

A *LYMNEA TRUNCATULA* VECTORA EM PORTUGAL DA *FASCIOLA HEPATICA*

POR

Maria de Loundes Xavier *João Fraga de Azevedo*
António Alves da Cruz

1. *Introdução.*

A fasciolíase hepática é uma doença largamente difundida nos animais herbívoros de Portugal onde a taxa de infecção apresenta valores variáveis conforme os distritos (fig. 1). Na espécie humana contam-se por algumas dezenas o número de casos no País desde que o primeiro foi descrito em 1948 por Fernando da Fonseca e Fraga de Azevedo.

Até agora os estudos feitos entre nós sobre a distomatose, têm-se limitado à apreciação da taxa de infecção dos animais (Leitão, 1960; Cruz, 1962), calculando-se em alguns milhares de contos os prejuízos causados à economia nacional pela epizootia. Todavia, no que se refere aos estudos de base, em que deve assentar o conhecimento da epidemiologia e epizootologia da doença pouco se conhece no País.

Visando este objectivo, temos em projecto, a realização de um vasto plano de estudos sob o patrocínio do Instituto de Alta Cultura e em ligação com o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, com o fim de conhecermos, entre nós a distribuição geográfica do vector, o seu ciclo biológico na Natureza, a sua ecologia, as relações hospedeiro-parasita e outros aspectos do problema.

Com tal finalidade começámos por proceder nalguns pon-

te, pelo que não entraremos aqui em pormenores sobre o assunto.

Por outro lado, nos locais pesquisados, encontramos a *P. acuta*, *L. peregra* e *L. auricularia*. A primeira espécie mais frequente que a segunda e a última só muito raramente. Nestas

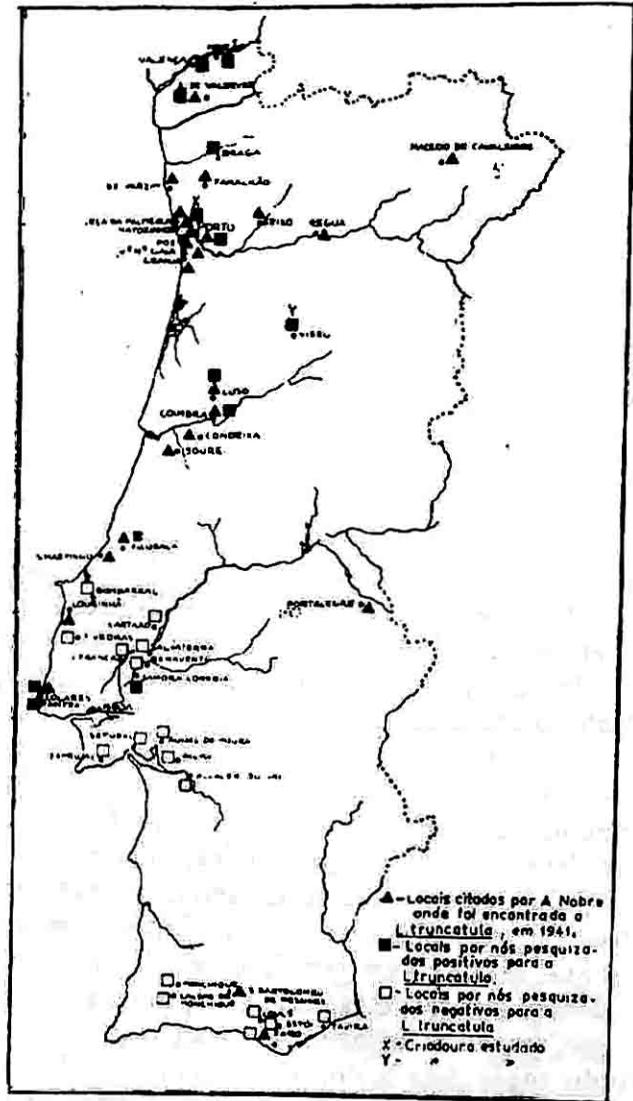


Fig. 2.—Distribuição da *L. truncatula* em Portugal de acordo com os conhecimentos actuais.

condições tentámos a infecção experimental só das duas primeiras, porquanto a *L. auricularia*, além de não ser frequente, nunca se mostrou susceptível à *F. hepática* em experiências feitas por Kendall (1950) e outros investigadores.

