

# INFECCÃO EXPERIMENTAL DE *Lymnaea columella* Say, 1817, com *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, DE OCORRÊNCIA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

PLÍNIO ANTÔNIO COSTA GOMES<sup>2</sup>, SILVINO NUERNBERG<sup>3</sup>, MANOEL PIMENTEL NETO<sup>3</sup>,  
GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA<sup>3</sup>, HUGO EDISON BARBOZA DE REZENDE<sup>4</sup>, JOSÉ LUIZ DE  
BARROS ARAÚJO<sup>4</sup> e RUBENS PINTO DE MELLO<sup>4</sup>

## Sinopse

Os autores observaram o comportamento dos moluscos submetidos à infecção com quantidades variáveis de miracídios de *Fasciola hepatica*. Estes miracídios foram obtidos pela incubação de ovos de *Fasciola hepatica* recolhidos diretamente de vesícula biliar de bovinos infectados, nascidos e criados no Estado do Rio de Janeiro, provenientes de matadouro. A eclosão ocorreu entre 9 a 12 dias, à temperatura de 27 a 29°C, e os miracídios sobreviveram, aproximadamente, 4 horas.

Moluscos adultos, infectados com 2 a 5 miracídios, resistiram bem a infecção, morrendo 3 a 7 dias após o início da emergência de cercárias; infectadas com 5 a 8 miracídios, também sobreviveram, enquanto que os infectados com 8 a 12, 12 e 16 miracídios, morreram antes da emergência de cercárias. A emergência de cercárias ocorreu entre os 44.º e 58.º dias e o tempo de enquistamento, para se transformarem em metacercárias foi, aproximadamente 20 a 25 minutos.

Camundongos infectados, por via oral, com duas metacercárias, resistiram bem, eliminando ovos de *Fasciola hepatica*, pela primeira vez nas fezes, 33 dias após a infecção.

## INTRODUÇÃO

A fasciolose, largamente distribuída no mundo, é fator importante na criação de bovinos e ovinos, por ser causa de grandes perdas econômicas em muitos países. Tais prejuízos traduzem-se, principalmente, pela redução que acarreta na produção dos animais. Não obstante, pode também, tornar-se problema de saúde pública.

Em 1953, KRULL, descreveu pela primeira vez nos Estados Unidos, *Pseudosuccinea columella* Say, 1817, como hospedeiro intermediário

de *Fasciola hepatica* L., 1758, comprovando experimentalmente, infectando um molusco, com um único miracídio. Sugeriu ainda, ser esta espécie, potencialmente, importante como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* nos Estados Unidos, face a larga distribuição geográfica e sua alta prolificidade.

VAN DER SCHALIE (1948), assinala, pela primeira vez *Lymnaea columella* em Porto Rico, sugerindo ter sido introduzida, porém, de maneira desconhecida.

LEÓN-DANCEL (1970), reproduziu, experimentalmente, a infecção de *L. columella* com *F. hepatica* em Porto Rico.

GONZALES, et al (1970 e 1971), assinalaram a ocorrência de *L. columella* para o Rio Grande do Sul e comprovaram a suscetibilidade da espécie, à infecção com miracídios de *F. hepatica*, em condições de laboratório.

PULLAN & WHITTEN (1972), referem-se a presença de *Lymnaea columella* na Nova Ze-

<sup>1</sup> Trabalho realizado na Seção de Parasitologia do Instituto de Pesquisa Agropecuária Centro-Sul (IPEAC-MA), Laboratório de Biologia Animal da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (LBA/SAA-RJ) e na Área de Parasitologia do Instituto de Biologia da UFRRJ, com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

<sup>2</sup> Médicos Veterinários do GEPARJ, Proc. CNPq 9569/72.

<sup>3</sup> Médicos Veterinários do IPEAC/MA, Proc. CNPq 5893/73, CNPq 2859/71 e CNPq 1325/71.

<sup>4</sup> Professores Assistentes da Área de Parasitologia da UFRRJ.

