *F. hepatica* com relação a sua origem. Os ovos de *F. hepatica* colhidos em fezes humanas, segundo este autor, quando colocados nas mesmas condições que os de origem bovina, não fertilizam, ou o fazem em escassa quantidade.

Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹² (1977), comparando o número e a viabilidade dos ovos de *F. hepatica* encontrados em vesícula biliar de vacas, ovelhas e cabras, chegaram a conclusão de que, tomando-se como grau de parasitismo o número de ovos que aparecem na bilis, as vacas foram as mais parasitadas e maior número de seus ovos mostraram capacidade de desenvolver miracídio. Mas, o índice de viabilidade (quociente entre número de ovos

com miracídio liberado e o número total de ovos) dos ovos de bilis de ovelhas foi maior que os de bilis de vaca e cabras.

Os miracídios obtidos na nossa experiência permaneceram em movimento ativo por um período muito maior que o relatado por León-Dancel²⁰ (1970), Gomes e col.⁹ (1974) e Christensen e col.⁷ (1976), mas ligeiramente inferior ao citado por Rey³¹ (1957). Pantelouris²⁸ (1965) citou, em seu livro, que alguns autores registraram sobrevivência de miracídios por 5,30 horas a 27°C e 6 a 8 horas a 30°C, ou até mesmo sobrevivência por 40 horas, apesar da atividade diminuir com o tempo. A esse respeito Pantelouris²⁸ (1965) observou que essas discrepâncias poderiam ser devidas a diferenças locais de cepas de *F. hepatica* ou devidas a diferenças de oxigenação, pH ou salinidade da água.

O problema da idade e do tamanho das limneas na época da infecção pelos miracídios é uma questão que tem sido discutida por vários autores.

Roberts³² (1950) utilizou nas suas experiências sobre infecção experimental de *F. hepatica* exemplares de *L. truncatula* medindo 2,5 mm de comprimento, apesar de ter encontrado caramujos de todos os tamanhos naturalmente infectados. Segundo este autor foram escolhidos caramujos de 2,5 mm de comprimento para contrabalançar a alta mortalidade entre caramujos menores de 2,5 mm e a aparente relutância do miracídio em penetrar tecidos de caramujos maiores que 6,0 mm. Mas, Christensen e col.⁷ (1976) aparentemente não encontraram dificuldades ao empregarem em seus estudos exemplares de *L. truncatula* medindo 4,0 a 6,0 mm de comprimento. Embora Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹³ (1977) não tenham se referido ao tamanho de *L. (Galba) truncatula* estudaram a influência da idade das limneas na infecção pela *F. hepatica*. Nesta pesquisa os autores constataram a dificuldade de infectar limneas muito pequenas com 1 ou 2 semanas de idade, pois estas ou não se infec-

tavam ou morriam antes da liberação das cercárias. Desse modo aconselharam a utilização de limneas de idade maior que 1 ou 2 semanas, de preferência a partir da quarta semana de vida.

Kendall¹⁵ (1950) observou que miracídios de *F. hepatica* atacavam exemplares de *L. stagnalis* de todos os tamanhos, mas a infecção não persistia em caramujos maiores e mais velhos, havendo desenvolvimento de rédias apenas nos menores indivíduos de cada grupo.

Quanto a *L. columella*, preferimos adotar aproximadamente o tamanho utilizado por León-Dancel²⁰ (1970) e Gomes e col.⁹ (1974), que já haviam sido bem sucedidos empregando limneas de 8,0-10,0 mm e 7,0-9,0 mm (com 24 a 35 dias de idade) de comprimento, respectivamente.

Ainda a respeito do tamanho da limnea infectada, Ollerenshaw²⁵ (1971) afirmou que, na natureza, a determinação do nível de infecção é de pouco valor do ponto de vista da epidemiologia da fasciolose. Um fator importante é o tamanho da população, se bem que uma população grande de caramujos não seja necessariamente condição prévia de alta incidência de doença. Outro fator importante é o tamanho do caramujo infectado, que quando maior e bem alimentado, produz mais cercárias, podendo aumentar consideravelmente o número de rédias que se desenvolvem em exemplares maiores. O que importa, efetivamente, na disseminação da fasciolose em uma dada região é, segundo Ollerenshaw²⁵ (1971), o número absoluto e o tamanho dos caramujos infectados.

