

Colección y evaluación mediante marcadores fenotípicos de morfotipos de hospederos intermediarios resistentes a formas infectivas de *Fasciola hepática*

Collection and evaluation by phenotypic markers of morphotypes of intermediate hosts resistant to infectious forms of *Fasciola hepatica*

¹Marco Cabrera-González y ²Cristian Hobán-Vergara

RESUMEN

El objetivo fue realizar la colección y evaluación mediante marcadores fenotípicos de morfotipos de hospederos intermediarios resistentes a formas infectivas de *Fasciola hepática*. Para esto se emplearon 08 rebaños en La Encañada y Baños del Inca, presentando resistencia múltiple a Triclabendazol 12%, Closantel 10%, siendo susceptible a Nitroxinil 34 %, analizado mediante técnica FECRT. Con respecto a redia y cercaria de Hospederos intermediarios colectados en estos rebaños, se encontró 16,6% en *Lymnaea viatrix* (n= 60) y *Lymnaea schirazensis* 1,66% (n=40) en La Encañada; y en Baños del Inca afectando a *Lymnaea viatrix* 60% (n=100). Se infectaron artificialmente Hospederos intermediarios F1 (n=100), obtenidos de masas ovígeras, criados en laboratorio; frente a miracidium obtenidos de huevos incubados en recipientes envueltos en papel aluminio por 45 días a 18°C eclosionando por exposición a luz por 5 minutos; se realizó infección trimiracidial en placa multipocillo por 4 horas; 45 días post inoculación se examinó emergencia de cercaría, sacrificando los morfotipos; encontrando resistentes en *L. viatrix* 3,75% y *L. schirazensis* 1,25%. El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas en longitud y abertura de concha, siendo los resistentes más alargados y estrechos que los susceptibles; la pigmentación del manto fue concentrada en resistentes, frente a susceptibles; la conducta de ovoposición de progenitores fue observada en F1 mostrando resistencia a miracidium morfotipos provenientes de huevos depositados en tierra frente a susceptibles adheridos a la pared de acuarios. Esto evidencia que se pueden usar a los hospederos intermediarios como controladores biológicos de miracidium.

Palabras clave: Infección artificial, hospedero intermediario, miracidium, *Fasciola hepática*.

ABSTRACT

The objective was to carry out the collection and evaluation using phenotypic markers of morphotypes of intermediate hosts resistant to infective forms of *Fasciola hepatica*. For this, 08 herds were used in La Encañada and Baños del Inca, presenting multiple resistance to Triclabendazole 12%, Closantel 10%, being susceptible to Nitroxynil 34%, analyzed by FECRT technique.

With respect to network and cercaria of intermediate Hospederos collected in these herds, 16.6% were found in *Lymnaea viatrix* (n = 60) and *Lymnaea schirazensis* 1.66% (n = 40) in La Encañada; and in Baños del Inca affecting *Lymnaea viatrix* 60% (n = 100). Intermediary F1 hosts were artificially infected (n = 100), obtained from ovigerous masses, reared in the laboratory; against miracidium obtained from eggs incubated in containers wrapped in aluminum foil for 45 days at 18 ° C hatching by exposure to light for 5 minutes; trimiracidial infection was performed in multiwell plate for 4 hours; 45 days post inoculation, an cercaria emergency was examined, sacrificing the morphotypes; finding resistant in *L. viatrix* 3.75% and *L. schirazensis* 1.25%. The analysis of variance showed that there are significant differences in shell length and opening, the resistant ones being longer and narrower than the susceptible ones; the pigmentation of the mantle was concentrated in resistant, against susceptible; the oviposition behavior of parents was observed in F1 showing resistance to miracidium morphotypes from eggs deposited on land against susceptible ones attached to the aquarium wall. This shows that intermediate hosts can be used as biological miracidium controllers.

Keywords: Artificial infection, intermediate host, miracidium, *Fasciola hepatica*.

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria, Lima - Perú

²Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca - Perú

³Médico veterinario.

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis, enfermedad infecciosa parasitaria, causada por tremátodos del género *Fasciola* y afecta a animales herbívoros, omnívoros y en algunas ocasiones al ser humano (Martínez *et al.*, 2012). Es más frecuente que afecte a los animales de regiones con abundantes precipitaciones. Sin embargo, puede aparecer en regiones más secas a lo largo de ríos o afluentes de riego (Estupiñán *et al.*, 2016). Esta enfermedad ocasiona baja condición corporal que afecta los parámetros reproductivos, lo que impide alcanzar los estándares en la producción de leche, debido a que el ganado lechero debe tener un parto por año y al presentar esta enfermedad parasitaria, reduce las tasas de concepción y por ende los índices productivos disminuyen (Acuña, 2019). En el Perú, la fascioliasis está muy difundida y es un problema grave de salud sobre todo en los valles de la sierra como Cajamarca, Mantaro y otros (Acuña, 2019). En la región Cajamarca la fasciolosis es una enfermedad parasitaria de mucha importancia por sus altos niveles de prevalencia en el ganado y la zoonosis en la población humana. (Ortiz, 2011). La *Fasciola hepática*, tremátodo causante de la Fascioliasis, tiene como hospedero intermediario a los caracoles del género *Lymnaea* y como hospederos definitivos a los mamíferos herbívoros y ocasionalmente a los humanos. Está trematodosis es causante de importantes pérdidas económicas, ya que repercute

