

Obtención de metacercarias de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea cubensis* y relación parásito-hospedero en ratas Wistar y ratones Balb/c

Ervelio Olazabal Manso*
Alcides Morales Monteagudo*
Héctor Serrano Pérez*
Elio Brito Alberto**

Abstract

This study included two experiments: Trial I in which two methods (necropsy and polyethylene bags) to collect *Fasciola hepatica* metacercariae were compared, and Trial II carried out in order to determine the invasive power of the metacercariae obtained in an artificial biotope using Wistar rats and Balb/c mice challenged with 20 and 5-10 metacercariae, respectively. It was found that the number of metacercariae obtained through the use of polyethylene bags is considerably higher ($p < 0.01$) than the dissection (1442 metacercariae were obtained with a mean of 12.87 per host as opposed to a 29.31 mean for polyethylene bags with a total of 3313 metacercariae). Both invasive power (IP) and extent (IE) in rats was higher in the third week (IP, 23%; IE, 80%). The same happened in the mice challenged with infective doses of 10 metacercariae (IP, 23%; IE, 80%). There was a 100% damage in the liver for both doses in the third week. It may be concluded that the polyethylene bag method is more effective than the dissection one, since it makes it possible to collect a larger number of invasive forms with a higher quality, cleanliness and easy removal of the metacercariae from the encystment surface, as well as due to the fact that the invasive power of the metacercariae and the extent of the invasion obtained, allows their use in test models of *Fasciola hepatica* in rats and mice with the appropriate doses of 10 and 20 metacercariae for mice and rats, respectively.

KEY WORDS: *Fasciola hepatica*, *Lymnaea cubensis*, Rats, Mice.

Resumen

Fueron realizados dos experimentos, el experimento I con dos métodos (necropsia y bolsa de polietileno) para coleccionar y comparar las metacercarias obtenidas, y el experimento II que fue desarrollado para determinar la potencia invasiva de las metacercarias obtenidas en un biotopo artificial, usando ratas Wistar y ratones Balb/c inoculados con 20 y 5-10 metacercarias, respectivamente. Se encontró que el número de metacercarias obtenidas con el uso de las bolsas de polietileno es considerablemente superior ($P < 0.01$) a las obtenidas por disección con un total de 1 442 metacercarias y una media de 12.87 por hospederos, mientras que en el método de las bolsas de polietileno la media fue de 29.31 y el total de 3 313. La potencia invasiva (PI) y la extensión de la invasión (EI) en las ratas fue más alta en la tercera semana (PI, 23%; EI, 80%), similar a los ratones inoculados con 10 metacercarias (PI, 23%; EI, 80%). Hubo 100% de hígados afectados por ambas dosis en la tercera semana. Se concluye que el método de las bolsas de polietileno es más efectivo que la disección facilitando la obtención de gran número de formas invasivas con alta calidad, limpieza y fácil desprendimiento de las metacercarias, desde la superficie de enquistamiento: así como el hecho de que la potencia invasiva y la extensión de la invasión obtenida valida su uso en las investigaciones con modelos de *Fasciola hepatica* en ratas y ratones con dosis apropiadas de 20 y 10 metacercarias por ratas y ratones, respectivamente.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola hepatica*, *Lymnaea cubensis*, Ratones, Ratones.

Recibido el 20 de febrero de 1998 y aceptado el 26 de agosto de 1998.

*Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5, Santa Clara, Villaclara, Cuba.

**Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5, Santa Clara, Villaclara, Cuba.

La obtención de metacercarias a escala, de laboratorio, es un requisito necesario para evaluar la efectividad de nuevos fármacos. Cuba, como país tropical en el que las condiciones ambientales fluctúan entre 25 y 30°C de temperatura, 85% de humedad relativa y en el que las precipitaciones pluviales son frecuentes, facilita la obtención de las metacercarias, así como el desarrollo del hospedero intermediario de *Fasciola hepatica*, *Lymnaea cubensis*. Estas formas invasivas son utilizadas en modelos experimentales y las cantidades que de ellas se obtienen, así como los métodos de obtención, tienen una gran significación en la cantidad y calidad de las formas invasivas.^{1,2,3,4,5}