No entanto, no que se refere à *L. peregra* apesar de Leuckart (1886-1901) e Thomas (1883) não terem sido bem sucedidos ao tentarem a sua infecção experimental, Walton (1917) refere ter encontrado cercárias semelhantes às da *F. hepática* naquela espécie e Kendall (1950) observou um exemplar de *L. peregra* com rédias e cercárias imaturas. Contudo, estudos no campo feitos pelo último investigador, indicaram que esta espécie só raramente actua como hospedeiro intermediário na Inglaterra, estando a *F. hepática* sobretudo dependente da *L. truncatula*.

No que se refere à *P. acuta* tentámos a sua infecção no laboratório não só porque moluscos pertencentes ao mesmo género forma considerados hospedeiros intermediários de *F. hepática* nalgumas áreas do globo, como é o caso da *Physa fontinalis* na América do Norte (citado por Neveu-Lemaire, 1936), mas também, porque foi aquela espécie de molusco que encontramos com maior frequência e em maior densidade nas áreas de enzootia.

Para a cultura dos exemplares de *L. truncatula* inglesa e portuguesa, que mantemos em laboratório desde 1962, usámos a técnica adoptada por Ollerenshaw no laboratório de Weybridge (Inglaterra), a qual já fora referida por Taylor e Mozley (1948). Tivemos todavia dificuldade na cultura da alga (*Oscillatoria*) a qual foi o único alimento utilizado tanto para os espécimens portugueses como ingleses. Com efeito só depois de experimentadas 20 amostras de terra portuguesa, provenientes de regiões diferentes, obtivemos como a do criadouro X, um crescimento semelhante ao obtido na terra inglesa.

A cultura da *P. acuta* e da *L. peregra* mantidas em laboratório a partir de 1961, foi feita em cristalizadores de vidro tapados, com 14cm. de altura por 15cm. de largura, em água dum tanque depois de filtrada. Como substracto usámos terra do criadouro natural esterilizada, em que colocámos como planta oxigenadora a *Vallisneria spiralis*. Como alimento usamos alface e agrião crus e no caso da *P. acuta* juntámos 2 gramas por semana de pó de concha destes moluscos ou carbonato de cálcio.

A temperatura do moluscário variou entre 18° e 24° C no decorrer das experiências.

A infecção experimental dos moluscos foi feita, expondo tanto a testemunha inglesa como os moluscos portugueses aos miracídios provenientes de ovos de animais infectados na Natureza e abatidos no Matadouro de Lisboa.

Para a eclosão dos miracídios seguimos a técnica usada por Ollerenshaw (1960), com ligeiras modificações. Incubámos os ovos em água da torneira (préviamente tratada por carvão animal), durante 8 dias a 28° C; após este período transferimos para um local onde permaneceram 10 a 20 dias à temperatura ambiente (16 a 22° C). Seguidamente colocámo-los em tubos de vidro com água da torneira (tratada como anteriormente), à temperatura de 28° C, e expuzemo-los à luz duma lâmpada com a potência de 100 watts. Por este processo, ao fim de 15 a 20 minutos, observámos a eclosão de um grande número de miracídios, os quais com auxílio de uma pipeta Pasteur, se transferiram para placas escavadas, onde eram contados, com auxílio duma lupa Zeiss.

Os moluscos foram infectados individualmente em tubos de hemolise com 2 cm³ de água tratada, usando-se 10 miracídios por molusco, no caso dos exemplares de *L. truncatula* portuguesa e inglesa. Para os exemplares de *P. acuta* e *L. peregra* usámos 10 a 50 miracídios por molusco.

A altura média dos moluscos infectados e não infectados, bem como a variância e o desvio padrão vêm expressos no quadro II.

Como hospedeiro definitivo usámos ratinhos (*Mus musculus*) e coelhos (*Lepus cuniculus*), mas só com estes últimos obtivemos ovos viáveis nas fazes. Para a infecção dos animais introduzimos por via oral uma pequena cápsula com 80 metacercárias por animal provenientes dos moluscos que eliminaram cercárias.