negativamente sobre los sistemas pecuarios de producción, por el decomiso de hígados y carcasas infectadas con fasciolas jóvenes o adultas, generando pérdidas económicas significativas (Chavez, 2019). Por lo general, se emplean productos químicos para su control generando resistencia del tremátodo. En la actualidad, se están considerando nuevos métodos de control como la selección genética de animales resistentes, control inmunológico y hospederos intermediarios del género *Lymnaea* resistentes a miracidium (Merino y Valderrama, 2017). Los individuos del género *Lymnaea* viven en cuerpos de agua estancados, praderas, charcos, riachuelos y otras áreas inundadas. Su potencial biótico es elevado, cada individuo produce hasta 25 000 huevos, que se convierten en nuevos caracoles al paso de tres meses, especialmente cuando las condiciones ambientales son apropiadas en lo que respecta a humedad y temperatura (Carrada, 2007). Sin embargo, la información es escasa respecto a la resistencia que presentan los Lymneidos a la infección (Villavicencio y Carvalho, 2005), por la variabilidad en la susceptibilidad de la especie y las diferencias entre poblaciones de caracoles y también entre los individuos (Gutiérrez *et al.*, 2013). En este contexto, se realizó la colección y evaluación mediante marcadores fenotípicos de morfotipos de hospederos intermediarios resistentes a formas infectivas de *Fasciola hepática*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación: Se utilizaron 8 rebaños: cuatro ubicados Baños del Inca y cuatro en La Encañada, ubicados entre los 2626 – 3115 msnm (figura 1).

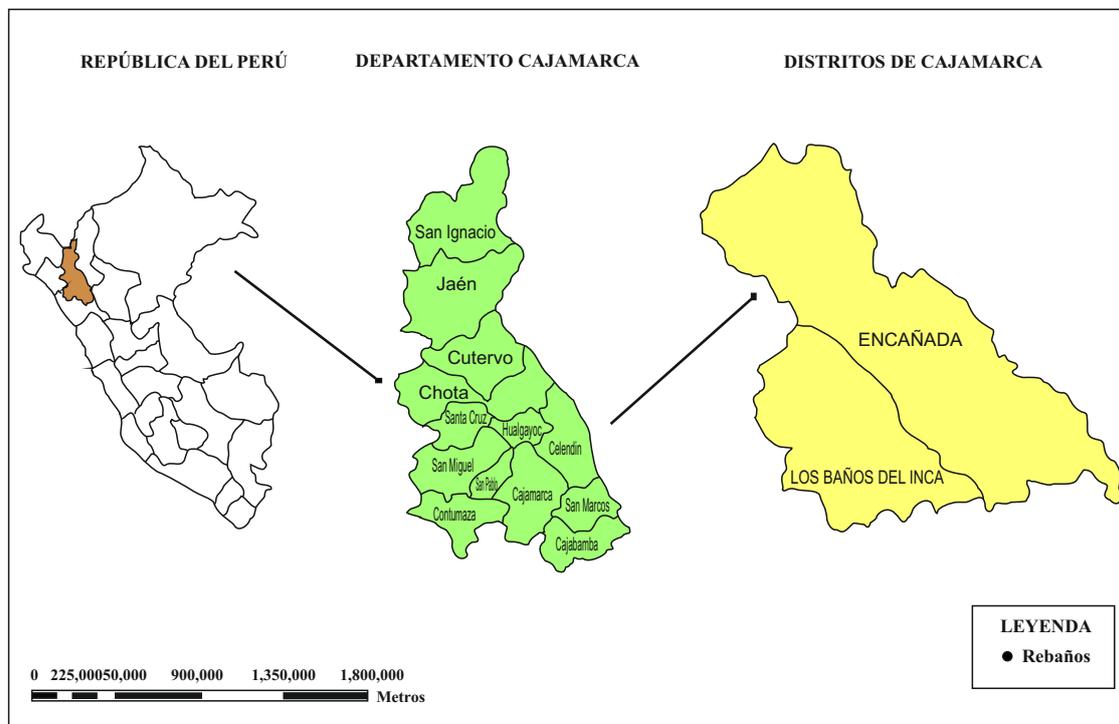


Figura 1. Ubicación de los rebaños en los distritos de la Encañada y Baños del Inca

Análisis de resistencia parasitaria: para el análisis de la resistencia de *Fasciola hepatica* a los fármacos utilizados en su control se utilizó la técnica de Reducción del Número de Huevos en las Heces-FECRT (Coles *et al.*, 2006). Se procesaron las muestras mediante la técnica de Sedimentación Modificada de Dennis.

Antihelmínticos utilizados: Se utilizó Triclabendazol (Valbazen plus ®12%), 7,5 mg/ kg vía oral, laboratorio PFIZER S.A.; Nitroxinil (Nitromic 34% ®), 6,8 mg/ kg peso vivo vía subcutánea, laboratorio LABOSIL y Closantel (Fasintel 10®), 10 mg/ kg vía oral laboratorio INNOVA Lima-Perú.

Material biológico: Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* (n = 100) se recogieron de 8 rebaños, seleccionándose *Lymnaea viatrix* y *Lymnaea schirazensis* (Bargues *et al.*, 2011). Se obtuvieron clústers de huevos para obtener caracoles F1 libres de formas infectivas de *F. hepatica* para realizar la infección artificial.

Infección natural: Se realizó el sacrificio y disección de hospederos intermediarios (n=200), con la finalidad de observar la presencia de estadios inmaduros (Giménez *et al.*, 2014). Determinándose la intensidad de infección producida (número de redias / caracol y número de cercarías / redia).