PROCI-1974.00004

GOM

1974

SP-1974.00004

lândia, como introduzida e conhecida desde 1940. A importância deste molusco na disseminação da *Fasciola hepatica* naquele país, é tão grande que de 40 surtos de fasciolose, 33 eram produzidos por *L. columella*, enquanto que apenas um foi produzido por *L. tomentosa* Pfeiffer, 1885, espécie autoctone da Nova Zelândia. *L. columella* é muito mais eficiente que *L. tomentosa* como hospedeiro intermediário deste parasita do fígado. (ANON, 1971 in PULLAN e WHITTEN, 1972).

REZENDE, et al (1973), assinalam a ocorrência de *L. columella* no Estado do Rio de Janeiro, realizando em condições de laboratório, a infecção experimental com *F. hepatica*.

GOMES, et al (1974) estudando a biologia de *L. columella*, utilizaram métodos que permitiram criar facilmente, em ambientes controlados, várias gerações do molusco. Destas gerações, foram separados exemplares, os quais mantidos sob os mesmos métodos de criação e condições ambientes, possibilitaram os estudos da infecção experimental com miracídios de *F. hepatica*, apresentados neste trabalho.

Em virtude da ampla distribuição de *L. columella*, no Estado do Rio de Janeiro, acreditamos ser importante o papel deste molusco na manutenção dos focos existentes, bem como na disseminação da fasciolose.

#### MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada no desenvolvimento deste trabalho, foi a mesma utilizada por LEÓN-DANCEL, (1970), para melhor comparação dos resultados.

Na infecção experimental de *L. columella*, foi utilizada a técnica de PANTELOURIS, (1965), para a obtenção de miracídios de *F. hepatica*. Os ovos foram obtidos de vesícula biliar de bovinos, nascidos e criados no Estado do Rio de Janeiro, proveniente de matadouros, dos municípios de Três Rios, Paraíba do Sul, Estado do Rio, e de Santa Cruz, Estado da Guanabara.

A secreção biliar foi diluída em um volume de 5 litros de água e após 5 minutos de repouso, tempo suficiente para a sedimentação dos ovos, foi o sobrenadante decantado, deixando-se uma coluna líquida no fundo do recipiente, de cerca de 4 cm de altura. Esta operação foi repetida, até a obtenção de um sobrenadante completamente claro; a última lavagem, foi

feita com água bidestilada, sendo passado todo o líquido por um tamis de 100 malhas por polegada quadrada.

Os ovos assim obtidos, foram transferidos para uma cuba de vidro de 15 cm de diâmetro e mantidos à temperatura de 27 à 29°C, sendo trocada diariamente, a água bidestilada, a fim de evitar a aglutinação dos ovos.

Nos trabalhos de infecção, foram utilizadas *L. columella*, com 24 a 35 dias de idade, as quais apresentavam comprimento de concha entre 7 e 9 mm. Para a infecção individual, 300 moluscos, divididos em três grupos, foram lavados em água bidestilada e colocados, isoladamente, em placas de Petri de 5 x 2 cm com 2 ml de água bidestilada, contendo miracídios recém eclodidos.

O primeiro grupo de 100 indivíduos, foi infectado com 2 a 5 miracídios; o segundo grupo de 100 indivíduos, com 5 a 8 miracídios; e o terceiro grupo, com 8 a 12 miracídios; todos os grupos foram mantidos à temperatura de 29°C durante 4 horas. Após este período, foram transferidos, cada grupo, para um viveiro previamente preparado.

Foi, também, efetuada a infecção em massa, utilizando-se 200 moluscos, divididos em dois grupos de 100. O primeiro grupo foi colocado em placa de Petri de 10 x 2 cm, contendo 10 ml de água bidestilada e infectados com cerca de 1.200 miracídios; com o segundo grupo, procedeu-se do mesmo modo, sendo infectados com cerca de 1.600 miracídios. Ambos os grupos, foram mantidos à temperatura de 29°C, durante 4 horas, sendo transferidos, cada grupo, para um viveiro.

A viabilidade da infecção em vertebrados, foi determinada, experimentalmente, administrando-se duas ou mais metacercárias, por via oral, a camundongos.

