

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

**TESIS**

**EFICACIA DEL TRICLABENDAZOL EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN**

**ARTIFICIAL POR *Fasciola hepatica*, EN ALPACAS (*Lama pacos*),**

**CAJAMARCA - PERÚ**

Presentado por:

**ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN**

Asesor:

**Dr. Corpus Hildebrando Cerna Cabrera**

**CAJAMARCA - PERÚ**

2016

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**



**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS**

**TESIS APROBADA:**

**EFICACIA DEL TRICLABENDAZOL EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN**

**ARTIFICIAL POR *Fasciola hepatica*, EN ALPACAS (*Lama pacos*),**

**CAJAMARCA - PERÚ**

Presentado por:

**ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN**

Comité Científico:

Dr. Corpus Cerna Cabrera  
Asesor

Dr. Severino Torrel Pajares  
Miembro de Comité Científico

Dra. Cecilia Pajares Acosta  
Miembro de Comité Científico

Dr. Carlos Rosales Loredo  
Miembro de Comité Científico

Cajamarca - Perú

2016

A:

Mi amada esposa María y a mis hijos queridos, David, Johnny, Luis, Roger, Fernando y Raúl; por ser incentivo en mi vida y por su paciencia, sin cuya ayuda moral, fraternal e intelectual, no habría sido posible lograr esta meta

Abel

COPYRIGHT © 2016 by  
**ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN**  
Todos los derechos reservados

La grandeza de una nación y su progreso moral pueden ser juzgados por la forma en que sus animales son tratados.

-Gandhi

## CONTENIDOS

Ítem	Página
AGRADECIMIENTOS.....	x
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación .....	4
2.2. Bases teóricas.....	16
CAPÍTULO III: DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	33
3.1. Hipótesis.....	33
3.2. Diseño metodológico.....	33
3.3. Localización.....	33
3.4. Unidad de análisis, universo y muestra .....	34
3.5. Descripción del diseño de investigación .....	34
3.6. Análisis estadístico.....	39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
LISTA DE REFERENCIAS .....	46
ANEXOS.....	55

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1. Diseño Experimental .....	37

### **Tablas**

1. Eficacia del Triclabendazol en en alpacas ( <i>Lama pacos</i> ), mediante el test de reducción del número de huevos (FECRT) .....	40
2. Eficacia absoluta del Triclabendazol en alpacas ( <i>Lama pacos</i> ), mediante necropsia. ....	43
3. Carga parasitaria expresada en hpg, día 0 antes del tratamiento en alpacas ( <i>Lama pacos</i> ), infectadas artificialmente con <i>Fasciola hepatica</i> .....	69
4. Registro de datos obtenidos en el grupo Triclabendazol.....	70
5. Registro de datos obtenidos en el grupo control sin tratamiento.....	70
6. Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, día 7 post tratamiento .....	71
7. Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, día 14 post tratamiento .....	71
8. Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, para la eficacia absoluta .....	72

## Fotos

1. Recolección de caracoles .....	73
2. Fasciolas adultas e incubación de huevos .....	73
3. Frascos de 100 ml con huevos .....	73
4. Frasco llevados a incubación para obtención de miracidios .....	73
5. Eclosión de miracidios .....	73
6. Miracidios en placa Petri .....	73
7. Placa de ELISA (3 miracidios por pocillo) .....	74
8. Estimulación de caracoles .....	74
9. Obtención de metacercarias.....	74
10. Selección de los animales .....	74
11. Instalación en fundo Tartar .....	74
12. Identificación de las alpacas .....	74
13. Pesado de las alpacas .....	75
14. Infección con metacercarias .....	75
15. Tratamiento con TCBZ .....	75
16. Análisis en laboratorio .....	75
17. Sacrificio y recolección de hígado .....	75
18. Conductos biliares engrosados .....	75
19. Conducto biliar con fasciolas .....	76
20. Trozo de 2 cm de espesor .....	76
21. Preparación bolsitas de gasa .....	76
22. Frasco con fasciolas .....	76



## **Anexos**

1. Técnica de Dennis Stone Swanson modificada (Dennis et al., 1954) .....	56
2. Protocolo cultivo y mantenimiento de caracoles .....	57
3. Protocolo incubación de huevos de <i>Fasciola hepatica</i> .....	59
4. Protocolo infección de caracoles .....	61
5. Protocolo estimulación de caracoles y obtención de metacercarias .....	63
6. Protocolo para recopilación y análisis de hígado .....	66
7. Fotos .....	73

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Corpus Cerna Cabrera, por su orientación como asesor y amigo; pero sobre todo por la motivación, participación activa y valiosa dirección a lo largo de este trabajo de investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Severino Torrel Pajares, por su apoyo incondicional a lo largo de todo el periodo de estudio doctoral y en la realización del presente trabajo investigativo.

