

Diagnóstico *post mortem* de *Fasciola hepatica* en bovinos faenados en la planta de beneficio de Sogamoso (Boyacá, Colombia)

Post mortem diagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered at the Sogamoso, Boyacá processing plant (Boyacá, Colombia)

Melissa Camila Ortiz-Pineda¹, Omar Alexander Archila-Barrera¹,
Diana María Bulla-Castañeda^{1,3}, Adriana María Díaz-Anaya¹,
Julio Cesar Giraldo Forero², Diego José García-Corredor¹,
Martín Orlando Pulido-Medellín¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de distomatosis hepática en bovinos faenados en la planta de beneficio de Sogamoso (Boyacá, Colombia), y definir la técnica diagnóstica más efectiva para establecer la presencia del parásito. Se estableció un tamaño muestral de 343 individuos teniendo en cuenta la tasa de sacrificio mensual de la planta. Se tomaron muestras de heces, sangre y contenido biliar y se colectaron los parásitos adultos del ducto biliar. En el examen coproparasitológico se utilizó la técnica de Ritchie modificada, el contenido biliar fue analizado mediante sedimentación y para el diagnóstico serológico se implementó un ELISA *in house* estandarizado a partir de parásitos adultos de *Fasciola hepatica*. El 29.7% (102/343) de los individuos muestreados

¹ Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia – GIDIMEVETZ, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

² Grupo de Investigación en Parasitología y Microbiología Tropical – GIPAMT, Programa de Biología, Facultad de Ingenierías, Administración y Ciencias Básicas, Universidad INCCA de Colombia, Bogotá, Colombia

³ E-mail: diana.bulla@uptc.edu.co

Recibido: 25 de enero de 2021

Aceptado para publicación: 31 de julio de 2021

Publicado: 27 de octubre de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

fueron positivos a la presencia de *F. hepatica* en por lo menos una de las técnicas empleadas. La evaluación *post mortem* presentó el valor más alto (19.8%; 68/343), seguido por el ELISA *in house* (13.7%; 47/343), detección de huevos en bilis (11.7%; 40/343) y la técnica coprológica (7.3%; 25/343).

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, bovinos, prevalencia, ELISA

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of hepatic distomatosis in cattle slaughtered in the Sogamoso slaughterhouse (Boyacá, Colombia), and to define the most effective diagnostic technique to establish the presence of the parasite. A sample size of 343 individuals was established considering the monthly slaughter rate of the plant. Stool, blood and bile samples were taken, and adult parasites were collected from the bile duct. The modified Ritchie technique was used in the coproparasitological examination, the bile content was analyzed by sedimentation and a standardized in-house ELISA was implemented for serological diagnosis from adult *Fasciola hepatica* parasites. The results showed that 29.7% (102/343) of the individuals sampled were positive for the presence of *F. hepatica* in at least one of the techniques used. The *post mortem* evaluation presented the highest value (19.8%; 68/343), followed by the in-house ELISA (13.7%; 47/343), detection of eggs in bile (11.7%; 40/343) and the coprological technique (7.3%; 25/343).

Key words: *Fasciola hepatica*, cattle, prevalence, ELISA

INTRODUCCIÓN

La distomatosis hepática o fascioliasis es una enfermedad zoonótica de origen parasitario y distribución mundial (López *et al.*, 2017), que afecta mayormente a los rumiantes y ocasionalmente al ser humano (Valderrama Pomé, 2016). Su agente etiológico es el trematodo *Fasciola hepatica*, un parásito del filo Platyhelminthes, clase Trematoda, orden Echinostomida y familia Fascioloidae (ITIS, 2019).

La fascioliasis es considerada como una de las enfermedades con mayor propagación a nivel mundial (Mas Coma *et al.*, 2009), siendo causante de severas pérdidas económicas, las cuales han sido valoradas por encima de dos millones de dólares al año (Mehmood *et al.*, 2017), mientras que en Colombia se estiman pérdidas anuales de

\$1.927 millones de pesos (US\$ 530 815) (Ortega *et al.*, 2017), debido mayormente a la mortalidad de los animales, el decomiso de los hígados en las plantas de sacrificio, y por reducción en la ganancia de peso, producción de leche y rendimiento reproductivo (Rojo-Vásquez *et al.*, 2012).