Por otra parte, con el objeto de analizar con rapidez los resultados en la evaluación de fasciolícidias, las ratas remplazaron a los conejos en muchos laboratorios de investigación del mundo por ser aquéllos, animales que resultan más económicos.⁶ También Corba⁷ estudió la factibilidad de usar la rata como modelo experimental para la *Fasciola hepatica*, dada la baja mortalidad y la posibilidad de evaluar los estados juveniles y adultos. El ratón también ha sido utilizado como un modelo útil, Andrews⁸ obtuvo que con dosis de hasta 8 metacercarias no se producían muertes y se lograba 100% de invasión a los 21 días, y con 4 metacercarias sobrevivían 50% hasta las 6 semanas de edad, por lo que considera la posibilidad de usar el ratón para evaluar estados juveniles y adultos. Corba *et al.*⁹ utilizaron posteriormente este modelo, con buenos resultados para la evaluación de nuevos fasciolícidias.

Por lo anteriormente expresado, en este trabajo se proponen dos métodos, uno para comparar la eficacia de la obtención de metacercarias mediante la disección, referido en la literatura; y otro empleado con la finalidad de obtener una mayor cantidad de metacercarias, así como para verificar la potencia invasiva de las metacercarias obtenidas en los locales de cría artificial, infectando ratones y ratas para evaluar la factibilidad de su utilización en la evaluación de nuevas sustancias fasciolícidias obtenidas en el Centro de Bioactivos Químicos, de la Universidad Central de las Villas, en Cuba. Con ese fin, se realizaron los experimentos I y II.

Experimento I: Comparación de dos métodos para la obtención de metacercarias

En cada uno de los métodos se utilizaron moluscos *Lymnaea cubensis*, de 5-10 mm de longitud, que según lo referido por Mitterpak *et al.*¹⁰ permiten los mejores resultados. Estos moluscos fueron colocados en tubos de ensayo de 10 ml de forma individual con agua destilada e invadidos con tres miracidios cada uno; posteriormente se cultivaron en un ambiente artificial dentro de cajas de plástico, alimentándolos con algas *Oscillatoria* sp y mantenidos a temperatura de 22 a 26°C.

Método 1: Disección de los caracoles

Sobre una hoja de polietileno de 10 cm² se colocaron 5 caracoles, se situaron en una placa de Petri, donde se añadieron 3 ml de agua. A continuación se comprimieron los moluscos con una pinza de disección y se observó en el microscopio el movimiento y la morfología de las cercarias; una hora después, aproximadamente, se introdujo la hoja de polietileno en una placa de Petri que contenía agua limpia con la ayuda de una pinza de disección para deshacerse de los residuos de los moluscos, quedando solamente fijadas las metacercarias.³

Método 2: Bolsa de polietileno

Se confeccionó una pequeña bolsa de polietileno con un recorte de 10 cm², donde se depositaron 5 caracoles y 2 o 3 ml de la solución con algas (en proporción 10 g de algas/100 ml de agua), se selló la bolsa con una liga de caucho y se situó en una placa de Petri que contenía la solución de algas, se perforó la bolsa con una aguja pequeña para facilitar la oxigenación y el intercambio de la solución del interior de la bolsa con el de la placa; se colocó al sol o luz artificial durante 4 horas todos los días; al quinto día se abrieron las bolsas, se verificó la presencia de las metacercarias enquistadas en la superficie del polietileno utilizando un microscopio biológico y se lavaron con agua en una placa de Petri cada una de las bolsas de forma similar al método anterior, los caracoles se llevaron otra vez al local de cría.

Experimento II: Determinación de la potencia invasiva en la metacercaria

Para la realización de este experimento se utilizaron 35 ratas Wistar con peso de 80-120 g y 52 ratones Balb/c de 20 g de peso, procedentes del bioterio del Centro Nacional de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se confeccionaron 7 grupos de animales con cada especie.

Para la obtención de las metacercarias se utilizó el método de la bolsa de polietileno descrito en este trabajo, por ser el de mejores resultados y se almacenaron los quistes a 10°C durante 9 días, previo a la invasión. La invasión de las ratas se realizó administrando 20 metacercarias por vía oral, mediante una jeringuilla de 1 ml con cánula, que fueron depositadas en el tercio posterior del esófago. Con los ratones se siguió el mismo procedimiento, pero a los ratones del grupo A (34 ratones) se les inoculó con 5 metacercarias y a los del grupo B (25 ratones) con 10 de ellas. Para facilitar un adecuado control se confeccionó un cronograma para el sacrificio de los animales.