Mi gratitud sincera al MV. Cristian Hobán Vergara, por su apoyo incondicional en varias actividades de campo y laboratorio que requirió el trabajo.

Del mismo modo mi reconocimiento especial a mis colegas el Dr. Pedro Ortíz Oblitas y al M.Cs. Juan de Dios Rojas Moncada, por las facilidades prestadas y por su participación valiosa en diferentes actividades realizadas.

Al Sr. Alejandro Quispe Chilón, Gerente General de la Cooperativa Agraria ATAHUALPA JERUSALÉN de Trabajadores Ltda. Granja Porcón; por las facilidades prestadas a lo largo de la ejecución del presente trabajo; un reconocimiento especial al Sr. Feliciano Ayay.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, por el apoyo económico a través del financiamiento de los fondos del canon minero, sobre canon y regalías mineras.

## LISTA DE ABREVIACIONES

ABZ:	Albendazol
ALT:	Alanina Aminotransferasa
AST:	Aspartato Aminotransferasa
BZ:	Benzimidazol
FECRT:	Faecal Egg Count Reduction Test
CGT:	Enzima Gama Glutamil Transpeptidasa
Gp-P:	Glicoproteina P
hpg:	Número de huevos por gramo de heces
HPLC:	High performance liquid chromatography
MG:	Media Geométrica
PT:	Pos Tratamiento
p.v.:	Peso vivo
R:	Resistente
RC:	Resistente Control
RCH:	Reducción de Conteo de Huevos Fecales
RF:	Reference formulation
RT:	Resistente tratado
S:	Susceptible
SAIS:	Sociedad Agraria de Interés Social
SENAMHI:	Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú
SC:	Control
SGPT:	Transaminasa Glutámico Pirúvico Sérico
ST:	Tratado
TCBZ:	Triclabendazol
TCBZ.SO:	Triclabendazol sulfóxido
TCBZ.SO2:	Triclabendazol sulfona
WAAVP:	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia del Triclabendazol (TCBZ) en dosis de 12 mg/kg de p.v. por vía oral en alpacas provenientes de la Granja Porcón de Cajamarca, las mismas que fueron artificialmente infectadas con *Fasciola hepatica*. Se trabajó con 10 alpacas positivas a *F. hepatica*, a las que se realizó un análisis coproparasitológicos previo, mediante el método de sedimentación, para determinar el número de huevos por gramos de heces (hpg). Luego los animales fueron ordenados en dos grupos homogéneos de 5 animales cada uno. En el grupo de los animales tratados con TCBZ, en el pre tratamiento, tuvo un promedio 3,8 hpg; y a los 7 y 14 días post tratamiento, tuvo un promedio de 6,4 hpg y 7,2 hpg, respectivamente; sobre la base de estos resultados se realizó la prueba de reducción del número de huevos en heces (FECRT), obteniéndose valores negativos a los 7 y 14 días respectivamente, lo que equivale a una nula eficacia, no existiendo diferencia significativa ( $P>0,05$ ) en la reducción de número huevos pre y post-tratamiento. Además, el día 14 post-tratamiento se realizó el sacrificio de las alpacas del grupo control sin tratamiento y del grupo tratado con TCBZ, se contó el número de fasciolas adultas en sus hígados mediante la prueba de eficacia absoluta; el número de fasciolas en el grupo control sin tratamiento fue en promedio geométrico 1,74 y en el grupo tratado de 4,69 respectivamente, obteniéndose un valor negativo, lo que equivale a una nula eficacia absoluta, no existiendo diferencia significativa ( $P>0,05$ ). Se concluye que el TCBZ en dosis de 12 mg/kg de p.v. no es eficaz para el control y tratamiento de las alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica* en Cajamarca; lo cual podría ser una evidencia de resistencia a este fármaco.