Cultivo de caracol en el laboratorio para obtención de F1: Los hospederos intermediarios colectados se limpiaron con agua destilada y ubicaron en recipientes de plástico con tierra molida, agua destilada y lechuga como alimento; manteniéndose a 18°C, y expuestos a 12 h luz / 12 oscuridad. Las masas de huevos fueron agrupadas teniendo en cuenta la forma y el sitio de la ovoposición (en tierra / sobre paredes del recipiente) (Bargues *et al.*, 2011); colocándose en recipientes de plástico con agua destilada, tierra y lechuga *ad libitum* como alimento hasta su eclosión.

Obtención de huevos de *Fasciola hepática* y miracidium: Se obtuvieron del recto de vacunos de los animales con resistencia a fármacos (Coles *et al.*, 2006). Se procesaron mediante la técnica de Sedimentación Modificada de Deniss. Los huevos se colocaron en vasos de precipitación y fueron envueltos en papel aluminio, almacenados en cajas de tecnoport, por 45 días en oscuridad a 18°C. La eclosión del miracidium se obtuvo con exposición a la luz del estereomicroscopio por 5 minutos.

Infección artificial: los caracoles F1 (n=100) con longitud mayor a 3 mm se infectaron con 3 miracidium por caracol en placas multipocillo exponiéndose al miracidium por 4 horas a 18°C. Pasado los 45 días post inoculación se examinó la emergencia de cercarías; los especímenes infectados muertos fueron diseccionados en busca de esporocistos, redias o cercarías inmaduras (Giménez *et al.*, 2014).

Marcadores fenotípicos de susceptibilidad / resistencia

Morfometría de la concha: Se determinó si está asociado con la susceptibilidad/resistencia, teniendo en cuenta: altura de la concha, longitud de la concha, apertura de la concha y número de verticilos de la concha.

Conducta de ovoposición: Se seleccionaron caracoles F1 que sus antecesores mostraron conducta de ovoposición en tierra y/o adheridos a las paredes del recipiente para ver si está asociado con la resistencia / susceptibilidad a la infección.

Patrón de pigmentación del manto: Se evaluó macroscópicamente hospederos intermediarios a la infección de miracidium de acuerdo a la pigmentación, color y su concentración.

Patrón de pigmentación del manto: Se evaluó macroscópicamente hospederos intermediarios a la infección de miracidium de acuerdo a la pigmentación, color y su concentración.

Diseño Estadístico: Se realizó el análisis de la estadística descriptiva considerando las medias aritméticas o promedios,

rangos, varianza, desviación estándar y el coeficiente de variabilidad. Se utilizó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre hospederos intermediarios mediante los parámetros de caracterización establecidos. Los datos se procesaron mediante Excel y el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia parasitaria in Vivo

Mediante la prueba de resistencia parasitaria In Vivo de Reducción del Número de Huevos en las Heces – FECRT al Triclabendazol 12%, Closantel 10% y Nitroxinil 34% (Anziani y Fiel, 2015). Se encontró que la *F. hepatica* en rebaños del distrito de Baños del Inca es resistente a Triclabendazol 12% con valores de eficacia que van desde el 77% hasta 85%, los cuales están por debajo del 95% que manifiesta la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Igualmente, a Closantel al 10% es resistente presentando eficacias desde 60% hasta 69%. En cuanto al uso de Nitroxinil al 34% no hubo resistencia mostrando valores superiores a 95% de eficacia (figura 2).

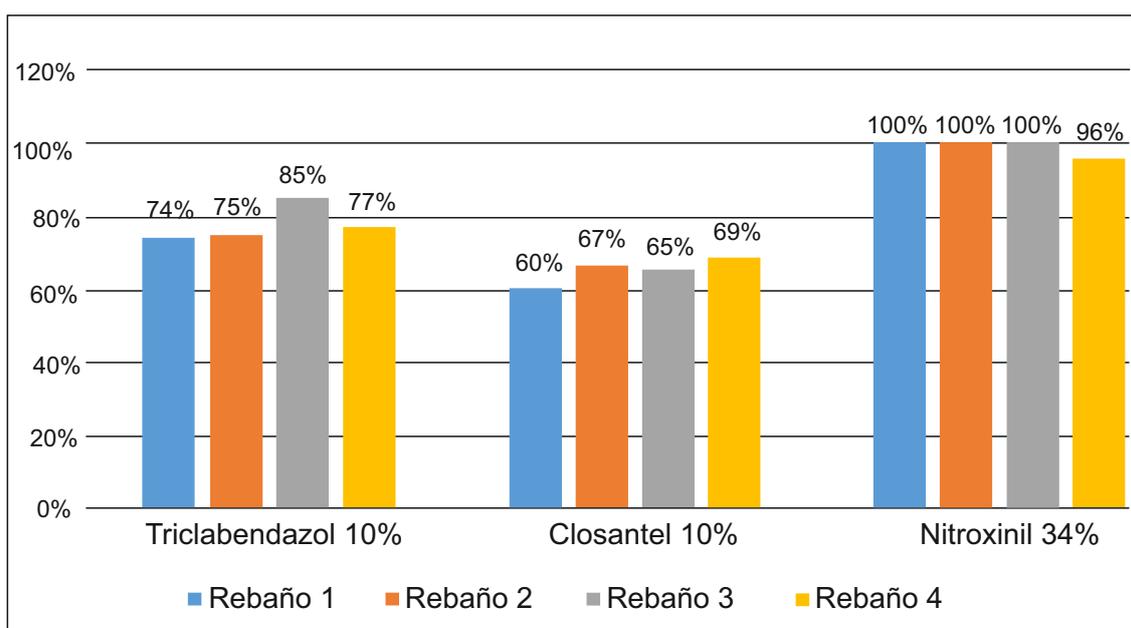


Figura 2. Eficacia de los fármacos en el control de *Fasciola hepatica* en el distrito Baños del Inca.

