

REVISION DEL CICLO BIOLÓGICO DE FASCIOLA HEPATICA

LUCILA M. VENTURINI (1)

RESUMEN

Mediante el método que se describe se ha logrado reproducir el ciclo biológico de *Fasciola hepatica* utilizando caracoles *Limnea viator* D'Orbigny criados en laboratorio y en cobayos.

Dicho ciclo se cumplió en los siguientes lapsos: a temperatura de laboratorio, ciclo de huevo a huevo, 150 días; ciclo en hospedador intermedio, en estufa a temperatura de 20°C (\pm 2°C) 50 días.

Se confirma que *Limnea viator* D'Orbigny se comporta como hospedador intermedio de *Fasciola hepatica* en la República Argentina.

SUMMARY

A REVIEW OF THE BIOLOGICAL CYCLE OF FASCIOLA HEPATICA

By means of the method described it has been possible to reproduce the biological cycle of *Fasciola hepatica* using *Limnea viator* D'Orbigny snails raised in laboratory and guinea pigs.

Said cycle was completed in the following time lapses: at laboratory temperature egg to egg cycle, 150 days; cycle at the intermediate host, in incubator at 20°C (\pm 2°C) 50 days.

It is confirmed that *Limnea viator* D'Orbigny behaves as an intermediate host of *Fasciola hepatica* in the Argentine Republic.

(1) Profesora Adjunta Interina de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

INTRODUCCION

El presente informe aporta datos sobre el ciclo biológico de *Fasciola hepática*, efectuado en forma experimental utilizando el caracol *Limnea viator* como hospedador intermedio y cobayos como hospedadores definitivos. En nuestro país sólo existe en la bibliografía el trabajo que publicara J. Bacigalupo en el año 1942, trabajo que no fue continuado posteriormente. La importancia de la distomatosis por las pérdidas económicas que ocasiona en las explotaciones pecuarias y la escasez de datos locales en lo concerniente a estudios de laboratorio alentó la inquietud de retomar este tema.

La literatura mundial provee abundante información, pero ésta difiere según los autores por el hospedador intermedio utilizado y las condiciones experimentales; con respecto a los hospedadores intermediarios, así como para Argentina se considera que dicho rol es desempeñado normalmente por *Limnea viator* D'Orbigny, en Australia lo es por *Limnea tomen-*

tosa, en algunas regiones de Europa por *Limnea truncatula*, etc.

De estos estudios surgieron métodos desarrollados por diferentes autores que incluyen técnicas de cultivo de caracoles, obtención de cercarias, etc., que permiten la reproducción experimental de la enfermedad para realizar estudios clínicos, patológicos, inmunológicos, pruebas de antihelmínticos controladas u otros estudios relacionados al tema.

El haber conseguido mantener colonias de *Limnea viator* desde el año 1973, alentó la prosecución del trabajo con el objeto de mejorar la técnica de cultivo. Simultáneamente, desde esa época se realizan infecciones de los mismos con *Fasciola hepática*. Esta tarea, por razones varias, fue hecha en forma discontinua, habiendo logrado completar el ciclo biológico recién en 1977.

Los datos vertidos por este medio provienen del desarrollo de dicho trabajo y son el punto de partida para futuras investigaciones.

MATERIAL Y METODOS

1.1 *Experiencia a*: Ciclo de *Fasciola hepática* en el hospedador intermedio y en el hospedador definitivo.

Realizada a temperatura ambiente de laboratorio. La temperatura tiene

importancia en el desarrollo de las formas juveniles del trematode en el molusco.

Durante el desarrollo de dicha etapa la temperatura ambiente fue la siguiente:

	Media máxima	Media mínima (cg)
Febrero	26,2°	17,9°
Marzo	25,2°	15,5°
Abril	23,5°	12,5°
Mayo	17 °	13 °

Caracoles: 8 ejemplares de *Limnea viator* de longitud promedio 7 mm, criados en el laboratorio (adultos).