#### RESULTADOS

O período de incubação dos ovos de *F. hepatica*, à temperatura de 27 a 29°C, foi de 9 a 12 dias. Os miracídios mostraram-se muito ativos, com fototropismo positivo, durante as primeiras 4 horas; raros indivíduos, sobreviveram após este período.

No quadro I, mostra-se os resultados da infecção experimental dos moluscos, com números variáveis de miracídios. Os infectados individualmente com 2 a 5, com 5 a 8

miracídios, sobreviveram; entretanto, os infectados com 8 a 12 miracídios, morreram antes da emergência de cercárias. Os moluscos infectados com 2 a 5 miracídios, apresentaram

melhor desenvolvimento, com índice de mortalidade de, apenas, 15%, comparados com os infectados, com 5 a 8 miracídios, cujo índice de mortalidade foi de 31%.

QUADRO I

*Infecção de Lymnaea columella com miracídios de Fasciola hepatica, seg. GOMES et al.*

Número da moluscos infectados	Comprimento da concha (mm)	Método de infecção	Número de miracídios p/molusco	Mortalidade %	Número de moluscos infectados sobreviventes			Número médio de rédias	Número médio de metacercárias
					Total	Positivos	Positivos (%)		
100	7 — 9	Individual	2 — 5	15	85	72	84	—	335
100	7 — 9	Individual	5 — 8	31	69	60	86	—	303
100	7 — 9	Individual	8 — 12	100	9	—	—	—	—

A infecção em massa, utilizando-se em média, 12 e 16 miracídios por hospedeiro, resultou na morte de todos os moluscos, antes da emergência das cercárias. Observou-se, ainda, que nesses grupos, moluscos dissecados após 5 semanas da infecção, apresentaram uma média de 9 rédias por espécime.

A emergência de cercárias, nos grupos infectados com 2 a 5 e 5 a 8 miracídios, ocorreu do 44.º ao 58.º dias após a infecção, e o enquistamento das cercárias, foi observado em torno de 20 a 25 minutos. Os moluscos infectados com 2 a 5 miracídios, produziram, em média, 335 metacercárias; os infectados com 5 a 8 produziram, em média, 303 metacercárias. A observação de 50 moluscos, revelou que 3 a 7 dias após a emergência das cercárias, todos haviam morrido.

Para completar o ciclo evolutivo da *Fasciola hepatica*, infectou-se camundongos, com 2 metacercárias, administradas por via oral, que foram suficientes para estabelecer a infecção, constatando-se, após 33 dias, o aparecimento dos primeiros ovos nas fezes.

Camundongos infectados com mais de 3 metacercárias, não resistiram à infecção, morrendo antes do aparecimento dos ovos nas fezes.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

KRULL, (1933), trabalhou com a terceira geração de *Pseudosuccinea columella* (= *L. columella*), obtida em condição de laboratório, mantendo os moluscos em água filtrada e alimentados com alface fresca. Utilizou, para

a infecção experimental, 23 moluscos, com 17 dias de idade, que foram colocados na presença de centenas de miracídios de *Fasciola hepatica*, por um período de 4 horas tendo o cuidado de observar a penetração dos miracídios nos moluscos.

No 17.º dias após a infecção, 2 dos 23 moluscos, dissecados, mostraram-se aparentemente negativos, porém no 30.º dia outro molusco foi dissecado, tendo constatado a presença de 8 rédias mães, contendo rédias filhas em desenvolvimento. Dos 20 moluscos restantes, mantidos em observação, verificou a emergência de cercária, em um deles, após 47.º dias de infecção; 17 outros, também, eliminaram cercárias, durante 8 dias. Os dois restantes apresentaram-se negativos.

O número máximo de cercárias liberadas por indivíduos em apenas 1 dia, foi de 161.

Um dos moluscos infectados, após ter liberado cercárias durante 2 dias, foi dissecado, apresentando, no hepatopâncreas, 241 rédias e 356 cercárias maduras.