La resistencia de *Fasciola hepatica* en los rebaños de La Encañada, es a Triclabendazol al 12% en tres rebaños con eficacias que van desde 44% hasta 86% a excepción de un rebaño/caserío Nuevo San José (17M, 0797666/9208157-2,948 msnm) donde se sospecha de resistencia con una eficacia de 95% y el límite inferior para un intervalo de confianza del 90% fue 77% (figura 3).

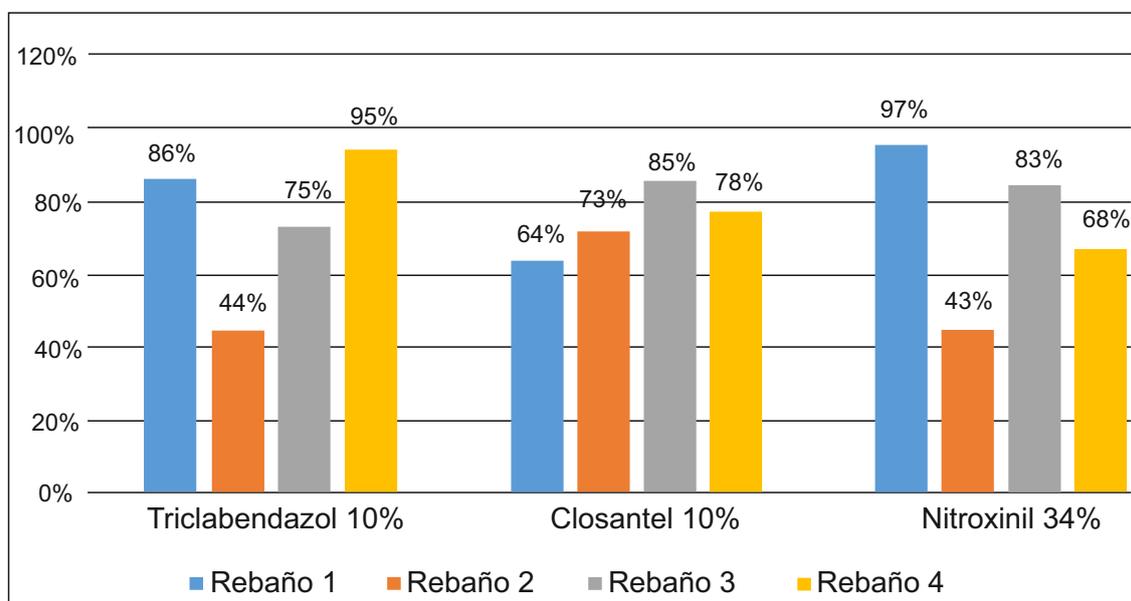


Figura 3. Eficacia de los fármacos en el control de *Fasciola hepatica* en el distrito La Encañada

También existe resistencia a Closantel 10% con eficacias desde 64% hasta 85%. Al Nitroxinil 34% existen resistencias en tres rebaños, pero se sospecha de resistencia en un rebaño de Polloc (17M 0797947/9212485 – 3,054msnm), con una eficacia de 97 y un límite inferior para un intervalo de confianza del 90% es 66%; resultados diferentes a los encontrados en Baños del Inca.

Al comparar nuestros resultados con otras investigaciones podemos afirmar que concuerdan con el estudio realizado en vacunos en la SAIS José Carlos Mariategui con una efectividad de 77% a Triclabendazol y 25% a Closantel, demostrando resistencia y 100% eficaz a Nitroxinil al 34% (Rojas, 2011), otros resultados muestran baja eficacia del triclabendazol con 50% en el fundo La Turba, caserío Río Seco, provincia de San Marcos (Vergara, 2017). Con respecto a Closantel 10% Terán y Rojas (2011) encontraron un 85% de eficacia, resultados similares al de esta investigación.

Los helmintos en rumiantes han desarrollado resistencia a todos los fármacos disponibles a escala mundial comprometiendo su viabilidad sanitaria. Los helmintos sobrevivientes al tratamiento son molecularmente capacitados para resistir el efecto del fármaco y heredado de generación en generación (Keller *et al.*, 2018).

Infección natural de hospederos intermediarios

Respecto a la infección natural de hospederos intermediarios de Polloc / Polloquito en el distrito La Encañada, en *Limneae viatrix* se encontró 16,66% con un promedio de $3,23 \pm 3,004$ redias y $48,33 \pm 12,583$ cercarias y *Limneae schirazensis* obtuvo 1,66% con $1,16 \pm 0,753$ redias y 40 ± 10 cercarias (figura 4).