La fascioliasis humana tiene una gran importancia en salud pública, debido al aumento de su incidencia en la cordillera andina, cuyos países representan las principales zonas endémicas (Mas-Coma *et al.*, 2005). La distribución geográfica de *F. hepatica* es amplia, encontrándose principalmente en Europa, América y Oceanía (Marcilla *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2016). Se reportó una prevalencia de 78.8, 75.8 y 86.9% para Inglaterra, Escocia y Gales en vacas lecheras (Howell *et al.*, 2015), de 27.4% en Egipto (El Damaty *et al.*, 2018), de 42.4% en Irán (Zarai *et al.*, 2019) y de 60% en Etiopía

(Asfaw, 2019), en tanto que para el continente americano se han reportado prevalencias entre 18.3 y 86.8% en ovinos y bovinos (Palacio *et al.*, 2017; Quevedo *et al.*, 2018; Jara *et al.*, 2018). De igual forma en Colombia, se reconocen áreas endémicas de fascioliasis como los departamentos de Boyacá, Nariño, Antioquia y Cundinamarca (Becerra, 2001). Por consiguiente, se han definido prevalencias de 5.9% (Blanco *et al.*, 1996), 42.2% (García Murillo *et al.*, 2009), 74.7% (Castro y Becerra, 2011), 13.1% (Bedoya *et al.*, 2012), 3.7% (Recalde-Reyes *et al.*, 2014), 7.8% (Pulido *et al.*, 2014) y 22.8% (Correa *et al.*, 2016).

El método de diagnóstico común para la fasciolosis en rumiantes es mediante la detección de huevos de *F. hepatica* en el examen coprológico, principalmente por medio de la técnica de Dennis (Sierra *et al.*, 2017). Sin embargo, la frecuencia de falsos positivos en estas pruebas puede ser elevada debido al periodo de prepatencia y a la ovoposición irregular (Kajugu *et al.*, 2015), así como de falsos positivos debido a la presencia de huevos que permanecen en el ducto biliar luego de las desparasitaciones (Sargison, 2012). De otra parte, se disponen de otros métodos de diagnóstico que pueden permitir la identificación de parásitos adultos en los canalículos hepáticos y de huevos en líquido biliar (Giraldo Forero *et al.*, 2016), los cuales pueden considerarse como diagnósticos tardíos, pero útiles para el control sanitario.

Las pruebas de inmunodiagnóstico tienen una mayor sensibilidad que las pruebas coprológicas, pues permiten revelar la presencia del parásito en los canales hepáticos luego del periodo prepatente (Kajugu *et al.*, 2015). Ante esto, el propósito del estudio fue determinar la prevalencia de distomatosis hepática en bovinos faenados en la planta de beneficio de Sogamoso (Boyacá), así como identificar la técnica diagnóstica más efectiva para establecer la presencia del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Muestreo

El municipio de Sogamoso está localizado en la región centro-oriente del departamento de Boyacá (Colombia). Se encuentra a una altitud de 2569 m y presenta una temperatura promedio anual de 18 °C (Alcaldía Municipal de Sogamoso, 2018).