2 Cobayos.

1.2 *Experiencia b*: Reproducción del ciclo biológico en el hospedador intermediario, en estufa a 20°Cg (± 2:cg).

Caracoles: 9 ejemplares de *Limnea viator*, longitud promedio 3 mm, criados en el laboratorio (jóvenes).

En ambas experiencias los huevos de *Fasciola hepática* fueron colectados de bilis de ovinos afectados por distomatosis.

Los recipientes de caracoles son variados: se trata de cajas plásticas de 8 cm de ancho por 13 cm de largo por 5 cm de profundidad, otras de 21 cm de ancho por 28 cm de largo por 6 cm de profundidad y cristalizados de 20 cm de diámetro por 10 cm de profundidad.

1.3 Cría de *Limnea viator*

Estos caracoles se crían y se reproducen en los recipientes descritos, con distintas condiciones de humedad y temperatura. La alimentación incluye lechuga, algas, harina de cereales y tiza. En todos los casos los recipientes tienen barro en el fondo.

1.4 Huevos de *Fasciola hepática*

1.4.1 *Recolección*: Se deja sedimentar la bilis en vasos cónicos, los huevos decantan, se vuelca el sobrenadante, se agrega agua destilada y se deja decantar nuevamente. Esta operación se repite la cantidad de veces que es necesarias para que queden libres de bilis.

1.4.2 *Almacenaje*: Se disponen en cajas de Petri a 4°Cg hasta que deben ser utilizados. A esa temperatura no hay evolución pero se mantienen viables. Normalmente no se mantienen en esas condiciones más de 2 ó 3 meses.

1.4.3 *Incubación*: Se realiza a 28°Cg durante 9 a 12 días, en oscuridad. Al cabo de ese período los miracidios ya se han formado en el interior de los huevos.

1.5 *Miracidios*

Los huevos que ya han sido incubados se exponen a la luz, produciéndose así la liberación de los miracidios en un lapso muy corto (puñitos 1.4.3 y 1.5 según técnica de Rowan).

1.6 *Infección de caracoles*

Se colocan los caracoles en los recipientes donde se hallan los miracidios (caja de Petri), permanecen en los mismos el tiempo necesario para que se fijan pocos miracidios por caracol, hecho que se controla por medio de una lupa.

1.7 *Control de la infección*

Se disecan caracoles para verificar la presencia de formas juveniles del trematode. El número de individuos y el tiempo en que se realiza el control varía de acuerdo a las necesidades.

1.8 *Cuidado de los caracoles después de la infección*

Los caracoles que han sido seleccionados para ser infectados, son dispuestos, después de la infección, en recipientes iguales a los utilizados para la cría. Es importante mantener el buen nivel nutricional de los mismos, la humedad adecuada y retirar los moluscos muertos en caso de que los haya.

1.9 *Recolección de metacercarias*

En este punto se siguió la técnica de Weybridge. La emisión de las cercarias del molusco al agua se provoca disminuyendo la temperatura de la misma en 10°Cg. Los caracoles se disponen en recipiente de celofán, con agua destilada. El papel celofán tapa el recipiente de vidrio. Las cercarias que nadan en el medio acuoso se enquistan sobre el primero. Se retiran los caracoles y se vuelven a su habitat. Se puede volver a estimular la salida de cercarias en la misma forma.

1.10 *Mantenimiento de Metacercarias*

Las metacercarias se mantuvieron hasta el momento de la infestación

del hospedador definitivo a temperatura ambiente de laboratorio, sumergidas en agua destilada.

1.11 *Infestación del hospedador definitivo*

La administración de metacercarias a los dos cobayos utilizados se realizó por medio de la ingesta de un pequeño trozo de papel celofán a cada uno, que tenía cada papel 10 metacercarias.

1.12 *Investigación de la presencia del trematode en el hospedador definitivo*

El primer cobayo fue sacrificado a los 4 días de la administración de las metacercarias y se investigó la presencia de formas juveniles con lupa.

El segundo cobayo murió y en ese momento se hizo la necropsia, observando lesiones, investigando la presencia de trematodes adultos en hígado y también se observó microscópicamente materia fecal y bilis.