O número de parasitas presentes, representado pelo número de esporocistos e rédias, bem como o tempo necessário para o desenvolvimento da larva até a emergência de cercárias, variam com as espécies de *Lymnaea* e com as condições externas. Kendall¹⁵ (1950) notou que é raro encontrar mais de um esporocisto em *L. palustris* jovem, enquanto *L. truncatula* da mesma idade e infectada nas mesmas condições,

desenvolveu 30 esporocistos. Em disseções feitas mais tarde em exemplares de *L. palustris* e *L. glabra* foram observadas 30 rédias bem desenvolvidas, enquanto que *L. truncatula* nas mesmas condições apresentou 150-300 rédias. O desenvolvimento de cercárias completando-se entre 28º a 35º dias foi assinalado em exemplares de *L. tomentosa* (Boray⁴, 1967; Whitlock e col.³⁶, 1976) à temperatura de 22º a 24ºC. Em *L. cubensis*, as cercárias desenvolveram em tempo menor, de 26º a 27º dias (Briceño-Rossi⁶, 1950), embora Rezende e col.³⁰ (1973) tenham referido somente 20 dias para a formação de cercárias. Rey³¹ (1957) citou um período de 35 a 98 dias para a evolução dos esporocistos até cercárias, sem no entanto fazer referências à emergência de cercárias neste período.

Krull¹⁷ (1933) relatou em *L. columella* a presença de rédias, contendo rédias filhas, um mês após infecção e León-Dancel²⁰ (1970) também assinalou a presença de rédias decorrido um mês da infecção, mas não fez referências a rédias filhas. Rezende e col.³⁰ (1973) constataram a formação de rédias mães em *L. columella* com somente 9 dias de infecção e de rédias filhas aos 20 dias, constatando presença de cercárias entre 30º a 33º dias. Gonzales e col.¹⁰ (1974) registraram o encontro de formas de rédias 42 dias após a infecção. Na nossa experiência, não observamos formação de rédias filhas.

Em relação a presença de rédias de 1ª e 2ª gerações na infecção experimental de *F. hepatica*, Maldonado²² (1965) relatou que não há uma regra para a formação de rédias filhas e observou a presença de rédias filhas e cercárias em uma mesma rédia mãe. Wright³⁷ (1971) afirmou que na Grã-Bretanha, em condições naturais, as rédias filhas são produzidas freqüentemente, mas *L. truncatula* infectada, mantida em laboratório, não mostrou evidência de produção de segunda geração de rédias. Estudando a formação de rédias filhas, Wright³⁷ (1971) chegou a conclusão, por meio de experiências, que o desenvolvimen-

to da 2ª geração de rédias em *F. hepatica* é inibida em temperaturas anormalmente altas.

Taylor³⁴ (1965), assinalando o aparecimento de rédias filhas em certas condições desfavoráveis, sugeriu influência das variações sazonais para a formação de 2ª geração de rédias. Afirmou, no entanto, que não se conhecem exatamente as razões que levam ao aparecimento destas rédias. Relatou ainda a produção mais freqüente de rédias de 2ª geração no final do verão.

Roberts³² (1950) citando o trabalho de Ross e McKay (1929), relatou a produção de um grande número de rédias filhas durante o verão. Sugeriu que o principal efeito de temperaturas altas é permitir a regeneração da glândula digestiva, de modo a favorecer a disponibilidade de alimento para o parasita e conseqüentemente produção maior de cercárias.

Bacigalupo¹ (1938) assinalou, uma única vez em *L. viatrix* a presença de rédias filhas durante o inverno. Segundo este autor esta seria uma das diferenças entre *L. viatrix* e as outras espécies de *Lymnaea* que servem de hospedeiros intermediários a *F. hepatica*, pois nestas últimas foi demonstrado o desenvolvimento de rédias filhas no verão, e de cercárias no inverno.

A emergência de cercárias foi observada a partir do 30º dia (Rezende e col.³⁰, 1973) para *L. cubensis*. Entretanto, vários autores observaram em outras espécies, emergência entre 32º a 42º dias à temperatura de 25ºC (Krull¹⁶, 1933; Roberts³², 1950; Taylor³⁴, 1965; Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, 1963; Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹³ (1977). Bacigalupo¹ (1938) citou emergência espontânea entre 57º a 80º dias para *L. viatrix*. Kendall^{14,15} (1949, 1950) também registrou tempo mais longo para emergência, de 3 a 4 meses, para 3 espécies de *Lymnaea*.