Tamaño de la Muestra

Se trabajó con bovinos faenados provenientes de la planta de beneficio de Sogamoso, caracterizada por su alto volumen de sacrificio mensual procedente de municipios de los departamentos de Boyacá y Casanare. Se estableció un tamaño muestral de 343 individuos Holstein, Normando y cruzados mayores de 1 año, mediante el programa estadístico Open Epi, teniendo en cuenta una tasa de sacrificio mensual de la planta de 3141 bovinos. Se registraron los datos de los animales en fichas epidemiológicas durante el momento de sacrificio, tales como edad, sexo, raza y origen. Esta información fue proporcionada por las guías de movilización animal emitidas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Colecta y Procesamiento de Muestras

Las muestras de materia fecal fueron recolectadas directamente del recto y dispuestas en recipientes plásticos y almacenadas en cavas refrigeradas a 4 °C. Además, se tomaron muestras de sangre (10 ml) en tubos tapa roja por punción yugular. Luego del sacrificio y durante el eviscerado se recolectó el contenido biliar en frascos de plástico y se almacenaron en cavas de icopor a 4 °C. La inspección directa de los hígados permitió la recolección de parásitos alojados en el ducto biliar (García Murillo *et al.*, 2009). Los parásitos fueron preservados en alcohol al 70% (Kooshan *et al.*, 2010).

Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). Para la evaluación coproparasitológica se emplearon 4 g de materia fecal y se utilizó la técnica de Ritchie modificada para la identificación de huevos, ooquistes y larvas (Botero y Restrepo, 2005). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2438 g durante 10 minutos para la obtención del suero (Figueiredo *et al.*, 2017). El contenido biliar fue centrifugado a 3483 g durante 10 minutos y los precipitados se utilizaron para el reconocimiento de los estadios ovals de *F. hepatica* mediante microscopía directa (Giraldo Forero *et al.*, 2016). Para el diagnóstico serológico se implementó un ELISA *in house* (Se 96%, Sp 98%, VP+ 96% y VP- 98%) estandarizado a partir de parásitos adultos de *F. hepatica* colectados de bovinos faenados en Boyacá, los cuales fueron lavados con solución salina y conservados en Buffer Fosfato de Sodio estéril (PBS, pH 7.2) suplementado con antibiótico (Giraldo Forero *et al.*, 2016).

Para la elaboración del extracto antigénico, cada ejemplar de *F. hepatica* se homogenizó en una solución de PBS estéril (pH 7.2) y se llevó a delipidado con éter anhidro. Cada tratamiento se agitó durante 24 horas a 4 °C. Finalmente, las muestras se sonicaron con ultrasonido, seguido de ultra centrifugación de la que se conservó el sobrenadante. Se realizó cuantificación proteica por medio de la técnica de Bradford con diluciones seriadas de albumina sérica bovina (ASB) para conocer la concentración del extracto antigénico. Luego se obtuvo un perfil electroforético en gel de Acrilamida-Bisacrilamida. Para el proceso de extracción y purificación de las proteínas se separaron los componentes proteicos en geles de electroforesis de SDS-PEAGE al 10%. Las fracciones antigénicas de interés se obtuvieron por procesos de elución y el corte de los geles producto de perfiles electroforéticos preparativos con fracciones antigénicas de

14 y 19 kDa. Se evaluaron nuevos perfiles electroforéticos para la caracterización de los extractos antigénicos totales en diferentes concentraciones. Las fracciones más antigénicas, dieron lugar a la optimización de la prueba.

Como control positivo se seleccionaron sueros de animales en los que mediante examen *post mortem* se identificó la presencia del parásito adulto en ducto biliar o de huevos en contenido biliar y que al realizar la titulación en bloque en la prueba de serodiagnóstico seleccionada, se identificaron títulos de anticuerpos valorados por espectrofotometría (tipo IgG) y que además superaran el punto de corte calculado para la prueba. Los sueros control negativo fueron seleccionados de animales que no cumplieron con los criterios establecidos para los sueros control positivo.

El punto de corte para la prueba de Elisa *in house* se calculó mediante la sumatoria de los valores de absorbancia, y a su promedio aritmético se le sumo dos desviaciones estándar. El punto de corte para la detección de anticuerpos IgG anti *F. hepatica* fue de 0.300.

Análisis Estadístico

El estudio realizado fue de tipo descriptivo, de corte transversal con muestreo aleatorio simple. El procesamiento de la información se llevó a cabo mediante el software estadístico IBM SPSS Statistics 19 utilizando las pruebas Q de Cochran y McNemar.

