

Artículo original

Fasciolosis y parásitos gastrointestinales en becerros de la Estación Experimental “El Joque” Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Fasciolosis and gastrointestinal parasites in calves of the Experimental Station “El Joque” University of Los Andes, Mérida, Venezuela.

González-Ramírez Carolina^{1*}, Martínez Asdrúbal¹, Assouad Manuel¹, Álvarez Janeth¹, Gil-Gómez Florimar¹, Castro-Vera Trino¹, Pérez-De Pablos Carlos², Dávila Ciro².

¹Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “Jesús Moreno Rangel”, Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, C.P. 5101, Mérida, República Bolivariana de Venezuela. ²Estación Experimental “El Joque”, Universidad de Los Andes, C.P. 5101, Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2016 - Aceptado junio 2016

RESUMEN

En el presente estudio de prevalencia de parásitos gastrointestinales en bovinos, se describen los determinantes ambientales que facilitan la transmisión de *Fasciola hepatica* y otros parásitos en becerros criados en la Estación Experimental “El Joque” de la Universidad de Los Andes en el estado Mérida, Venezuela. Se estudiaron 153 bovinos mediante las técnicas coprológicas de filtración y sedimentación. Se determinó una prevalencia parasitaria global de 37,90 %, siendo el Helminto *Cotylophoron* spp. el parásito más frecuente (16,99 %), seguido por *F. hepatica* (10,46 %), entre los protozoarios la mayor prevalencia la alcanzó *Eimeria* spp. (13,07 %). La variable edad del animal fue directamente proporcional al índice de parasitación ($p=0,0001$). No se logró evidenciar transmisión transplacentaria de *F. hepatica* mediante coprología, aunque un recién nacido mostró Ig G anti-*F. hepatica*. Se determinó que los animales se infectan en Levante 1, cuando comienzan a pastar libremente y a consumir agua de bebedero. Se evaluó la eficacia y efectividad de cuatro drogas antiparasitarias, resultando más eficaz contra la fasciolosis el Triclabendazol administrado oralmente. Estudios preliminares de las sustancias químicas ensayadas para el control de moluscos, indican que el más efectivo es el óxido de calcio.

PALABRAS CLAVE

Fasciola hepatica, *Cotylophoron* spp., fasciolosis, fascioliasis, bovinos, parásitos, trematodo, Venezuela.

ABSTRACT

In this study prevalence of gastrointestinal parasites in cattle, are describe environmental determinants that facilitate the transmission of *Fasciola hepatica* and other parasites in calves reared at the Experimental Station “El Joque” of the University of Los Andes in Merida. 153 bovine ones were studied by means of the coprological techniques of filtration and sedimentation. A global parasite prevalence is determine 37.90 %, the most frequent parasite of the Helmitos was *Cotylophoron* spp. (16.99 %), followed by *F. hepatica* (10.46 %), between the protozoans the more prevalencia was *Eimeria* spp. (13.07 %), The variable age of the animal was directly proportional to the rate of parasitism ($p=0.0001$). No transplacental transmission of *F. hepatica* is evidence by means of coprological study, though a calf proved to be Ig G anti-*F. hepatica*. One determined that the animals become infected in Levante 1, when they begin to graze freely and to consuming water of drinking-trough. The efficiency and effectiveness

*Correspondencia al autor: luisacarolinagonzalez@gmail.com

four antiparasitic drugs was evaluated, resulting in more effective against fascioliasis is triclabendazole administered orally. Preliminary studies testing various chemical substances for mollusk control, suggest that calcium oxide is the most effective.

KEY WORDS

Fasciola hepatica, *Cotylophoron* spp., fasciolosis, fascioliasis, bovine, parasitic, trematode, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis hepática es una parasitosis causada principalmente por el Helminto de la clase Trematoda *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) [1] afecta a humanos y animales, siendo descrita por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una zoonosis reemergente [2]. Su importancia veterinaria radica en las pérdidas económicas que ocasiona en animales de significancia productiva como son los rumiantes, como consecuencia de la muerte (casos agudos); decomiso de vísceras en mataderos y gastos por tratamiento. En la etapa crónica de la enfermedad el efecto indirecto más característico es la desnutrición, pero también se presentan otras secuelas de la infección como son la disminución del crecimiento, la menor resistencia a otras enfermedades, alteración en la conversión alimenticia, disminución de la fertilidad y mengua en la producción de carne y leche, entre otras [3,4].

Para el establecimiento de esta parasitosis es necesaria la coincidencia de los hospedadores intermediarios y definitivos, temperaturas mayores de 10 °C, suelos con deficiente drenaje y/o humedad, características indispensable para la sobrevivencia y multiplicación de lymneidos [5,6], así como para sobrevivencia y diseminación de cercarias y metacercarias [7].

La embrionación de los huevos de *F. hepatica* no ocurre a menos de $9,5 \pm 0,5$ °C, se inhibe a más de 30 °C y se detiene a 37 °C [8], a bajas temperaturas los huevos pueden madurar y mantenerse viables hasta por 14 semanas [9]. En heces líquidas los huevos sobreviven durante 50 o más días y no soportan la desecación, eclosionan en un rango de pH entre 6 y 8 [10]. Se ha determinado que en condiciones climáticas favorables (15-25 °C), el miracidio se desarrolla y emerge entre los 9 y 21 días, la sobrevivencia del miracidio depende

de la temperatura, se ha determinado que a 10 °C el promedio de vida es de 23 horas y a 30 °C de 6 horas [10], al contactar con el molusco, puede penetrar por el manto, tentáculos y pie [8], durante la penetración el miracidio va perdiendo la capa epitelial ciliada, para transformarse en esporocisto, migra hacia genitales, pulmón, glándula digestiva, intestino y riñón, donde madura, se estima que cada esporocisto produce entre 12 a 15 redias aproximadamente [11-13].

La emisión de las cercarias es pasiva, siendo expelidas desde la cavidad corporal del molusco, con un incremento de presión que origina el escape a través de la apertura respiratoria, esta salida es irregular con emisiones promedio de 203 cercarias por miracidio y 270 cercarias por caracol [14], habiéndose detectado la mayor producción cercariana es entre las 12 pm y la 1 am [15].