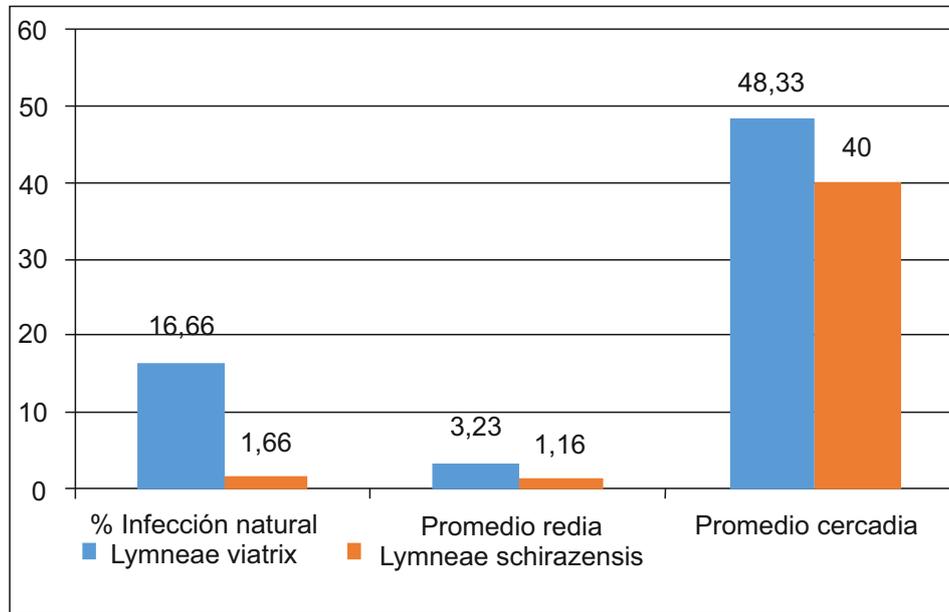


Figura 4. Infección natural en hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*- La Encañada

En Baños del Inca, se encontró infección en *Limneae viatrix* (60%); principalmente con un promedio de $6,5 \pm 3,5355$ redias y $20 \pm 7,0711$ cercarias (figura 5).

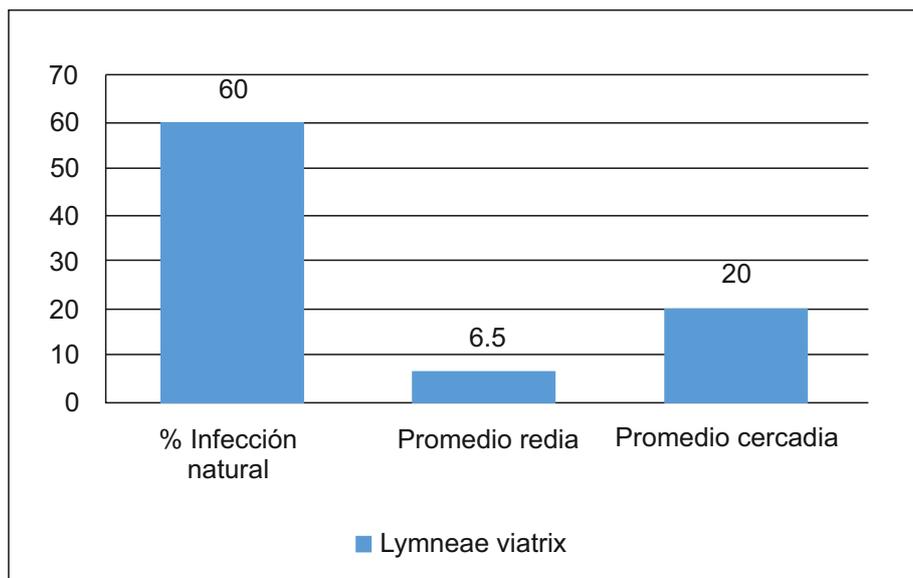


Figura 5. Infección natural en hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*- Baños del Inca

La infección natural fue superior en Baños del Inca e inferior en La Encañada. Hernani *et al.* (2007) obtuvieron resultados de infección natural de 27% para *Lymnaea viatrix*, resultados inferiores a los obtenidos en la Estación Baños del Inca. Por otro lado, Giménez y Chamorro (2014) encontraron valores de infección para *Lymnaea columella* de 30% que es superior a lo obtenido para *Lymnaea viatrix* en la Encañada pero inferior a lo obtenido por esa misma especie en Baños del Inca. Estas diferencias podrían atribuirse a la época de colecta y las condiciones medioambientales (Godoy, 2018).

Con respecto a *Limnaea schirazensis* pocos trabajos reportaron infección natural teniendo bajos niveles de infección a pesar de encontrarse en zonas endémicas (Bargues *et al.*, 2011).

La intensidad de infección natural está dentro del rango que señalan otros investigadores para *Lymnaea columella* con 8,6 redias/caracol y 14,4 cercarias/redia, mientras que para

Lymnaea viatrix está alrededor de 16,5 redias/caracol y 14,2 cercaria/redia (Hernani *et al.*, 2007).

Infección artificial de hospederos intermediarios

Se observó mayor susceptibilidad en *L. viatrix* (13,7%) en comparación con *L. schirazensis* (2,5%). La mortalidad de caracoles infectados artificialmente fue menor en *L. schirazensis* (12,5%) en comparación a *L. viatrix* (66,2%); encontrándose morfotipos resistentes en *L. viatrix* (3,75%) y *L. schirazensis* (1,25%); observándose relación directa entre el tamaño del caracol y susceptibilidad a la infección, a menor tamaño mayor porcentaje de infección y mortalidad; Con respecto al género *L. schirazensis* son pocos los trabajos donde se han reportado infección natural y se reporta bajos niveles de infección a pesar de encontrarse en hábitats donde se conocen que las prevalencias de fasciolosis son altas (Bargues *et al.*, 2011) (figura 6).