**Palabras clave:** Triclabendazol, eficacia, *Fasciola hepatica*, alpaca.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficacy of Triclabendazole (TCBZ) in the single dose of 12 mg/kg live weight orally in alpacas from the Porcón farm of Cajamarca, the same ones that were artificially infected with *Fasciola hepatica*. We worked with 10 alpacas positive to *F. hepatica*, those who underwent a previous stool testing by the sedimentation method to determine the number of eggs per gram of faeces (epg). Then these animals were sorted into two homogeneous groups of 5 animals each. In the group of animals treated with TCBZ, in the pre-treatment, it had an average of 3,8 hpg; at 7 and 14 days post treatment, had an average of 6,4 epg and 7,2 epg, respectively; with these results, a reduction test was performed to obtain the number of eggs in faeces (FECRT), obtaining negative values at 7 and 14 days respectively, which is equivalent to null efficacy, with no significant difference ( $P > 0,05$ ) on reducing number of pre-and post- treatment eggs. Also, on day 14 post – treatment, the alpaca was sacrificed in the control group without treatment and in the group treated with TCBZ, the number of adult fasciolas in their livers was counted using a test for absolute efficacy.; the number of fasciolas in the control group without treatment was in geometric average 1,74 and in the treated group of 4,69 respectively, obtaining a negative value, which is equivalent to a null absolute efficacy, with no significant difference ( $P > 0,05$ ). It is concluded that TCBZ at doses of 12 mg/kg live weight is not effective for the control and treatment of alpacas artificially infected with *F. hepatica* in Cajamarca; which could be evidence of resistance to this drug.

**Keywords:** Triclabendazole, efficiency, *Fasciola hepatica*, alpaca.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La Fasciolosis es una afección parasitaria ampliamente difundida en el todo el mundo. En esta realidad reside la dedicación tan importante y numerosa que han desarrollado diversos y prestigiosos equipos de investigación, ello quizás también resalta que los puntos de vista desde los que se ha investigado sobre *Fasciola* o Fasciolosis, hayan sido muy distintos y hayan hecho avanzar profundamente todo lo referente a su conocimiento; desde los estudios iniciales, puramente biológicos o ecológicos, hasta los más modernos y actuales que tienen su máximo apoyo en la aplicación de avanzadas técnicas de biología molecular, bioquímica, inmunología, etc. (Díez, 2011).

La Fasciolosis causada por *Fasciola hepatica*, es una enfermedad parasitaria prevalente en los rumiantes criados en las regiones templadas del mundo. Es económicamente importante, con pérdidas que suman entre US dólares 2000 – 3000 millones anuales (Boray, 1994). Infecta también a más de 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos en todo el mundo y causa pérdidas económicas muy importantes estimadas en más de US tres billones de dólares anuales (Mas-Coma et al., 2005). El impacto negativo de la Fasciolosis animal en la economía de Perú se estima en no menos de 50 millones de dólares americanos por año, estimada por la prevalencia de la infección, decomisos de hígados en mataderos, pérdidas en los productos del ganado, costos asociados al tratamiento, baja ganancia de peso, reducida fertilidad y productividad, entre otros (Espinoza et al., 2010).

*Fasciola hepatica* es capaz de infectar a una amplia gama de mamíferos; sin embargo, las diferentes especies presentan distintos grados de resistencia a la infección. De acuerdo a esto, a los hospederos susceptibles se ha clasificado en 3 grupos: el primer grupo conformado por ovinos, equinos y cuyes, presenta una menor resistencia; el segundo grupo constituido por bovinos y el hombre está en el grupo de resistencia moderada, y el tercer grupo conformado por los porcinos, es el grupo de mayor resistencia (Boray, 1986; Quiroz, 1999).

Las medidas actuales de control de la Fasciolosis se basan en el uso de drogas como el TCBZ (Claxton et al., 1998). En Cajamarca, entre los años 2006 y 2011 se demostró la resistencia antihelmíntica de *F. hepatica* al TCBZ en bovinos de los predios Quebrada Honda, S.A.I.S. José Carlos Mariátegui-Huacraruco, San Vicente, San Luis y Tartar (Rojas, 2012).

La crianza de alpacas en Cajamarca tiene importancia significativa en su sistema productivo, tanto en fibra como en carne; sin embargo, se conoce poco sobre trabajos de investigación relacionados con la sanidad. Por tal motivo, este estudio persiguió el objetivo general de determinar la eficacia del TCBZ a la dosis de 12 mg/kg. de p.v. por vía oral en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, en Cajamarca; cuyos objetivos específicos fueron:

- Determinar la eficacia del TCBZ en dosis de 12 mg/kg. de p.v. por vía oral en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, mediante la prueba de reducción del número de huevos en heces.
- Determinar la eficacia del TCBZ en dosis de 12 mg/kg. de p.v. por vía oral en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, mediante el test de eficacia absoluta.





## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

##### **A nivel internacional:**

*Fasciola hepatica* se encuentra distribuida en todo el mundo, la infección puede conducir a disminuir la productividad y muerte de los animales, y originar millones de dólares cada año en pérdidas en la producción (carne, lana, leche, condena de hígados, infecciones secundarias, los requisitos de reemplazo de valores), por elevados costos en tratamiento y prevención. En Australia afecta principalmente al ganado vacuno y ovino, pero también puede afectar a las alpacas, cabras, caballos, cerdos, canguros, marsupias, conejos y ciervos. Los seres humanos también pueden ser infectados. Los parásitos adultos son de color marrón pálido o marrón grisáceo, y son planos, miden entre 1,5-4 cm de largo y viven en los conductos biliares del hígado. El medicamento más eficaz de elección contra *Fasciola hepatica* es Triclabendazol (Ej Fasinex®, Flukare®, Tremacide®). Si bien es muy específica para *Fasciola*, no es eficaz contra nemátodos, cestodos y otros trematodos. Se estima que la tasa de dosis para alpacas debe de ser 15 mg/kg de peso corporal por vía oral (en comparación con ovejas y cabras 10 mg/kg pv y vacunos 12 mg/kg pv). La vía de administración oral (Vaughan, 2013).

En un estudio realizado en la India, en búfalos infectados experimentalmente con *Fasciola gigantica*, para entender la farmacocinética mediante la administración intrarruminal del Triclabendazol (TCBZ) con dosis de 12, 24 y 36 mg por kg/pv, en la semana 2 y 10 después de la infección; no se observó presencia de huevos de trematodos en las heces en los animales que se trataron con dosis de 24 y 36 mg/kg pv, mientras que la dosis terapéutica recomendada de 12 mg/kg pv fue de 19 a 23% de efectividad. La biodisponibilidad de Triclabendazol era más en búfalos con trematodos maduros que con duelas inmaduras (Sanyal y Gupta, 1996).

En Holanda, se estudió la eficacia de Triclabendazol en ovinos experimentalmente infectados con *F. hepatica*. Dos grupos de doce corderos fueron infectados con cepas susceptibles (S) y resistentes (R) de *F. hepatica*. Ocho semanas después de la infección, seis corderos de cada grupo (ST y RT) fueron tratados con Triclabendazol (10 mg/kg). Los otros corderos se utilizaron como controles no tratados (SC y RC). Se observaron infecciones patentes en todos los animales de los grupos SC, RT y RC. En el grupo ST, de vez en cuando un par de huevos se encontraron en cinco corderos. El porcentaje de trematodos era 31,3 en SC y 37,6 en RC. En los grupos tratados ST y RT, el porcentaje de trematodos era 0,06 y 33,6, respectivamente. Estos resultados corresponden a eficacias de 99,8% en los susceptibles y 10,8% en la cepa resistente. Puesto que la cepa resistente se aisló de una mezcla de ganado y granja de ovejas, se confirma la presencia de resistencia Triclabendazol en los Países Bajos (Gaasenbeek et al., 2001).

En un estudio realizado en México, cuyo objetivo fue determinar la dosis efectiva de un fasciolicida alfa compuesto o 5 -cloro- 2 - metiltio - 6 - (1 - naftiloxi) - 1H Bencimidazol, en ganado infectados experimental y naturalmente. En el primer experimento, se trabajó con 24 novillas libres de fasciolas, fueron infectadas con 800 metacercarias de *F. hepatica* y re-infectados a los 45 días con otros 600 metacercarias por animal. En el día 75, fueron divididos en cuatro grupos (G) de seis animales cada uno de acuerdo con el recuento de huevos. Grupos 1-3 recibieron el compuesto alfa en dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/PO, respectivamente. G4 permaneció como un testigo sin tratar. Veinte días después del tratamiento, los animales fueron sacrificados para la recuperación de trematodos. La eficacia se evaluó como porcentaje de reducción huevos en relación con el control sin tratar. En el segundo experimento (bovinos infectados en forma natural), 24 novillos positivos a huevos de *F. hepatica* se formó cuatro grupos de cinco animales cada uno. Grupos 1-3 recibieron el compuesto alfa a 10, 12 y 14 mg/ kg/PO, respectivamente. Grupo 4 sirvió como control no tratado. Todos los procedimientos para determinar la eficacia se llevaron a cabo como se ha mencionado en el primer experimento. Los resultados en el primer estudio mostraron un porcentaje de reducción de huevos de 97.3, 100 y 100 y la reducción de huevos fue de 94.3, 100 y 100 para los grupos 1-3, respectivamente. En el segundo estudio, el porcentaje de reducción de huevos fue de 87.5, 99.1 y 100 y la eficacia general fue de 84.2, 99.6, y 100 para los Grupos 1-3, respectivamente. Se concluye que la dosis efectiva seleccionada para el compuesto alfa fue de 12 mg/kg/PO en el ganado bovino (Ibarra et al., 2004).

