
Fasciolosis humana en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela: prevalencia y factores asociados.

Azael Freites¹, Cecilia Colmenares², Belkisyolé Alarcón-Noya², María Eugenia García¹ y Odelis Díaz-Suárez¹.

¹ Sección de Parasitología, Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela y

² Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Fasciolosis humana, *Fasciola hepatica*, Venezuela, parásitos intestinales.

Resumen. La Fasciolosis humana tiene baja frecuencia en Venezuela; sin embargo, el Municipio Mara es una región altamente endémica para fasciolosis bovina y no existen estudios sobre esta infección parasitaria en humanos. Con el propósito de determinar la prevalencia y factores asociados a la fasciolosis humana en el municipio Mara del estado Zulia, se recolectaron un total de 51 muestras de sangre y de heces. Los sueros se procesaron mediante la técnica de ELISA y “Western blot” (WB) con antígenos excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AFhES). A los sueros que resultaron positivos se les realizó ELISA IgG anti *Toxocara* spp, *Toxoplasma gondii* y cisticercosis. Las muestras de heces se concentraron mediante las técnicas de Ritchie y sedimentación rápida. Dos sueros (3,9%) fueron positivos a la técnica de ELISA AFhES; estos no reconocieron las moléculas específicas del WB-AFhES, detectadas por sueros de pacientes con infección absolutamente demostrada. Ambos individuos resultaron negativos a IgG anti *Toxocara* spp, *Toxoplasma gondii* y cisticercosis, así como también a parásitos intestinales. La prevalencia general de las parasitosis intestinales fue de 52,9% (27/51), siendo más frecuente los protozoarios que los helmintos. No se encontraron huevos de *F. hepatica*. Los dos individuos positivos a ELISA AFhES tenían en común trabajar en el corte de pasto fresco. Los resultados obtenidos sugieren que la población ha estado en contacto con *F. hepatica*, en ausencia de una infección activa por la falta de reconocimiento de las moléculas específicas del WB-AFhES y la ausencia de huevos en las heces. La fasciolosis humana tiene una baja frecuencia en Venezuela, razón por la cual no es sospechada su presencia, existiendo poco conocimiento de esta infección por el personal de salud y la población general.

Human fasciolosis in Mara municipality, Zulia state. Venezuela: Prevalence and associated factors.

Invest Clin 2009; 50(4):497 - 506

Key words: Human fasciolosis, *Fasciola*, Venezuela, intestinal parasites.

Abstract. In Venezuela, human Fasciolosis shows a low frequency. However, Mara Municipality is a highly endemic region for bovine fasciolosis and there are no reports of this parasite infection in humans. To determine the prevalence and associated factors to human fasciolosis in Mara municipality - Zulia state, a total of 51 blood and stool samples were collected. Serums were tested by ELISA and Western Blot (WB) assays, with excretion-secretion antigens of *Fasciola hepatica* (AFhES). The serum samples that resulted positive by these assays were tested by ELISA IgG anti *Toxocara sp*, *Toxoplasma gondii* and cysticercosis. Stool samples were concentrated by the Ritchie and rapid sedimentation techniques. Two serum samples were reactive to ELISA AFhES (3.9%) and these did not recognize the specific molecules of WB-AFhES detected by serum from patients with an absolutely demonstrated infection. Both participants were not positive to IgG anti *Toxocara sp*, *Toxoplasma gondii*, cysticercosis, and stool samples of these were negative to intestinal parasites. The general prevalence of intestinal parasites was 52.9% (27/51), being protozoa more frequent than helminthes. No *Fasciola* eggs were found. The two positives participants had in common that both had worked as fresh pasture cutters. These results suggest that the population had been in contact with *F. hepatica*, with no active infection because of the lack of specific molecules recognition and the absence of eggs in stool samples. Human fasciolosis has a low frequency in Venezuela and is underestimated and underrecognized by health workers and the general population.

Recibido: 29-01-2009. Aceptado: 29-06-2009.

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una infección parasitaria causada por tremátodes del género *Fasciola*, siendo la especie más frecuente *Fasciola hepatica*, la cual está distribuida en todos los continentes e infecta humanos y animales herbívoros; otra especie es *Fasciola gigantica* con distribución predominante en África y Asia. Estos tremátodes son hermafroditas y presentan un ciclo evolutivo y manifestaciones clínicas similares en humanos, considerándose éste como huésped accidental (1).