El sacrificio de las ratas invadidas con 20 metacercarias se llevó a cabo semanalmente a partir de la tercera semana posinvasión hasta los 77 días; en los ratones fue cada 15 días, comenzando también en la tercera semana posinvasión hasta los 63 días. El método para obtener las formas juveniles de *Fasciola hepatica* en las ratas fue el

descrito por Corba,⁷ y el empleado en los ratones, el referido por Corba *et al.* A los animales sacrificados o muertos durante la experiencia se les realizó la necropsia con el fin de observar las lesiones hepáticas, las formas juveniles en el parénquima o en la cavidad abdominal, se cuantificaron y midieron; además se determinaron la potencia invasiva (PI) expresada en el hospedaje de fasciolas juveniles encontradas, comparadas con las metacercarias inoculadas, la extensión de la invasión (EI) utilizando el porcentaje obtenido, al comparar cantidad de animales encontrados parasitados en la necropsia con cantidad de animales inoculados en cada grupo, y, por último, la mortalidad. A partir de la quinta semana se efectuó el análisis de las heces por el método de sedimentación por decantación.⁶

Para el análisis estadístico de los resultados de obtención de metacercarias se utilizó un ANOVA de factor simple y la prueba de Z.

Los resultados del experimento I se pueden observar en el Cuadro 1. Independientemente de que al aplicar la compresión aparecieron un gran número de metacercarias enquistadas, en muchas de ellas no se aprecia la estructura característica de las formas fértiles, además de que no se logra la suficiente limpieza en el polietileno lo que dificulta la manipulación de las metacercarias. Sin embargo, en el método de la bolsa de polietileno fue donde se encontraron los mayores resultados en los 250 caracoles colocados en las bolsas (29.31 metacercarias promedio en el método de las bolsas y 12.87 en el método de la compresión), la estructura de la capa externa del quiste es más homogénea y la morfología interna más definida, el medio es más limpio e higiénico que los anteriores y fácil de preparar.

El Cuadro 2 muestra los resultados de las necropsias realizadas a las ratas infestadas con 20 metacercarias. Las ratas sacrificadas del primer grupo mostraron lesiones hepáticas visibles y en una de ellas la afección era severa. Al observar el macerado hepático en el microscopio, se encontró 16 formas juveniles en un animal. La PI representó 23% y la EI, 80%. De las ratas sacrificadas en la cuarta semana, 4 presentaron lesiones muy marcadas a nivel del hígado, sólo una no presentó lesiones visibles, la PI fue de 20% y la EI de 80%. En la quinta semana, la presencia de *Fasciola hepatica* disminuyó, la PI fue de 7% y la EI de 40%. Las lesiones más severas fueron de la tercera a la quinta semanas; posteriormente, las lesiones fueron mínimas y más localizadas. En la séptima semana, a tres de las 5 ratas se les detectaron parásitos, la PI y la EI fueron de 10% y 60%, respectivamente. En los grupos restantes disminuyeron los animales positivos y la cantidad de fasciolas.

El Cuadro 3 presenta los resultados de las necropsias realizadas a los ratones con diferentes semanas posinvasión con 5 (A) y 10 (B) metacercarias. En la tercera semana se sacrificaron ratones de los dos grupos; en el A la PI fue de 15% y la EI de 40%; en el B, a dos ratones no se les detectaron las formas juveniles, pero en los demás, el hígado estaba fuertemente dañado con una PI de 23% y la EI de 80%. En la quinta semana, en el

Cuadro 1
Metacercarias de *Fasciola hepatica* obtenidas por diferentes métodos de *Lymnaea cubensis* invadidos artificialmente

Parámetros/Tratamientos	Disección	Bolsa de polietileno
<i>Lymnaea</i> invadidos	250	250
Muertos	121	115
Muertos (%)	48.4	46
Vivos	129	135
Vivos (%)	51.6	54
Positivos	112	113
Positivos (%)	86	84
Media de metacercarias	12.87 ^a	29.31 ^b
Máximo de metacercarias	250	350
Mínimo de metacercarias	1	1
Total de metacercarias	1442	3313