En un trabajo realizado en Argentina, que tuvo como objetivo determinar la ocurrencia de la infestación por *F. hepatica* en llamas (*Lama glama*) criadas en un área de Fasciolosis endémica de la puna de Argentina, donde se evaluó por coprología la infección natural. Durante 24 meses se obtuvieron muestras de heces en una cohorte compuesta por 15 llamas de dos años de edad promedio. Todas las llamas se infectaron con *F. hepatica*. En nueve determinaciones la prevalencia de la infección fue de 80%. La necropsia de una llama con 16 exámenes consecutivos positivos reveló la presencia en el hígado de 62 ejemplares adultos de este trematodo. No se observaron signos clínicos atribuibles a la parasitosis en ninguna de las llamas (Cafrune et al. 1996). Por otro lado en un hato de vicuñas (*Vicugna vicugna*) en semi-cautiverio de la localidad de Molinos, Salta en Argentina. En mayo 2002 la prevalencia coprológica de *F. hepatica* fue de 23,6%, en junio del mismo año murieron dos vicuñas con diagnóstico presuntivo de Fasciolosis. Tras dos tratamientos consecutivos con Closantel y Triclabendazol (junio y agosto de 2002); la prevalencia y la intensidad media de Fasciolosis disminuyeron. Sin embargo en agosto del 2003 volvió a incrementarse. Se discuten aspectos vinculados al probable origen de la infestación por *F. hepatica* (Cafrune et al., 2004).

En un estudio realizado en Brasil, cuyo objetivo fue determinar la eficacia del tratamiento contra la *F. hepatica* en ovejas y cabras en una granja durante un brote de la Fasciolosis. La granja albergaba 33 ovejas y 60 cabras de razas mezcladas con diferentes pesos y edades. Se hizo tratamientos mensuales con Moxidectina. Se hicieron 7 evaluaciones por método Famacha, de examen fecal (EPG), coprocultivos y la técnica de sedimentación de huevos se hicieron en siete ocasiones. Al momento de la primera visita un 81% de las cabras y el

100% de las ovejas fueron positivas para *F. hepatica*. Los tratamientos con Triclabendazol no lograron aliviar la fuerte infección debido a la resistencia, con una eficacia de sólo el 66,3% el ganado ovino y el 57,3% en el ganado caprino. No había constancia de se haya administrado el Triclabendazol anteriormente en la granja (Oliveira et al., 2008).

También en Irlanda se trabajó con setenta ovejas, los animales fueron divididos en 10 grupos experimental, para probar la eficacia de dos fasciolicidas, compuesto alfa (15 mg/kg) contra el Triclabendazol (TCBZ) - resistentes y TCBZ - susceptibles. Un ensayo paralelo se llevó a cabo usando TCBZ (10 mg/kg). Las ovejas fueron sacrificadas a las 16 semanas p.i. Todos los trematodos restantes se recogieron y se midieron, antes de ser procesadas para la tinción de todo el montaje para evaluar la condición de sus estructuras reproductivas (testículo, vitelina, ovario y útero). Un segundo estudio se realizó para probar la actividad del compuesto alfa (15 mg/kg) en contra de *F. hepatica* maduras susceptibles a TCBZ. Dieciocho ovejas fueron divididos en dos grupos, A y B. El grupo A fue tratado y el grupo B sirvieron como un grupo de control sin tratar. La eficacia se determinó por la reducción en los recuentos de huevos fecales. Los resultados mostraron que, mientras que el compuesto alfa era muy activo contra tremátodos produciendo una reducción del 100% en los recuentos de huevos fecales, el TCBZ sólo provocó una reducción del 62,5% en la carga contra trematodos juveniles (McConville et al., 2009).

En Irlanda se trabajó con veinticuatro corderos los que fueron infectados vía oral con 250 metacercarias de *F. hepatica*. Doce semanas después de la infección los corderos fueron tratados con TCBZ (10 mg/kg), y con el

fasciolicida experimental un compuesto alfa (Comp.  $\alpha$ ), un derivado de Bencimidazol de TCBZ (15 mg/kg). Los corderos fueron sacrificados 48, 72 y 96 h después del tratamiento TCBZ, o 24, 48 y 72 h después del tratamiento  $\alpha$  Comp.; se recogieron los tremátodos del hígado y vesícula biliar de cada animal, se logró anotar la intensidad de tres lesiones bien definidas que se desarrollaron en los testículos y el útero de una muestra representativa de tremátodos de cada cordero, evidencia histológica que indica un fallo de ovogénesis desde las 24 h post - tratamiento en adelante. El desarrollo de estas lesiones puede estar relacionado con la actividad anti-tubulina conocido de la clase Bencimidazol de antihelmínticos. Los resultados indicaron que Comp.  $\alpha$  es un poco menos eficaz que los tratados con TCBZ, en causar daño histológico de las estructuras reproductivas de tremátodos (Hanna et al., 2010).