3. Resultados

Os resultados vêm expressos nos quadros I e II os quais nos merecem as seguintes considerações:

No primeiro grupo de 30 exemplares de *L. truncatula* portuguesa (quadro I) provenientes do distrito do Porto (criadouro X), obtivemos 10 moluscos eliminando cercárias o que corresponde a uma taxa de 33,3 %. Os moluscos que não eliminaram cercárias até aos 60 dias ou que morreram até esta data foram

QUADRO I

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE DUAS POPULAÇÕES DE *LYMNEA TRUNCATULA*, USANDO COMO TESTEMUNHA UMA POPULAÇÃO INGLESA DA MESMA ESPÉCIE.

Populações estudadas	Nº de moluscos ensaiados	Moluscos que eliminaram cercárias		Período de infecção (dias)	Moluscos dissecados (com rédias)	Total de infectados %
		Nº	%			
Porto (Criadouro X)	30	10	33,3	32,3	3	43,3
Beira (Criadouro Y)	38	8	31,1	31,3	4	31,5
Inglaterra (controles)	30	12	40,0	42,8	5	56,6

dissecados tendo-se encontrado em 3 deles rédias. Juntando estes moluscos aos 10 que eliminaram cercárias perfaz um total de 13, o que corresponde a uma taxa de 43,3 % de positivos.

No segundo grupo de 38 exemplares de *L. truncatula* portuguesa provenientes de Beira (criadouro Y), a percentagem dos que eliminaram cercárias foi de 31,1 % e o total de positivos de 31,5 %, enquanto que nos 30 exemplares de *L. truncatula* provenientes de Inglaterra foi respectivamente de 40 e 56,6 %. Feita a análise estatística dos resultados, entre a taxa de infecção de cada uma das populações portuguesas e a população inglesa obtivemos valores de $X^2 = 3,349$ (Beira) e $X^2 = 0,01$ (Porto), o que corresponde a diferenças não significativas.

O tempo durante o qual os moluscos se mantiveram eliminando cercárias foi de 42,8 dias no caso dos exemplares ingleses e de 32,3 e 31,3 dias respectivamente nas populações portuguesas do Porto e da Beira (quadro I).

A longevidade média dos exemplares de *L. truncatula* portugueses e ingleses infectados em não infectados, bem como a percentagem de moluscos que morreram até aos 60 dias vem expresso no quadro II.

Com as metacercárias (fig. 3) eliminadas pelos moluscos infectámos 20 coelhos com 2 meses de idade, e de que resultou a eliminação de ovos nas fezes em 10 deles, o que corresponde a uma taxa de 50 % positivos.

A mortalidade até aos 120 dias foi de 25 % nos coelhos infectados e de 20 % nos 10 que usámos como testemunha. A partir dos ovos obtivemos miracídios com os quais infectámos novos moluscos, fechando assim o ciclo em laboratório, o qual mantemos a partir desta data.

No caso de 50 exemplares de *P. acuta* e 49 de *L. peregra* submetidos à infecção, não se observou a eliminação de cercárias nem formas larvares do parasita nos vários exemplares dissecados. A longevidade média, bem como a mortalidade até aos 60 dias, dos moluscos infectados e não infectados vem expressa no quadro II.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Berghen (1964) na Bélgica para a *L. peregra*, porquanto aquele autor, também não conseguiu a eliminação de cercárias nem formas larvares de *F. hepática* em 104 exemplares submetidos à infecção e posteriormente dissecados. Todavia aquele autor conse-