La cercaria nada hacia la vegetación acuática y se enquistada en aproximadamente 10 a 20 minutos de ser emitidas, se adhieren al sustrato por la región ventral [9]. La transmisión de *F. hepatica* ocurre principalmente por la ingestión de plantas acuáticas de tallo corto como los berros silvestres (*Nasturtium officinale*), alfalfa, lechuga entre otras que crecen en las orillas de los cuerpos de agua, siendo favorecida la adherencia de las metacercarias a los tallos y hojas de estas plantas a bajas temperaturas. También se debe tener en cuenta la transmisión hídrica de *F. hepatica* como consecuencia de la ingestión de metacercarias flotantes [16-19]. Otra forma de infección del trematodo es la vía transplacentaria, con descripciones de prevalencia entre 0,5 y 40 % [20-22].

Como otro elemento epidemiológico se deben tener en cuenta los factores de riesgo (explotación de tipo extensiva, condiciones rurales, falta de planes sanitarios, intensidad de exposición al agente infecciosos). Todo ello es determinante para que las especies rumiantes entren en el ciclo biológico de la fasciolosis hepática y actúen como diseminadores de huevos embrionados, que al hallar a un ambiente húmedo encuentra condiciones favorables para la persistencia de la parasitosis.

La patología de la fasciolosis depende de la cantidad de metacercarias ingeridas y de la susceptibilidad del hospedador. Inicialmente, la penetración puede causar hemorragia e inflamación, pero el mayor daño es causado por la migración a través del parénquima hepático, donde el

tejido sufre lesiones hemorrágicas y reacciones inflamatorias e inmunológicas. Las larvas migrantes dejan cavidades necróticas que posteriormente son remplazadas por tejido cicatrizado [1,4]. Una vez que los parásitos alcanzan los conductos biliares disminuye la patogenicidad, se produce fibrosis por la inflamación, engrosamiento y dilatación de los canalículos [1]. Se ha estimado que la migración, crecimiento y maduración hasta convertirse en parásito adulto tiene una duración entre 3 y 4 meses [1,9]. Entre los signos clínicos se puede observar anemia, inapetencia, mucosas pálidas, edema sub-mandibular y diarrea; que llevan al animal a un estado de emaciación, debilidad general y baja productividad [1,3,4]. La mayor patogenicidad ocurre en la fase aguda de la enfermedad, por la migración de las larvas, algunos animales jóvenes no pueden superar esta fase debido a inmadurez de su sistema inmune o a altas cargas parasitarias, lo que ocasiona la muerte [1].

La OMS en 1995 publica un reporte técnico del control de las trematodiasis de transmisión alimentaria donde estima que la fasciolosis causa pérdidas económicas de aproximadamente 11 millones US\$ anuales [23], en países latinoamericanos donde se han descrito prevalencias en bovinos que alcanzan hasta el 100 % [24-26] y gastos de 10 millones US\$ anuales en tratamiento [27]. En Venezuela los registros indican prevalencias variables según los estados: Zulia (76,7 %) [2], Trujillo (45 %) [28], Falcón (45 %) [29], Portuguesa (46 %) [30], las investigaciones en el estado Mérida refieren prevalencias en bovinos entre 13,8 % y 58,6 % mediante análisis coprológico [31] y 68 % en necropsias de hígados obtenidos en el matadero de Mucuchíes [32].

Igualmente existen registros de decomiso de hígados con pérdidas anuales calculadas en US\$ 3.011 [33], merma en producción láctea entre 21 y 73 % y disminución de la eficiencia reproductiva [3].

En la Estación Experimental “El Joque”, de la Universidad de Los Andes, se realizan investigaciones y es centro piloto en el programa de ganadería de altura, contando para ello con animales de alto valor genético de las razas Holstein, Jersey y Mestizos de ambas razas. Un considerable número de becerros presentan cuadros clínicos sugerentes de fasciolosis, el deceso de estas crías genera pérdidas económicas importantes, por lo que es necesario

describir las condiciones ambientales determinantes que favorecen la infección del hospedador vertebrado. Y proponer un medicamento idóneo y la vía de administración adecuada para implementar un Programa de Control sobre el hospedador definitivo rumiante. Otro elemento de importancia epidemiológica es la transmisión transplacentaria o congénita de *F. hepatica* para explorar el momento en que ocurre la primoinfección de los becerros. Para implementar un Programa de Control de parásitos gastrointestinales y ectoparásitos sobre el hospedador definitiva (rumiante), entre tanto, durante el abordaje de la investigación se evaluaron dos antiparasitarios reunidos en una presentación farmacéutica la Ivermectina contra parásitos gastrointestinales y ectoparásitos y Triclabendazol contra las formas inmaduras y adultas de *F. hepatica* [34], razón por la cual se empleó FASIMEC[®], medicamento que reúne Ivermectina 2 % y Triclabendazol 12 %, combinación ésta que es capaz de eliminar un mayor número de especies parásitas utilizando un solo medicamento. Se ensayó el uso de esta droga vía oral (como es indicado por la industria farmacéutica), su efectividad se comparó con IVOMEF-F[®] (Clorsulon 100 mg/1mL - Ivermectina 10 mg/1mL), conociendo que el Clorsulon solamente elimina formas adultas de *F. hepatica*.

La fasciolosis cobra aún mayor interés cuando coexiste en forma simultánea con especies de la familia Paramphistomidae, dentro de la que se encuentra *Cotylophoron* spp. presente en rumiantes, afectando el tracto gastrointestinal y provocando en casos agudos, inflamación hemorrágica y mala absorción [35,36]. De igual manera, la coccidiosis en bovinos es una enfermedad parasitaria generalmente aguda causada por la presencia y la acción de los protozoarios del género *Eimeria* y *Cryptosporidium* en las células intestinales. Esta parasitosis tiene una gran particularidad afectando de forma aguda a los animales jóvenes, ya que los adultos poseen inmunidad contra ellos, presentándose en éstos de forma crónica. Se conoce también a esta enfermedad se conoce como diarrea sanguícola o diarrea hemorrágica y ha sido reportado en muchas partes del mundo, siendo un parásito cosmopolita, se encuentra en zonas tropicales, subtropicales y templadas [37].