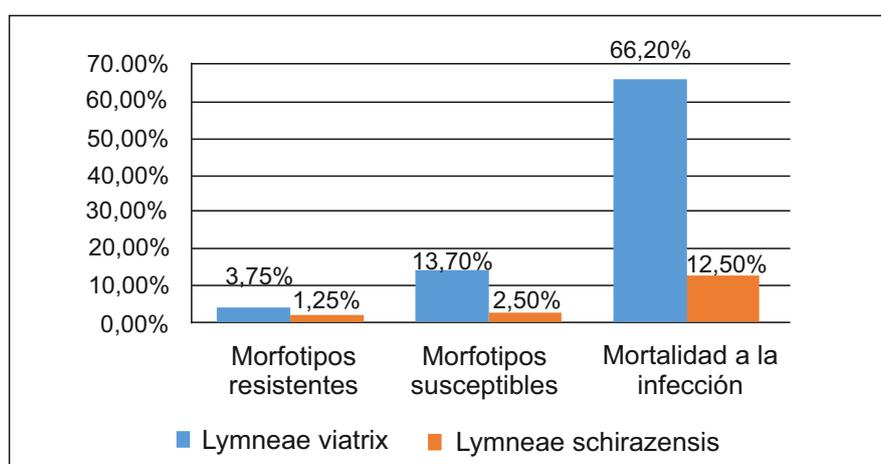


Figura 6. Infección artificial de hospederos intermedios F1 a miracidium de *Fasciola hepática*

La infección artificial encontrada es menor si lo relacionamos con otras investigaciones como la de Iturbe y Muñiz (2012) quienes obtuvieron una infección con *Fasciola hepatica* para el limneido *Galba truncatula* de 71,78%. Siancas (2016) en la región de La Libertad, Perú obtuvo valores de infección para *L. viatrix* en época de invierno de 39,6% y en época de primavera de 49,1%, estos resultados son menores a los obtenidos en esta investigación. Por otro lado, Hernani *et al.* (2007) obtuvieron datos de susceptibilidad para *L. viatrix* de 70%, resultado superior a lo obtenido en esta

investigación; con respecto a la mortalidad por infección para *L. viatrix* de 7% que es inferior a lo obtenido en esta investigación.

Caracterización por marcadores fenotípicos de morfotipos

Morfometría de la concha: Se evaluaron 4 variables: alto, ancho, apertura y circunvalaciones (Bargues *et al.*, 2011); encontrándose diferencias significativas en 2 variables ($p < 0,05$), siendo la concha de los moluscos resistentes más estrecha y alargada que la concha de los susceptibles (figuras 7, 8 y 9).

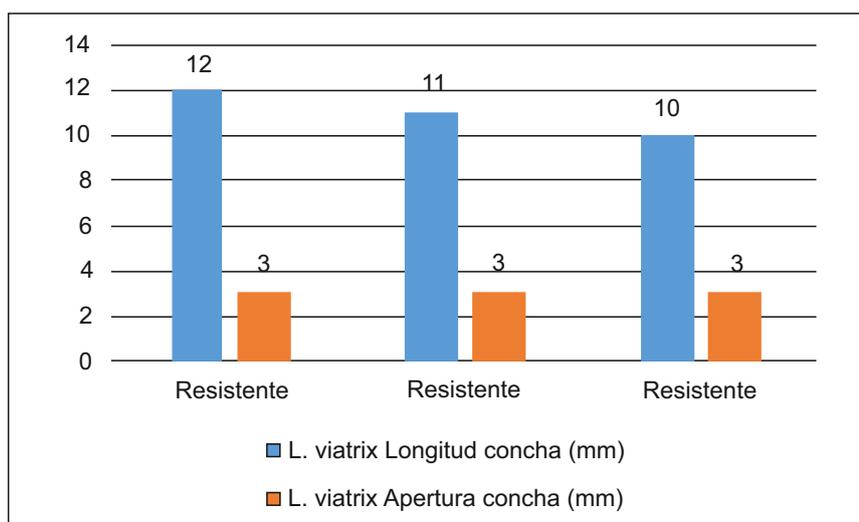


Figura 7. Longitud y apertura de concha de *L. viatrix* resistentes a la infección con miracidium.

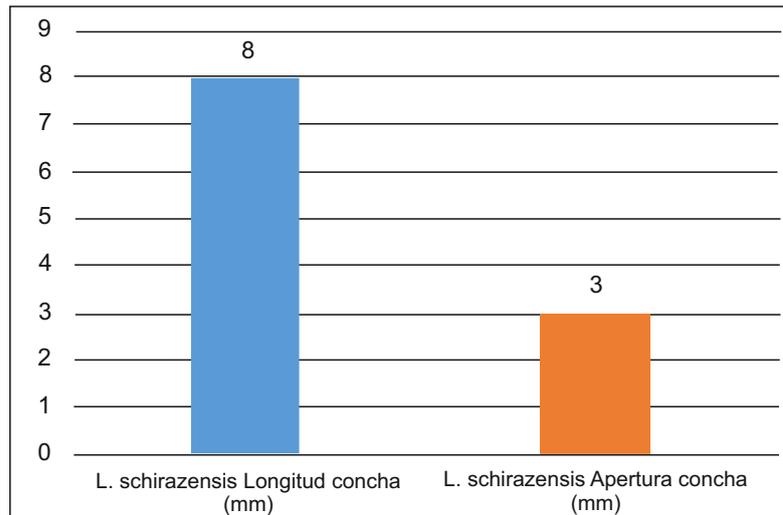


Figura 8. Longitud y apertura de concha de *L. shirezenci* susceptibles a la infección con miracidium.

