

ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 (MOLLUS-  
CA, GASTROPODA, BASOMATOPHORA, LYMNAEIDAE) COMO HOSPEDEIRO INTER-  
MEDIÁRIO DE *Fasciola hepatica* L., 1758 (TREMATODA, FASCIOLIDAE),  
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**TESE**

Apresentada à Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro para obtenção do grau  
de *Magister Scientiae*

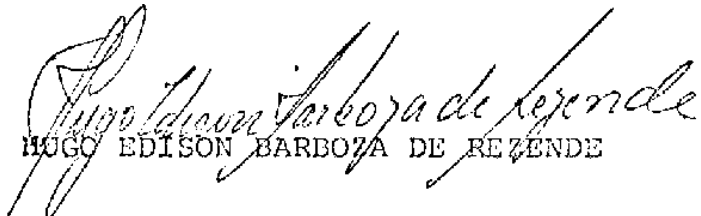
SILVINO NUERNBERG

Dezembro 1978

ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839 (MOLLUS-  
CA, GASTROPODA, BASOMMATOPHORA, LYMNAEIDAE), COMO HOSPEDEIRO INTER-  
MEDIÁRIO DE *Fasciola hepatica* L., 1758 (TREMATODA, FASCIOLIDAE),  
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**TESE**

APROVADA POR:

  
HUGO EDISON BARBOZA DE REZENDE

  
LUIZ FERNANDO FERREIRA DA ROCHA

  
LAERTE GRISI

De zembro - 1978

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hugo Edison Barboza de Rezende, Coordenador do Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária da UFRRJ, pela orientação científica e participação durante a realização deste trabalho.

Aos Professores José Luiz de Barros Araújo, Nicolau Maués da Serra Freire, Delir Corrêa Gomes e Rubens Pinto de Mello, pela orientação científica e incentivo à pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Plínio Antonio Costa Gomes e Gilson Pereira de Oliveira, pelo auxílio prestado durante a realização da parte experimental.

## BIOGRAFIA

Silvino Nuernberg, filho de Gregório Nuernberg (falecido) e Elisa Michels Nuernberg, nasceu a 10 de setembro de 1935 em Nova Veneza, Estado de Santa Catarina.

Realizou o curso primário na Escola Municipal de São Bento Baixo, Município de Nova Veneza. Em seguida fez o curso de Iniciação, Mestría e Técnico Agrícola na Escola Agrotécnica "Ildefonso Simões Lopes" da atual Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em 1959 ingressou na Escola Nacional de Veterinária da Universidade Rural do Brasil, tendo-se graduado a 22 de dezembro de 1962.

Em 1963 foi contratado como Médico Veterinário pelo Instituto de Biologia Animal do Ministério da Agricultura.

Em 1964 foi nomeado interinamente para exercer as funções de Médico Veterinário do Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul, IPEACS.

Em 1967 passou para o quadro permanente do Ministério da Agricultura no Estado do Rio de Janeiro, por concurso de provas e títulos do D.A.S.P.

Aos meus pais

## CONTEÚDO

I. Introdução	1
II. Revisão da Literatura	3
III. Material e Métodos	17
IV. Resultados	25
V. Discussão	29
VI. Conclusões	39
VII. Resumo	41
VIII. Summary	43
IX. Referências Bibliográficas	45
X. Apêndice	52

## I. INTRODUÇÃO

Ao lado da importância médico-veterinária e econômica despertada pelo estudo de *Fasciola hepática* L., 1758, mencionada pela primeira vez no Brasil por LUTZ (1921), salienta-se também o grande interesse médico, por se tratar de uma zoonose observada nos cinco continentes.

No Brasil, as maiores atenções estão voltadas para o conhecimento dos prejuízos oriundos do parasitismo por *F. hepática* em ovinos e bovinos, especialmente na Região Sul do País, apesar de alguns casos de fasciolose humana terem sido descritos por REY (1958), SANTOS & VIEIRA (1965/67) e BARANSKI *et al.* (1978).

Durante o desenrolar dos trabalhos que constituíram o projeto "Epidemiologia dos nematódeos gastro-intestinais de bovinos" desenvolvido no Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Centro-Sul - IPEACS, foram encontrados ovos de *F. hepática* em animais nascidos e criados em fazendas 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.

Constatada na Região Sudeste do Brasil a elevada incidên-

cia de fasciolose bovina em determinadas fazendas, os pesquisadores da seção de parasitologia do IPEACS, da Área de Parasitologia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (AP/DBA/IB/UFRRJ) e do laboratório de Biologia Animal da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (LBA/SAA-RJ), delinearam um projeto de pesquisa sobre esta parasitose.

No desenvolver deste projeto, 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*. Posteriormente, o grupo responsável pela pesquisa comprovou que *L. columella* (Say, 1817) é hospedeiro intermediário deste trematódeo no Estado do Rio de Janeiro, bem como elucidou vários aspectos da biologia destes moluscos em condições de laboratório. Em etapa subsequente, procurou-se estudar a segunda espécie do gênero *Lymnaea* identificada como *L. cubensis* Pfeiffer, 1839 (REZEND E et al., 1973). Esta espécie constitui o assunto escolhido para esta Tese, visando esclarecer como ponto de partida, em condições de laboratório, aspectos biológicos e o comportamento do molusco em infecções experimentais com *F. hepatica*.



## II. REVISÃO DA LITERATURA

Em material proveniente do Peru, d'ORBIGNY (1835) descreveu *Lymnaea viator* (*Lymnaea viatrix*). Em trabalho posterior, o mesmo autor (1837) fez descrição mais detalhada da espécie, utilizando material coletado na Argentina e no Chile.

PFEIFFER (1839) descreveu pela primeira vez *L. cubensis*.

PILSBRY (1911) afirmou ser impossível separar *L. cubensis* Pfeiffer 1839, das Antilhas, de espécimes colhidos nas proximidades de Montevidéu, no Uruguai, e de Lima, no Peru, baseando-se apenas nos caracteres das conchas.

LUTZ (1918), em trabalho que trata das espécies de *Planorbis* observadas no Brasil, cita a presença de duas ou três espécies de *Lymnaeidae*, destacando apenas *L. viatrix* d'Orbigny, 1835 (*L. viator*), sem indicar a procedência do material correspondente à espécie identificada.

LUTZ (1921) referiu a ocorrência de *F. hepatica*, pela primeira vez, no Estado do Rio de Janeiro. Examinou exemplares coletados em Santa Mônica de Massambará, perto da Estação de Comércio e da Fazenda da Floresta, próximo a Entre Rios. Acreditando ter coletado duas espécies, propôs *L. ochrostigma* para uma delas, deixando

sem determinação os espécimes de molusco que acreditou pertencerem a outra espécie, uma vez que não coincidiam com a descrição de d'ORBIGNY para *Lymnaeus viator*. "Pareceu-me todavia difícil conciliar a nossa espécie com a descrição de d'Orbigny e tão pouco com as espécies europeas; será provavelmente necessário dar um nome novo", declarou o autor.