El objetivo principal de esta investigación fue conocer la prevalencia de parasitosis gastrointestinales y fasciolosis hepática en

becerros criados en la Estación Experimental “El Joque”, además se conoció el momento de la primoinfección de los becerros debido a las condiciones medioambientales que favorecen la entrada de los rumiantes en el ciclo biológico de *F. hepatica*. Se evaluaron dos medicamentos antiparasitarios y por último se ensayaron cuatro agentes químicos en el control de moluscos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La Estación Experimental “El Joque” adscrita a la Universidad de Los Andes, se encuentra ubicada en la Parroquia Jají, Municipio Campo Elías, a una altitud que oscila entre los 1.900 y 2.100 m.s.n.m. La temperatura media anual de 16 °C, precipitación promedio anual de 1.300 mm, con humedad relativa de 82,2 % y una topografía irregular con suelos ácidos.

Población de Estudio. Se evaluaron 153 bovinos Holstein, Jersey y Mestizo de ambas razas, mantenidos en Cuna y en el grupo Levante con 5 subgrupos:

Los becerros se mantienen junto a la madre en un potrero durante los primeros 3 días de vida, para que la cría aproveche el calostro materno. Luego se confinan en las cunas (Fig. 1)

Cuna. Se estudiaron 26 becerros de entre 0 y 2½ meses, alimentados con 6 L/día de leche en biberón, alimento concentrado y agua fresca.

Unidad Pre-Levante 1. Se estudiaron 26 becerros de 3-6 meses de edad, permanecen en esta unidad hasta alcanzar los 150 Kg de peso, y a partir de este momento comienzan a ingerir Heno (traído a “El Joque”, no es pasto propio del lugar).

Unidad Levante 1. Se estudiaron 21 becerros de más de 6 meses y peso entre 100-200 Kg. Salen por primera vez a los potreros y comienzan a ingerir pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), más alimento concentrado a razón de 2 kg/día, con un contenido de 14 % de proteína cruda. Además ingieren agua del bebedero ubicado en el potrero de Levante 1.

Unidad Levante 2. Se estudiaron 29 animales de edad entre 1-3 años y peso entre 150-300 Kg.

Unidad Levante 3. Se estudiaron 28 animales de edad entre 3-4 años y con un peso mayor a 300 Kg.

Unidad Levante 4. Se estudiaron 23 animales de edad comprendida entre 3-4 ½ años en estado de gestación, permanecen en esta unidad hasta el término de la gestación.



Fig. 1. Becerros mantenidos en cunas.

Análisis Pre-Tratamiento. Las muestras fecales fueron tomadas del recto del animal, con guantes plásticos. Se trasladaron en cavas hasta el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “Dr. Jesús Moreno Rangel” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento. Se realizó filtración de las heces a través de 4 tamices (100,150, 200 y 250 Mesh), según Ueno & Goncalves (1998) [38]. Parte del filtrado se conservó con Formalina 10 % en conos de sedimentación durante 24 horas, el sedimento se observó a 100 x en microscopios Nikon Eclipse E 100.

Tratamiento de los animales. Para la evaluación de las drogas antiparasitarias, los 16 animales infectados por *F. hepatica* se dividieron en dos grupos iguales, un grupo recibió por vía oral FASIMEC® (calculando su dosis a razón de 12 mg de Triclabendazol y 0,2 mg de Ivermectina). Y el otro grupo fue tratado con IVOMECE-F® (Clorsulon 100 mg/1mL-Ivermectina 10 mg/1mL) por vía intramuscular a razón de 1 mL/50 kg de peso del animal.

Análisis post-tratamiento. Después de 1, 8 y 16 semanas del tratamiento se realizaron evaluaciones coprológicas a los bovinos infectados y tratados.

Estudio inmunológico (ELISA). Las muestras sanguíneas fueron tomadas de la vena coccígea de los bovinos mantenidos en cunas, se emplearon agujas N° 20 con tubos Vacutainer®, luego de la coagulación de la muestra se separaron los sueros mediante centrifugación a 250 g durante 20 minutos. Cada suero fue congelado a -20 °C en tubos Eppendorf® de 0,5 mL y transportados en nitrógeno líquido hasta el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Unidad de Biotecnología Molecular de la Universidad Cayetano Heredia en Lima, Perú, donde se realizó el ELISA para la detección de anticuerpos (IgG) anti-*F. hepatica* en bovinos siguiendo la metodología

descrita por Espinoza y col. (2005) [39].

Pruebas para el control de moluscos.

Debido a la eficiencia descrita del molusco Lymneidos como hospedador intermediario de *F. hepatica*, a su alta densidad y su capacidad de colonizar, como medida de control del mismo, se realizó la prueba con 4 agentes químicos en el suelo sobre las áreas más afectadas (zonas inundadas alrededor de los bebederos y tanques) en torno a un tanque australiano. Se consideró un buen modelo para comparar la efectividad de cada químico, debido a que existía un pantano producto de la fuga de agua. Se dividió el diámetro externo del tanque en 4 segmentos iguales, donde se aplicó: cloruro de sodio y óxido de calcio (manualmente sobre el terreno), solución jabonosa (saponina) a una dilución de 0,5 mL/1.000 mL y sulfato de cobre en solución a una dilución al 3/1000 (con aspersor) (Fig. 2).

Para comparar la acción de los molusquicidas, se realizaron observaciones directas del terreno, a la semana de haber rociado sulfato de cobre y saponinas y espolvoreado cloruro de sodio y óxido de calcio, evaluando la cantidad de moluscos muertos.



Fig. 2. Distribución de las sustancias molusquicidas alrededor del tanque.

RESULTADOS

De los 153 bovinos estudiados el 37,91 % resultaron parasitados, 10,46 % por *F. hepatica*, la especie más prevalente fue *Cotylophoron* spp. 16,99 % seguida de *Eimeria* spp. 13,07 %.

A medida que los animales crecieron se evidenció diferencias significativas en el incremento de la prevalencia por *F. hepatica* ($X^2=36,14$, $P=0,0001$), *Cotylophoron* spp. ($X^2=35,72$, $P=0,0001$) y *Eimeria* spp. ($X^2=20,49$, $P=0,001$) (Tabla 1), comprobándose así la relación directamente proporcional entre la infección parasitaria y la edad del animal ($X^2=38,99$, $P=0,0001$).