Consideraciones éticas

El estudio se realizó bajo las condiciones de la Ley 576 del 2000 y la Ley 84 de 1989 de la República de Colombia. Se obtuvo consentimiento informado por parte de los propietarios de los bovinos antes de la recolección de las muestras.

Cuadro 1. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos faenados en Boyacá, Colombia de acuerdo con la técnica diagnóstica y el sexo de los animales muestreados

| Técnica | Sexo | Muestras | | Prevalencia (%) | P-valor |
|----------------------------------|------|----------|-----------|-----------------|---------|
| | | n | Positivos | | |
| Visualización <i>post-mortem</i> | H | 148 | 25 | 16.9 | 0.235 |
| | M | 195 | 43 | 22.1 | |
| ELISA <i>in house</i> | H | 148 | 17 | 11.5 | 0.298 |
| | M | 195 | 30 | 15.4 | |
| Bilis (Microscopía directa) | H | 148 | 16 | 10.8 | 0.669 |
| | M | 195 | 24 | 12.3 | |
| Coprología (Ritchie) | H | 148 | 9 | 6.1 | 0.454 |
| | M | 195 | 16 | 8.2 | |

RESULTADOS

La presencia de *F. hepatica* en los bovinos del estudio fue mayor al realizar la evaluación *post mortem* (19.8%; 68/343), seguido por la técnica de ELISA *in house* (13.7%, 47/343), detección de huevos en bilis (11.7%; 40/343) y la técnica coprológica (7.3%; 25/343). Por otra parte, si bien se observó una mayor prevalencia en machos que en hembras, las diferencias no fueron significativas (Cuadro 1).

La prueba Q de Cochran determinó una asociación estadística significativa entre las técnicas implementadas. Por otra parte, la prueba de McNemar evidenció diferencias significativas entre el número de casos positivos entre el análisis coprológico y el *post mortem* ($p = 0.000$), análisis coprológico y ELISA *in house* ($p = 0.011$), análisis biliar y *post mortem* ($p = 0.000$) y *post mortem* y ELISA *in house* ($p = 0.001$), mientras que no hubo diferencias significativas entre el análisis coprológico y el análisis biliar ($p = 0.64$) y el análisis biliar el el ELISA *in house* ($p = 0.324$) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Se han reportado estudios de prevalencia de distomatosis hepática en varios departamentos de Colombia, donde los valores de las prevalencias encontradas estuvieron influenciados por el método diagnóstico. Así, Giraldo Forero *et al.* (2016) reportaron una prevalencia de 32.4% al detectar los parásitos en los conductos biliares, en tanto que determinando coproantígenos en heces de bovinos faenados en Antioquia se reportaron valores de 5.9% (Blanco *et al.*, 1996) y de 13.1% (Bedoya *et al.*, 2012). Estas diferencias no solo pueden deberse a la técnica empleada, sino además, al número de animales muestreados.

La variabilidad de las prevalencias encontradas puede deberse, asimismo, al potencial del trematodo durante la etapa de desarrollo, así como al huésped y su respuesta inmune (De Ayala *et al.*, 2014). Sumado a esto, intervienen factores como la edad del huésped (Soca Pérez *et al.*, 2016), el contenido de agua en la materia fecal (Iturbe Espinoza y Muñiz Pareja, 2011), la cantidad

Cuadro 2. Asociación entre técnicas implementadas para el diagnóstico de *F. hepatica* en bovinos faenados en la planta de beneficio de Sogamoso, Boyacá

| Casos | Coprología | <i>Post mortem</i> | Coprología | ELISA <i>in house</i> | Bilis ¹ | <i>Post mortem</i> | <i>Post mortem</i> | ELISA <i>in house</i> |
|--------------------|------------|--------------------|------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Positivos | 25 | 68 | 25 | 47 | 40 | 68 | 68 | 47 |
| Positivos en común | 4 | | 2 | | 26 | | | 38 |
| P-valor | 0 | | 0.011 | | 0 | | | 0.001 |

¹ Microscopía directa

de muestra y el número de alícuotas analizadas por muestra (Uribe *et al.*, 2012), todos los cuales contribuyen a presentar variaciones en la detección de los huevos de *F. hepatica*.