LUTZ (1928) achou 10 exemplares de *L. cubensis* infectadas com rédias de *F. hepatica* em Caracas, Venezuela.

VAN VOLKENBERG (1929) destacou a importância da fasciolose hepática em bovinos e caprinos em Porto Rico, responsável por grandes perdas econômicas dos rebanhos. Indicou a presença de moluscos e locais ideais de criação, bem como a necessidade de identificação da espécie. Aconselhou ainda métodos de controle com utilização de drenagem e de substâncias químicas.

BACIGALUPO (1930), em nota prévia, apresentou *L. viatrix*, como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* na Argentina. Observou que em diversas províncias, em regiões montanhosas, as cabras são os animais mais afetados pela fasciolose. Os moluscos, por sua vez, foram coletados em água corrente principalmente em vertentes, mas também nos remansos formados por estas vertentes. Destacou a distribuição geográfica de *F. hepatica* em coincidência com a de *Lymnaea* spp. nas províncias estudadas, bem como o alto índice de infecção de suínos, caprinos e bovinos com percentuais de até 96% para animais provenientes da serra, onde acreditava existirem os maiores focos. Teve ainda oportunidade de constatar dois casos de

fasciolose humana.

HOFFMAN (1930) citou a importância da fasciolose bovina em determinadas regiões de Porto Rico, depreciando carcaças de animais nos matadouros. Em outras áreas endêmicas destacou que a criação de caprinos era impossível devido ao trematódeo.

Coletou alguns exemplares de *L. cubensis* naturalmente infectadas e eliminando cercárias idênticas às de *F. hepatica*, as quais após o enquistamento, foram dadas a cinco cobaias, em número, variável de 25 a 130. Dos animais necropsiados obteve jovens adultos de *F. hepatica*, confirmando os achados de VAN' VOLKENBERG. Identificou ainda a *L. cubensis* como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em Porto Rico.

BAILY (1931) estudou vários aspectos da biologia de *L. colunalella*, no entanto não fez referências ao comportamento biológico do molusco em relação às variáveis do meio ambiente.

BACIGALUPO (1932a) coletou *L. viatrix* naturalmente infectadas com cercárias de *F. hepatica*. Obteve grande quantidade de metacercárias que foram utilizadas na infecção de quatro cobaias. A primeira morreu após 27 dias e à necropsia observou zonas de necrose no fígado, hemorragia peritoneal e sete pequenas fascíolas no peritônio, na região hepática. A segunda morreu após um mês, a terceira aos 36 dias e a quarta aos 45 dias da infecção, todas apresentando lesões hepáticas intensas e número variável de pequenos trematódeos, alguns no peritônio e outros penetrando no tecido hepático.

BACIGALUPO (1932b) citou a ocorrência de dois casos de distomatose hepática humana na Argentina, descritos anteriormente (1927 e 1930), em colaboração. Apresentou resultados que mostram a superposição da distribuição geográfica do parasito e dos hospedeiros intermediários. Salientou o fato de que em muitas regiões foi muito difícil encontrar os moluscos apesar da presença do parasito nos animais, mesmo em áreas restritas. Assinalou ainda a presença de *L. viatrix* na Argentina em muitas províncias, ampliando a distribuição original de d'ORBIGNY.

VAN VOLKENBERG (1934) descreveu, em linhas gerais, o ciclo de *F. hepatica*, indicando como hospedeiro intermediário *L. cubensis*. Destacou a importância do parasito para animais e para o homem e a necessidade de se combater os moluscos. Para isto indicou o sulfato de cobre, com resultados eficientes quando aplicado anualmente em épocas certas, enquanto não se adotassem outras medidas de erradicação do molusco.

BACIGALUPO (1937) obteve sucesso na infecção de cobaias a partir de metacercárias obtidas de *L. viatrix*, repetindo, os resultados de 1932 (a).

BACIGALUPO (1938a) fez a descrição detalhada do ciclo evolutivo de *F. hepatica* em *L. viatrix*, enfatizando as passagens, tanto no hospedeiro invertebrado como vertebrado.

BACIGALUPO (1938b) em conferência proferida no Mont Si-nay Hospital, reportou-se aos trabalhos anteriores que publicou,

sobre *F. hepatica* e seu desenvolvimento em *L. viatrix*.

VIGUERAS & MORENO (1938), em Cuba, procederam a dissecação de moluscos coletados em regiões onde os bovinos apresentavam fasciolose e observaram a presença de rédias e cercárias de *F. hepatica* em *L. cubensis* e em *Physa cubensis* Pfeiffer, 1830, destacando esta como novo hospedeiro do parasito. Confirmaram em seguida a infecção de *L. cubensis* e *P. cubensis*, trabalhando com moluscos coletados de regiões livres de doenças.

VIGUERAS (1938) apresentou, em conferência na Academia de Ciências de Cuba, a confirmação dos resultados obtidos no trabalho anterior. De cerca de 4.000 moluscos entre *P. cubensis* e *L. cubensis* encontrou até 30% de moluscos infectados em regiões onde a concentração de bovinos era maior a de 4 a 8%, em locais com baixo número de animais. Observou ainda esporocistos e rédias em ambas as espécies, porém apenas em espécimes adultos ditos grandes, resultando negativos os exames de moluscos médios e pequenos. A infecção experimental com *F. cubensis* com 8 a 20 dias de nascidos não logrou êxito.

BACIGALUP O et al. (1941), no Uruguai, observaram que 12,07% de *L. viatrix* na cidade de Montevideu estavam naturalmente infectadas por *F. hepatica*, concluindo ser esta a espécie em que se passa o ciclo do trematódeo naquele país.

BACIGALUPO (1942) reuniu neste trabalho os resultados de suas pesquisas sobre *F. hepatica* na Argentina e no Uruguai, an-

teriormente publicados. Apresentou, no entanto, dados sobre a infecção de *L. viatrix* em laboratório, relatando ser de 57 a 80 dias o período para emergência de cercárias. Utilizou ainda dois cobaios e dois coelhos para infecção experimental com metacercárias obtidas de *L. viatrix* naturalmente parasitadas. Em um dos cobaios conseguiu observar ovos nas fezes decorridos 97 dias da infecção, e para coelhos o período pré-patente foi de 54 a 65 dias. Reportou-se ainda, com dados mais precisos, à distribuição de *F. hepatica* e de *L. viatrix* na Argentina, confirmando a sua superposição geográfica.

Das pesquisas executadas no Uruguai, salientou a presença de *L. viatrix* nos arredores de Montevidéu e a infecção natural dos moluscos no percentual de 12,07%.