El ganado bovino y ovino son los principales hospederos definitivos de *F. hepática*. El estadio adulto aplanado se ubica generalmente en los canalículos biliares, donde depositan sus huevos no embrionados que entran al duodeno y son excretados a través de las heces, cuyo contenido evoluciona dando origen a larvas ciliadas o miracidios. Cuando los huevos caen en los cuerpos de agua dulce por la defecación de animales o humanos infectados, eclosionan y los miracidios son liberados, penetrando (si existe en el ambiente) al hospedador intermediario específico (caracol del género

Lymnaea), del cual se liberan cercarias que se transforman en metacercarias o forma evolutiva infectante, las cuales se adhieren a plantas acuáticas y vegetales o quedan libres en el agua (2).

Las manifestaciones clínicas de la fasciolosis humana son inespecíficas y varían de acuerdo la fase de la enfermedad, aguda o crónica. La fase aguda está asociada con la triada de fiebre, hepatomegalia y eosinofilia. La fase crónica sintomática se caracteriza por cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática (3). No se evidencia la misma epidemiología y factores de riesgo de la fasciolosis humana en las distintas zonas endémicas del mundo, siendo necesaria la determinación de los factores de riesgo de infección humana en cada región geográfica y entre los diferentes países, asociados muchas veces a los hábitos alimenticios como la ingesta de vegetales crudos (4).

Actualmente, esta infección parasitaria se encuentra en expansión, constituyéndose en una infección emergente y re-emergente en muchos países, con incremento de su prevalencia e intensidad. Asimismo, recientes investigaciones sugieren que existe entre 2,6 y 17 millones de personas infectadas por *Fasciola hepatica* en el mundo, ubicándose las regiones endémicas con mayor número de casos de fasciolosis humana en América del Sur, como es el caso del Altiplano Boliviano, con prevalencias en humanos que oscilan entre 15,4 y 100%, considerándose la zona más afectada del mundo (5).

Desde 1910 hasta el 2002 se publicaron 8 casos de fasciolosis humana en Venezuela, los cuales fueron diagnosticados mediante el hallazgo de adultos del parásito en procedimientos imagenológicos o quirúrgicos, de huevos en hígado o heces por análisis histopatológicos o por hallazgos coproparasitológicos fortuitos, mientras que hasta el año 2007, se diagnosticaron 9 casos

mediante estudios inmunológicos, utilizando las técnicas de ELISA y confirmación por "Western blot" (6-8).

En Venezuela se han reportado prevalencias variables de fasciolosis bovina, con cifras que oscilan entre 18 a 86,6%, considerándose un grave problema de salud pública animal, especialmente relacionada con pérdida de peso y disminución de la producción láctea. En el municipio Mara del estado Zulia, existe la mayor prevalencia de fasciolosis bovina del país, demostrada mediante estudios coproparasitológicos, con cifras que oscilan entre 10 a 86,6% (9,10).

Debido a la inexistencia de publicaciones sobre la fasciolosis humana en el municipio Mara del estado Zulia, se planteó el objetivo de determinar su prevalencia y factores asociados.

PACIENTES Y MÉTODOS

Área y población estudiada

El estudio se realizó en los habitantes de fincas lecheras que se encuentran situadas en márgenes del río Guasare del municipio Mara, ubicado en la región noroccidental de la cuenca del Lago de Maracaibo, estado Zulia - Venezuela. Climatológicamente la zona corresponde a bosque seco tropical, con una precipitación promedio de 730 mm/año, la temperatura promedio anual es de 27,8°C y la humedad relativa de 76%. La zona cuenta con los ríos Socuy y Guasare, siendo éstos la principal fuente de agua para todo uso de la población, además en época de lluvia pueden ser causa de importantes inundaciones (11). La mayoría de las viviendas de los trabajadores de las fincas se caracterizan por presentar precarias condiciones sanitarias, un servicio eléctrico deficiente y carecer de sistemas adecuados para la disposición de excretas. La principal fuente de trabajo es la ganadería bovina de doble propósito y en la mayoría de las fincas

se utilizan sistemas de riego a través de cajones o por inundación de áreas con agua proveniente de los ríos antes mencionados, lo cual favorece el desarrollo del hospedero intermediario de *Fasciola* descritos previamente en la región: caracoles de las especies *Lymnaea cubensis* (12).