No estudo da infecção experimental de *Lymnaea columella* com miracídios de *Fasciola hepatica*, nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por LEÓN-DANCEL, (1970), conforme pode-se observar no Quadro II. Este autor, ao infectar, individualmente, moluscos com 2 a 4 e 4 a 6 miracídios, verificou índices de mortalidade de 20 a 41%, respectivamente; enquanto que em nossas observações, verificou-se que com 2 a 5 e 5 a 8 miracídios, por molusco, o índice de mortalidade foi de 15 a 31%, respectivamente.

QUADRO II

Infeção de *Lymnaea columella* com miracídios de *Fasciola hepatica*, seg. LEON-DANCEL

Número de moluscos infectados	Comprimento da concha (mm)	Método de infecção	Número de miracídios p/molusco	Mortalidade %	Número de moluscos infectados sobreviventes			Número médio de rédias	Número médio da metacercárias
					Total	Positivos	Positivos (%)		
100	8 - 10	Individual	2 - 4	20	80	70	87	—	312
100	8 - 10	Individual	4 - 6	41	59	56	94	—	298
100	8 - 10	Individual	6 - 10	100	0	—	—	—	—

## AGRADECIMENTOS

A Secretária de Agricultura e ao Grupo Executivo da Produção Animal do Estado do Rio de Janeiro, bem como aos Drs. Celso Rayol, Ilmar Pinheiro Goulart, Murilo Vieira Rupp e Otávio Bartolomeu Dantas Alves, nossos agradecimentos, pelo apoio e facilidades dispensadas no decorrer deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GONZALES, J. C., SANCHES, V. M., THOMÉ, J. M., GONÇALVES, P. C. & OLIVEIRA, C. B. M. 1970. Hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica* no Rio Grande do Sul. Anais do XII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Porto Alegre, R. S. Brasil.
- GONZALES, J. C., SANCHES, 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). Anais do Congresso da SOVERG, Bagé, R. S., realizado em julho de 1971.
- GOMES, P. A. C., NUERNBERG, S., NETO, M. P., OLIVEIRA, G. P., REZENDE, H. E. B., ARAUJO J. L. de B., MELLO, R. P., 1973. Biologia da *Lymnaea columella* Say, 1817, (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). II Encontro dos Malacologistas Brasileiros. Museu Nacional do Rio de Janeiro, julho de 1973. Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro (no prelo).
- 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.
- LEÓN-DANCEL, D. de, 1970, Life history of *Lymnaea columella* (Say) and its experimental infection with *Fasciola hepatica* (L.) *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, 54(2): 297-305.
- PANTELOURIS, E. M., 1965, The Common Liver-fluke *Fasciola hepatica* in New Zealand. Part 1. A spreading parasite in sheep and cattle. *New Zealand Veterinary J.*, 20: 69-72.
- REZENDE, H. E. B., GOMES, P. A. C., NETO, M. P., MELLO, R. P., ARAUJO J. L. de B., NUERNBERG, S. & OLIVEIRA, G. P., 1973, Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur. do Rio de J.* 3(1): 21-23.
- VAN DER SCHALIE, H., 1948, The land and fresh water mollusk of Puerto Rico. *Misc. Publ. Mus. Zool., Univ. Mich.*, 70: 100-101.

## Abstract

EXPERIMENTAL INFECTION OF *Lymnaea columella* Say, 1817, WITH *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, OF OCCURRENCE IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL

The behavior of snails infected with different amounts of *Fasciola hepatica* miracidia was observed. These miracidia were obtained from incubated eggs of *F. hepatica* collected directly from gall-bladder of bovines. These infected animals were born and growth in Rio de Janeiro State and were killed at the abattoir. The incubation period of *F. hepatica* eggs ranges 9-12 days at 27-29°C. The miracidia survived four days, approximately.

Adult snails with 2-5 miracidia resisted the infection and died 3-7 days after the emerging cercaria left host. Snails infected with 5 to 8 miracidia also survived; however, snails infected with 8 to 12 and 12 and 16 miracidia died before the cercaria left hosts. Forty-four to 58 days required for development from the miracidium to the cercaria stage. The time of encysting to transform in metacercaria was 20-25 minutes, approximately.

Orally infected white mice with two metacercaria resisted the parasites and eliminated the first *F. hepatica* eggs in their faeces 33 days after infecting the animals.