En Argentina en corderos infectados con *F. hepatica*, los que fueron tratados con el Triclabendazol Cullompton (TCBZ) a una dosis de 10 mg/kg y luego de 16 semanas después de la infección, se recuperaron tremátodos del hígado y a las 3 h, 24 h, 48 h y 60 h post-tratamiento (PT). Las fasciolas fueron procesadas para su análisis histológico del útero, glándula de Mehlis, Vitellaria, ovario y testículo. A las 3 h pt, los tremátodos son esencialmente similares a los controles y producían huevos normales. La producción de huevos había cesado a las 24 h pt. en este período de tiempo, las células de la glándula de la Mehlis mostraron cierta evidencia de vacuolización, pero por lo demás eran relativamente normales. Un cambio en la población de células vitelino hacia las células maduras se observó a las 24 h pt, y esta tendencia continuó en posteriores períodos de tiempo. Esto fue acompañado de un desglose de las células y la presencia de cuerpos apoptóticos. Cambios marcados en el ovario

se observó por primera vez en 48 h pt, como se evidencia por la vacuolización y la presencia de cuerpos apoptóticos. Alguna interrupción en el testículo se observó a las 24 h pt., con una reducción en la población de células de espermatogénesis, la aparición de cuerpos apoptóticos y algunos vacuolización periférica de los túbulos. Estas anormalidades aumentaron en severidad con períodos de tiempo más largos pt. Los resultados de adelantar la línea de tiempo de cese de la producción de huevos por 24 h, lo que demuestra que este proceso se ve afectada muy rápidamente pt (Hanna et al., 2012).

#### **A nivel nacional:**

Un estudio realizado en Perú para ver la caracterización de la respuesta inmune humoral de alpacas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, se llevó a cabo en el transcurso de los 6 meses de la infección experimental. Seis alpacas adultas de entre 1-2 años de edad recibieron una dosis única de 200 metacercarias de *F. hepatica*, dos alpacas no infectados se mantuvieron como grupo de control. Todos los animales infectados arrojaron huevos a las 8 semanas después de la infección (PI) y el número de trematodos recuperados en la necropsia promedio fue de  $41 \pm 4$ . Los hígados de animales infectados mostraron regiones con inflamación crónica, granuloma con huevos de parásitos, necrosis y cirrosis. Luego se observó una eosinofilia periférica en los animales infectados. Un solo pico de transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT) se observó 4 semanas PI y transaminasa sérica glutámico oxalacético (TGO) elevado a las 3 semanas PI y posteriores. Las IgG circulantes Abs contra FAS1 y FAS2 se midieron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). FAS2 -ELISA detectó la infección a los 10 días PI llegando al título más alto en

7-8 semanas PI y se mantiene elevada, hasta el final de la infección. FAS1 - ELISA detecta la infección 2 semanas PI y siguió el mismo patrón que FAS2 - ELISA. Anti FAS2 IgG Abs estaban en títulos mayores y mostraron avidez fuerte que contra FAS1 IgG Abs. Además, los anticuerpos IgG de conejo producidos contra la proteinasa de la cisteína FAS2 mostraron infiltración de este antígeno del parásito asociado a la degradación de los conductos biliares y el parénquima del hígado de alpacas infectadas. Las alpacas infectadas provocaron una fuerte respuesta inmune humoral contra cisteína proteinasas FAS1 y FAS2, que podría considerarse como candidatos para el inmunodiagnóstico y desarrollo de vacunas contra la Fasciolosis en alpacas (Timoteo et al., 2005).

En el departamento de Ayacucho a 2750 msnm, se estudiaron varias muestras de animales que llegaron al Camal de Tunsulla de la provincia de Cangallo, las mismas que fueron analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica de la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Los datos para determinar grado de lesión fueron obtenidos a través de suero sanguíneo (AST y ALT) también tejido hepático (histopatología), y para determinar grado de infección se analizó heces (huevos por gramo de heces) y se contó fasciolas adultas y juveniles (Necropsia). Los datos fueron analizados haciendo uso de regresiones lineales, para correlacionar los niveles de transaminasas y número de fasciolas encontradas, para medir el grado de lesión (histopatología) frente al grado de infección (hpg) se usó de la prueba de independencia de Chi cuadrado, llegando al siguiente resultado: Las lesiones hepática están influenciadas por el grado de infección de la Distomatosis hepática, siendo las fasciolas juveniles las



que causarían lesiones en mayor grado que las fasciolas adultas  $R^2=0.8044$  ( $Y=3.3257X+98.52$ ) y  $R^2=0.7569$  ( $Y=2X+41$ ). Cuando existe mayor número de fasciolas adultas los niveles de AST y ALT se mantienen o disminuyen ligeramente  $R^2=-0.0119$  ( $Y=-0.3676X+126.76$ ) y  $R^2=0.4617$  ( $Y=-1.41183X+74.005$ ). El grado de lesión con respecto al grado de infección causada por la Distomatosis hepática en alpacas es evidente ya que a mayor grado de infección existe mayor grado de lesión hepática que se puede determinar a través de los niveles séricos de AST y ALT (Cipriani, 2007).