TAGLE (1943) reportou-se ao trabalho de GERMAN & NERVEU LAMAIRE (1926), que citam a presença de *L. viatrix* (*L. viator*) para o Peru, Uruguai, Argentina e Chile até a Patagônia. Identificou *L. viatrix* (*L. viator*) como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, no Chile, com achados de moluscos naturalmente infectados. Partindo ainda de metacercárias provenientes de moluscos criados e infectados em laboratório obteve trematódeos adultos em coelho com período pré-patente de 54 a 56 dias.

RAMIRES VILLAMEDIANA & VERGANI (1942), trabalhando em zonas de cultivo de hortaliças nos arredores de Caracas, Venezuela, descreveram os criadouros e as condições ambientes onde 50% dos moluscos pertenciam à espécie *L. cubensis*. De moluscos coletados de

ambientes naturais, e após exames de amostras que resultaram negativos pela microscopia, procederam à infecção experimental obtendo rédias com cercárias aos 41 dias. Utilizaram, para completar o ciclo do trematódeo, 10 coelhos dos quais 2 morreram (aos 27 e 45 dias) e 8 foram necropsiados (aos 60, 65 e 70 dias). Todos apresentaram lesões hepáticas características, bem como jovens e adultos, de *F. hepatica*.

GAJARDO et al. (1950) inicialmente apresentaram dados estatísticos dando a incidência da fasciolose em bovinos, ovinos, caprinos e suínos no matadouro de Portalos, Chile, compreendendo os anos de 1930 a 1949. Correlacionaram ainda os percentuais de distomatose bovina com índices de precipitação pluviométrica no mesmo período e mensalmente para o ano de 1942, no mesmo matadouro. Fizeram também um estudo sobre a patogenia de *F. hepatica* e sobre a profilaxia e tratamento da fasciolose, descrevendo com detalhe numerosos casos de doença na espécie humana.

BRICENO ROSSI (1950), em trabalho experimental realizado na Venezuela, verificou a eclodibilidade de ovos de *F. hepatica* colhidos em fígado de bovinos procedentes de matadouro e de ovos obtidos de fezes humanas, de quatro casos constatados pelo autor. Observou que o período de incubação para o desenvolvimento e eclosão do miracídio variou de 11 a 13 dias e que o percentual de eclodibilidade foi muito maior (82 a 86%) para ovos de *F. hepatica* de bovinos do que aquele observado para os ovos de fezes humanas,

(0%, 2%, 14% e 39%).

Infectou experimentalmente *L. cubensis* com miracídios de *F. hepatica*, verificando a presença de esporocistos com 7 a 9 dias, primeiras rédias com 14, rédias com cercárias aos 27 dias e cercárias livres um pouco mais tarde.

VERGANI (1955) divulgou dados biológicos experimentais, sobre *L. cubensis*, até então o único hospedeiro intermediário de *F. hepatica* conhecido na Venezuela. Neste estudo, apresentou resultados de longevidade com sobrevivência máxima de 212 dias, alcançando a concha 16mm de comprimento e 8mm de largura; de ovopostura com postura de 5 por 3mm, ovóide, com número de ovos variável com o tamanho e a alimentação, tendo ainda constatado o máximo de 1.530 ovos por molusco em quatro meses de vida; de resistência à dessecação, constatado a fragilidade dos ovos e a resistência de moluscos de tamanho médio até 235 dias, tempo que acreditou ser suficiente para ultrapassar todo verão. Testou a resistência de ovos e adultos às baixas temperaturas (7°C e 7°C), que resultou em tempo de eclosão dos ovos em período três vezes maior que o normal e cinco meses de sobrevivência, sem postura, para os adultos. Finalmente estudou a eficácia do pantaclorofenato de sódio, como moluscicida no controle de *L. cubensis*.

TAGLE (1956) reportou o ciclo evolutivo de *F. hepatica*, tendo *L. viatrix* como hospedeiro intermediário natural. Salientou a maneira pela qual o homem se infecta, e indicou o tetracloreto



de carbono e a hexacloretana para o treinamento da fasciolose ovina e bovina.

REY (1957) não comprovou a ocorrência de casos humanos de infecção por *F. hepatica* no Estado do Rio Grande do Sul. Um ano depois, este mesmo autor, assinalou o primeiro caso de fasciolose humana no Brasil.

LEE (1962) completou o ciclo biológico de *Heterobilharzia americana* Price 1929, parasita de mamíferos, indicando como hospedeiro intermediário *L. cubensis* e *L. columella*.

MALDONADO (1965), estudando diferentes helmintoses nas Américas, fez comentários sobre as espécies hospedeiros intermediários de *F. hepatica*, destacando as já conhecidas para a América do Norte, Cuba, Porto Rico, Venezuela e Colômbia. Entre os moluscos que incluiu como hospedeiros intermediários de *F. hepatica*, figuram *L. viatrix* seguramente ocorrendo na Argentina e Chile e provavelmente no Rio Grande do Sul, Brasil, *L. cubensis* em Luisiana, Cuba, Porto Rico e Venezuela, *L. columella* em Porto Rico e *L. bogotensis* na Colômbia.

PANTELOURIS (1965) descreveu uma nova técnica para a obtenção de miracídios de *F. hepatica*.

SANTOS & VIEIRA (1965/67) elevaram para oito as citações de ocorrência de fasciolose humana no Brasil ao divulgarem o achado de sete novos casos no Vale do Rio Paraíba. Salientaram ainda a alta incidência de *F. hepatica* no gado bovino (10%) de São Paulo

neste Vale.

GRETILLAT (1966), ao constatar a presença de *F. hepatica* em fígados de bovinos em matadouros na Ilha de Martinica, assinalou pela primeira vez a presença de *L. cubensis*, relacionando-a como hospedeiro intermediário, e descreveu ainda alguns ambientes propícios ao seu desenvolvimento.

GRETILLAT (1967), em excursões malacológicas em Martinica, Guadalupe e dependências, teve a oportunidade de fazer algumas observações sobre a biologia de *L. cubensis* em laboratório, salientando a necessidade dos moluscos, para viverem, de ambiente especiais, muito oxigenados e com renovação da água; lama no fundo do aquário, rica em matéria orgânica em suspensão, foi indispensável, para a sobrevivência, alimentação e multiplicação. A falta de oxigênio, ou a dessecação do meio, levou à diapausa. O crescimento foi acelerado quando os moluscos foram alimentados com folhas de alfaca, obtendo-se espécimes muito maiores que aqueles obtidos em ambientes naturais, porém destituídos da capacidade de entrar em diapausa, quando em meio adverso(seco). Moluscos alimentados somente com matéria orgânica em suspensão na água dos viveiros cresceram muito lentamente, mas não perderam a habilidade de entrar em diapausa.