A emergência de cercárias verificada por nós, entre o 46º a 54º dias, está de acordo com o obtido por outros autores que trabalharam com *L. columella* (Krull¹⁷, 1933;

Rezende e col.³⁰, 1973; Gomes e col.⁹, 1974). León-Dancel²⁰ (1970), no entanto, constatou a eliminação de cercárias 57 a 60 dias após infecção, mostrando, portanto, uma evolução ligeiramente mais lenta que a observada por nós. Na nossa experiência, as cercárias não emergiram espontaneamente, o que confirmou a observação de Lutz²¹ (1921) que viu que as cercárias se acumulavam no ápice da concha, esperando a morte do hospedeiro e logo que o corpo se desprendia da casca ou quando se quebrava o ápice, as cercárias saíam e encistavam em objetos sólidos.

As nossas cercárias não foram liberadas imediatamente após terem saído das rédias, o que confirmou a observação de Maldonado²² (1965) que mencionou o transcurso de um tempo considerável entre o nascimento da cercária e o momento dela estar pronta para deixar o caramujo. Segundo Maldonado²² (1965), aparentemente, durante este tempo ocorre algum processo de maturação fisiológica, uma vez que não há diferença estrutural entre uma e outra forma.

Na nossa experiência, em infecções com 2 a 5 miracídeos, a percentagem de caramujos mortos antes da eliminação de cercárias foi muito alta, obtendo-se pouquíssimos exemplares que se mantiveram infectados e sobreviveram tempo suficiente até as cercárias completarem seu desenvolvimento. Além disso, a percentagem de limneas que não se infectou foi relativamente alta, principalmente se levarmos em consideração o fato de que não houve infecção positiva em todo um lote. Porém, a nossa taxa de não infecção foi menor que a encontrada por Krull¹⁷ (1933) que foi de 17,3% também para *L. columella*.

Trabalhando com *L. columella* León-Dancel²⁰ (1970) observou que quando os caramujos eram expostos a um número reduzido de miracídeos variando de 2 a 4 e 4 a 6, a percentagem de mortos foi de 20,0% e 41,0%, respectivamente, enquanto que os expostos a um número de 6 a 10 miracídeos morriam antes da eliminação de

cercárias. As infecções em massa realizadas com 10 a 16 miracídeos por caramujo, também resultaram mortais para os caramujos, não chegando a produzir cercárias. No entanto, Gomes e col.⁹ (1974), trabalhando com *L. columella* em condições semelhantes as de León-Dancel²⁰ (1970), obtiveram um índice de mortalidade mais baixo, de 15,0% para caramujos expostos a 2-5 miracídeos. E para caramujos expostos a um número variável de 5 a 8 miracídeos, o índice de mortalidade foi de 31,0%. Para os infectados em massa, empregando-se em média 12 a 16 miracídeos por hospedeiro, não foi observada sobrevivência dos caramujos por tempo suficiente para eliminação de cercárias, o que concorda com o relatado por León-Dancel²⁰ (1970). Se compararmos os resultados obtidos por estes dois autores, as nossas percentagens de caramujos mortos foi extremamente alta (84,15%), apesar de termos utilizado pequeno número de miracídeos.

Alta percentagem de morte entre os caramujos infectados, antes da eliminação de cercárias foi assinalada por Krull¹⁶ (1933) que observou 62,5% de morte e por Hoffman¹¹ (1930) quando notou que os exemplares de *L. cubensis* apesar de facilmente infectados, não sobreviviam tempo suficientemente longo para permitir desenvolvimento de cercárias. A não eliminação de cercárias pelas limneas infectadas foi relatada por Krull¹⁶ (1933) em uma infecção experimental em *Fossaria modicella*. Esta não eliminação de cercárias foi explicada pelo autor como devida à completa destruição do hepatopâncreas muito antes da maturação de qualquer cercária em virtude de uma quantidade muito grande de parasitas.

É interessante observar que apesar da percentagem alta de morte dos caramujos infectados na experiência realizada por Krull¹⁶ (1933) a percentagem de não infecção foi bastante baixa, de apenas 5%.

Na fase final da nossa experiência, os poucos caramujos sobreviventes já estavam moribundos, de modo que os animais foram retirados das conchas e as cercárias que

já estavam fora das rédias há bastante tempo foram libertadas e logo depois encistaram.