La muestra estuvo constituida por un total de 51 individuos, 43 del sexo masculino y 8 del sexo femenino, en edades comprendidas entre 2 a 67 años.

Recolección de datos

Se realizó una visita previa a las fincas con la finalidad de informar el objetivo de la investigación, obteniéndose posteriormente el consentimiento por escrito de cada individuo. Se les practicó una encuesta simple para recoger datos personales y aspectos clínico-epidemiológicos de importancia, tales como disposición de excretas, fuentes de agua para consumo, ingesta de vegetales crudos, dolor abdominal, diarrea y fiebre. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad del Zulia.

Metodología de laboratorio

Se obtuvo una muestra de heces de cada participante, las cuales fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Universidad del Zulia, donde se preservaron en formol salino al 10% y se concentraron mediante la técnica de Ritchie (13) y la técnica de sedimentación rápida (14), los sedimentos se examinaron exhaustivamente hasta su agotamiento.

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa y centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Los sueros así obtenidos fueron almacenados a -70°C hasta el momento de ser procesadas en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

Obtención del antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (AFhES)

Se extrajeron parásitos adultos de *F. hepatica* de los conductos biliares de bovinos infectados. Luego de lavarlos en solución salina estéril, se procedió según lo señalado por Colmenares y col. (15). Se colocaron de 10 a 15 vermes en 20 mL de medio RPMI + penicilina-estreptomicina, en viales de cultivo Falcon®. Se incubaron en ambiente de CO_2 a 28°C por 6 horas, luego se sustituyó por medio nuevo dejando 12 horas más. Una vez retirados los vermes, se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y EDTA, 2 mM y 1mM respectivamente, se centrifugó a -4°C , a 3.376 g por 30 minutos; el sobrenadante obtenido se congeló a -70°C y se liofilizó por 10 horas continuas (16). Posteriormente, se resuspendió con PBS 0,15 M y se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (17).

El preparado obtenido se sometió a un proceso de filtración por centrifugación con membrana YM de celulosa regenerada (CENTRICON®) con poro de 50 kDa, el cual fue determinado como óptimo por Colmenares y col. (13). Se centrifugó a 5.000 g por 30 min. Se determinó la concentración de proteínas del retenido obtenido, usando el método de Bradford (17) y se congeló la fracción obtenida a -70°C .

Inmunoensayo enzimático con AFhES (ELISA AFhES)

Para su realización se siguió la técnica de Voller y col. (18) con algunas modificaciones descritas en el 2007 por Colmenares y col. (15). Las placas Nunc-Immuno Maxi Sorp fueron sensibilizadas con 50 μL /pozo de AFhES a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; luego de 18 h a 4°C , las placas se lavaron dos veces con buffer salino fosfato (PBS) con 0,05% de Tween 20. Para el bloqueo se

colocaron 150 μL /pozo de solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% por 1 h. Luego se secaron y guardaron a 4°C hasta su uso.

Los sueros se diluyeron en la misma solución de bloqueo (1/200), colocando 50 μL /pozo por 1h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05% y se expusieron a 50 μL / pozo de solución de anti IgG-humana conjugada a fosfatasa alcalina (1/2000) en la misma solución de bloqueo. Las placas se revelaron usando 50 μL /pozo de para-nitrofenilfosfato (PNPP) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ como sustrato de la enzima. Luego, se detuvo la reacción con 50 μL /pozo de una solución de NaOH 3M. El punto de corte se estableció en base al promedio más tres desviaciones estándar de la D.O. de 40 sueros negativos (DO=0,280).

Electroforesis y Western blot con AFhES (WB AFhES)

La determinación del contenido proteico de la fracción retenida utilizada como antígeno fue de 1,34 mg/mL. Esta fracción fue usada para realizar ELISA y WB. El WB se usa como prueba confirmatoria buscando el reconocimiento específico a las moléculas de 9, 14, 27 y 65 kDa, según los resultados obtenidos por Colmenares y col. (15). Si los sueros ensayados no reconocen este patrón no son considerados positivos con infección activa.