BENDEZU (1969), no decurso do trabalho de epidemiologia, e controle de *F. hepatica* no Vale de Montaru, Peru, à altitude de 3.322 a 3.962m, durante alguns anos, examinou crianças em idade escolar e verificou a incidência em diversas localidades, e consta-

tando índices de 2%,10%, 15% e de até 60%, num total de 950 crianças. Observou que as crianças se infectavam em valas onde *L. viatrix* era abundante, por mastigarem capim, e que 1% das folhas de alface vendidas nos mercados apresentavam metacercárias.

FRANÇA (1969) advertiu as autoridades sanitárias do estado de São Paulo ao constatar o percentual de 10,1% de *F. hepatica* em 941 bovinos examinados no Matadouro de Taubaté. Comparou os resultados obtidos com aqueles encontrados em diferentes autores brasileiros, acreditando ser bastante elevado o percentual encontrado neste novo foco de fasciolose.

Estudando o ciclo biológico de *L. columella* e a infecção experimental com *F. hepatica* em Porto Rico, de LEON-DANCEL (1970) adotou uma metodologia que passou a ser empregada em estudos de fasciolose no Rio de Janeiro, Brasil.

GONZALES et al. (1970,1971), no Estado do Rio Grande do Sul, assinalaram pela primeira vez no Brasil *L. columella* como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*. Tendo inicialmente identificado a espécie como *L. peregrina* Clessin, 1822, os mesmos autores, em 1971, confirmaram ser *L. columella* a espécie de molusco envolvida no ciclo da *F. hepatica* naquele Estado.

REZENDE et al. (1973), em nota prévia, evidenciaram pela primeira vez no Estado de Rio de Janeiro, a ocorrência de *L. columella* e *L. cubensis* como hospedeiro intermediário da fasciolose bovina no Estado.

UENO *et al.* (1973) estudaram a prevalência de doenças, parasitárias em bovinos na República Dominicana. Através de exames de fezes verificaram ser de mais de 78% a prevalência de animais, infectados com *F. hepatica*. Também identificaram *L. cubensis* como hospedeiro intermediário deste trematódeo. Comprovaram ser de 2 a 18% o percentual de moluscos naturalmente infectados em diferentes fazendas. O número máximo de rédias foi de 19, a emergência de cercárias foi observada em cinco espécimes e metacercárias foram obtidas. A infecção experimental resultou no desenvolvimento de rédias com 8 a 11 dias e cercárias com 34 a 37 dias após a infecção. Foi ainda tentada a infecção em condições de laboratório com *Physa* spp. sem, contudo, alcançar qualquer resultado.

ALVAREZ (1974) observou aspectos ecológicos de *L. cubensis*, espécie incriminada como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* na República Dominicana. A campo, demonstrou a distribuição vertical dos moluscos nos canais de irrigação utilizados na plantação de arroz, alertando para a profundidade que podem alcançar, sem parecer. Em laboratório fez observações sobre o desenvolvimento e idade para postura.

GOMES *et al.* (1974), no Estado do Rio de Janeiro, obtiveram sucesso em trabalhos experimentais de infecção de *L. columella*, utilizando quantidades variáveis de miracídios de *F. hepatica*. Moluscos adultos infectados com dois e cinco miracídios resistiram bem à infecção e produziram em média 303 metacercárias. A ob-

servação de 50 moluscos revelou que a emergência de cercárias ocorreu do 44° ao 50° dias e que de 3 a 7 dias após, todos morreram. O ciclo foi completado em camundongos que foram infectados com duas metacercárias, e o período prepatente foi de 33 dias.

GOMES et al. (1975) fizeram estudo detalhado da biologia de *L. columella* em condições experimentais, utilizando moluscos coletados no município de Terezópolis, Estado do Rio de Janeiro.

UENO et al. (1975) salientaram a importância da fasciolose que impedia muitas vezes a criação de ovinos, bovinos e alpacas na região do Altiplano Boliviano em altitudes entre 3.700 e 4.200m, com temperatura máxima anual de 19°C. Nesta região, duas espécies de moluscos foram identificadas, *L. viatrix* e *L. cubensis*, como hospedeiros intermediários da *F. hepatica*, uma outra espécie foi ainda encontrada em algumas áreas subtropicais da Bolívia, porém não foi identificada. Infectaram experimentalmente 14 cobaias fazendo-as ingerir plantas com metacercárias provenientes das duas espécies de moluscos, completando o ciclo vital. Verificaram ainda a infecção natural de 6,4% para *L. viatrix* e 12,3% para *L. cubensis* em 664 e 292 moluscos dissecados, respectivamente. Não conseguiram êxito na infecção experimental dos moluscos, com miracídios, creditando o insucesso às baixas temperaturas. Finalmente, em bioclimatógrafo, evidenciaram a relação entre a ocorrência de fasciolose aguda em ovinos e os fatores climáticos da região.

LOBATO PARAENSE (1976) estudou espécimes topotípicos de *L. viatrix*, utilizando material coletado das mesmas localidades mencionadas originalmente por d' ORBIGNY (1835), ao mesmo tempo em

que manteve a espécie provisoriamente no gênero *Lymnaea*.

BARANSKI et al. (1978), no Paraná, descreveram o 15º caso de infecção humana com *F. hepatica* no Brasil, precisando em 14 o número de casos autóctones em nosso país. Testou a eficácia de novo anti-helmíntico, praziquantel, síntese Merck + Bayer (Embay 8440), demonstrando a ineficácia do medicamento.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### A. Material

1. Helminto: ovos de *F. hepatica* foram obtidos de vesícula biliar de *Bos taurus* L., 1758, adulto, nascido e criado em Avelar, Estado do Rio de Janeiro.
2. Hospedeiros Invertebrados: Os exemplares de *L. cubensis* Pfeiffer, 1839, hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, 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, tendo dado origem à população trabalhada.
3. Hospedeiros Vertebrados:
  - a. Bovino: durante o trabalho foram utilizados dois *B. taurus*, fêmeas, com 9 e 2 anos, respectivamente como doador de ovos de *F. hepatica* e receptor de formas infectantes; o mais jovem nasceu e foi criado nas dependências do Ministério da Agricultura em Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

b. Animais de Laboratório: foram utilizados dois *Orytolagus cuniculi* L., 1758, quatro *Cavia porcellus* L., 1758, seis *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, cinco *M. esocricetus auratus* Waterhouse, 1840 e dez *Mus musculus* L., 1758, todos machos, adultos, nascidos e criados no biotério do Ministério da Agricultura em Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

## B. Métodos

1. Obtenção de ovos: os ovos da *F. hepatica* foram obtidos de posturas dos helmintos realizados 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 1.000ml, 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 $\mu$ , para a retirada de fragmentos de cálculos biliares que ocorreram.