^{a,b} diferentes en la misma fila difieren para $P < 0.01$

Cuadro 2
Resultados de las necropsias realizadas a las ratas invadidas con 20 metacercarias

Semanas posinvasión	Fasciolas encontradas en el hígado	Total de I. I.	Media I. I.	Invasión (%) EI	Potencia invasiva (%)
3	1, 16, 3, 2, 0	23	5, 7	80	23
4	3, 8, 4, 5, 0	20	5	80	20
5	2, 5, 0, 0, 0	7	3, 5	40	7
6	2, 4, 0, 0, 0	6	3	40	6
7	1, 6, 3, 0, 0	10	3, 3	60	10
8	3, 0, 0, 0, 0	3	3	20	3
9	1, 0, 0, 0, 0	1	1	20	1

I.I. = Intensidad e invasión

EI = Extensión de la invasión

grupo A la PI fue de 8% y la EI 40%, mientras que en el B, un animal estaba parasitado con cuatro formas juveniles en la cavidad abdominal y tres en el hígado, la PI fue de 20% y la EI de 60%. En los animales del grupo A sacrificados durante la

séptima semana, la EI y la PI fueron de 20%, ya que sólo un ratón resultó positivo con 3 metacercarias y en el B hubo dos ratones positivos con 4 y 3 fasciolas juveniles, una PI de 18% y una EI de 40%. En el último sacrificio de la novena semana realizado a los ratones del grupo A, resultó que sólo un ratón fue positivo con 4 parásitos en el conducto biliar. Llamó la atención que el hígado estaba completamente sano, sin lesiones, a pesar de la presencia del parásito; en el grupo B no quedaron más ratones, y los parásitos aparecieron en el conducto biliar hasta finalizar la experiencia.

En el Cuadro 4 se expresan los resultados del tamaño de los parásitos juveniles y adultos en las diferentes semanas posinvasión en ratas y ratones. El menor tamaño en ratones fue de 3 mm de longitud, durante la tercera-cuarta semanas, y el mayor en la novena semana, con 11 mm. En ratas, el menor fue de 3 mm de tres a cuatro semanas, y una media de 3.4 mm; en la séptima semana la media fue de 14.5 mm y el máximo de 17 mm. El periodo prepatente fue constante en todos los animales entre los 56 y 60 días posinvasión.

La obtención de formas invasivas de *Fasciola hepatica* ha sido investigada por diferentes autores. El método tradicional usado ha sido la disección de los caracoles y entre ellos, en Cuba, Mauri-Maida *et al.*³ aplicaron la disección en caracoles, para determinar la dinámica de invasión en *Lymnaea cubensis*; Hernández *et al.*¹¹ utilizaron la técnica de obtención de cercarias por disección en *Physa cubensis*; Larramendi *et al.*¹² emplearon la técnica de disección en la obtención de las cercarias de *Fasciola hepatica*, en *Lymnaea columella*. En otros países este aspecto ha sido tratado por varios autores, Jang *et al.*² refieren el número de metacercarias obtenidas por miracidios con un máximo de 48, pero no el método empleado. Boray¹³ enfatiza que las especies de

caracoles tienen gran importancia en el número de cercarias producidas, aspecto que coincide con el presente estudio. Babicek y Danek¹ utilizan el método de la disección, exponiendo a los moluscos de 5 a 6 horas, frente a la acción de aire forzado y luz, en una placa de Petri con agua desionizada, logrando así el enquistamiento de las cercarias, obteniendo un promedio de 511.6 metacercarias por molusco positivo invadido con 15 miracidios, pero con una mortalidad de 76.4% que es alta. La disección de los moluscos tiene como inconvenientes que las metacercarias queden con residuos, lo que dificulta su manipulación para determinados trabajos. Muchas de las formas enquistadas no poseen la madurez necesaria, por lo que son infértiles y pueden enmascarar cualquier resultado cuando se utilizan para invadir los animales de laboratorio. Manga *et al.*¹⁴ utilizaron la disección en *Lymnaea truncatula* invadidos naturalmente en España, para la obtención de cercarias con un resultado máximo de 127.