Se realizó electroforesis mediante la metodología de Cleveland y col. (19) y Towbin y col. (20), siguiendo las modificaciones descritas por Colmenares y col. (15). Se colocó con 72 μg de AFhES en 300 μL de buffer de muestra, en gel de poliacrilamida al 12,5% bajo condiciones disociantes y no reductoras, luego se transfirió a papel de nitrocelulosa (NC). A continuación, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBSTween 20 al 0,05%, al término de lo cual se secaron y guardaron a -20°C hasta su uso.

El papel de NC se cortó en tiras de 2 mm, las cuales se expusieron a 800 μL (1/200) de suero humano en solución de bloqueo, por 90 min, en constante agitación a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 4 lavados de 15 min cada uno con PBS-Tween 20 al 0,05%. Seguidamente, las tiras se colocaron en una solución de anti-IgG humana conjugada a peroxidasa (1/15.000) en solución de bloqueo por 90 min, en agitación constante. Se repitieron los lavados como ya se indicó y se procedió a exponer las tiras al sustrato quimioluminiscente por 1 min y se reveló la reacción usando placas fotográficas Hiperfilm®.

Las muestras que resultaron positivas a la técnica de ELISA AFhES, se ensayaron con Kits comerciales mediante las técnicas de ELISA IgG anti-*Toxocara spp* (IBL®), IgG anti- *Toxoplasma* (DRG®) e IgG anti-cisticercosis (DRG®), esto con la finalidad de descartar reacciones cruzadas con parásitos tisulares.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos y porcentajes. Se calculó el Chi cuadrado o el análisis exacto de Fisher según correspondiera, tomando un 95% como índice de confiabilidad estadística ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Un total de 51 individuos fueron estudiados en un rango de edad de 2 a 67 años, 43 del sexo masculino y 8 del femenino. Dos de estas personas (3,9%) resultaron positivas por ELISA-AFhES, ambos del sexo masculino, pero sus sueros no presentaron reacción con las moléculas específicas del AFhES por WB, además resultaron negativas a la técnica de ELISA IgG anti-*Toxocara sp*, IgG anti-*Toxoplasma gondii* e IgG anti-cisticercosis.

En la Tabla I se presentan los resultados del examen parasitológico de las 51

TABLA I
PREVALENCIA DE PARÁSITOS INTESTINALES EN 51 INDIVIDUOS DEL MUNICIPIO MARA DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Especies parasitarias	Nº de Casos*	%
Protozoarios		
<i>Blastocystis hominis</i>	16	31,4
<i>Giardia lamblia</i>	11	21,6
<i>Endolimax nana</i>	9	17,6
<i>Entamoeba coli</i>	6	11,8
Complejo <i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	2	3,9
Helmintos		
<i>Ancilostomideos</i>	6	11,8
<i>Ascaris lumbricoides</i>	5	9,8
<i>Hymenolepis nana</i>	3	5,9
<i>Trichuris trichiura</i>	3	5,9
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	2
Huevos de <i>Fasciola</i> sp.	0	0

* Incluye asociaciones parasitarias.

muestras de heces evaluadas. La prevalencia de las parasitosis intestinales fue 52,9% (27/51), siendo más frecuente los protozoarios que los helmintos, destacando la especie parasitaria *Blastocystis hominis* con 31,4% (16/51), seguido por *Giardia lamblia* con 21,6% (11/51). Los helmintos más frecuentes fueron los Ancylostomideos con 11,8% y *Ascaris lumbricoides* con 7,8%. No se observaron huevos de *F. hepatica* en las muestras de heces examinadas. El 29,4% de los individuos se encontraron poliparasitados.

En la encuesta clínico-epidemiológica se apreció que dos participantes tenían diarrea al momento o en los últimos 30 días previos al estudio y 8 presentaban dolor abdominal generalizado y persistente, el 82,4% (42/51) indicó la ingesta frecuente de vegetales crudos (lechuga, tomate). Los dos individuos positivos mediante ELISA AFhES, fueron del sexo masculino y negaron algún síntoma al momento y durante un mes antes del estudio.