Es interesante destacar que los becerros mantenidos en cunas no presentaron parasitación por ningún helminto, mientras que se detectó *Eimeria* spp. (15,38 %) y *Buxtonella sulcata* (3,85 %) aunque sin diferencia significativa entre sus prevalencias ($X^2=19,33$, $P=0,0036$).

En Levante 1 se encontró *Cotylophoron* spp. 4,76 %, en Levante 2 *F. hepatica* 6,90 %, en Levante 3 la prevalencia de los trematodos es superior que la del resto de especies, aunque el porcentaje de *Cotylophoron* spp. es el doble que el detectado para *F. hepatica*, no obstante, las pruebas estadísticas no determinan que estas diferencias sean significativas ($X^2=18,66$, $P=0,0048$).

Es en Levante 4 donde se encontró la mayor cantidad de especímenes infectados; las prevalencias de *Cotylophoron* spp. (52,17 %), *F. hepatica* (43,48 %) y *Eimeria* spp. (39,13 %) fueron considerablemente superiores que las mostradas por el resto de parásitos asociados ($X^2=22,82$, $P=0,0009$) (Tabla 1)

TABLA 1
Prevalencia de *F. hepatica* y parásitos gastrointestinales en los grupos de animales estudiados.

Especies	Cuna (%) n=26	Pre-Levante (%) n=26	Levante 1 (%) n=21	Levante 2 (%) n=29	Levante 3 (%) n=28	Levante 4 (%) n=23	Total (%) n=153
<i>Fasciola hepática</i>	0	0	0	6,90	14,29	43,48	10,46
<i>Cotylophoron</i> spp.	0	0	4,76	17,24	28,57	52,17	16,99
<i>Hemonchus contortus</i>	0	0	19,05	3,45	7,14	21,74	7,84
<i>Ostertagia</i> spp.	0	0	9,52	0	17,85	13,04	7,19
<i>Trichuris</i> spp.	0	0	0	6,90	0	0	1,31
<i>Buxtonella sulcata</i>	3,85	3,85	0	0	0	26,09	5,23
<i>Eimeria</i> spp.	15,38	15,38	4,76	0	7,14	39,13	13,07
Total	15,38	15,38	28,57	31,03	53,57	86,96	37,91

n=número de individuos estudiados en cada rebaño

En la Fig. 3 se compara la infección por una o más especies parásitas, encontrándose que el monoparasitismo (64 %) casi duplica al poliparasitismo (36 %), sin embargo no se determinó diferencia significativa ($X^2=8,83$, $P=0,0030$).

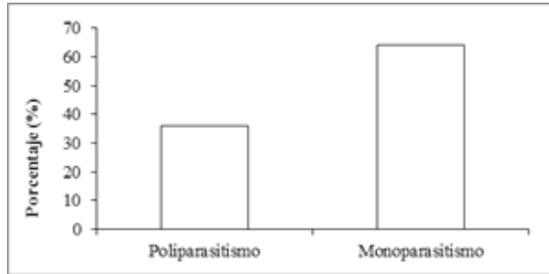


Fig. 3. Distribución Porcentual de mono y poliparasitismo.

En la Unidad Levante se encontró mayor parasitismo por helmintos (66 %) que por protozoarios (17 %) o la combinación de ambos (17 %) ($X^2=40,55$, $P=0,0001$) Fig. 4.

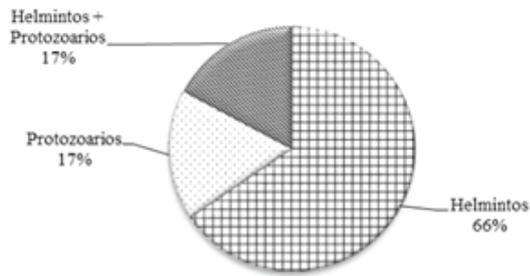


Fig. 4. Prevalencia parasitaria por tipo de parásito y sus combinaciones.

En la primera reevaluación post-tratamiento con Fasimec® e Ivomec-F® no se detectaron huevos de *F. hepatica* con el análisis coprológico, lo que indica la total eliminación de las formas adultas del parásito, en contraste aquellos animales que se les aplicó Ivomec-F® se detecta *Cotylophoron* spp. y *Ostertagia* spp. (Tabla 2).

TABLA 2

Primera reevaluación coprológica 1 semana post-tratamiento.

Especies	Fasimec®(%)	Ivomec-F®(%)
	n=8	n=8
<i>Fasciola hepatica</i>	0,00	0,00
<i>Cotylophoron</i> spp.	0,00	37,50
<i>Haemonchus contortus</i>	0,00	0,00
<i>Ostertagia</i> spp.	0,00	50,00
<i>Trichuris</i> spp.	0,00	0,00
Total	0,00	50,00

n= individuos estudiados con cada medicamento

La primera reevaluación coprológica practicada a la octava semana post-tratamiento, indica que el Ivomec-F® no fue capaz de eliminar la totalidad de los estadios larvarios de *F. hepatica* a diferencia del Fasimec® oral que mostró la mayor eficacia en la eliminación de formas larvarias (Tabla 3).

TABLA 3

Segunda reevaluación coprológica 8 semanas post-tratamiento.

Especies	Fasimec®(%)	Ivomec-F®(%)
	n=8	n=8
<i>Fasciola hepatica</i>	0,00	50,00
<i>Cotylophoron</i> spp.	0,00	50,00
<i>Haemonchus contortus</i>	0,00	0,00
<i>Ostertagia</i> spp.	0,00	50,00
<i>Trichuris</i> spp.	0,00	0,00
Total	0,00	50,00

n= individuos estudiados con cada medicamento

La segunda reevaluación practicada a la décimo sexta semana post-tratamiento se encontraron tasas de reinfección para *F. hepatica* (68,75 %) y *Cotylophoron* spp. (75,00 %) en los animales a los que se les aplicó el tratamiento, así como una reinfección global del (87,50 %) (Tabla 4)

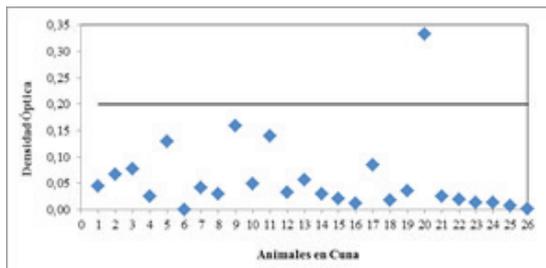
TABLA 4

Tercera reevaluación coprológica 16 semanas post-tratamiento.