A quantidade de cercárias obtidas a partir de infecção por grande número de miracídios de *F. hepatica* variou desde 44 cercárias por dia, com média diária de 5 cercárias por caramujo (Krull¹⁶, 1933) a 156 cercárias em 24 horas (Kendall^{14,15}, 1949, 1950). Em infecções com 5 a 10 miracídios foram obtidos de 476 a 544 cercárias que emergiram de cada caramujo (Roberts³², 1950) e uma média de 142,55 a 312,46 cercárias por caramujo em 24 horas (Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹³, 1977).

Segundo Krull¹⁶ (1933) a emergência de cercárias foi errática e algumas vezes decorriam muitos dias sem que houvesse liberação de nenhuma cercária. A experiência de Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹³ (1977) comprovou o início de emergência de cercárias a partir da 6ª semana após infecção, havendo maior liberação na 8ª semana.

A respeito do número de cercárias produzidas por *L. columella*, Krull¹⁷ (1933) infectando em massa, observou que o maior número de cercárias eliminadas por um caramujo em um único dia foi 161. Em uma limnea que expeliu cercárias por dois dias, quando examinada mostrou no hepatopâncreas 241 rédias e 356 cercárias maduras.

Em 1970, Léon-Dancel²⁰ verificou que *L. columella* infectadas com 2 a 4 miracídios produziram em média 312 metacercárias e os infectados com 4 a 6 miracídios uma média de 298 metacercárias. Observou ainda que todos os caramujos morreram 2 a 6 dias depois de terem eliminado as cercárias. Gomes e col.⁹ (1974) conseguiram obter uma média de 335 metacercárias em exemplares infectados com 2 a 5 miracídios e média de 303 metacercárias com 5 a 8 miracídios. Todos os infectados morreram 3 a 7 dias após a emergência das cercárias.

Nossos dados mostraram-se inferiores aos dos dois autores acima citados para infecções com 2 e 3 miracídios, mas muito superiores para infecção com 5 miracídios, até mesmo superiores ao número obtido por Roberts³² (1950) em *L. truncatula* com 5 miracídios. Isto provavelmente porque nossos números referem-se a dados individuais e não à média. Não pudemos comparar nossos resultados com os de Krull¹⁷ (1933) porque nas infecções em massa nossos caramujos morreram antes de permitir o desenvolvimento de rédias e como não obtivemos liberação espontânea de cercárias não houve possibilidade de verificarmos o número de cercárias libertadas em um dia.

Sob o ponto de vista da duração da infecção em diferentes espécies de *Lymnaea*, Kendall¹⁵ (1950) assinalou na Inglaterra a persistência da infecção em *L. truncatula* durante toda a vida, até a morte do caramujo. No entanto, *L. stagnalis* conseguiu livrar-se da infecção após a liberação de certo número de cercárias. Observações posteriores nesta mesma espécie sugeriram que a infecção foi mantida durante 3 meses aproximadamente, quando umas poucas rédias não desenvolvidas puderam ser encontradas em caramujos que anteriormente continham grande número de cercárias maduras.

A morte de exemplares de *L. truncatula* infectada foi assinalada também por Roberts³² (1950) que verificou que a emergência de cercárias se processava durante um período de 2 a 8 dias, com morte sobrevivendo 8 dias após o início da eliminação das larvas. Observou ainda que *L. truncatula* infectada morria invariavelmente, em laboratório e em campo, depois de ter eliminado um certo número de cercárias. Jimenez-Albarran e Guevara-Pozo¹³ (1977) relataram um período maior de eliminação de cercárias e também sobrevivência mais longa, pois observaram o início da eliminação de cercárias na 6ª semana, atingindo maior número de emergências na 8ª semana. A morte de *L. truncatula* ocorreu

a partir da 12ª semana de infecção. A literatura disponível registra que morte de *L. columella* ocorre pouco tempo depois da eliminação de cercárias, mas não faz referências quanto a cura espontânea da infecção.

Em nosso experimento as cercárias encistaram-se em menos de 15 min., o que corrobora a opinião de Hoffman¹¹ (1930) de que as cercárias de *F. hepatica* encistam quase imediatamente nos recipientes que contêm os caramujos. O encistamento das cercárias ocorrendo entre 15 a 20 min. raramente ultrapassando 30 min. foi assinalado por Bacigalupo^{2,3} (1932, 1938); León-Dancel²⁰ (1970); Gomes e col.⁹ (1974). Um período mais longo para encistamento foi citado por Rey³¹ (1957) que assinalou formação de metacercárias em poucas horas e por Taylor³⁴ (1965) que referiu um período de 15 min. a uma hora.