La población estudiada trabajaba en el ordeño manual del ganado bovino (70,6%), en el corte de pasto fresco (13,7%) y en el traslado del ganado bovino en las distintas zonas de pastoreo (15,7%), (resultados no mostrados).

Respecto a los factores epidemiológicos indagados, un 80,4% de los participantes manifestaron poseer una inadecuada disposición de excretas, así como también un servicio de agua deficiente en su vivienda 94,1% (48/51). Los dos individuos que resultaron positivos a la técnica de ELISA AFhES, trabajaban en el corte de pasto fresco para alimentar el ganado, pero esto sin significancia estadística relacionado con los otros factores de riesgo (Tabla II).

DISCUSIÓN

La fasciolosis es una parasitosis que se puede localizar en todas las latitudes y altitudes, con un extraordinario poder de ex-

TABLA II
FACTORES ASOCIADOS CON LA INFECCIÓN POR *Fasciola* EN 51 INDIVIDUOS MUESTREADOS,
MUNICIPIO MARA DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Factores de riesgo	ELISA AFhES	ELISA AFhES
	Negativo n=49	Positivo n=2
Inadecuada disposición de excretas	40 (81,6)	1 (50)
Trabajar en corte de pasto	5 (10,2)	2 (100)
Servicio de agua ineficiente	46 (93,9)	2 (100)
Ingesta frecuente de vegetales crudos	47 (95,9)	2 (100)
Contacto estrecho con bovinos	46 (92,9)	2 (100)

pansión gracias a la gran capacidad de colonización de su vector, caracoles del género *Lymnaea*, siendo considerada como la infección parasitaria transmitida por vectores con mayor distribución en el mundo (21). La prevalencia general de fasciolosis humana, determinada mediante la técnica de ELISA AFhES, fue de 3,9%, siendo esta inferior a la observada en otros países como Bolivia con 67% (4), Perú (22,7-36,3%) (22, 23) y Egipto (10,4%) (24).

En el área muestreada, existen estudios que indican la infección de caracoles del género *Lymnaea* con formas larvianas de *Fasciola* en el 23,3% de 1760 caracoles recolectados y analizados, manteniendo el ciclo continuo del parásito en el ambiente y aumentando el riesgo de infección para sus hospederos definitivos (12). Asimismo, la construcción de canales de irrigación para el uso de riego por inundación practicadas por los pobladores de la región, establecen las condiciones ideales para la reproducción de los hospederos intermediarios, lo cual ha causado que se establezcan las mayores endemias bovinas en Venezuela, asociada a las condiciones ambientales tales como alta humedad relativa y grandes precipitaciones anuales. Este tipo de riego ha sido indicado en países como Perú y Bolivia como factores de riesgo en humanos y en ganado bovino (22, 25).

La positividad a la técnica de ELISA AFhES en dos individuos, revela que la población estudiada ha estado en contacto con el parásito. La ausencia de reacción a las moléculas específicas (9, 14, 27 y 65 kDa), sugiere una infección superada por el sistema inmune, sin anticuerpos circulantes contra estas importantes moléculas al momento de la toma de la muestra. Asimismo, estos dos individuos resultaron negativos a la técnica de ELISA IgG anti-*Toxocara* sp, IgG anti-*Toxoplasma gondii*, e IgG anti- cisticercosis y a parásitos intestinales, además la región estudiada no es considerada endémica para *Schistosoma*, así como tampoco se obtuvo la información de los individuos sobre viajes a zonas del país donde se conoce como endémica para este último, disminuyendo de esta forma las posibilidades de reacción cruzada con otros parásitos.

La detección de huevos de *Fasciola* mediante técnicas parasitológicas de examen directo y concentrado es una difícil labor, debido a que generalmente los humanos se encuentran infectados por pocos parásitos en su estado adulto; aunado a esto, liberan pocos huevos por día y de forma intermitente, recomendándose el estudio seriado de las heces (14). La ausencia de huevos de *Fasciola* en las muestras de heces de los participantes que resultaron positivos a

la técnica de ELISA AFhES, se relaciona con la ausencia de infección activa, asociado ésta a su vez con los resultados del WB AFhES. El advenimiento de técnicas como el "Western blot" con una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la fasciolosis humana en Venezuela (15); aumenta las posibilidades de detectar casos y lograr un diagnóstico oportuno de esta infección parasitaria, altamente subestimada y poco conocida por el personal de salud y la comunidad en general.