RESULTADOS

2.1 *Experiencia a:*

El día 0 de la prueba se considera el de la fecha de iniciación, 4 de febrero de 1977.

Día 0: Se ponen a incubar en la estufa los huevos de *Fasciola hepática*.

Día 11: Los miracidios abandonan los huevos e infectan los caracoles.

Días 12 a 38: Mantenimiento de los caracoles infectados.

Día 39: Se realiza el control de infección con un solo caracol. Se hallan redias juveniles de 300 a 400 micras de largo, localizadas en el hepatopáncreas.

Día 66: Se estimula la eliminación de cercarias, éstas se enquistan en el papel celofán.

Día 73: Las metacercarias son administradas a los cobayos.

Día 77: Se sacrifica e investiga un cobayo con resultados negativos.

Día 150: Fue investigado el segundo cobayo. Se hallaron 8 *Fasciolas hepáticas* adultas y gran cantidad de huevos en bilis y materia fecal.

Mortandad de caracoles:

1º muerto a las 24 horas de infección.

2º muerto a los 28 días para control.

3º muerto a los 52 días.

4º muerto a los 64 días.

5º y 6º muertos entre los días 75 y 112.

7º muerto el día 112.

8º muerto el día 119.

2.2 *Experiencia b:*

Día cero, fecha de iniciación de la experiencia: 1º de agosto de 1977.

Día 0: Se ponen a incubar los huevos de *Fasciola hepática*.

Día 9: Eclósión de los huevos, infección de los caracoles.

Día 43: Se realiza el control de infección de los caracoles en dos ejemplares: En la disección se hallan redias y redias hijas, dentro de estas últimas libres en el hepatopáncreas no se observan todavía cercarias formadas. Cantidad de redias halladas y tamaño de las mismas: en un caracol 4 redias; longitud máxima: 1,296 mm; longitud mínima: 936 micras; 10 redias hijas de longitud máxima de 720 micras y mínimo 360 micras. En el otro caracol se hallaron 2 redias que medían 1,008 mm y 1,152 mm y 10 redias hijas de longitud máxima de 648 micras y mínima de 288 micras.

Día 59: Emisión de cercarias.

Mortandad de caracoles:

Los únicos caracoles muertos fueron los sacrificados como control. Los restantes permanecieron vivos después de dada por concluida la experiencia.

DISCUSION

Con referencia a las investigaciones llevadas a cabo por el Dr. J. Bacigalupo hasta el año 1942, se han realizado las observaciones que se describen:

Se confirma que *Limnea viator* D'Orbigny se comporta como hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* en Argentina.

Afirma que "este molusco puede infectarse durante toda su vida, en estado joven y adulto" aunque no precisa en su trabajo la edad de los caracoles con que trabajó, ni la cantidad. Por las presentes experiencias se confirma en parte este hecho: en la *experiencia a* se trabajó con adultos (considerados como tales por su tamaño y por hallarse en oviposición) y la *experiencia b* se realizó con individuos jóvenes, en ambos casos se logró la evolución hasta cercarias. Sería importante sin embargo determinar la viabilidad de las infecciones en caracoles más pequeños.

Otra de las observaciones hecha es: "No hemos visto formarse en nuestras experiencias redias hijas en verano y sólo en una ocasión en invierno". En la presente *experiencia b* se observó la formación de redias hijas con temperatura de estufa de 20°cg ($\pm 2^{\circ}$ cg).

Con respecto al tiempo transcurrido entre la infección de *Limnea* por miracidios y la eliminación de cercarias da valores que oscilan entre 57 y 80 días. En el presente trabajo dicha etapa se cumplió en 50 y 54 días en las condiciones descriptas.

Es importante el estudio de los factores que concurren al acortamiento o alargamiento del ciclo en el hospedador intermediario, por los datos que puede aportar para la comprensión de los hechos que ocurren a campo.

Estudios hechos con otras especies de *Limnea* remarcan la importancia que tienen el nivel nutricional de los caracoles y la temperatura ambiente, entre otros factores, con respecto a ese punto.