Se realizó un estudio en la Estación Experimental de la Raya, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, para determinar la presencia de formas larvarias de *F. hepatica* y las especies de caracoles hospederos intermediarios de *F. hepatica* en altitudes superiores a 4000 msnm. Se trabajó en tres altitudes (4000 a 4200, 4200 a 4300, y 4300 a 4500 msnm) colectándose 150 caracoles por cada altitud en la época de lluvias (enero-marzo) del 2004. Se utilizaron 50 caracoles para la medición de la concha, 50 para observar el aparato reproductor y la rádula a fin de identificar las especies, y 50 para verificar la presencia de formas larvarias de *F. hepatica*. Se encontró caracoles de la especie *Lymnaea viatrix* entre 4000 a 4200 msnm y de la especie *Pseudosuccinea columella* entre 4200 a 4500 msnm. El porcentaje de infestación de los caracoles con las formas larvarias de *F. hepatica* fue de 48, 46 y 36% a 4000-4200, 4200-4300, y 4300-4500 msnm, respectivamente, demostrando que el parásito puede sobrevivir sobre los 4000 msnm. La relación entre el nivel de infestación y altitud fue inversamente proporcional (Londoño et al., 2009).

En el distrito de Huertas, provincia de Jauja - Junín, se hizo un estudio para determinar la prevalencia de *F. hepatica* mediante exámenes coprológicos en el ganado bovino para evaluar la eficacia de dos fasciolicidas ampliamente utilizados en la zona: Triclabendazol (TBCZ) y Albendazol (ABZ). Se trabajó con 387 vacas de 30 establos durante la época de lluvias. Se colectaron muestras de heces directamente del recto y se analizaron mediante los métodos de sedimentación espontánea y de Mc Master modificado. La prevalencia de *F. hepatica* fue de 38,2% con cargas promedio de 16 hpg (1-197 hpg). Asimismo, 26 establos (86,7%) resultaron positivos a *F. hepatica*. En la evaluación de resistencia a las drogas se empleó la prueba de reducción de recuento de huevos (FECRT). Se seleccionaron 75 animales que superaron recuentos de 13 hpg y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: a) TCBZ, 12 mg/kg peso vivo (n=39) y b) ABZ, 10 mg/kg peso vivo (n=33). Las drogas fueron administradas vía oral. La eficacia del TBCZ a los 7, 14, 21 y 28 días post tratamiento fue de 53,4; 53,3; 36,4 y 34,9% respectivamente, mientras que para el ABZ fue nula en todos los casos. Se concluye que la ganadería lechera de Jauja, Junín, muestra una alta prevalencia de *F. hepatica*, además, de presentar resistencia del parásito al Albendazol y Triclabendazol (Chávez et al., 2012).

#### **A nivel local:**

En un trabajo realizado en cinco predios de la campiña de Cajamarca, para determinar el grado de eficacia y resistencia antihelmíntica de *F. hepatica* al Triclabendazol 12% en bovinos: "Tartar", "El Cortijo", "San Vicente", "Santa Catalina" y "Granja Porcón"; entre los años 2006 y 2008, se utilizó 10 bovinos en cada predio con infección natural a *F. hepatica*, entre 6 a 60 meses de edad la

dosis terapéutica fue de 12 mg/kg. pv, vía oral. Se extrajo aproximadamente 200 g de heces directamente del recto de cada animal en el día 3 antes y el día 28 post dosificación. Se usó el método Dennis, Stone y Swanson modificada para cuantificar el número de huevos por gramo de heces (hpg), la eficacia se calculó mediante la fórmula  $\%E = C/A \times 100$  y  $C = A - B$ . En los resultados se determinó 2,8%; 3,1%; 68%; 96% y 100% de eficacia en los predios "Tartar", "El Cortijo", "San Vicente", "Santa Catalina" y "Granja Porcón"; respectivamente. Demostrándose en los tres primeros predios un grado de eficacia "insuficientemente activo" y por tanto *F. hepatica* es resistente al Triclabendazol, en tanto que en los predios "Santa Catalina" y "Granja Porcón", los grados de eficacia van de "eficaz" a "muy eficaz"; respectivamente, lo cual indica que *F. hepatica* aún es sensible al fármaco. Se concluye que el grado de eficacia del Triclabendazol en el control de *F. hepatica* en los bovinos pueden ser distintos en los predios de la campiña de Cajamarca y la resistencia de *F. hepatica* está relacionado al uso excesivo del Triclabendazol por muchos años (Rojas, 2009).