La población estudiada se encuentra en contacto directo y diario con el ganado bovino y los ambientes donde se mantienen, existiendo estudios previos que revelan altas prevalencias de infección por *Fasciola* en estos (9, 12). Los dos individuos positivos a la técnica de ELISA AFhES encontrados en el presente estudio, trabajaban en el corte de pasto fresco ubicado en zonas de riego por inundación, el cual se utiliza para alimentar al ganado. Durante la entrevista informaron sobre la introducción de un trozo de éste a la boca cuando realizan tal actividad, pudiendo esto ser un importante factor asociado a la fasciolosis humana en la zona, debido a la adherencia de las metacercarias a las plantas y vegetales acuáticos, mecanismo similar al que ocurre en otras regiones, donde la ingesta frecuente de vegetales crudos y bebidas a base de éstos son los principales factores de riesgo (7, 22, 26).

Un brote familiar de fasciolosis humana fue recientemente descrito en los Andes venezolanos a 2050 msnm (7), así como otro caso de localización ectópica autóctono del estado Bolívar aproximadamente a 100 msnm (6), en asociación con los resultados obtenidos en el presente estudio al nivel del mar, se podría deducir que la fasciolosis se encuentra distribuida en todas las altitudes y latitudes de Venezuela.

En Venezuela investigaciones realizadas en diferentes regiones refieren elevadas

prevalencias de parásitos intestinales en comunidades con un pobre saneamiento ambiental y deficiencia en servicios públicos. Los resultados obtenidos en el presente estudio (52,9%) confirman esta realidad, observándose los protozoarios con prevalencias más altas que los helmintos, apreciándose dentro de los primeros *Blastocystis hominis* con el mayor porcentaje, lo que ha sido referido por otros autores (27-31).

Es necesario continuar en la búsqueda de casos de fasciolosis humana en la zona, mediante exámenes coprológicos concentrados de bajo costo especialmente en la población pediátrica, a nivel de los centros de educación básica, ya que con mayor frecuencia este grupo se encuentra parasitado de forma activa, tal como ocurre en zonas altamente endémicas (32).

Este es el primer estudio sobre la fasciolosis humana en el estado Zulia, siendo considerada una infección actualmente subestimada y poco conocida por el personal de salud y la población general, incluida actualmente entre las parasitosis emergentes re-emergentes en el mundo, con un aumento considerable de la detección de casos como consecuencia del desarrollo de técnicas inmunodiagnóstica de gran sensibilidad y especificidad en Venezuela..

REFERENCIAS

1. **Mas-Coma S.** Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *J Helminthol* 2005; 79: 207.
2. **Malek EA.** Snail-transmitted parasitic diseases Vol 1. Boca Raton, FL, CRC Press 1980; 1-334.
3. **Marcos LA, Bussalleu A, Terashima A, Espinoza JR.** Detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in cirrhotic patients from Peru. *J Helminthol* 2009; 83(1):23-26.
4. **Parkinson M, O'Neill S, Dalton J.** Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol Infect* 2007; 135(4): 669-674.