La técnica diagnóstica ELISA *in house* fue la herramienta que presentó el segundo resultado más alto (13.7%). En Colombia, la implementación de la prueba de ELISA ha reportado prevalencias de 40% en Boyacá (García Murillo *et al.*, 2009) y de 5.9% detectando coproantígenos del trematodo (Blanco *et al.*, 1996) y de 80% de positividad en muestras de leche mediante un ELISA indirecto en Antioquia (Uruburu *et al.*, 2013). Resultados diferentes fueron reportados en el Reino Unido (79.7% en muestras de leche) por Howell *et al.* (2015), de 16-58% en Bolivia por Hillyer *et al.* (1996) y de 23.1% en Perú por Valencia *et al.* (2005).

La herramienta diagnóstica que reportó la prevalencia más alta en los bovinos faenados fue el examen *post mortem* (19.8%); sin embargo, es una técnica de diagnóstico tardío para la detección de la fascioliasis (Espino *et al.*, 2000). En Colombia se reportan prevalencias de 24.4% en Boyacá (García Murillo *et al.*, 2009) y de 32.4% en Cundinamarca (Giraldo Forero *et al.*, 2016) mediante esta técnica, en tanto que en América Latina se reportan valores entre

28.2 y 35.5% (Chagas *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2012; Palacio *et al.*, 2017). Los resultados del presente estudio no concuerdan con los obtenidos por García Murillo *et al.* (2009), quienes encuentran más casos positivos con la técnica de ELISA que con la identificación de los parásitos en el hígado.

La ausencia de asociación entre el sexo de los animales con la presentación del parásito coincide con otras investigaciones (García Murillo *et al.*, 2009; Afshan *et al.*, 2013; Giraldo Forero *et al.*, 2016), aunque se encontró que los machos presentaron prevalencias numéricas más altas respecto a las hembras en las cuatro herramientas diagnósticas.

Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las cuatro técnicas diagnósticas. Asimismo, se estableció que la concordancia se presentó entre las herramientas que estaban asociadas con el diagnóstico *post mortem*, lo cual podría deberse a que esta técnica es la más efectiva para la detección del parásito en los rumiantes. De otra parte, Blanco *et al.* (1996) establecieron una relación del 100% entre los casos positivos a ELISA (11/183) y a la inspección directa de hígados (11/183). No obstante, la presencia de la duela adulta en el hígado no garantiza la aparición de huevos en el contenido biliar o en heces (Chirinos *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias significativas entre las cuatro técnicas diagnósticas para *Fasciola hepatica*, especialmente con la visualización del trematodo en el hígado.
- No se encontró relación estadística entre el sexo de los bovinos y la presentación del parásito.
- Se pudo determinar que la presencia de los trematodos adultos en el hígado no está completamente relacionada con la detección de huevos y la presencia de seropositividad.