O encistamento se dá em objetos e raramente na água (Bacigalupo^{2,3}, 1938), mas Krull¹⁶ (1933) relatou o encontro de metacercárias também na superfície da água e Roberts³² (1950) assinalou que 60% das cercárias de *F. hepatica* obtidas de *L. truncatula* encistaram no menisco da água, 25% flutuaram na superfície da água e 15% no fundo do recipiente.

Hoffman¹¹ (1930) e Mazzotti²³ (1955) utilizaram metacercárias para ingestão por cobaias, aproximadamente 24 horas após o encistamento obtendo resultados positivos. Taylor³⁴ (1965) afirmou que as metacercárias se tornavam infectantes em 2 ou 3 dias. Esta pode ter sido uma das causas do insucesso da nossa primeira série de infecções, quando usamos metacercárias com pouco menos de 24 h do encistamento e somente obtivemos êxito quando empregamos metacercárias com 4 dias de idade. Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, 1963) armazenou metacercárias em geladeira por uma semana antes de usá-las para infectar animais e usava somente as viáveis, isto é, aquelas que exibiam glândulas cistogênicas pareadas. No entanto, Standen observou que as metacercárias po-

dem permanecer vivas por muitos meses (comprovação feita através de uma infecção bem sucedida em camundongos, após 18 meses de armazenamento), mas a proporção de metacercárias viáveis começa a decrescer após 3 ou 4 meses. Rajasekariah e Howell²⁹ (1977) também usaram metacercárias armazenadas a 4°C após confirmarem a viabilidade através dos grânulos excretos refráteis.

Ollerenshaw²⁵ (1971) relatou a sobrevivência, por uns meses, das metacercárias durante o inverno, no campo, de modo que quase toda a vegetação infectada, provavelmente é consumida, no outono ou no inverno, concorrendo assim para a manutenção dos focos de fasciolose. Rey³¹ (1957) salientou que as metacercárias resistem por algumas semanas nas forragens secas e até um ano nas forragens úmidas, permanecendo vivas na água até 80 dias à temperatura de 22° e 31°C.

Alguns vertebrados de pequeno porte foram utilizados por vários autores para infecção experimental de *F. hepatica*, como o camundongo (León-Dancel²⁰, 1970; Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, 1963; Gomes e col.⁹, 1974), ratos (León-Dancel²⁰, 1970; Rajasekariah e Howell²⁹, 1977) e cobaias (Lutz²¹, 1921; Hoffman¹¹, 1930; Bacigalupo^{2,3}, 1932; Mazzotti²³, 1955). Infecções em coelhos foram assinaladas por Krull¹⁶ (1933), e Dacal⁸ (1979).

Com relação a infecção experimental de *F. hepatica* em cobaias, Lutz²¹ (1921) demonstrou que metacercárias maduras, quando ingeridas úmidas, davam origem a distômulos e que após alguns dias as cobaias morriam com peritonite sero-hemorrágica, podendo-se encontrar os distômulos no fígado e na cavidade peritoneal. Hoffman¹¹ (1930) infectou 5 cobaias com 25 a 130 metacercárias e após um período de 23 a 33 dias de infecção obteve, com a morte das cobaias, adultos jovens de *F. hepatica* havendo grande degeneração do fígado. Bacigalupo^{2,3} (1932) em duas experiências distintas infectando 4 cobaias de cada vez com um número variável de metacercárias,

obteve pequenos parasitas no peritônio ou no fígado. Observou com a morte das cobaias, ocorrida após 27 a 45 dias, lesões hepáticas intensas. Mazzotti²³ (1955), também assinalou morte de uma cobaia aos 45 dias com ampla zona de fibrose no fígado, recuperando 2 fasciolas jovens.

León-Dancel²⁰ (1970) conseguiu que camundongos infectados sobrevivessem com 1 metacercária, observando ovos nas fezes pela primeira vez após 31 dias de infecção. Usando apenas 1 metacercária este autor conseguiu 60% de infecção positiva em camundongos. Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, (1963) infectou camundongos com 10 metacercárias, obtendo 4 fasciolas jovens por camundongo. Estes camundongos morreram com 42 dias, antes das fasciolas atingirem sua maturidade sexual, mas com danos no fígado. Standen citou ainda Lagrange e Gutmann (1961) que observaram morte de camundongos infectados com pequeno número de metacercárias depois de 4 ou 5 semanas, notando presença de pequenas fasciolas imaturas no fígado e na cavidade peritoneal. Standen citado por Schnitzer e Hawking³³, (1963) afirmou ainda que infecções com uma única metacercária podem ser bem sucedidas, sendo que se o camundongo sobreviver além de 33 dias, poderão ser encontrados fasciolas maduras no fígado que eliminarão centenas de ovos nas fezes por um período ilimitado. Este mesmo período de 33 dias para maturação das fasciolas foi constatado por Gomes e col.⁹ (1974) que, ao infectarem camundongos com 2 metacercárias, assinalaram o aparecimento dos primeiros ovos nas fezes após 33 dias. No entanto esses autores não tiveram sucesso em infecções de camundongos que ingeriram mais de 3 metacercárias, pois todos os roedores morreram antes do aparecimento de ovos nas fezes.