Especies	16 Semanas %
	n=16
<i>Fasciola hepatica</i>	68,75
<i>Cotylophoron</i> spp.	75,00
<i>Haemonchus contortus</i>	18,75
<i>Ostertagia</i> spp.	31,25
<i>Trichuris</i> spp.	18,75
Total	87,50

n= individuos estudiados

Estudio Inmunológico (ELISA). Se evaluaron mediante ELISA los 26 bovinos mantenidos en Cuna (100 %), el punto de corte del ELISA se estimó en D.O.=0,20, del total de los animales evaluados solamente uno mostró anticuerpos Anti-*F. hepatica* (Ig-G) lo que representa el 3,85 % de positividad (Fig. 5).

Fig. 5. Determinación de anticuerpos anti-*F. hepatica* (IgG).

Pruebas de sustancias molusquicidas. Por observación directa de campo, se estimó cuál de las sustancias utilizadas (sulfato de cobre, saponinas, cloruro de sodio y óxido de calcio) mostró mayor actividad molusquicida para el control de los moluscos en los pantanos, orillas de cuerpos naturales de agua dulce y en torno al tanque australiano.

Aunque no se pudo estandarizar la prueba, ni se hicieron análisis controlados en el laboratorio, por la premura en la necesidad del control de la gran cantidad de caracoles y la falta de recursos económicos, la simple observación visual fue suficiente como prueba biológica para evidenciar que el agente químico que mostró mayor acción molusquicida fue el óxido de calcio (cal viva), en las zonas donde se aplicó cal, se alcanzó una alcalinidad con pH de 9,1, no se encontraron caracoles vivos ni sus huevos y se visualizaron las conchas de los

moluscos secas.

En segundo lugar de acción molusquicida se encontró el cloruro de sodio, luego el sulfato de cobre y por último la saponina.



Fig. 6. Condiciones del potrero y bebedero donde pastan los animales Levante 1. A: Derrame de agua del bebedero. B.: Bovinos. C y D: Moluscos en pared de bebedero.

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados muestra que en la población de bovinos de la Estación Experimental “El Joque” se mantiene una prevalencia considerable de fasciolosis, aunque los becerros de Cuna, Pre-Levante y Levante 1, se mantienen libres de la infección es un grave problema en los adultos. Nieves y col. (2005) [40] describieron en “El Joque” 39 % de bovinos infectados, sectorizando los resultados indican prevalencias de: Cuna (0 %); Cesta (0 %); Levante 1 (3 %); Levante 2 (13 %); Levante 3 (7 %); Unidad Productora Joque (4 %) y Escotero (12 %). Al promediar las prevalencias de la Unidad Levante solamente, ellos encontraron 8,89 % frente al 10,46 % que se detectó en esta investigación. Es necesario resaltar que para el momento del muestreo no había animales en cesta, por el contrario en el muestreo de Nieves y col., no había animales en Levante 4.

Estos resultados permiten inferir que no se detectó infección por *F. hepatica* en Pre-Levante porque en esta etapa del crecimiento los animales no han salido a pastar, se mantienen en estabulación y son alimentados con concentrado alimenticio y heno, los cuales no pueden ser fuente de infección puesto que las metacercarias no soportan la desecación que conlleva el corte y empaquetado del heno [41].

Aunque en este estudio se determinó que la edad promedio de aparición de la fasciolosis (detectable

por examen coprológico) fue entre 2-3 años en la población del subgrupo Levante 2, los resultados obtenidos indican que el contacto de los animales con *F. hepatica* ocurre cuando los animales salen a pastar en el potrero asignado para Levante 1, donde se encontró una fuga de agua en el bebedero, que provoca la inundación del entorno (Fig. 5) y por consiguiente la proliferación del molusco *Lymnaea* sobre una gran cantidad de *Nastirtium officinale*, reconocido vehículo del trematodo [17,18,23].

El periodo pre-patente de la fasciolosis oscila entre 6 a 13 semanas y el ciclo completo entre 14 y 23 semanas (aproximadamente 6 meses) [42]; tiempo en el que los bovinos permanecen aún en Levante 1. Estos resultados no concuerdan con los hallazgos de Nieves y col. (2005) [40] quienes describen fasciolosis en becerros de Levante 1, es probable que debido a la baja sensibilidad del examen coprológico [43] no se hayan detectado huevos de *F. hepatica* en este grupo, justificando esta ausencia por la baja e intermitente emisión de huevos de este Trematodo [43-45].

Además, en este estudio se encontraron seis especies de parásitos intestinales que afectan la población bovina de la Unidad Levante, determinando un 37,91 % de prevalencia parasitaria total, los nematodos comienzan a aparecer cuando los bovinos tienen contacto con pasto, agua y tierra. Es interesante explicar la transmisión de los protozoarios (*Eimeria* spp 15,35 % y *B. sulcata* 3,85 %) en los becerros mantenidos en Cuna, es probable que estas infecciones se deban a que las cunas se encuentran situadas una al lado de la otra y los animales pueden contaminarse con las heces del animal contiguo, así como la posible transmisión hídrica con el lavado diario de las cunas [46,47]. Los resultados muestran aumento progresivo del parasitismo con respecto a la edad, las menores prevalencias las muestran los bovinos de Cuna y Pre-Levante (15,38 %) que ascienden progresivamente hasta 86,96 % en Levante 4. Esta relación directamente proporcional puede deberse a la mayor exposición del animal a las fuentes de infección así como los fallos de la terapia antiparasitaria.

La significancia estadística mostrada por el aumento progresivo de *F. hepatica* en las subsecuentes etapas del desarrollo de los bovinos, permite aseverar que la fasciolosis es una infección acumulativa proporcional al aumento de la edad del animal, esto se explica por las reinfecciones encontradas después de 16 semanas de aplicado el

tratamiento antiparasitario.