5. Mas-Coma S, Esteban J, Bargues M. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull WHO. 1999; 77: 340-346.
6. Alarcón-Noya B, Sosa V, Colmenares C, Beker B, Contreras R, Meo P. Localización pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. Rev Soc Venezol Gastro 2006; 60:134-137.
7. Alarcón-Noya B, Rojas E, Colmenares C, Morales C, Contreras R, Valero S, Hernández D, Briceño S, Scorza J, Noya O. Brote familiar de fascioliasis en Venezuela. Bol Mal Salud Amb 2007; 47(1):47-54.
8. Rojas E, Alarcón-Noya B, Colmenares C, Morales C, Contreras R, Kay S. Fasciolosis humana en los Andes de Venezuela. Parasitol Latinoam 2005; 60:294.
9. Angulo F, Molero M, Escalona F, Muñoz J, Ramírez R. Prevalencia y dinámica mensual de *Fasciola hepática* y otros helmintos en un rebaño bovino de una zona inundable tropical. Rev Científ FCV-LUZ 2007; (2):111-116.
10. Chirinos AR, De Chirinos N. Evaluación de los efectos de la distomatosis hepática bovina sobre la eficiencia reproductiva y producción lechera. Rev científ FCV-LUZ 1993; (1):35-45.
11. Comisión nacional plan de aprovechamiento de los recursos hidráulicos y cuencas hidrográficas. Inventario nacional de tierras. Región del lago de Maracaibo. Publicación N° 34, Caracas. 1974: 8-9.
12. Fuenmayor A, Simoes D, González R, Chirinos A. La Distomatosis hepática y su asociación con los factores de riesgo en los Municipios Mara y Páez del Estado Zulia, Venezuela. Rev Científ FCV-LUZ 2000; 103:183-190.
13. Ritchie L. An Ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull US Army Med Dept 1948; 8:326.
14. Lumbreras H, Cantella R, Burgá R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepática* en las heces, su evaluación y uso en el campo. Rev Med Perú. 1962; 31:167-174.
15. Colmenares C, Méndez L, Díaz-Bello Z, Alarcón-Noya B. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepática*: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. Acta Bioquím Clín Latinoam 2007; 41(2):259-266.
16. Espino AM, Duménigo BE, Huesca N, Finlay CM. Mantenimiento *in vitro* de adultos de *Fasciola hepatica*: Obtención de antígenos de excreción-secreción. Rev. Salud Anim 1988; 10: 287-293.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
18. Voller A, Barlett A, Bidweel D. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 1976; 70:98-105.
19. Cleveland D, Fischer S, Kirschner M, Laemmli U. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J Biol Chem 1977; 252:1102-1106.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:4350-4354.
21. Mas-Coma S, Funatsu I, Bargues M. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in south America. Parasitology 2001; 123:S115-S127.
22. Raymundo L, Flores V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantalean M, Espinoza J, Gotuzzo E. Hyperendemicity of human fasciolosis in the Mantaro Valley, Peru: factors for infection with *Fasciola hepatica*. Rev Gastroenterol Peru 2004; 24(2):158-164.
23. Marcos L, Maco V, Florencio L, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantalean M, Espinoza J, Gotuzzo E. Altas tasas de Prevalencia de Fasciolosis humana en el Perú: Una enfermedad emergente. Rev Per Enf Infec Trop 2005; 3(2):8-13.
24. El-Ahl SA, El Shazly AM, El Shafei AA, Hegazi MA, El-Dardiry MA. Risk factors

- contributing to fascioliasis endemicity in a focus in Dakahlia Governorate 1-human host. *J Egypt Soc Parasitol* 2007; 37(3): 1075-1090.
25. **Esteban J, Flores A, Angles R, Mas-Coma S.** High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; (93):151-156.
 26. **Incani R, Vieira J, Pacheco M, Planchart S, Amarista M, Lazdins J.** Infección humana por *Fasciola hepatica* en Venezuela: reporte de un caso geriátrico. *Invest Clin* 2003; 44(3): 255-260.
 27. **Marcos L, Maco V, Samalvides F, Terashima A, Espinoza J, Gotuzzo E.** Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 2006; 100:158-166.
 28. **Freites A, Colmenares D, Pérez M, García M, Díaz de Suárez O.** *Cryptosporidium* sp infections and other intestinal parasites in food handlers from Zulia state, Venezuela. *Invest Clin* 2009; 50(1):13-21.
 29. **Nolla A, Cantos G.** Relationship between intestinal parasites in food handlers and epidemiological factors in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil *Cad Saúde Pública* 2005; 21:641-645.
 30. **Leelayoova S, Ram R, Paanjit T, Tawee N, Umaporn T, Mathirut M.** Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70: 658-662.
 31. **Kain K, Noble M, Freedman H, Barteluk R.** Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Microbiol Infect Dis* 1987; 8:235-244.
 32. **Marcos LA, Tagle M, Terashima A, Bussalleu A, Ramirez C, Carrasco C, Valdez L, Huerta-Mercado J, Freedman DO, Vinetz JM, Gotuzzo E.** Natural history, clinicoradiologic correlates, and response to triclabendazole in acute massive fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(2):222-227.