Em relação a infecção experimental em ratos, León-Dancel²⁰ (1970) notou que os animais infectados sobreviviam quando ingeriam até 5 metacercárias, aparecendo ovos nas fezes pela primeira vez 51 dias após

infecção. Em autópsias realizadas, esse autor constatou fasciolas em 85% dos ratos que receberam um a 4 metacercárias. Os vermes recuperados mediam 11 a 13 mm de comprimento por 4 a 5 mm de largura.

Rajasekariah e Howell²⁹ (1977) estudando a influência da idade do hospedeiro vertebrado e do número de metacercárias utilizadas na infecção, verificaram que os ratos com 5 semanas de idade eram mais suscetíveis à infecção. Estes animais apresentaram lesões inflamatórias em todos os lóbulos hepáticos quando infectadas por 5 metacercárias sendo que, nessa faixa etária, a recuperação do número de vermes foi maior. Em ratos infectados com 15 e 25 semanas de idade, estas mesmas lesões apareciam somente quando ingeriam 15 a 20 metacercárias. Observaram ainda que o período prepatente variou de 57 a 60 dias em todos os grupos e que a infecção estava restrita ao conduto biliar, não encontrando vermes migratórios no parênquima hepático. Concluíram que, dentro de cada grupo etário de ratos, a proporção de metacercárias que se desenvolviam até a maturidade era a mesma independentemente do número de metacercárias e que estes resultados indicavam não ocorrer efeito "crowding". Os autores sugeriram que roedores após completar 10 semanas desenvolviam resistência à infecção. Não notaram ainda diferença entre os vários grupos etários quando administravam apenas uma metacercária.

Krull¹⁶ (1933) infectou um tapiti (*Sylvilagus floridanus mallurus*) capturado ainda bem jovem, com 37 metacercárias ingeridas durante um período de 9 dias. Após 20 dias da ingestão inicial de metacercárias, o tapiti foi morto, obtendo-se 25 fasciolas imaturas (67,6%). Após fixação verificou-se que as fasciolas mediram 1,5 a 4,5 mm de comprimento, com média de 3,0 mm. Outro tapiti da mesma ninhada infectado com 12 metacercárias mostrou ovos nas fezes após 101 dias de infecção. Quando as fezes foram examinadas 60 dias após, não foram encontrados ovos. Com a morte

do tapiti ocorrida no 102º dia foram recolhidos 3 *F. hepatica* adultos (25,0%), medindo cerca de 20,0 mm de comprimento

Comparando os nossos resultados com os de Krull¹⁶ (1933) obtivemos ovos nas fezes de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) 23 dias antes daquele autor, mas cerca de 15 dias depois do assinalado por Olsen²⁰ (1974). Com a morte dos coelhos recuperamos 60% e 20% dos vermes, o que representou uma percentagem semelhante a encontrada por Krull¹⁶ (1933). Em relação a sobrevivência, um dos nossos coelhos infectados morreu cerca de 20 dias antes do de Krull¹⁶ (1933) e o outro quase dois meses depois, eliminando sempre ovos nas fezes durante este período. O tamanho médio dos vermes recuperados foi também maior que o observado por Krull.

Quanto a longevidade da *F. hepatica* em coelhos, Leiper¹⁹ (1938), citou um trabalho de Montgomerie (1931) em que este autor relatava a sobrevivência dos coelhos infectados por um período de 1 a 3 anos após infecção.

Leiper¹⁹ (1938) ao infectar 16 cabras de aproximadamente 6 meses de idade com 30 a 100 metacercárias, observou início da eliminação de ovos nas fezes após 78 dias, e nas cabras que não morreram ou não foram sacrificadas, eliminação de ovos persistiu por quase 5 anos. O número de vermes adultos recuperados nas cabras mortas variou de 15,0 a 58,0%, com média de 35,5%.