Los resultados de este estudio contrastan con los de Pino y col. (1992) [22] puesto que no se encontró evidencia coprológica de transmisión transplacentaria de *F. hepatica*. En los 26 becerros analizados mediante serología, solo uno mostró anticuerpos anti-*F. hepatica*, resultado que puede explicarse con la transmisión de Inmunoglobulinas G, a través del calostro de la madre como ha sido reportado por Angulo y col., (2013) en el 30 % de las muestras de leche evaluadas por ELISA para la determinación de IgG anti-*F. hepatica* [48]. Esta explicación se ve reforzada porque el seguimiento coprológico del becerro no resultó positivo en ninguna de las tres reevaluaciones, sin embargo hay que aclarar que no se comprobó el estado de infección de la madre, pero en otras investigaciones donde se evaluó la fasciolosis en vacas adultas del mismo rebaño se evidenció hasta un 80 % de positividad (Datos no publicados).

En el subgrupo Levante 1 hay un incremento importante en la parasitación total (28,57 %), con aumento de los nematodos gastrointestinales, siendo el más prevalente para este grupo *H. contortus* (19,04 %), también se evidencia la aparición de la primera trematodosis causada por *Cotylophoron*, esto debido a que el rebaño comienza a pastar libremente en los potreros y frecuentar los bebederos.

Los trematodos que afectan el ganado en esta finca, mostraron un aumento progresivo en el tiempo *Cotylophoron* (4,76-52,17 %) y *F. hepatica* (6,90 - 43,48 %), y es probable que esta analogía sea causada por la gran cantidad de moluscos diseminados en el medio, utilizado por ambos parásitos en su ciclo evolutivo, siendo las condiciones del medio ambiente las adecuadas para su desarrollo.

La terapia antiparasitaria aplicada anteriormente en estos rebaños (Albendazol) no es la más efectiva para estas especies de parásitos, puesto que solamente elimina parásitos adultos, sin afectar las formas larvianas de *F. hepatica*.

Al evaluar la actividad del Fasimec[®], se encontró que fue capaz de eliminar la totalidad de los estados larvales y adultos de *F. hepatica*, este resultado es acorde con los de Boray (1983) [38] y Bennet & Kholer (1987) [49] quienes reportan efectividad del 100 % con Triclabendazol.

Los resultados con Ivomec-F[®] indican que el tratamiento eliminó el 100 % de parásitos adultos de *F. hepatica* (puesto que en ninguno de los bovinos tratados se pudo encontrar huevos del Trematodo en

la reevaluación coprológica de la primera semana post-tratamiento), mientras que contra su estadio larvario solo logró destruir los parásitos presentes en el 50,00 % de los bovinos infectados, detectándose huevos en el análisis coprológico de la segunda reevaluación realizada a la octava semana post-tratamiento .

Se encontraron altas tasas de reinfección para *F. hepatica* (68,75 %), debido a que las condiciones ambientales favorecen la alta densidad del hospedador intermediario, se debe limitar el hábitat de los caracoles, drenando las zonas pantanosas y evitando el derrame permanente de los bebederos y tuberías, lo que aminoraría la proliferación del hospedador intermediario. De lo contrario, cualquier esfuerzo con tratamiento antiparasitario sería inútil, al no interrumpirse la constante exposición de los bovinos al agente infeccioso emitido por los moluscos. La reinfección es un grave problema porque causa pérdidas económicas y de trabajo horas-hombre.

En este estudio se observó que el Clorsulon no tuvo acción significativa contra *Cotylophoron*, mientras que se evidenció negativización del análisis coprológico en los animales tratados con Triclabendazol. Es bien conocido el Rafoxanide como tratamiento de elección para Paramphistomidos, con dosis 7,5 a 10 mg/kg de peso [50]. Por lo que se hace necesario realizar investigaciones utilizando este medicamento contra *Cotylophoron*, debido a que los adultos de este trematodo se implantan en el rumen, las larvas penetran la mucosa del duodeno hasta alcanzar la submucosa, alterando la irrigación sanguínea, conduciendo al bovino a cuadros anémicos y de mala absorción por la destrucción de las glándulas digestivas del intestino delgado y abomaso [36,50]. En la presente investigación se determinó *Cotylophoron* spp. como el parásito más frecuente, llegando alcanzar una prevalencia de 75,0 % (a la semana 16 post-tratamiento, asumiendo que es un estado de reinfección), lo que supera los hallazgos de Forlano *et al.* (1996-1997) [51] en la “Las Majaguas” estado Portuguesa, cuyos hallazgos de prevalencia fueron de 42 %.

Existen descripciones de infección simultánea de *F. hepatica* y *Cotylophoron* (natural y experimental) en *Lymnaea* [50,52], es probable que la asociación de estos dos trematodos esté ocurriendo en los caracoles presentes en “El Joque” lo que aumenta la probabilidad de infección por estos trematodos [53,54]. Los resultados de este trabajo llevan a proponer una medida de control contra el hospedador

intermediario, se localizaron los hábitats, donde se probaron sustancias de bajo costo que se emplean con regularidad en la zona y que no causan daños excesivos a la fauna acuífera. Estos resultados preliminares deben ser tomados en consideración debido a que conociendo las condiciones edafológicas de la zona, donde se encuentran suelos ácidos que al ser tratados con óxido de calcio, se alcalinizaron hasta alcanzar un pH de 9,1; lo que disminuyó la densidad de moluscos [10] sin causar daños severos al medio ambiente. Tampoco causa toxicidad a los bovinos, puesto que en su dieta consumen bloques multinutricionales con añadido de cal y se utiliza frecuentemente en la finca para el control del helecho macho *Pteridium quilinum*, que es patógeno para el ganado. Por otro lado, se tomaron medidas correctivas, limpiando, encalando y evitando derrames de agua de los bebederos, drenando áreas pantanosas y corrigiendo las fugas de agua de los tanques para limitar los hábitats de los caracoles.

Finalmente se sugiere implementar un Programa de Control contra *F. hepatica* para disminuir las pérdidas económicas de los productores pecuarios [53] y evitar transmisión zoonótica, lo que puede conllevar a infecciones humanas en la zona, tal como ha sido descrito en otras regiones de los Andes bolivianos [55] y peruanos [56,57].