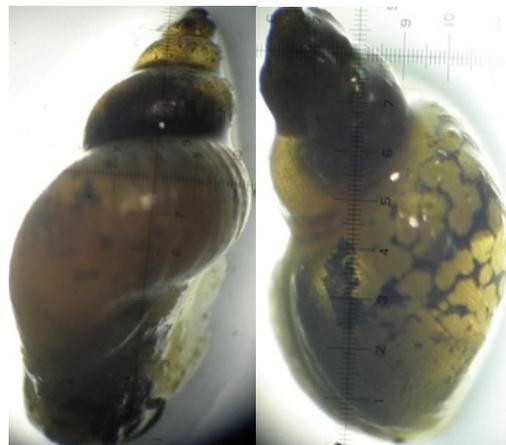


Figura 9. Morfotipo resistente EE. Baños del Inca (A) y Morfotipo susceptible EE. Baños del Inca (B) en cuanto a la variable longitud de concha.

Algunos autores observaron en otros géneros de limneydos que se comportan como H. intermediarios de *F. hepatica* que el tamaño ideal varía entre 3,5 a 5 mm en *L. viatrix* y de 2,2 a 8,2 en *L. columella* (Londoño *et al.*, 2009). Además, mientras más pequeños sean mayor facilidad para la infección experimental y mortalidad presentarán. Estudios realizados en Cuba manifiestan que la longitud del caracol y apertura de la concha son características importantes de resistencia (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Patrón de pigmentación del manto: Mediante un estereomicroscopio permitió diferenciar moluscos resistentes, siendo estos más concentrados que los de los moluscos susceptibles, que tienen pigmentos más aislados (Figura 10). Resultados similares se obtuvieron en otras especies como el género *Pseudosuccinea columella* que presentó diferenciación en el patrón del manto en cepas resistentes frente a susceptibles (Gutiérrez, 2003).

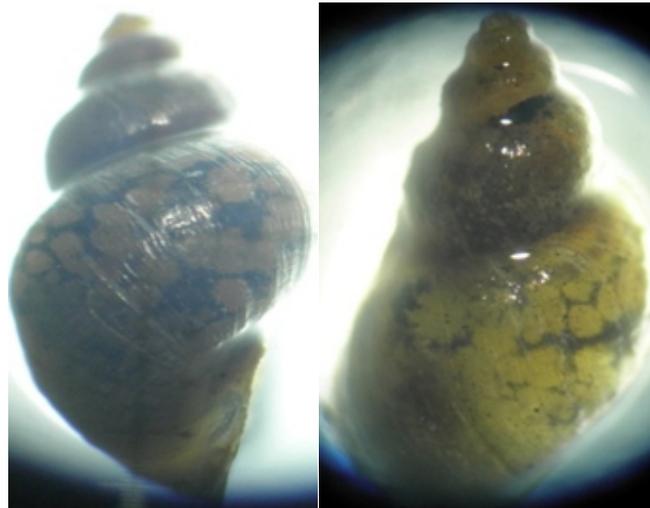


Figura 10. Morfotipo resistente EE. Baños del Inca (A) y Morfotipo susceptible EE. Baños del Inca (B) en cuanto a la variable pigmentación del manto.

Conducta de ovoposición: La infección artificial de morfotipos F1 teniendo en cuenta su conducta ovopositoria de sus progenitores fue estudiada y observada, encontrando que en *L. schirazensis* los huevos mostraron tendencia de riñón a banana y *L. viatrix* forma oval (Bargues *et al.*, 2011) (figura 10). Se pudo observar que los morfotipos F1 resistentes eran los

provenientes de caracoles con conducta ovopositoria a depositar los clúster de huevos sobre la tierra de los acuarios; mientras que los susceptibles ponen los clúster de huevos adheridos a las paredes (figura 11); situación similar se menciona en el género *Pseudosuccinea columella* (Gutiérrez *et al.*, 2003).



Figura 10. Variabilidad de clúster de huevos en hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*



Figura 11. Conducta ovopositoria de hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*: ovoposición en tierra (A) y ovoposición en la pared (B).

CONCLUSIONES

En Rebaños del Inca, se encontró resistencia múltiple de *Fasciola hepatica* a Triclabendazol 12%, Closantel 10%; mostrando susceptibilidad al tratamiento con Nitroxinil al 34%. Se observó una eficiencia hasta del 100% para Nitroxinil 34%. En La Encañada, se encontró resistencias de la *Fasciola hepatica* a Triclabendazol 12%, Closantel 10% y Nitroxinil al 34%; en dos rebaños se logró una eficiencia ideal con 95% para Triclabendazol 10% y 97% para Nitroxinil 34%. La infección natural fue de 16,6% en *Limnaea viatrix* y 1,66% en *Limnaea shirazensis* en La Encañada; y en Baños del Inca principalmente fue por *Limnaea viatrix* en 60%. Con respecto a la Infección artificial de hospederos intermediarios se observó mayores valores porcentajes de morfotipos resistentes, morfotipos susceptibles y mortalidad a la infección para *Limnaea viatrix*. En cuando a la morfometría de la conchase observó que la concha de