LITERATURA CITADA

1. **Afshan K, Qayyum M, Rizvi SSR, Mukhtar M, Mushtaq M, Miller JE. 2013.** Serological and coprological comparison for rapid diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in small ruminants from sub-tropical area of Pakistan. *Small Ruminant Res* 113): 267-272. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.-01.020
2. **Alcaldía Municipal de Sogamoso. 2018.** Alcaldía Municipal de Sogamoso, Boyacá. [Internet]. Disponible en: <http://www.sogamoso-boyaca.gov.co/>
3. **Asfaw A. 2019.** Prevalence and economic significance of bovine fasciolosis in Bale Rural Abattoir, Ethiopia. *Acad Agri J* 3: 541-550.
4. **Becerra Rozo WM. 2001.** Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. *Rev Colomb Cienc Pec* 14: 28-35.
5. **Bedoya AJ, Hurtado Y, Pérez J, Solano S, Úsuga MV, Vanegas M, Gómez C, et al. 2012.** Primer registro de focos de fasciolosis y paramfistomosis en bovinos doble propósito, Gómez Plata, Antioquia, Colombia. *Hechos Microbiol* 3: 31-39.
6. **Blanco A, Jaramillo G, Restrepo, JG 1996.** Detección de coproantígenos de *Fasciola hepatica* por ELISA en bovinos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín. *Rev Colomb Cienc Pec* 9: 46-48.
7. **Botero D, Restrepo M. 2005.** Conceptos generales sobre parasitología. En: *Parasitosis humanas*. 4º ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas. p 409-436.
8. **Brito E, Hernández MA, Fe, PDS, Silveira EA. 2012.** Prevalencia, decompensados de hígado y pérdidas económicas por *Fasciola hepatica* en mataderos bovinos de tres provincias de la región central de Cuba. *REDVET* 9(4). [Internet]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613155004.pdf>
9. **Castro N, Becerra W. 2011.** Foco de fasciolosis ovina en hacienda en la vereda Presidente, municipio de Chitagá, Norte de Santander, Colombia. *Bistua* 9: 64-72.
10. **Chagas C, Batista Carneiro M, Rauta de Avelar B, Molinari Donatele D, Vilhena Freire I, Salim Pereira M. 2011.** Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Rev Bras Parasitol V* 20: 49-53. doi: 10.1590/s1984-296120-11000100010
11. **Chirinos A, de Chirinos N, Roman R, HómezG, Pirela H, Rodríguez N. 2000.** Distomatosis hepática bovina a nivel de dos mataderos industriales del estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cien V* 10: 297-302.
12. **Correa S, Martínez YL, López JL, Velásquez LE. 2016.** Evaluación de la técnica modificada de Dennis para el diagnóstico de fasciolosis bovina. *Biomédica* 36: 64-68. doi: 10.7705/biomedica.v36i2.2875
13. **De Ayala Fernández JA, Cebrián, EM, Lazcano I, González F. 2014.** Infecciones por trematodos: esquistosomiasis, fascioliasis, opistorquiasis,