La obtención de metacercarias por el método de la bolsa de polietileno rodeada de solución reduce la evaporación, los moluscos siempre están en contacto con la solución nutritivo, estimulando la salida de las cercarias que se obtienen con una buena limpieza, los quistes se agrupan en una menor área, con gran cantidad de formas invasivas fértiles, lo que puede deberse a la constante permanencia del caracol dentro de la solución.

En este estudio se infectó con 3 miracidios por molusco y se obtuvieron hasta 350 metacercarias morfológicamente aptas, con una mortalidad de 46%-48.4% de los caracoles, con una productividad promedio en el método con bolsas de polietileno, de 31.6 metacercarias coincidiendo con Jang *et al.*², quienes obtuvieron una productividad que osciló entre 5.5 y 48; mientras que Lee *et al.*¹⁵ encontraron en invasiones artificiales de *Lymnaea viridis*,

Cuadro 3

Resultados de las necropsias realizadas a los ratones invadidos con 5 (tratamiento a) y 10 (tratamiento b) metacercarias

Tratamiento	Semanas posinvasión	<i>Fasciolas encontradas</i>	Total de	Media	Invasión	Potencia
		en el hígado	I. I.	I. I.	(%) EI	Invasiva (%)
A	3*	1, 2, 0, 0, 0	23	1, 5	40	15
	5**	1, 1, 0, 0, 0	2	1	40	8
	7	3, 0, 0, 0, 0	3	3	20	20
	9	4, 0, 0, 0, 0	4	4	20	20
B	3***	4, 2, 3, 0, 0	9	3	80	23
	5	3, 4, 3, 0, 0	10	3, 3	60	20
	7	4, 3, 0, 0, 0	7	3, 5	40	18

*Murieron 7 ratones. **Murieron 7 ratones. ***Murieron 10 ratones. II = Intensidad e invasión. EI = Extensión de la invasión

Cuadro 4

Resultados de las necropsias respecto al tamaño de las fasciolas juveniles y adultas en ratas, realizadas en diferentes semanas posinvasión

Especie	Semanas	Número de	Longitud de las fasciolas en el hígado y la cavidad abdominal (mm)		
	posinvasión	Metacercarias	Mínima	Máxima	Media
		<i>inoculadas</i>			
Ratones	3-4	5	3	5	4
	3-4	10	3	4	3, 5
	5-6	5	5	7	6
	5-6	10	4	5	4, 5
	7-9	5	9	11	10
Ratas	3-4	20	3	4	3, 4
	5-6		10	10	10, 5
	7-8		15	17	14, 5

en Corea del Sur, un máximo de 1220 cercarias por miracidio con una temperatura de 20 ° C, obtenidas colocando los caracoles en placas de Petri con adición diaria de agua destilada y algas *Gloeocystis ampla* con una mortalidad de 42.2%.

Los resultados obtenidos en el porcentaje recobrado de las *Fasciolas* en las ratas infectadas con 20 metacercarias y sacrificadas en la tercera y cuarta semanas, coinciden con las de Pfister *et al.*¹⁶ y Facino *et al.*¹⁷ pero en el estudio de Burden y Hammet¹⁸, en el grupo testigo utilizado en el experimento con animales infectados con 30 metacercarias presentó una PI de 37.03 y 47.06 superior a los del presente estudio, que fueron de 23.5 y 20, respectivamente. Esto pudo deberse a lo planteado por Hughes *et al.*¹⁹, quienes encontraron diferencias significativas entre la Sprague Dowley y el Piebald Virol Glaxo, siendo más susceptible esta última. En la quinta semana disminuyó la presencia de parásitos al compararlos con los grupos anteriores, pero prevaleció una severa lesión hepática; estas lesiones fueron producidas por los parásitos jóvenes principalmente, que pueden ser destruidos y calificados quizás como resultado de la respuesta inmune, lo que fue considerado por Mango *et al.*,²⁰ en África del Sur, y ratificado por Goose y Macgregor,²¹ quienes administraron una dosis simple de metacercarias a ratas, y se notó una marcada resistencia a posteriores infestaciones de parásitos adultos. Hayes y Mitrovic²² detectaron que las ratas a las 24 horas expresan inmunidad, y Goose²³ consideró que los productos de excreción-secreción son los responsables de esta inmunidad. Por otra parte, Kelly *et al.*²⁴ demostraron que el paso del parásito juvenil a través del intestino no es esencial para el desarrollo de la resistencia.