CONCLUSÕES

- 1) A temperatura ambiente os miracídios de *F. hepatica* provenientes de ovos de bilis de boi eclodiram entre 9º e 13º

dias. Os miracídios de ovos colhidos nas fezes e na bilis de coelhos eclodiram ao redor de 15º dia. Os miracídios nadaram ativamente durante 6 a 7 h.

- 2) A percentagem de limneas infectadas que sobreviveram até o desenvolvimento completo das cercárias foi de apenas 3%. O índice de infecção de *L. columella* expostas a miracídios de *F. hepatica* foi de 89%. Não foi observada a formação de rédias filhas.
- 3) As cercárias não saíram espontaneamente do caramujo, sendo retiradas das conchas entre 46º a 54º dias após infecção. O encistamento das cercárias processou-se em menos de 15 minutos.
- 4) Foram obtidas cerca de 200 metacercárias em caramujos infectados com 2 miracídios, aproximadamente 190 com 3 miracídios e 1150 com 5 miracídios. A viabilidade das metacercárias guardadas em geladeira foi de cerca de 4 meses.
- 5) Os coelhos iniciaram a eliminação de ovos pelas fezes 78 dias após ingestão de 10 metacercárias. Foram recuperados, após a morte dos coelhos, 6 vermes adultos em um dos coelhos e 2 em outro.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Sérgio Vianna e Arnor Fadu Saber, aos demais funcionários da Casa da Lavoura de Pindamonhangaba e Casa da Agricultura de Lorena (SP), pela colaboração na cessão de ovos de *F. hepatica* e nas coletas de limneídeos.

UETA, M. T. [Laboratory infection of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella*.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 14:43-57, 1980.

ABSTRACT: *F. hepatica* eggs from infected cattle and rabbits were incubated at room temperature, hatching miracidia within 9 to 13 days. Newly hatched miracidia were used to infect 233 *L. columella* 5 to 11 mm long. Only 3% of the infected snails survived until the cercariae fully developed. From 190 to 1150 metacercariae developed within 46 to 54 days. Laboratory-bred mice, rats, Guinea pigs, and rabbits were fed metacercariae of different ages, but only the rabbits eliminated eggs in their feces, and this 78 days after infection. Adult worms were recovered after death of the rabbits.

UNITERMS: Laboratory infection. *Fasciola hepatica*. *Lymnaea columella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACIGALUPO, J. *Fasciola hepatica*. Su ciclo evolutivo. *Rev. Med. trop.*, Cuba, 4:203-6, 1938.
2. BACIGALUPO, J. Hallazgo en la ciudad de Buenos Aires de *Lymnaea viatrix* d'Orb. infectada espontaneamente con cercarias de *Fasciola hepatica*, L. *Rev. Soc. argent. Biol.*, 8:511-3, 1932.
3. BACIGALUPO, J. *Limnaea viatrix* d'Orb. infectée par des cercaires de *Fasciola hepatica*, a Buenos Aires. *C. R. Soc. Biol.*, 111:828, 1932.
4. BORAY, J. C. Host-parasite relationship between lymnaeid snails and *Fasciola hepatica*. *Vet. Med. Rev.*, 132:140, 1967.
5. BORAY, J. C. The role of the relative susceptibility of snails to infection with helminths and the adaptation of the parasites in the epidemiology of some helminthic diseases. *Malacologia*, 14:125-7, 1973.
6. BRICENO-ROSSI, A. L. Trabajo experimental sobre *Fasciola hepatica*. *Rev. Sanid. Asist. soc.*, 15:381-8, 1950.
7. CHRISTENSEN, N. O. et al. The influence of temperature on the infectivity of *Fasciola hepatica* miracidia to *Lymnaea truncatula*. *J. Parasit.*, 62: 698-701, 1976.
8. DACAL, A. R. C. & COSTA, H. M. A. Suscetibilidade de amostras de *Lymnaea* à infecção por miracidios de *Fasciola hepatica*. [Apresentado ao 4º Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Campinas, 1979]
9. GOMES, P. A. C. et al. Infecção experimental de *Lymnaea columella* Say, 1817, com *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, 4:35-8, 1974.
10. GONZALES, J. C. et al. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Linn, 1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, 2:37-40, 1974.
11. HOFFMAN, W. A. The intermediate host of *Fasciola hepatica* in Puerto Rico. *Puerto Rico J. publ. Hlth*, 6:89-90, 1930.
12. JIMENEZ-ALBARRAN, M. & GUEVARA-POZO, D. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 1º — Número y viabilidad de los huevos de *Fasciola hepatica* hallados en vesícula biliar de vaca, oveja y cabra. *Rev. ibér. Parasit.*, 37:291-300, 1977.
13. JIMENEZ-ALBARRAN, M. & GUEVARA-POZO, D. Estudios experimentales sobre biología de *Fasciola hepatica*: 2º — Influencia de la edad de *Limnaea (Galba) truncatula* en su infección por miracidium de *Fasciola hepatica* y de las diferencias en la emisión de cercarias según el tiempo transcurrido desde su infestación. *Rev. ibér. Parasit.*, 37:355-63, 1977.