En lo referente a los cultivos de caracoles, el trabajo de Bacigalupo es muy escueto, y fue uno de los principales obstáculos que atrasó la obtención de los resultados sobre el ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

Las colonias de *Limnea viator* se mantienen desde 1973, pero la cría se ha realizado con muchos altibajos. Recién en el presente año se ha obtenido un incremento marcado en el número de individuos.

Es necesario sin embargo, realizar nuevos estudios, que serán motivo de un próximo trabajo. Estará orientado a determinar diversos parámetros biológicos entre los que se hallan tasas de reproducción y crecimiento, alimentación, temperatura y medio óptimo de desarrollo. Tiene como objeto lograr técnicas de cultivo simples que no insuman por sí exceso de trabajo o equipos.

La infección de caracoles se mostró adecuada referida a la cantidad de miracidios. Como se describe en la *experiencia a*, de 8 caracoles murieron 2 antes de que se produjera la liberación de las cercarias. El tercer individuo muerto fue sacrificado para control. El último ejemplar murió 53 días después de la primera salida de cercarias. En la *experiencia b* no hubo mortandad espontánea antes de la emisión de cercarias.

Es evidente que la escasa cantidad de individuos no permite generalizar y las conclusiones serán válidas para las condiciones dadas en el presente trabajo.

Este punto también exige ampliación en los estudios posteriores. Las infecciones que fueron realizadas antes de estas experiencias, culminaron varias veces con la mortandad de los caracoles antes de llegar los estadios evolutivos a la etapa de cercaria. Sólo en una oportunidad en el año 1974 había sido logrado, pero el trabajo debió ser suspendido.

Es necesario realizar estudios referidos al almacenaje de metacercarias

que permita mantenerlas por periodos prolongados en condiciones óptimas de viabilidad.

Se deben probar técnicas para la administración de metacercarias, la

cantidad necesaria de las mismas para producir enfermedad de curso agudo o crónico en las distintas especies y porcentaje de recuperación de trematodes.

CONCLUSIONES

Se presenta un método que permite el desarrollo del ciclo de *Fasciola hepática* en forma experimental.

Se realizó dicho ciclo biológico como se describe a continuación:

Experiencia a: Se utilizaron como hospedador intermediario caracoles *Limnea viator* D'Orbigny criados en el laboratorio y cobayos como hospedador definitivo. Se realizó a temperatura de laboratorio. Dicho ciclo se cumplió en los siguientes lapsos: incubación de los huevos de *Fasciola hepática* 11 días, período en el hospedador intermediario desde la infección con miracidios hasta la salida de las cercarias 54 días. En el hospedador definitivo desde la administración de metacercarias hasta el hallazgo de *Fasciola hepática* adulta en el hígado, huevos en bilis y materia fecal 76 días, habiéndose realizado el

ciclo completo de huevo a huevo en 150 días, abarcando también el período desde la emergencia de las cercarias hasta la administración.

Experiencia b: Se utilizaron caracoles *Limnea viator* criados en laboratorio y fue realizada a temperatura de estufa de 20°Cg. Tiempo de incubación de los huevos 9 días (a 28°Cg), lapso entre la infección del hospedador intermediario con miracidios y salida de las metacercarias: 50 días. A los 34 días de la infección se hallaron redias y redias hijas libres en el hepatopáncreas.

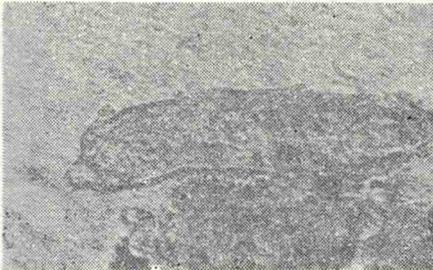
Se confirma que *Limnea viator* D'Orbigny se comporta en Argentina como hospedador intermediario de *Fasciola hepática*, hecho que ya fuera comprobado por Bacigalupo en 1942, con diferentes condiciones experimentales.