Se comprobó también que las lesiones más severas aparecieron en la tercera y cuarta semanas; posteriormente

las lesiones eran localizadas y pocas. Esto evidencia que las ratas asimilan la dosis de 20 y 30 metacercarias, lo que fue demostrado también por Corba⁷ al administrar 15 y 20 metacercarias; pero con 30 y 50 metacercarias la mortalidad fue de 40%-60%, a diferencia de Thorpe,²⁵ que no registró mortalidad con dosis de 40 metacercarias y a 80 fue esporádica y muy rara. A partir de la séptima semana disminuye en los animales positivos la cantidad de parásitos. Esta observación la hace también Hughes *et al.*,¹⁹ pero en su experiencia la PI es mayor y la disminución de los parásitos en el conducto biliar se da a partir de los tres meses y muy marcado a los 7 meses, debido al desarrollo de la inmunidad que presentan las ratas a la *Fasciola hepatica*, lo que coincide también con Babicek y Danek,¹ quienes utilizaron 20 metacercarias y obtuvieron una media de recobrado de *Fasciola* entre 1.7 y 3.8, y al infestar con 25 metacercarias, de 4% a 5.9%, después de 19 a 35 semanas en ratas Wistar. En el sacrificio realizado en la última semana no se apreciaron lesiones; sin embargo, existían parásitos en el conducto biliar. Estos hallazgos son convergentes con el de Corba,⁷ quien encontró *Fasciola hepatica* en el conducto biliar a partir de la sexta semana, hasta que finalizó el experimento, pero en éste aparecen a partir de la octava. En los ratones los parásitos se localizan en el conducto biliar entre la quinta y novena semanas. Lang²⁶ los encuentra a los 40 días, es decir, a la sexta semana. Sin embargo, Bennett y Threadgold²⁷ refieren haberlos encontrado a partir de la cuarta semana posinfección.

La mortalidad de los ratones, ocurrida entre la tercera y cuarta semanas con dosis de 5 y 10 metacercarias, fue similar a la registrada por Andrews,⁸ quien encontró también que la mayor mortalidad ocurría entre la tercera y cuarta semanas con dosis de 1, 2, 3 y 4 fasciolas, siendo positivos a los análisis coprológicos entre 28.2% y 48.1%

de los sobrevivientes. En relación con el tamaño de las fasciolas, los resultados del presente estudio son similares a los encontrados por Corba⁷ y Hughes *et al.*¹⁹ Por otra parte, Corba *et al.*⁹ recomiendan en los ratones dosis de 5 metacercarias con 50% de mortalidad como un buen criterio para la evaluación de antihelmínticos. La mortalidad obtenida aquí fue un poco más baja, pero suficiente para considerarla como buena por su potencia invasiva, daños ocasionados a los animales y extensión de la invasión lograda. Rajasekariak y Howell²⁸ no encontraron relación entre el nivel de infección, la edad de las ratas y el tamaño de las fasciolas; el periodo prepatente detectado fue similar al encontrado en el presente estudio. De todo lo analizado anteriormente se deduce que el método de la bolsa de polietileno es superior al de la disección, porque permite obtener mayor número de metacercarias, más calidad en la limpieza y se desprenden más fácilmente de la superficie de polietileno; asimismo, la potencia invasiva de las metacercarias demostradas en las ratas y ratones y las dosis aplicadas permiten confirmar que pueden utilizarse en estos animales experimentales.