Os ovos assim obtidos foram transferidos para Erlenmeyer de 500ml, imersos em 200ml de água destilada



e incubados em estufa à temperatura de 25 a 27°C. Diariamente era trocada a água com auxílio de sifão, agitando-se em seguida o sedimentado 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.

2. Infecção dos Hospedeiros Invertebrados: foram separadas 300 *L. cubensis* nascidos em laboratório, com 60 dias de idade, apresentando comprimento de concha entre 5 e 7mm, e lavadas em água destilada. Após serem divididas em três grupos iguais, foram distribuídas em compartimentos individuais com 3ml 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, e 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 capa-

cidade 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.

3. 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 do que se retirou a água e o molusco. As metacercárias formadas foram imergidas em água destilada à temperatura ambiente para maturação e mantidas nas placas de Petri tampadas e apenas com papel de filtro úmido, sendo guardadas em geladeira para posterior uso em infecções experimentais.
4. Infecção dos Hospedeiros Vertebrados: a viabilidade das metacercárias foi testada descolando-se das paredes das placas de Petri com auxílio de estilete e administrando-se-as "per os" com pipeta Pasteur a cobaias,

rato bronco, hamster e camundongo, tendo-se previamente o cuidado de anestésiar com éter os receptores. A ingestão do parasito por bovino e coelho foi conseguida com metacercáris colocadas sobre folhas de couve e oferecidas aos animais em jejum. Para conhecimento do período pré-patente da *F. hepatica* em cada espécie infectada, foram realizados diariamente coletas de fezes pela manhã e à tarde, examinando-se esse material por técnicas 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. Bovino e cobaio fizeram exceção à regra; o primeiro por ter morrido intoxicado por planta tóxica e o segundo, que não eliminava ovos de *F. hepatica* nas fezes, foi sacrificado no 56º dia.

5. Criação de Moluscos em Laboratório: para a criação de *L. cubensis* em laboratório foi adotada, com modificações, a metodologia de TAYLOR & MOZLEY (1948). Amostras pe-neiradas de terra vegetal foram colocadas em recipientes metálico com capacidade para 20 litros, adicionando-se água de bica até que o material ficasse totalmente imerso; em seguida a mistura foi submetida a fervura. Após permanecer em completo re-

pouso, para sedimentação e resfriamento, descartou-se o sobrenadante e a massa pastosa que compunha o sedimento foi espalhada em caixas de 80x80x11 cm, de madeira, forradas com folha de plástico flexível fixada somente nos bordos superiores (figura 1). Durante 3 a 6 dias as caixas eram mantidas em posição horizontal favorecendo a formação de uma massa de terra, com espessura de 8cm, 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 (figura 2).

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 da 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*, espe-

cialmente quanto à reprodução e à resistência à dessecação, foram preparados viveiros menores, com 10 cm de diâmetro por 5cm de profundidade e de 40x25x8 cm, obedecendo às mesmas etapas de preparação já descritas.

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

6. 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 fetal de bovinos, no município de Itaguaí e Distrito de Santa Cruz, na zona fisiográfica da Baixada do Rio Guandú, municípios de Paraíba do Sul, Pirai e Três Rios, na zona fisiográfica de Rezende, 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 nestes 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 piguetes onde existiam passagens de água corrente, e as noites permaneciam presos recebendo no cocho capim + cana picada, ração balanceada e sais minerais como suplemento alimentar.

As propriedades selecionadas obrigatoriamente deviam receber assistência Veterinária e, no manejo do gado, ocorrer duas ordenhas por dia (algumas com ordenha mecânica), bezerros com aleitamento artificial e monta controlada.

#### IV. RESULTADOS

##### A. 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 de 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 35º 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 invertebrado foi de 15 minutos, e que todos os moluscos morreram após a emergência das cercárias.

## B. 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 períodos 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).

## C. 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.

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 3, com média de 8,65 ovos por postura, sendo que o diâmetro das posturas variou entre 3 e 6mm.

Duas placas de Petri foram preparadas com papel umidecido 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 eclodi-



bilidade 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 40x25x8cm, cujos resultados são mostrados no Quadro 6.

Testes de resistência à dessecação 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 cada viveiro; os viveiros foram cobertos com toalha plástica, assim permanecendo por 40 dias, tempo suficiente para dessecação total do meio criatório. Findo o período, removeu-se a cobertura, 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 14º dia.

#### D. Prevalência

Os 695 animais examinados para determinação de prevalência de fasciolose bovina eram adultos e somente dois deles eram

machos. Os resultados obtidos dos exames de 10% de 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% para 475 animais estudados neste município.

## V. DISCUSSÃO

### A. 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 e período de incubação variou entre 9 e 45 dias.

Parecem destoantes 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 compara este 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, 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 e 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, possíveis de utilização em estudos epidemiológicos, até agora não haviam sido descritos e se constituíram, 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 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 incriminados por REZENDE et al. (1973) como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* no Estado do Rio de Janeiro.

De acordo com os trabalhos de LEON-DANCEL (1970), 94% de *L. columella* sobrevivem a infecção individual de 4 a 6 miracídios/molusco e 93% resistem a infecções coletivas de até 16 mi-

racídios/molusco. Para GOMES et al. (1974), 84% e 86% foram, respectivamente, 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 deixou sobrevivente, 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 conseguido 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 de 298,0 citada por de LEON-DANCEL (1970) para infecções com 4 a 6 miracídios/molusco, pode-se dizer 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 serem explicadas 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 muitos 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*, informando que o enquistamento se deu entre 15 a 20 minutos. O mesmo período foi apresentado por de LEON-DANCEL (1970) utilizando *L. colummela*, e nesta mesma espécie GOMES *et al.* (1974) referiram ser de 20 a 25 minutos o tempo de enquistamento. RAMIRES VILLAMEDIANA & VERGANI (1949), trabalhando com *L. cubensis* reportaram 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 & 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*; 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 & VERGANI (1949) de que aproximadamente 50% dos moluscos morreram em consequência da infecção coletiva a

que foram submetidos, é possível dizer que o número máximo 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.

#### B. 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 necessários para o encontro de ovos de *F. hepatica* nas fezes dos mamíferos infectados experimentalmente variou muito de espécie para espécie.

Com 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 com os diferentes hospedeiros intermediários (Quadro 10), observa-se quase uma identidade de resultados. As pequenas diferenças que aparecem não podem ser explicadas com segurança sem que trabalhos experimentais sejam conduzidos com cada espécie de hospe-

deiro vertebrado.

Fica bem destacado entretanto que os períodos pré-patentes apresentados por BACIGALUPO (1940) para cobaios esta 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 a 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 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 a 45 dias, todos com intensas lesões hepáticas e um número variável de formas jovens de trematódeo. Justificam bem a dúvida anteriormente exposta.

No presente trabalho 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 pro-



dução de ovos pelo trematódeo nos cobaios.