- clonorquiasis y paragonimiasis. *Medicine* 11: 3115-3128. doi: 10.1016/S0304-5412(14)70748-6
14. **El Damaty HM, Mahmmod YS, Gouda SM, Sobhy NM. 2018.** Epidemiological and ultrasonographic investigation of bovine fascioliasis in smallholder production system in Eastern Nile Delta of Egypt. *Prev Vet Med* 158: 35-42. doi: 10.1016/j.prevetmed.-2018.07.009
 15. **Espino AM, Borges A, Duménigo BE. 2000.** Coproantígenos de *Fasciola hepatica* de posible utilidad en el diagnóstico de la fascioliasis. *Rev Panam Salud Publ* 7: 225-231. doi: 10.1590/S1020-49892000000400003
 16. **Figueiredo Marques G, Augusto Pompei JC, Martini M. 2017.** Manual veterinario de toma y envío de muestras 2017. Cooperación Técnica MAPA/OPS/PANAFTOSA para el Fortalecimiento de los Programas de Salud Animal de Brasil. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPS/OMS. 218 p.
 17. **García-Murillo ME, Granados-Hurtado SJ, Pulido-Medellín MO, Andrade-Becerra RJ. 2009.** Comparación de métodos diagnósticos para *Fasciola hepatica* en el matadero de Chiquinquirá (Boyacá). *Cien Agric* 7: 71-79.
 18. **Giraldo Forero JC, Díaz Anaya AM, Pulido Medellín MO. 2016.** Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en la planta de beneficio del municipio de Une, Cundinamarca, Colombia. *Rev Inv Vet Peru* 27: 751-757. doi: 10.15381/rivep.v27i4.12572
 19. **Hillyer GV, de Galanes MS, Buchón P, Bjorland J. 1996.** Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. *Vet Parasitol* 61: 211-220. doi: 10.1016/0304-4017(95)00831-4
 20. **Howell A, Baylis M, Smith R, Pinchbeck G, Williams D. 2015.** Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. *Prev Vet Med* 121: 41-48. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.05.013
 21. **ITIS. 2019.** Sistema Integrado de Información Taxonómica. Disponible en: <http://www.itis.gov>
 22. **Iturbe Espinoza P, Muñoz Pareja F. 2011.** Desarrollo de huevos de *Fasciola hepatica* a partir de huevos aislados de la vesícula biliar de ovinos y vacunos, expuestos a luz y oscuridad. *Neotrop Helminthol* 5: 89-93.
 23. **Jara Campos C, Escalante Añorga H, Cassana W, Davelois Atac K, Benites Murrieta A. 2018.** Prevalencia de fascioliasis en ovinos y bovinos en la provincia de Pataz, La Libertad, Perú, mediante examen coproparasitológico y Western Blot. *Rev Inv Vet Perú* 29: 1421-1429. doi: 10.15381/rivep.v29i4.-15198
 24. **Kajugu PE, Hanna REB, Edgar HW, McMahan C, Cooper M, Gordon A, Barley JP, et al. 2015.** *Fasciola hepatica*: specificity of a coproantigen ELISA test for diagnosis of fasciolosis in faecal samples from cattle and sheep concurrently infected with gastrointestinal nematodes, coccidians and/or rumen flukes (paramphistomes), under field conditions. *Vet Parasitol* 212: 181-187. doi: 10.1016/J.VETPAR.2015.-07.018
 25. **Kooshan M, Hashemi T, Naghibi A. 2010.** Use of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* in diagnosis of sheep by ELISA. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.* 7: 170-175.
 26. **López-Villacís IC, Artieda-Rojas JR, Mera-Andrade RI, Muñoz-Espinoza MS, Rivera-Guerra V E, Cuadrado-Guevara AC, Zurita-Vásquez JH, et al. 2017.** *Fasciola hepatica*: aspectos relevantes en la salud animal. *J Selva Anim Sci* 4: 137-146.
 27. **Marcilla A, Barges MD, Mas-Coma S. 2002.** A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Mol Cell Probes* 16: 327-333. doi: 10.1006/mcpr.2002.-0429

28. **Martínez-Valladares M, Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Cordero-Pérez C, Famularo M del R, Fernández-Pato N, González-Lanza C, et al. 2013.** Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasite Vector* 6: 282. doi: 10.1186/1756-3305-6-282
29. **Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. 2005.** Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 35: 1255-1278. doi: 10.1016/J.IJPARA.-2005.07.010
30. **Mas Coma S, Valero MA, Bargues MD. 2009.** *Fasciola*, *Lymnaeids* and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasit* 69: 41-146. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69002-3
31. **Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, Saleem MH, et al. 2017.** A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog* 109: 253-262. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.006
32. **Ortega CM, Vásquez LR, Vargas R, Vergara D, Victoria I CL. 2017.** Descripción epidemiológica de *Fasciola hepatica* en bovinos en el beneficiadero de Popayán, Cauca, Colombia. *Rev Med Hond* 85: 1-114.
33. **Palacio Collado D, Bertot Valdés JA, Beltrao Molento M, Vázquez Gil Á, Izquierdo Pérez N, Arenal Cruz A, Arteaga Campbell A. 2017.** Comportamiento estacional de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en el mata-dero Chacuba, Camagüey, Cuba. *Rev Prod Anim* 29: 30-35.
34. **Pereira Silva AE, Freitas C da C, Vieira Dutra L, Beltrão Molento M. 2016.** Assessing the risk of bovine fasciolosis using linear regression analysis for the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Vet Parasitol* 217: 7-13. doi: 10.1016/j.vetpar.-2015.12.021
35. **Pulido-Medellín MO, García-Corredor D, Díaz-Anaya A, Andrade-Becerra R. 2014.** Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas. *Rev Salud Anim* 36: 65-69.
36. **Quevedo LS, Bruhn FRP, Teixeira JLR, Alberti TS, Scheid HV, Raffi MB, Sallis E, et al. 2018.** Epidemiological and clinical-pathological aspects of fasciolosis in livers of cattle slaughtered in southern Brazil. *Pes Vet Bras* 38: 1761-1766. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5880
37. **Recalde-Reyes DP, Padilla Sanabria L, Isabel M, Giraldo Giraldo MI, Toro Segovia JL, González MM, Castaño Osorio JC. 2014.** Prevalencia de *Fasciola hepatica*, en humanos y bovinos en el departamento del Quindío-Colombia. *Infectio* 18: 153 157. doi: 10.1016/j.infect.2014.09.001
38. **Rojo-Vázquez F, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M. 2012.** Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 189: 15-38. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.029
39. **Sargison N. 2012.** Diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Vet Rec* 171: 151.152. doi: 10.1136/vr.e5357
40. **Sierra Balcárcel R, Martínez Vega R, Gutiérrez-Marín R, Dolores C, Uribe N. 2017.** Estandarización de ELISA para el diagnóstico de fasciolosis bovina, ovina y humana. *Salud UIS* 49: 549-556. doi: 10.18273/revsal.v49n4-2017004
41. **Soca-Pérez M, Giupponi-Cardoso P, López-Vigoa O, Sanavria A, Sánchez-Santana T, Labrada-Vázquez A. 2016.** Prevalencia de *Fasciola hepatica* en vacas en pastoreo durante el periodo poco lluvioso. *Pastos y Forrajes* 39: 281-285.
42. **Uribe Delgado N, Sierra Balcárcel RF, Espinosa Gonzáles C. 2012.** Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos *Salud UIS* 44 7-12.