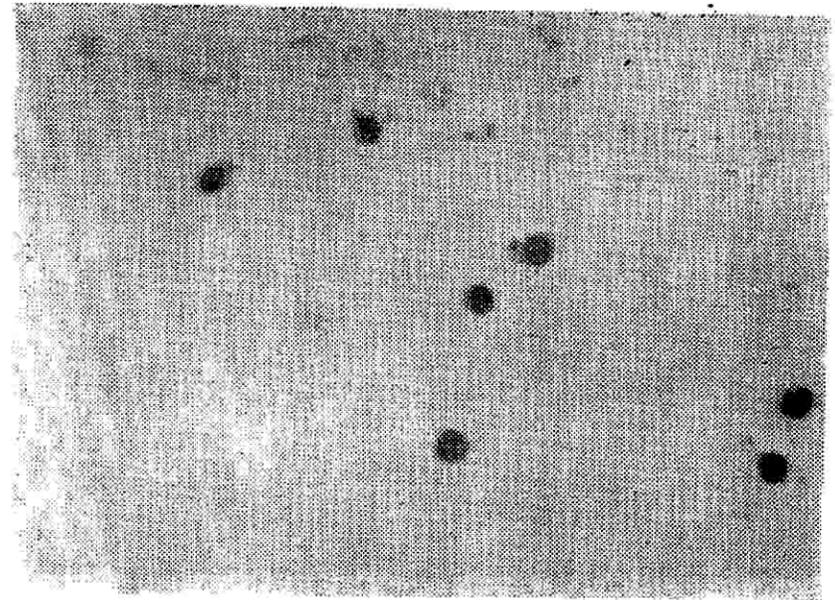


Fig. 3.—Microfotografia de metacercárias de *Fasciola hepatica* eliminadas pela *Lymnaea truncatula* portuguesa.

QUADRO II

DIMENSÕES, MORTALIDADE E LONGEVIDADE DOS MOLUSCOS PORTUGUESES SUBMETIDOS A INFEÇÃO EXPERIMENTAL PELA *FASCIOLA HEPATICA*, USANDO COMO TESTEMUNHA EXEMPLARES DE *LYMNEA TRUNCATULA* INGLESA.

Espécies de moluscos	Proveniência das populações	Tipos de experiência	Número de moluscos	Altura dos moluscos			Longevidade (dias)	Mortalidade até 60 dias	
				\bar{x}	s^2	s		Nº	%
<i>L. TRUNCATULA</i>	Porto (Criadouro X)	Infectados	30	5,1	2,3	1,5	66,9	9	30,0
		Não infectados	20	4,8	2,8	1,5	80,5	4	20,0
	Beira (Criadouro Y)	Infectados	38	4,8	2,1	1,5	64,7	12	32,0
		Não infectados	20	4,5	2,2	1,5	79,5	5	25,0
	Inglaterra	Infectados	30	4,7	3,2	1,8	78,2	9	30,0
		Não infectados	20	5,1	2,3	1,7	116,7	3	15,0
<i>L. PEREIRA</i>	Porto	Infectados	50	5,5	3,9	1,9	82,5	13	26,0
		Não infectados	20	5,1	5,2	2,2	88,6	5	25,0
<i>R. ACUTA</i>	Porto	Infectados	49	5,0	2,60	1,6	93,5	15	30,6
		Não infectados	23	4,9	6,5	2,5	95,0	6	26,1

guiu infectar experimentalmente a *L. stagnalis* e a *L. palustris*, mas não verificou a eliminação espontânea de cercárias. Deve referir-se, no entanto, que Kendall (1950) infectou a *L. stagnalis* e a *L. palustris* até à fase de cercária enquanto que na *L. peregra* observou apenas um exemplar com cercárias imaturas como referimos anteriormente.

Trabalhos em curso, sobre a infecção experimental de *L. palustris* e da *L. stagnalis* estão-se realizando neste laboratório, os quais serão publicados posteriormente. Deve, no entanto, dizer-se que são espécies muito pouco frequentes nas áreas por nós estudadas até à data onde ocorre a distomatose.

4. Conclusões

Em face do exposto fica pela primeira demonstrado experimentalmente que a *L. truncatula* de Portugal se deixa infectar pela *F. hepática*.

Com efeito submetendo duas populações geograficamente distintas do Norte País, à infecção experimental, obtivemos uma taxa de infecção de 43,3 % (população de Porto), de 31,5 % (população da Beira) e de 56,6 % (população inglesa) que nos serviu de testemunha, enquanto que os exemplares de *P. acuta* e *L. peregra* se mostraram negativos nas mesmas condições de experiência.

Feita a análise estatística dos resultados pelo método do quadrado não encontramos diferenças significativas entre as taxas de infecção da espécie portuguesa e da espécie inglesa, pelo que parece não haver diferença de susceptibilidade entre as duas espécies, bom efeito, embora se tivesse verificado, nos anos de epizootia, em determinadas áreas de Inglaterra grande mortalidade de carneiros por fasciolíase, também no nosso País se observaram em ovinos (1961) as elevadas taxas de mortalidade expressas no quadro III. Nos bovinos, porto que esta parasitose não mostre, em regra, com carácter letal, nas regiões de Coimbra e Benavente, observou-se elevada mortalidade sobretudo, em animais com menos de 2 anos de idade (Cruz, 1962).