BIBLIOGRAFIA

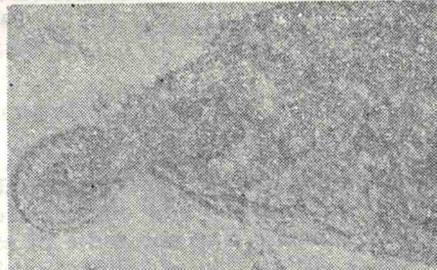
- BACIGALUPO, J.: *Fasciola hepatica*, su ciclo evolutivo en Argentina, Anales de la Facultad de Medicina Veterinaria de Montevideo. Vol. 1, pág. 7-134. 1942.
- BORAY, J. C., ENIGK, K.: Laboratory studies on the survival and infectivity of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* - metacercariae. Tropenmedizin und Parasitologie, Band 15, Häft 3, pág. 324-331. 1964.
- BORAY, J. C.: Studies on experimental infections with *Fasciola hepatica*, with particular reference to acute fascioliasis in sheep. Ann. Trop. Med. Parasit. 61, pág. 439-450. 1967.
- DAWES, B.: The trematoda. Cambridge University press, Inglaterra. 1946.
- KENDALL, B.: Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnea truncatula*. Jour. of Helm. Vol. XXIII, números 3-4, pág. 179-190. 1949.
- KENDALL, B.: Snails hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. Journ. of Helm. Vol. 24, números 1-2, pág. 63-74. 1950.
- KENDALL, B.: The life story of *Limnea truncatula* under laboratory conditions. Jour. of Helm. Vol. 27, pág. 17-28. 1953.
- ROWAN, W.: The mode of hatching of the egg of *Fasciola hepatica*. Experimental Parasitology. Vol. 5, número 2, pág. 118-136. 1956.



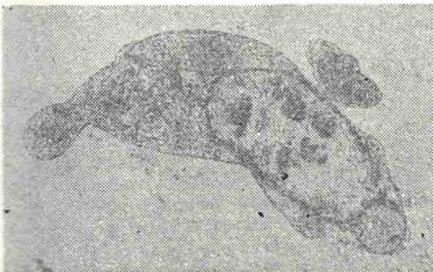
1. Esporocito de 24 horas.



2. Redia hallada a los 29 días de la infección de los caracoles. No tiene redias hijas en su interior. Longitud 300 micras (experiencia A).



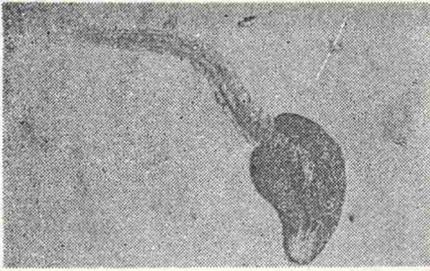
4. Detalle de la redia de la foto 3 donde se aprecian las redias hijas.



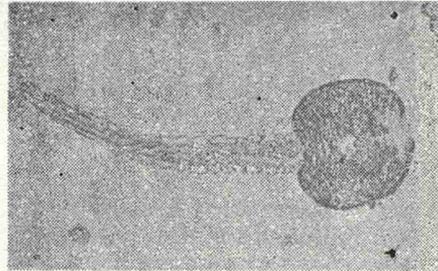
3. Redia hallada a los 34 días en la experiencia B, con redias hijas en su interior.



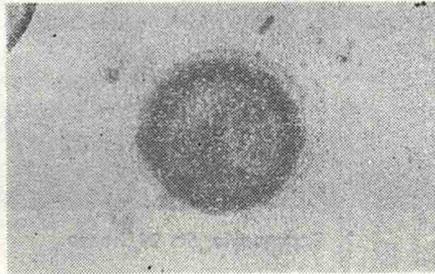
5. Redias hijas ya liberadas en el hepatopáncreas del caracol.



6. Cercaria libre.



7. Cercaria adherida al vidrio, iniciando el enquistamiento.



8. Metacercaria adherida a un papel celofán.