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

#### C. Criação de Moluscos em Laboratório

Nas condições laboratoriais no Estado do Rio de Janeiro, em setembro de 1973, 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, o tamanho das posturas, que tendem a ter forma ovóide, são idênticas. Embora se saiba que o tamanho das posturas e o número de ovos são geneticamente determinados, é possível que outros fatores interferam nas posturas, e como VERGANI (1955) não referiu a temperatura e 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 mas-

sa 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 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).

Em *L. columella*, GOMES et al. (1974) reportaram que 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 de LEON-DANCEL (1970) informou 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), podendo-se julgar portanto, que os primeiros óvulos tivessem sido postos antes que os espermatozóides depositados no receptáculo seminal os fecundassem.

São poucas as referências encontradas na América do Sul, sobre testes de resistência de moluscos a dessecação. VERGANI (1955) expôs ovos e moluscos de tamanhos diferentes à des-

secação, 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. No presente trabalho 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 àqueles que VERGANI (1955) reportou terem resistido 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 de 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.

Não são precisos os dados bibliográficos para que se possa comprovar na mesma espécie de molusco o índice de 98,9% de susceptibilidade de *L. cubensis* a *F. hepatica* observado no Estado do Rio de Janeiro.

KRULL (1933) assinalou 91,3% como a susceptibilidade

de de *L. columella* ao miracídio de *F. hepatica* e de LEON-DANCEL (1970) citou como 72,0 e 93,0% a susceptibilidade em infecções, coletivas com 10 a 16 miracídios/molusco, respectivamente. A comparação destes percentuais permite que se suspeite ser *L. cubensis* mais sensível a *F. hepatica*.

Como já foi demonstrado que o tempo necessário para emergência de cercárias de *F. hepatica* é menor em *L. cubensis*, e que o índice de sobrevivência a infecções por este helminto é bem alto em *L. columella* onde as duas espécies ocorrem em conjunto, a constatação da maior susceptibilidade de *L. cubensis*, àqueles trematódeos vem corroborar a idéia inicial de que *L. columella* deva ser o hospedeiro intermediário preferido na seleção evolutiva de *F. hepatica*, no Estado do Rio de Janeiro.

#### D. Prevalência

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% entre 475 vacas leiteiras examinadas vivas, 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, não é aconselhável que se compare este percentual com as referências de FRANÇA (1969), que encontrou 10,1% entre 941 bovinos do Vale do Paraíba abatidos no Matadouro Municipal de Taubaté, Estado de S. Paulo, e de REY (1957) que encontrou 2,24% em 714.545 bovinos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul.

## VI. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos da infecção experimental dos moluscos e da biologia de *Lumnaea cubensis* confrontados com dados bibliográficos, pode-se concluir que:

1. *L. cubensis* é hospedeiro intermediário de *F. hepatica* no Estado do Rio de Janeiro, sendo mais susceptível e liberando menor número de cercárias que *L. columella*;
2. o período de incubação dos ovos de *F. hepatica* em estufa a 25 - 27°C, é de 11 a 13 dias;
3. *L. cubensis* não sobrevive até a emergência de cercárias em infecções com mais de cinco miracídios de *F. hepatica*/molusco.
4. o período de evolução de *F. hepatica* em *L. cubensis*, a temperatura ambiente de laboratório entre 27 a 29°C é de 35 a 36 dias;
5. os mamíferos boi, coelho, cobaio, rato, hamster e camundongo são sensíveis à metacercárias de *F. hepatica* e apresentam períodos pré-patentes desiguais entre si;

6. *L. cubensis* é facilmente criável em laboratório pela técnica de TAYLOR & MOZLEY (1948), modificada;
7. em condições ambientes de laboratório o número de ovos de *L. cubensis* é de 3 a 24 por postura;
8. ovos de *L. cubensis* e indivíduos com mais de 30 dias, de idade não resistem a 40 dias de dessecação, porém exemplares com um dia de vida resistem a estas condições;
9. *L. cubensis* inicia a postura em condições de laboratório de 27 a 29°C, aos 18 dias de idade;
10. no município de Três Rios, Estado do Rio de Janeiro, para uma amostra de 475 bovinos, a prevalência da fasciolose é de 35,8%.

## VII. RESUMO

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 molusco criados em laboratório, sendo estudados aspectos da ovopostura, eclodibilidade, resistência à dessecação e maturidade sexual; também foram observadas a susceptibilidade e a resistência à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* L., 1758, bem como o desenvolvimento do helminto nestes hospedeiros.

Foi experimentalmente constatado que os períodos pré-patentes da fasciolose em bovino é de 71 dias, em coelhos, de 65 dias, em rato, de 41 a 44 dias, em hamster, de 33 a 34 dias, e em camundongo, de 32 a 35 dias; em cobaios com 56 dias de infectados, foi observada, nas vias biliares, a presença de helmintos com ovos no útero.

Foi comprovada a participação de *L. cubensis* como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, no Estado do Rio de Janeiro. Constatou-se maior susceptibilidade desta espécie de molusco ao miracídio de *F. hepatica* bem como a emergência de menor número de cercárias, comparativamente com *Lymnaea columella* Say, 1817, também hospedeiro intermediário deste trematódeo no mencionado Estado.

A prevalência da fasciolose entre 475 bovinos examinados no município de Três Rios alcançou 35,8%.



### VIII. SUMMARY

Starting with *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, permitting studies on oviposition, hatchability, resistance to desiccation, and sexual maturation; additionally the susceptibility and resistance to infection with the miracidium of *Fasciola hepatica*, L., 1758, and the development of this trematode in the mollusc were studied.

The role of *L. cubensis* as an intermediate host for *F. hepatica* was established in laboratory experiments. The greater susceptibility of this species to the miracidium of *F. hepatica*, was observed, together with the emergence of a smaller number of cercariae when compared to *Lymnaea columella* Say, 1817, also an intermediate host of this trematode 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 fasciolosis was noted in 475 cattle examined in the municipality of Três Rios.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, J.M.V., 1974. Observaciones sobre la ecología del caracol de agua dulce *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, hospedador intermediario de la *Fasciola hepatica* en la Republica Dominicana. *Rev. Fac. Agron. Vet. Univ. Auto. Santo Domingo*, 2(2):52-54.
- BACIGALUPO, J., 1930. La *Lymnaea viatrix* d'Orb., hoesped intermediario de la *Fasciola hepatica* L., en la Republica Argentina. *Sem. Méd.*, B. Aires, 37(46):1481-1484.
- BACIGALUPO, J., 1932a. Hallazgo en la ciudad de Buenos Aires de *Lymnaea viatrix* d'Orb., infectada espontaneamente com cercárias, de *Fasciola hepatica* L. *Rev. Soc. Arg ent . Biol.*, 8(7-8):511-513.
- BACIGALUPO, J., 1932b. Supersposicion de la distribucion geográfica de *Fasciola hepatica* L. y *Lymnaea viatrix* d' Orb. en la Republica Argentina. *Rev. Soc. Arg ent. Biol.*, 8(7-8):556-558.
- BACIGALUPO, J., 1937. *Lymnaea viatrix* d'Orb, infectée par des cercaires de *Fasciola hepatica*, a Buenos Aires. *C.R. Soc. Biol.* 111:828.
- BACIGALUPO, J., 1938 a. *Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo. *Rev. Méd.*, Habana, 4 (4): 203-206.
- BACIGALUPO, J., 1938b. The life history of *Fasciola hepatica*. *J. Mt. Sinai hosp.*, 5(2):65-74.
- BACIGALUPO, J., 1942. *Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo en la Republica Argentina. *Distomatosis hepatica*. *An. Fac. Vet. Uruguay*, 4(1):9-34.