Embora, até agora, não tivessemos encontrado a *L. truncatula* no centro do País e a sul do Tejo, com excepção de Sintra, Colares e Alcobaça (fig. 2), não significa que uma pesquisa mais decalçada e sistemática abrangendo áreas sucessivamente maiores não nos revele a existência daquela espécie. Com efeito, em

bora aí extensas áreas, não apresentem, em regra, as características ecológicas e climáticas ideais ao desenvolvimento da *L. truncatula*, pode, contudo, admitir-se a existência de certas zonas muito restritas com microlimas propícios ao aparecimento deste molusco, constituindo, portanto, zonas potenciais de fasciolíase, que em anos de epizootia, se tornariam focos importantes de doença como aconteceu nos locais anteriormente citados.

QUADRO III

TAXAS DE MORTALIDADE DOS OVINOS NALGUNAS ÁREAS DE PORTUGAL EM 1961 (CRUZ, ALVES A. 1962)

Localidades	Taxa de mortalidade
Alenquer	17,7 %
"	50,9 %
Soure	21,1 %
"	45,4 %
Alvaizere	45 %
"	29,7 %
Sintra	37 %
"	60,7 %
Benavente	46,6 %

O facto da *L. truncatula* não ser por nós frequentemente encontrada, quando é tão vasta a área de distomatose no País, contrariamente ao que sucede com a *P. acuta* e com a *L. peregra*, a primeira das quais, sobretudo, apresenta uma larga área de distribuição, pode talvez explicar-se por ser difícil constatar a presença de *L. truncatula*, no seu habitat natural, como já referimos, ou pela sua ocorrência em nichos ecológicos. Aliás outros autores, como Berghen (1964) têm notado a mesma falta de sobreposição entre a distribuição da *L. truncatula* e a fasciolíase.

Outra hipótese a considerar, é a de que a *P. acuta*, a *L. peregrina* e talvez outras espécies de moluscos ainda não incriminados como vectores, inclusivé moluscos terrestres, sejam também no País hospedeiros intermediários da *F. hepática*.

Pelas razões expostas, apesar dos resultados negativos obtidos por nós com aquelas espécies, julgamos que novas tentativas de infecção experimental se tornam necessárias no sentido de esclarecer o problema.

5. *Resumo.*

Os autores submetem duas populações de *Lymnea truncatula* do Norte de Portugal, geograficamente distintas, aos miracídios de *Fasciola hepática*, procedentes de carneiros naturalmente parasitados, usando como testemunha a *Lymnea truncatula* inglesa. Verificaram que os moluscos portugueses se infectaram, ficando assim demonstrado experimentalmente pela primeira vez que a *L. truncatula* é vectora em Portugal de *F. hepática*. Submetidos à mesma infecção exemplares de *Lymnea peregrina* e de *Physa acuta* da mesma região e nas mesmas condições de experiência, estas mostraram-se refractárias à infecção.

Feita a análise estatística dos resultados obtidos, entre a taxa de infecção da *L. truncatula* inglesa (56,6 %) e a taxa de infecção da população portuguesa da Beira (31,5 %) e da população portuguesa do Porto (43,3 %) não encontraram diferenças significativas, pelo que parece não haver diferença de susceptibilidade, entre a espécie inglesa e a espécie portuguesa.

Não se verificando em Portugal, aparentemente pelo menos, uma sobreposição entre a distomatose dos herbívoros e a ocorrência da *L. truncatula*, pode o facto explicar-se ou, porque esta espécie não foi revelada nos locais da enzootia, dada a dificuldade de se encontrar, ou porque outras espécies de *Lymnea* e de *Physa*, ou outros moluscos ainda não incriminados como vectores, inclusivé moluscos terrestres, desempenhem esse papel.

6. *Summary.*

The author have submitted two geographically distinct populations of *Lymnea truncatula* from the North of Portugal to infection by miracidia of *Fasciola hepatica* from naturally parasited sheep, using the English *Lymnea truncatula* as control. They have noticed that the Portuguese snail became infected, thus proving experimentally, for the first time, that *L. truncatula* is a vector of *F. hepatica* in Portugal. Under the same experimental conditions, specimens of *Lymnea peregrina* and *Physa acuta* from the same area proved to be not susceptible to the infection.

No significant differences were reported after making the statistical

analysis of the results obtained between the rate of infection of the English *L. truncatula* (56,6 %) and the rate of infection of the Portuguese population of Beira (31,5 %) and the Portuguese population of Oporto (43,3 %); accordingly, there seems to exist no difference in susceptibility between the English species and the Portuguese one.