moluscos resistentes (*Limnaea viatrix*) fue más estrecha y alargada que la concha de los moluscos susceptibles (*Limnaea shirazensis*). En lo que respecta al patrón de pigmentación del manto, los resistentes fueron más concentrados, mientras que los susceptibles fueron más aislados. Por último, en lo referido a la conducta de ovoposición, los huevos mostraron tendencia de riñón a banana. Los caracoles resistentes fueron los que tuvieron la conducta de depositar los cluster de huevos en tierra, mientras que los susceptibles lo hicieron adheridos a la pared del acuario.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa Nacional de Bovinos de la Estación Experimental Baños del Inca – INIA y al Consejo Regional de Ciencia y Tecnología – CORECITI – Cajamarca / Cuarto Concurso de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Acuña, Y.G. (2019). Prevalencia e *Fasciola hepática* en vacas de la asociación ganadera de la provincia Huancabamba-Piura- junio- Noviembre 2018. Tesis de grado. Facultad de medicina veterinaria, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 52pp.
- Bargues, M. D., Artigas, P., Khoubbane, M., Flores, R. (2011). *Lymnaea schirazensis*, an Overlooked Snail Distorting Fascioliasis Data: Genotype, Phenotype, Ecology, Worldwide Spread, Susceptibility, Applicability. *PLOS ONE* 6(9): e24567.
- Carrada, T. (2007). *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 54(1): 21 -27.
- Chavez, E.V. (2019). Fasciolosis animal y frecuencia de infección por *Fasciola hepatica* en lymneidos del distrito de Huanca, Caylloma, Arequipa, 2018. Tesis de grado. Facultad de ciencias biológicas, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú. 117pp.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., vom Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor M.A., Vercruyssen, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136: 167-185.
- Estupiñán, J.D., Pabuenta, J., Castro, C., Ramírez, E., Vásquez, M.C., Calle, M., Sierra, R.F. (2016). Determinación de la prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos de Rio de Oro y Aguachica, Cesar. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES*, 3(1):19.
- Giménez, T., Núñez, A., Chamorro, N., Alarcon, G. (2014). Estudio de la infección natural por *Fasciola hepatica* en *Lymnaea* spp. en el distrito de Yabebyry, departamento de Misiones - Paraguay. *Compendio de ciencias veterinarias*, 4(2):14-18
- Godoy, D. J. (2018). Desarrollo de un modelo espacial de riesgo de infección de *Fasciola hepatica* en vacunos lecheros de la sierra central. Tesis de maestría. Maestría en producción animal, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 141 pp.
- Gutiérrez, A., Yong, M., Fernández-Calienes, Fraga, J., Sánchez, J., Wong, L. (2003). Diferenciación fenotípica de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*. *Biotecnología Aplicada*, 20 (3): 177-179.
- Gutiérrez, R. M. (2015). Especies de gasterópodos e incidencia de *Lymnaea* sp. en las fuentes de alimentación de ganado vacuno del distrito de Chiara - Ayacucho, 2013. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional

- San Cristobal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 96 pp.
- Hernani, C., Flórez, M., Vivar, R., Huamán, P. y Velásquez, J. (2007). Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en el Perú. *Revista Horizonte Médico*, 7 (1): 39-46.
- Iturbe, P. y Muñiz, F. (2012). *Galva truncatula* inducida a infección con miracidios de *Fasciola hepática*, colectados en Huayllapampa, San Jerónimo, Cusco, Perú. *Neotrop. Helminthol.*, 6(2): 211-217.
- Keller, I. M., Lissarrague, C. y Fiel, C. A. (2018). Estudio de la resistencia antihelmíntica en cría y recría de bovinos de carne. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 43 pp.
- Londoño, P., Chávez, A., Li, O., Suárez, F., Pezo, D. (2009). Presencia de caracoles lymnaeidae con formas larvarias de *Fasciola hepatica* en altitudes sobre los 4000 msnm en la sierra del Perú. *Revista de Investigación Veterinaria en el Perú*, 20(1): 58-65.
- Martínez, R., Domenech, I., Millán, J. C. y Pino, A. (2012). Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 50 (1): 88-96.
- Ortiz, P. (2011). Estado actual de la infección por *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú. *Biomedica*, 31 (3): 172-179.
- Rojas, J. (2011). Diagnóstico de resistencia antihelmíntica de *Fasciola hepatica* frente a cinco fasciolicidas en bovinos de la S.A.I.S. José Carlos Mariategui, distrito de San Juan, Cajamarca, Perú. *Asociación Peruana de Producción Animal –APPA*, 2012.
- Siancas, F. M. (2017). Frecuencia de infección por *Fasciola hepática* en *Lymnaea viatrix* e identificación de plantas asociadas en la provincia de Pataz, región La Libertad- Perú, 2016. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 60 pp.
- Terán, J. y Rojas, J. (2011). Eficacia de cuatro grupos químicos fasciolicidas en el control de Fasciolosis en bovinos del predio “Quebrada Honda”, distrito Tumbadén, provincia San Pablo-Cajamarca. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú. 72pp.
- Vergara, R. (2017). Eficacia de cuatro principios activos en el control de *Fasciola hepatica* en bovinos del fundo “Turba”, caserío río seco, provincia San Marco, 2017. Tesis grado. Facultad de ciencias veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca, Perú. 65pp.

CORRESPONDENCIA:

Dr. Cabrera González Marco
mcabrera9@gmail.com