- BACIGALUPO, J., POU, M.C., CALZAD A, S.V. & BERNINZONE, J., 1941. La *Lymnaea viatrix* d' Orb. hoesped intermediário de la *Fasciola hepatica* en el Uruguay. *Sem. Méd.*, B. Aires, 48:1282-1283.
- BAILY, J.L., 1931. Some data on growth, longevity and fecundity in *Lymnaea columella* Say. *Biol. Gen.*, 7:407-428.
- BARANSKI, M.C., FRARE E SILVA, R., CARNEIRO F°, M., AMARAL, D.F., SILVEIRA, H.B. & MAGNI, N.R., 1978. Novo caso autóctone de fascise hepatica humana no Brasil. XIV Cong. Soc. Brasil. Med. Trop. III Cong. Soc. Brasil. Parasit., P. 388.
- BENDEZU, P., 1969, Liver Fluke im humans. *Vet. Rec.*, 85(19):532-533.
- BRICENO ROSSI, A.L., 1950. Trabajo experimental sobre *Fasciola hepatica*. Primeira comprobacion del verdadero huésped intermedio de este parásito en Venezuela. *Rev. San. As. Soc.*, 15(6):381.
- FRANÇA, I., 1969. *Fasciola hepatica* em bovinos no Vale do Paraíba. *Bol. 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. Viña d. 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*

- tica* L. 1758, de ocorrência no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur. 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, LYMNEIDAE). *Arq. Mus. Nac.*, Rio de Janeiro, 55: 67-70.
- GONZALES, J.C., SANCHEZ, V.M., THOMÉ, J.W., GONÇALVES, P.C. & OLIVEIRA, C.B.M., 1970. Hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica* no Rio Grande do Sul. An. XII Cong. Bras. Med. Vet., Porto Alegre, RS, Brasil.
- GONZALES, J.C., SANCHEZ, V.M., THOMÉ, J.W., GONÇALVES, P.C. & OLIVEIRA, C.B.M., 1971. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* L., no Rio Grande do Sul (Brasil). An. Cong. SOVERG, Bagé, RS, Brasil.
- GRETILLAT, M.S., 1966. *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1911, molusque hôte intermédiaire de *Fasciola hepatica* L., 1758 a la Martinique. *C.R. Acad. Sc. Paris*, T. 262:2736-2739.
- GRETILLAT, M.S., 1967. Prospections malacologiques aux Antilles françaises. Observations sur l'écologie et l'élevage au laboratoire de *Lymnaea cubensis* Pfeiffer. *Rev. Élev. Vet. 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.
- KRULL, W.H., 1933. The snail *Pseudosuccinea columella* (Say) as a

- potentially important intermediate host in extending the range of *Fasciola hepatica* Linn. *J. Wash. Acad. Sci.*, 23:389-391.
- LEE, H.F., 1962. Life history of *Heterobilharzia americana* Price, 1929, a schistomose of the racoon and other mammals in southeastern United States. *J. Parasitol.*, 48:(5):728-739.
- de LEON-DANCEL, D. , 1970. Life history of *Lymnaea columella* (Say), and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.). *J. Agri. Univ. P. Rico*, 54(2): 297- 305.
- LOBATO PARAENSE, W., 1976. *Lymnaea viatrix*: A study of topotypic specimens (MOLLUSCA, LYMNAEIDAE). *Rev. Bras. Biol.*, 36(2): 419-428.
- LUTZ, A., 1918. Caramujos de água doce do gênero *Planorbis*, observados no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 10(1):65-82.
- LUTZ, A., 1921. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Bol. Inst. Oswaldo Cruz*, 1(1):9-13.
- LUTZ, A., 1928. Estudios de zoologia y parasitologia Venezuelanas. Rio de Janeiro.
- MALDONADO, J.F., 1965. Helminthiasis del hombre em América. *Ed. Cient. Med.* 373-376pp., Barcelona.
- d'ORBIGNY, A., 1835. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum in suo per. Americam meridionalem itinere collectorum. *Mac. Zool.*, 5(61-62):1-44.
- d'ORBIGNY, A., 1837. Voyage dans l' Amerique Méridionale, Vol. 5, 3e. Partie: Mollusque. P. Bertrand, Paris.

- PFEIFFER, L., 1839. *Limnaeas cubensis*. Arch. F. Natura., 5(1):354.
- PANTELOURIS, E.M., 1965. The common liver-fluke *Fasciola hepatica* in New Zealand. Part I. A spreading parasite in shepp and cattle. N.Z. Vet. J., 20:69-72.
- PILSBRY, H.A., 1911. Non marine Mollusca of Patagonia. Rep. Princeton Exped. Patagonia, 1869-1899(3):513.
- RAMIRES VILLAMEDIANA, J.J., & VERGANI, F., 1949. Contribucion al estudio del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepatica* en Venezuela. Rev. 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. Rev. 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). Rev. Paul. 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 *Lumnaea* Lamarck, 1799, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. (MOLLUSCA, GASTROPODA, BASOMMATOPHORA, LYMNAEIDAE). Arq. Univ. Fed. Rur. 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. Rev. Inst. Lutz., 25/27:95-109.

- TAGLE, I., 1943. Observaciones sobre la evolucion de la *Fasciola hepatica* L., 1758. Comprobacion del huesped intermediario em Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 46/47:232-241.
- TAGLE, I., 1956. Distomatosis hepatica en el ganado. *Bol. Chil. Par.*, 11(2): 35-36.
- 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. *Nar . 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. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 15:61-67.
- VAN VOLKENBERG, H.L., 1929. Report of the parasitologist. *Porto Rico Agr. Expt. Sta. Bol.*, 1928:36-38.
- VAN VOLKENBERG, H.L., 1934. Parasites and parasitic diseade of cattle in Puerto Rico. *Porto Rico Agr. Expt. Sta. Bol.* 36:26.
- VERGANI, F., 1955. Datos biológicos experimentales sobre el caracol, *Lymnaea (Galba) cubensis* P., 1911. *Bol. Inst. Invest. Vet. Caracas*, 7(23):34-55.
- VIGUERAS, I. & MORENO, B.A., 1938. *Physa cubensis* (MOLLUSCA), um novo hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (TREMATODA). *Mem.*



*Soc. Cubana Hist. Nat.*, (12):74.