CONCLUSIONES

La fasciolosis hepática es una infección veterinaria importante en el ganado estudiado, puede llegar a causar enfermedad, sobre todo cuando se encuentra asociado a otros parásitos, llegando a alcanzar prevalencias importantes como la encontrada en los becerros de la Estación experimental “El Joque”, pudiendo ocasionar importantes pérdidas productivas y económicas. *F. hepatica* muestra una gran capacidad de adaptación a condiciones medioambientales extremas, a grandes altitudes, como ocurre en esta zona localizada entre los 1.900 y 2.100 m.s.n.m, aún más si se considera que ostenta un ciclo biológico de naturaleza diheteroxena, con un gasterópodo acuático de hospedador intermediario, resulta evidente que éste debe mostrar también una gran capacidad adaptativa y de colonización de diferentes nichos ecológicos. Si bien durante mucho tiempo se ha considerado un patrón epidemiológico estándar para explicar la transmisión de la fascioliasis, los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan

a que se debe ser cauto en esta consideración, dado que el patrón de transmisión puede resultar considerablemente diferente según el área, por lo que para caracterizar epidemiológicamente cada zona, se requiere la investigación en el terreno. Paralelamente a los estudios básicos, resultan importantes las características generales de la zona para permitir el establecimiento de las adecuadas medidas de control en cada área.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes por haber otorgado el financiamiento con los siguientes proyectos: FA-462-09-03-F, FA-463-09-03-F y FA-464-09-03.

Al Dr. José Ronald Espinoza y la Dra. Patricia Herrera-Velít por el procesamiento de los sueros para la detección de Ig-G contra *Fasciola hepatica* en bovinos en la Unidad de Biotecnología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Honorio Delgado 430, Lima 31, (San Martín de Porras), 4314 Lima, Perú.

Al personal que labora en la Estación Experimental “El Joque”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Boray JC. Diseases of domestic animals caused by Flukes. F.A.O. Roma. 1994 p.1-32.

[2] World Health Organization. Foodborne trematode infections. Fascioliasis. World Health Organization. Geneva 2016.

[3] Chirinos AR, De Chirinos N. Evaluación de los efectos de la distomatosis hepática bovina sobre la eficiencia reproductiva y producción lechera. Rev Cient FCV-LUZ. 1993; 3: 35-45.

[4] Chirinos AR, De Chirinos N, Román R, Homez G, Pirela H, Rodríguez N. Distomatosis hepática bovina a nivel de dos mataderos industriales del estado Zulia, Venezuela. Rev Cient FCV-LUZ. 2000;10: 297-302.

[5] Morales G, Pino LA. *Limnaea cubensis* Pfeiffer, 1839, Hospedador Intermediario de *Fasciola hepatica* en la zona Alta de Los Andes Trujillanos, Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 1981; 21:1-9.

[6] Pointier JP, Noya O, Alarcón de Noya B, Theron A. Distribution of *Limnaeidae* (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail host of *Fasciola hepatica* in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz.

2009; 105(5): 790-796.

[7] Hodasi JK. The output of cercariae of *F. hepatica* by *Limnaea truncatula* and distribution of the metacercariae on grass. Parasitology. 1972; 64(1): 53-60

[8] Carrada-Bravo T. *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. Rev Mex Patol Clin. 2007; 54(1): 21-27.

[9] Suhardono B, Roberts JA, Copeman DB. Variations in the survival of *Fasciola gigantica* eggs in bovine dung stored in the sun as opposed to the shade. Trop Anim Health Prod. 2006; 38(5): 379-82.

[10] Smith P, Grenfell V. The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. Parasitology. 1984; 88(1): 97-104.

[11] Rondelaud D, Barthe D. Les generations rédines de *Fasciola hepatica*, premières observations chez des linnés tronqués en fin de cycle parasitaire. Bull Soc Fr Parasitol. 1986; 4(4):29-38.

[12] Rondelaud D, Barthe D. *Fasciola hepatica* le étude de la productivité d'un sporocyste en fonction de la taille de *Limnaea truncatula* Müller. Parasitol Res. 1987a; 7: 155-60.

[13] Rondelaud D, Barthe D. *Fasciola hepatica* l. étude du developpement des réies chez quatre especes de limnées. Bull Soc Fr Parasitol. 1987b; 5(1): 99-104.

[14] Iturbe-Espinoza P, Muñoz-Pareja F. Life cycle and biotic potential of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula*. Neotrop Helminthol. 2013; 7(2): 243-254.

[15] Rondelaud D, Sanabria R, Vignoles P, Dreyfuss G, Romero J. *Fasciola hepatica*: variations in redial development and cercarial production in relation to the geographic origin of the parasite. Parasite. 2013; 5: 20-33.

[16] Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *F. hepatica* and *limnaeid* snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology. 2001; 123: 115-127.

[17] Mas-Coma S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J Helminthol. 2005; 79(3): 207-216.

[18] Barca JA. El berro y otras comidas peligrosas. Medicina. 2005; 65 (3): 277-79.

[19] Bargues MD, Mangold AJ, Oviedo JA, Mas-Coma S. Natural water and additional source for human infection by *F. hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. Parasitología. 1996; 38: 251.

[20] Rees JB, Sykes W, Richards M. Prenatal

infection with *Fasciola hepatica* in calves. Aust Vet J. 1975; 51: 497-499.

[21] Pecheur M. L'infestation prénatale des veaux par *F. hepatica*. Ann Méd Vét. 1984; 128: 567-568.

[22] Pino L, Morales G, Perdomo L. Infestación prenatal de becerros por *F. hepatica*. Rev Cient FCV-LUZ. 1992; 2: 59-60.

[23] World Health Organization. Control of Foodborne Trematode Infections. WHO. Technical Report Series 849. World Health Organization, Geneva 1995.

[24] Murga S, Moreno B. Frecuencia de ganado ovino y caprino de Cajamarca y La Libertad parasitados por *Fasciola hepatica*. REBIOL. 1986; 6: 63-70.

[25] Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Amoros C, Delgado E, Escurra E, Clarkson MJ. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Perú. Parasitol Int. 1997; 46: 281-288.

[26] Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Delgado E, Escurra E, Clarkson MJ. Strategic control of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. Vet Rec. 1998; 143: 42-45.

[27] Brockwell Y, Elliott T, Anderson G, Stanton R, Spithill T, Sangster NC. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. Int J Parasitol. 2014; 4: 48-54.

[28] Morales G, Carreño A, Pino A, Perdomo L. Fascioliasis hepática en bovinos del Estado Trujillo, Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 1985; 15: 3-4.