14. KENDALL, S. B. *Lymnaea stagnalis* as an intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Nature*, 163:880-1, 1949.
15. KENDALL, S. B. Snail hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminth.*, 24: 63-74, 1950.
16. KRULL, W. H. New snail and rabbit host for *Fasciola hepatica* Linn. *J. Parasit.*, 20:49-52, 1933.
17. KRULL, W. H. The snail *Pseudosuccinea columella* (Say) as a potentially important intermediate host in extending the range of *Fasciola hepatica* Linn. *J. Wash. Acad. Sci.*, 23:389-91, 1933.
18. LANG, B. Z. Snail and mammalian hosts for *Fasciola hepatica* in eastern Washington. *J. Parasit.*, 63:938-9, 1977.
19. LEIPER, J. W. G. The longevity of *Fasciola hepatica*. *J. Helminth.*, 16:173-6, 1938.
20. LEÓN-DANCEL, D. Life history of *Lymnaea columella* (Say) and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.). *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, 54:297-305, 1970.
21. LUTZ, A. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Bol. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1:9-13, 1921.
22. MALDONADO, J. F. *Helmintiasis del hombre en America*. Barcelona, Editorial Científico-Médica, 1965.
23. MAZZOTTI, L. *Lymnaea obrussa* Say, huesped intermediario de *Fasciola hepatica*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop.*, Mexico, 15:163-5, 1955.
24. NICE, N. G. & WILSON, R. A. A study of the effect of temperature on the growth of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*. *Parasitology*, 68:47-56, 1974.
25. OLLERENSHAW, C. B. Predicción de la fasciolosis hepática en Inglaterra y País de Gales en 1958-1968, con un comentario acerca de la influencia del clima sobre la incidencia de la enfermedad en algunos otros países. *Not. méd.-vet.*, 2/3:285-308, 1971.
26. OLSEN, O. W. *Animal parasites: their life cycles and ecology*. 3rd ed. Washington, University Park Press, 1974.
27. OLSEN, O. W. Bionomics of the lymnaeid snail, *Stagnicola bulimoides techella*, the intermediate host of the liver fluke in southern Texas. *J. Agric. Res.*, 69:389-403, 1944.
28. PANTELOURIS, E. M. *The common liver fluke*. Oxford, Eng., Pergamon Press, 1965. (International series of Monographs on Pure and applied Biology Zoology Division, v. 21).
29. RAJASEKARIAH, G. R. & HOWELL, M. J. *Fasciola hepatica* in rats: effects of host age and infective dose. *Int. J. Parasit.*, 7:119-21, 1977.
30. REZENDE, H. E. B. et al. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro. (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, 3: 21-3, 1973.
31. REY, L. *Fasciola hepatica* no gado, no Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. *Rev. bras. Mular.*, 9:473-83, 1957.
32. ROBERTS, E. W. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 44:187-206, 1950.
33. SCHNITZER, R. J. & HAWKING, F. *Experimental chemotherapy*. New York, Academic Press, 1963. v. 1.
34. TAYLOR, E. L. *La fascioliasis y el distoma hepatico*. Roma, FAO, 1965. (FAO: Estudios agropecuários, 64).
35. TAYLOR, M. Water snails and liver flukes. *Nature*, 110:701, 1922.
36. WHITLOK, H. V. et al. The laboratory maintenance of field-collected *Lymnaea tomentosa* for the production of *Fasciola hepatica* metacercariae. *Vet. Parasit.*, 1:317-25, 1976.
37. WRIGHT, C. A. *Flukes and snails*. London, George Allen and Unwin, 1971. (Science of Biology Series, 4).

Recebido para publicação em 23/07/1979

Aprovado para publicação em 30/10/1979