WATANABE, S., NAGAYAMA, F. & IWATA, K., 1953. Simple detection technique for *Fasciola* ova. *J. Jap. Vet. Med. Ass.*, 6:176-177.

## X. APÊNDICE

Quadro 1. Condições experimentais da infecção de *L. cubensis* com miracídios de *F. hepatica*

Condições experimentais	1º grupo	2º grupo	3º grupo
Número de moluscos utilizados expostos à infecção	100	100	100
dissecados no 14º 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

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

Número de ordem	1º grupo (1-3 miracídios/molusco)		2º grupo (3-5 miracídios/molusco)		3º grupo (5-10 miracídios/molusco)	
	Resul- tado+	Nº de re- dia.	Resul- tado+	Nº de re- dias.	Resul- tado+	Nº de re- dias.
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
To-nº tais	8	11	13	39	16	81
p %	40	-	65	-	80	-

+ N= negativo , P= positivo

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

Aspectos observados	1º grupo (1-3 miracídios/mo- lusco)	2º grupo (3-5 mira- cídios/mo- lusco)	3º grupo (5-10 mi- racídios/mo- lusco)
Mortalidade (%)	63,7	71,2	100
Moluscos infectados sobrevi- ventes			
Total	29	23	0
Número de Positivos	11	12	0
Percentagem	37,9	52,1	0
Número de metacercárias 35 a 36 dias após infecção	862	1.299	0
Número médio de metacercária por molusco	78,4	108,3	0

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

Animais Utilizados		Pré-patência	Número de metacercárias administradas por hospedeiro	
Espécie	Número	(dias)		
Bovino	1	71	120	
Coelho	2	65	15	a 30
Cobaio	4	56+	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

+ 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

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 à 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

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 20 - 25	25 15 - 20
TAGLE	1943	Chile	23 - 27 24 - 26	11 13
RAMIRES VILLAME DIANA & VERGANI	1949	Venezuela	26	13
GAJARDO <i>et al.</i>	1950	Chile	10 - 37	9 - 45
REY	1957	Brasil	11 - 18	20 - 40
de LEON-DANCEL	1970	Porto Rico	26 - 28	10 - 13
UENO	1973	República Dominicana	21 - 32	9
GOMES <i>et al.</i>	1974	Brasil	27 - 29	9 - 12
Presente trabalho	1978	Brasil	25 - 27	11 - 13

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

Referência			Molusco		Método de	Nº de miracídios/molusco	Moluscos sobre vivências.			Emergência de cercárias (dias).	nº médio de metacercárias
Autor	Ano	País	Espécie	nº	Infecção		Total	Positivo	%		
de LEON-DANCEL	1970	P.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	-	-
VENO 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	305	
			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	1978	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	102,3
				80	individual	5 - 10	0	-	-	-	-

Quadro 10. Resultados obtidos por diversos autores para o período pré-patente de *F. hepatica* em diferentes mamíferos.

Hospedeiro Vertebrado		Pré-patên- cia (dias)	Autor, Ano	Locali- dade	Hospedeiro intermediá- rio
Nome Científi- co	Nome vulgar				
<i>Bos taurus</i>	vaca	71	presente tra- balho, 1978	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Orytolagus cun- culi</i>	coelho	54 - 65	BACIGALUPO , 1942	Argenti- na	<i>L. viatrix</i>
		54 - 56	TAGLE, 1943	Chile	<i>L. viatrix</i>
		65	Presente tra- balho, 1978	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Cavia porcellus</i>	cobaio	97	BACIGALUPO , 1942	Argenti- na	<i>L. viatrix</i>
<i>Rattus norvegicus</i>	rato	51	de LEON-DAN- CEL - 1970	Porto Ri- co	<i>L. columella</i>
		41 - 44	Presente tra- balho, 1978	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Mesocricetus au- ratus</i>	Hamster	33 - 34	Presente tra- balho, 1978	Brasil	<i>L. cubensis</i>
<i>Mus musculus</i>	camundon- go	31	de LEON-DAN- CEL, 1970	Porto Ri- co	<i>L. columella</i>
		33	GOMES <i>et al.</i> , 1974	Brasil	<i>L. columella</i>
		32 - 35	Presente tra- balho, 1978	Brasil	<i>L. cubensis</i>





FIG. 1: Caixa de madeira forrada com plástico para preparação de viveiros para *L. cubensis* {modificação da metodologia de TAYLOR & MOZLEY (1948)}.

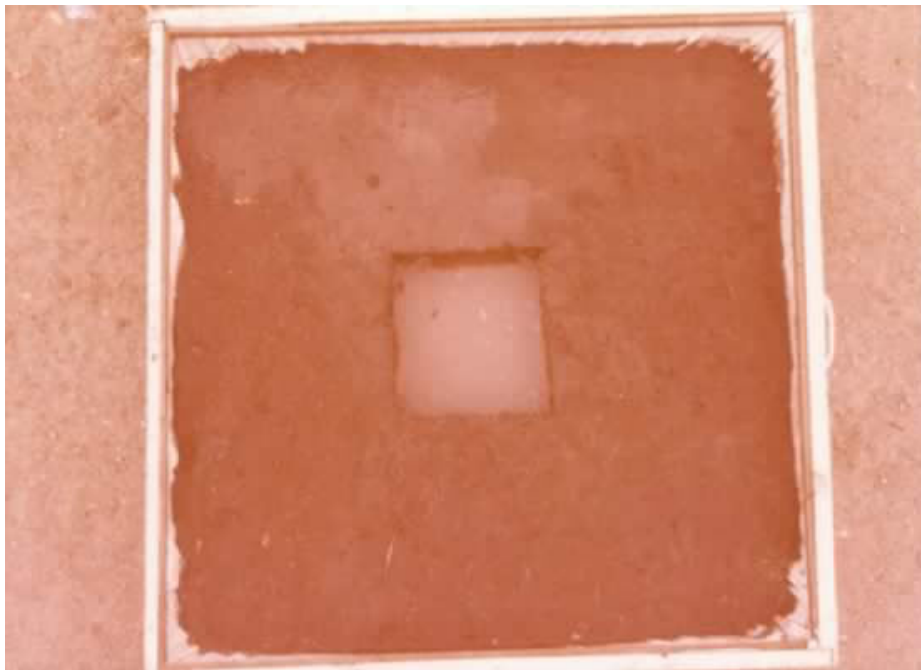


FIG. 2: Viveiro para criação de *L. cubensis*, pronto para transferência dos moluscos.