[29] Sandoval E, Medina R, Alfonso S. Prevalencia de la distomatosis hepática en cuatro unidades agroecológicas del Bajo Tocuyo - Estado Falcón, Venezuela. Veterinaria Trop. 1989; 14: 43-51.

[30] Meléndez RD, Coronado A, Díaz JJ, Crespo GL. Aspectos epidemiológicos de la fascioliasis bovina en el Centro Occidente Venezolano con énfasis en la prevalencia del trematode y de su hospedador intermediario. ACV. 1983; 34: 65-138.

[31] Betancourt A. Prevalencia de fascioliasis bovina en el Estado Mérida, Venezuela. Trabajo de Ascenso, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 1978. p 25.

[32] Vivas JF. Comprobación de distomatosis hepática por *Fasciola hepatica* en huéspedes bovinos en la zona alta del Páramo del Estado Mérida. Trabajo de Ascenso, Facultad de Farmacia,

Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela 1976. p 32.

[33] Pascal PE, Homez G, Huerta Leidenz N, Chávez K. Prevalencia de distomatosis hepática bovina a nivel de mataderos del Estado Zulia en Venezuela. Veterinaria Trop. 1977; 2: 43-59.

[34] Boray JC, Jackson R, Strong MB. Chemoprophylaxis of fascioliasis with triclabendazole. New Zealand Vet J. 1985; 33: 182-185.

[35] Paucar S, Chávez A, Casas E, Suárez F. Prevalencia de fascioliasis y paramfistomiasis en el ganado lechero de Oxapampa, Pasco. Rev investig vet Perú. 2010; 21(1): 87-92.

[36] Alarcón E, Velásquez LE. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (Digenea: Paramphistomidae) hallado en bovinos de Rionegro, Antioquia, Colombia. Rev Colom Cienc Pecu. 2009; 22(2): 168-177.

[37] Tamasaukas R, Agudo L, Vintimilla M. Patología de la coccidiosis bovina en Venezuela: una revisión. REDVET. 2010; 11(7).

[38] Ueno H, Goncalves PC. Manual para diagnóstico das helmintosos de ruminantes. Japan International Cooperation Agency - JICA, 1998 - 143.

[39] Espinoza JR, Timoteo O, Herrera-Velít P. Fas2-ELISA in the detection of human infection by *Fasciola hepatica*. J Helminthol. 2005; 79(3): 235-240.

[40] Nieves E, Rondón M, Zamora E, Salazar M. *Fasciola hepatica* (Trematode: Fasciolidae) en la zona alta de Mérida, Venezuela. Rev Electron Vet. 2005; 6(12): 1-9.

[41] Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schelenbaum M, Von Ornelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *F. hepatica* infections in sheep and cattle. Vet Rec. 1983; 113: 315-317.

[42] Olaechea FV. Epidemiología y Control de *Fasciola hepatica* en Argentina, En: Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos, Nari A, Fiel C. Ed. Hemisferio Sur. Argentina; 1994; 213-233.

[43] Castellanos H, Romero H, Guerrero C, Ibarra F, Ochoa P. Cinética de excreción de huevos y títulos de anticuerpos de *Fasciola hepatica*, en ganado bovino tratado con triclabendazol en clima cálido húmedo en México Vet Mex. 1999; 30(4): 534-543.

[44] Angulo-Cubillán FJ, Molero M, Escalona F, Muñoz J, Ramírez R. Prevalencia y dinámica de HPG mensual de *Fasciola hepatica* y otros helmintos

en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. Rev Cient FCV-LUZ. 2007; 17: 194-198.

[45] Palmer D, Lyon J, Palmer M, Forshaw D. Evaluation of a copro-antigen ELISA to detect *Fasciola hepatica* infection in sheep, cattle and horses. Aust Vet J. 2014; 92(9): 357-361.

[46] Berto BP, McIntosh D, Lopes CW. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). Rev Bras Parasitol Vet. 2014; 23(1): 1-15.

[47] Mohammad TA, Kasim SA. Prevalence of *Buxtonella sulcata* in neonatal and young calves in al-nasir station and some regions in Baghdad (al-shuala snd gazaliya). Iraqi J Sci. 2011; 52(4): 420-424.

[48] Angulo-Cubillán F, Chacín E, Sánchez A, Calle M, Zambrano S, Montero M, Pérez M, Ramírez R. Detección de anticuerpos IgG frente a *Fasciola hepatica* en un rebaño bovino criollo limonero del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. Rev Cien. 2013; 23(6): 471-474.

[49] Bennet JL, Kholer P. *F. hepatica*: Action *in vitro* of Triclabendazole on immature and adults stages. Helmintol. Abstr. 1987; 56: 376.

[50] Ribas JG. *Cotylophoron cotylophorum*: revisión de aspectos generales como medida inicial para implementar programas de control. 2013. www.engormix.com

[51] Forlano MD, Henríquez HR, Meléndez RD. Incidencia y prevalencia de *Cotylophoron* spp. (Trematoda: Digenea) en bovinos del asentamiento campesino "Las Majaguas". Portuguesa, Venezuela, 1996-1997. Gac Vet. 2001; 7: 51-58.

[52] Pino LA, Morales G. *Lymnaea cubensis* Pfeiffer, 1839, hospedador intermediario de *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901) Stiles yGoldberg, 1910, en condiciones naturales. ACV. 1982; 33: 57-60.

[53] Bargues MD, González LC, Artigas P, Mas-Coma S. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection. Parasit Vectors. 2011; 14(4): 200-234.

[54] Correa A, Escobar JS, Noya O, Velásquez LE, González-Ramírez C, Hurtrez-Boussès S, Pointier JP. Morphological and molecular characterization of Neotropic *Lymnaeidae* (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. Infect Genet Evol. 2011; 11(8): 1978-1988.

[55] Esteban JQ, Flores A, Aguirre C, Strauss W, Angles R, Mas-Coma S. Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. Acta Trop. 1997; 66: 1-14.

[56] González C, Esteban JG, Bargues MD, Valero MA, Ortiz P, Náquira C, Mas-Coma S. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Perú. Acta Trop. 2011; 120: 119-129.

[57] Esteban JG, González C, Bargues MD, Angles R, Sánchez C, Náquira C, Mas-Coma S. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. Trop Med Int Health. 2002; 7(4): 339-348.