43. **Uruburu Gómez M, Bedoya Blandon J, Velásquez Trujillo L. 2013.** ELISA indirecta para el diagnóstico de fasciolosis bovina en leche. *Rev CES Med Vet Zoot* 8: 93-100. doi: 10.21615/2850
44. **Valderrama Pomé AA. 2016.** Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Rev Med Vet* 32: 121-129. doi: 10.19052/mv.3861
45. **Valencia MN, Pariona DA, Huamán A M, Miranda M F, Quintanilla C S, Gonzáles A A. 2005.** Seroprevalencia de fasciolosis en escolares y ganado vacuno en la Provincia de Huancavelica, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22: 96-102.
46. **Zaraei M, Arefkhah N, Moshfe A, Ghorbani F, Mikaeili F, Sarkari B. 2019.** Prevalence of bovine fascioliasis in a new-emerging focus of human fascioliasis in Boyer Ahmad district, southwest of Iran. *Comp Immunol Microb* 66: 101350. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101350
47. **Uribe Delgado N, Sierra Balcárcel RF, Espinosa Gonzáles C. 2012.** Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos. *Rev Univ Ind Santander*. 44(3), 7–12.
48. **Uruburu Gómez M, Bedoya Blandon J, Velásquez Trujillo L. 2013.** ELISA indirecta para el diagnóstico de fasciolosis bovina en leche. *Rev CES Med Vet Zoot*. 8(2): 93–100. Doi: 10.21615/2850
49. **Valderrama Pomé AA. 2016.** Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Rev Med Vet*, (32): 121. Doi: 10.19052/mv.3861
50. **Valencia M N, Pariona DA, Huamán A M, Miranda M F, Quintanilla C S, Gonzáles A A. 2005.** Seroprevalencia de fasciolosis en escolares y ganado vacuno en la Provincia de Huancavelica, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 22(2): 96–102.
51. **Zaraei M, Arefkhah N, Moshfe A, Ghorbani F, Mikaeili F, Sarkari B. 2019.** Prevalence of bovine fascioliasis in a new-emerging focus of human fascioliasis in BoyerAhmad district, southwest of Iran. *Comparative Immunol Microbiol Infect Dis*, 66: 101350. doi: 10.1016/J.CIMID.2019.101350.