Since there is no superposition in Portugal, at least apparently, between the fascioliasis of herbivora and the occurrence of *L. truncatula*, the fact may be explained either because this species has not been revealed in the enzootic areas due to its elusiveness, or because other *Lymnea* and *Physa* species or other snail including land snails are actually acting as vectors, though having not yet been considered so.

AGRADECIMIENTOS

Estamos muito reconhecidos ao Dr. C. B. Ollerenshaw do Veterinary Laboratory of Weybridge-Inglaterra, não só por nos ter enviado *Oscillatoria* e a *Lymnea truncatula* inglesa e ter confirmado a classificação dos moluscos portugueses mas também pelas suas valiosas sugestões e continuo interesse que lhe mereceu o nosso trabalho.

Queremos igualmente agradecer ao Exmo. Sr. Presidente da Câmara Municipal de Matosinhos, Sr. Engenheiro Fernando Pinto Oliveira, não só as facilidades concedidas, como a colaboração que se dignou prestar-nos por intermédio do Dr. Fernando Sá Dantas, chefe do Matadouro de Matosinhos e do seu ajudante Bernardino de Oliveira Melo.

Exprimimos também ao Exmo. Sr. Prof. J. Machado Vaz da Faculdade de Medicina do Porto, o nosso maior reconhecimento, não só pelas valiosas informações que nos deu sobre a incidência dos casos humanos no Norte do País, mas ainda pela colaboração que, por intermédio do seu assistente, Dr. Santos Mota, se dignou prestar-nos.

Estamos igualmente muito reconhecidos ao pessoal técnico e auxiliar do Instituto de Medicina Tropical de Lisboa que colaborou neste trabalho: Ilda Avelino, Viviane Marreiros Furtado e José Ferreira.

BIBLIOGRAFIA

- BERGHEN, P.—Some Lymnaeidae as Intermediate Hosts of *Fasciola hepatica* in Belgium. *Exp. Parasit.*, 15-2: 118-124, 1964.
- CRUZ, A. A.—La fasciolose bovine et ovine au Portugal. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 58: 323-335, 1962.
- FONSECA, F. e AZEVEDO, J. FRAGA.—Un cas humain de fascioliose hépatique. *Ann. Par. Hum. et Comp.*, 23: 18-22, 1948.
- KENDALL, S. B.—Snails hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *Journ. Helminth.*, 24: 63-74, 1950.

- KENDALL, S. B.—The life history of *Lymnea truncatula* under laboratory conditions. *Journ. Helminth.*, 27: 18-28, 1953.
- LEITAO, J. S.—Fasciolíase e Dicrocelíase em Portugal. Etiologia e Considerações. *Anais da Escola Superior de Medicina Veterinária*, Vol. II, n.º 2, 1960.
- LEUCKART, R.—Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden Krankheiten. C. F. Winter'sche Verlagshandlung. Leipzig, 1886-1901.
- NEVEU-LEMAIRE.—Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. Paris, 1936.
- NOBRE, A.—Fauna Malacológica de Portugal. II. Moluscos terrestres e fluviais. Memórias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra, 1941.
- ROWCLIFFE, S. A. e OLLERENSHAW, C. B.—Observations on the Bionomics of the Egg of *Fasciola hepática*. *Ann Trop. Med. Parasit.*, 54, 2: 172-181, 1960.
- SNEDECOR, G. W.—Statistical Methods, 4th ed. Iowa State College Press.
- TAYLOR, M.—Water Snails and Liver Flukes. *Nature*, No. 2776, III: Ames, Iowa, 1950.
- NEVEU-LEMAIRE.—Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. Paris, 701, 1922.
- TAYLOR, M.—Water Snails and Liver Flukes. *Nature*, No. 2769, 110: 49, 1923.
- TAYLOR, E. L. and MOZLEY, A.—A culture method for *Lymnaea truncatula*, No. 4101, 161: 894, 1948.
- THOMAS, A. P.—The life history of the liver fluke (*Fasciola hepática*). *Quart. J. Micr. Sci. Society*, 23, 99-113, 1883.
- WALTON, C. L.—Liver-rot of sheep and bionomics of *Lymnaea truncatula* in the Aberystwyth area. *Parasit.*, 10, n.º 2: 232-266, 1917.