Referencias

1. Babicek K, Danek J. Checking the method of testing antifasciolles on the model helminth *Fasciola hepatica* in experimentally invaded laboratory Wistar rats. *Biol Chem Vet (Praha)* 1989;25:311-320.
2. Jang DH, Young HJ, Jum GS. Study on the metacercarial productivity of *Fasciola* sp intermediate host *Austropeplea ollula* (*Lymnaea ollula*). *Korean J Vet Res* 1987;27:291-299.
3. Mauri-Maida, Mitterpak J, Brito E. Embriogonia de la *Fasciola hepatica* Linneo, 1758 en las condiciones de Cuba. *Rev Cub Cienc Vet* 1980;11:93-97.
4. Taira N, Yoshifuji H, Boray JC. Zoonotic potential of infection with *Fasciola* spp. By consumption freshly prepared raw liver containing immature flukes. *Int J Parasitol* 1997;27:775-779.
5. Ibarra OF, Jenkins DC. An in vitro screen for new fasciolicidal agents. *Parasitenkunde* 1984;70:665-661.
6. Boray JC, Happich FA, Andrews JC. Studies on the suitability of the albino rat for testing anthelmintic activity against *Fasciola hepatica*. *Ann Trop Med Parasitol* 1967;61:104-111.
7. Corba J. Studies on the development of *Fasciola hepatica* in rats. *Folia Vet* 1972;16:133-138.
8. Andrews P. The mouse as experimental host for *Fasciola hepatica*. *Helminthologia* 1979;16:207-215.
9. Corba J, Velebny S, Spaldonova R. Primary screening of newly synthesized substances in white mice invaded with *Fasciola hepatica*. *Helminthologia* 1981;18:43-52.
10. Mitterpak J, Méndez M, Mauri M. Problemas relacionados con los hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Serie Biológica* 1972;30:1-24.
11. Hernández Silvia, Larramendi Rocío, Mesa J. Observaciones biométricas de *Lymnaea cubensis*, Pfeiffer 1929 en condiciones naturales. Informe preliminar. *Rev Salud Anim* 1979;1:25-30.
12. Larramendi Rocío, Hernández Silvia, Mesa J. *Lymnaea columella* como nuevo hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* en Cuba. *Rev Cub Cienc Vet* 1981;12:73-76.
13. Boray JC. The potential impact of exotic *Lymnaea* spp on fascioliasis in Australia. *Vet Parasitol* 1978;4:127-141.
14. Manga Y, González C, Otero CB. *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Proma Basin, León, NW Spain. *J Helminthol* 1991;65:15-27.
15. Lee CG, Cho SH, Lee SY. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1995;58:313-318.
16. Pfister K, Turner K, Wedrychowics H. Worm recovery, haemagglutinating antibodies and IgE-levels after immunisation against *Fasciola hepatica* in rats. *Vet Parasitol* 1980;17:139-150.
17. Facino RM, Carini M, Formo A, Genchi C. Metabolismo hepático del fármaco fasciolicida Nitroxinil en ratas en curso de infestación experimental por *Fasciola hepatica*. *Attidella Soc Ital Cienc Vet* 1985;39:794-796.
18. Burden DJ, Hammet NC. *Fasciola hepatica*: attempts to immunise rats using fluke eggs and in vitro culture products. *Vet Parasitol* 1980;7:51-57.
19. Hughes DL, Harness E, Doy TG. The establishment and duration of *Fasciola hepatica* infections in two strains of rats and the development of acquired resistance. *Res Vet Sci* 1976;20:207-211.
20. Mango AM, Mango CKA, Esamal A. Preliminary note on the susceptibility prepatence and recovery of *Fasciola gigantica* in small laboratory animals. *J Helminthol* 1972;46:381-386.
21. Goose J, MacGregor M. Naturally acquired immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *Br vet J* 1973;129:49-53.
22. Hayes TJ, Mitrovic M. The early expression on protective immunity to *Fasciola hepatica* in rats. *J Parasitol* 1977;63:584-587.
23. Goose J. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defence by *Fasciola hepatica*. *Nature* 1978;275:216-217.
24. Kelly JD, Campbell NJ, Dinnen JK. The role of the gut in acquired resistance to *Fasciola hepatica* in the rat. *Vet Parasitol* 1980;6:359-367.
25. Thorpe E. Experimental fascioliasis in the albino rat (PHD thesis). Glasgow, Scotland: Veterinary Medicine, University of Glasgow, 1963.
26. Lang BZ. Host-parasitic relationships of *Fasciola hepatica* in white mouse. II Studies on required immunity. *J Parasitol* 1967;53:21-30.

27. Bennett CE, Threadgold LT. *Fasciola hepatica*: development of the tegument during migration in the white mouse. *Exp Parasitol* 1975;38:38-56.
28. Rajasekariak JR, Howell MJ. *Fasciola hepatica* in rats: effects of host age and infective dose. *Int J Parasitol* 1977;7:119-121.