En un trabajo de investigación experimental, realizado en el valle de Cajamarca en ganado lechero Holstein, se les administró vía oral el TCBZ en dosis de 12 mg/kg en diferentes formulaciones, para determinar la biodisponibilidad a nivel sistémico y poder realizar las comparaciones respectivas, ya que hay una falta de información sobre el control de calidad de éste fármaco y sobre todo, cómo esto podría afectar la absorción del mismo. Se trabajó con 30 vacas lecheras, fueron distribuidas aleatoriamente en cinco grupos (n = 6) como sigue: Grupo RF, tratado con la formulación de referencia (Fasinex®) y otros grupos tratados con T1, T2, T3 o T4, cada uno

representando una formulación diferente de TCBZ comercialmente disponibles. Se obtuvieron muestras de sangre antes y hasta 168 horas después del tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de los metabolitos de TCBZ se cuantificaron por HPLC. TCBZ-sulfóxido (TCBZSO) y TCBZ-sulfona (TCBZSO<sub>2</sub>) fueron los únicos analitos recuperados en plasma. Sin embargo la concentración del TCBZSO comparado con el tiempo, observamos que el T2 resultó significativamente bajo comparado con el obtenido por el grupo RF. En los valores del área observados en relación a la curva, fue alta para el T3 y el T4 en relación al grupo RF, considerándose que la única formulación de prueba bajo evaluación que podría considerarse equivalente al grupo RF fue el T1; quedando demostrado así, que hay diferentes concentraciones expuestas al metabolito sistémico del TCBZSO, indicándonos esto que hay una gran necesidad de realizar mayores controles de calidad para la aprobación de los fármacos dentro del campo farmacéutico veterinario (Ortiz et al., 2011).

En un trabajo que se realizó en Cajamarca, que tuvo como objetivo determinar la eficacia del TCBZ en 11 vacas lecheras positivas a *F. hepatica* las que fueron tratadas con TCBZ (10% Fasinex®) a 12 mg/kg de peso vivo; a los 14 días y 30 días después del tratamiento; se analizaron las heces mediante la prueba de reducción de huevos, demostrándose una eficacia de 31,05% y del 13,63% respectivamente. Por otro lado, en la prueba en vivo se trabajó con 11 ovejas, divididos en dos grupos, un grupo de control sin tratamiento (n = 5) y un grupo tratado (n = 6), los que fueron infectados con 200 metacercarias. A los 106 días después de la infección todos los animales presentaron huevos de *F. hepatica* en las heces, confirmando la presencia de parásitos adultos en sus hígados. Estos ovinos se trataron con TCBZ (10% Fasinex®) a 10 mg/kg de

peso vivo; los que a los 15 días pos-tratamiento se realizó el sacrificio de estos animales y se contó el número de fasciolas en sus hígados; mostrando una eficacia del fasciolicida de 25,2%. Confirmándose la resistencia a TCBZ en Cajamarca, Perú (Ortiz et al., 2013).

En Cajamarca, en un estudio que tuvo como objetivo determinar la situación actual de la parasitosis gastrointestinal y hepática de las alpacas y vicuñas, se encontró una prevalencia de 38% de *F. hepatica* para el caso de vicuñas, y para alpacas 30,66% (Cabrera et al., 2013).

## **2.2. Bases teóricas**

### **Definición y epidemiología de la Fasciolosis**

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria muy común y de gran importancia en el mundo de los animales domésticos, causada por un trematodo llamado *Fasciola hepatica*; siendo más importante en los rumiantes domésticos como las alpacas, bovinos y ovinos (Cordero et al., 1999). La enfermedad se debe a la presencia y acción del trematodo en el parénquima hepático y conductos biliares, en general es un proceso crónico que produce trastornos digestivos y de nutrición (Quiroz, 1999).

La Fasciolosis, causada por especies de tremátodos hepáticos del género *Fasciola*, siempre ha sido bien reconocido por su alto impacto en veterinaria pero ha sido una de las enfermedades más olvidadas durante décadas con respecto a la infección humana; el cual se encuentra comúnmente en el hígado y el sistema biliar de los rumiantes (Mas-Coma et al., 2009).

Se ha observado que seis especies de tremátodos, son transmitidas por las plantas y que afectan a los seres humanos: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* y *Fasciolopsis buski* (Fasciolidae), *Gastrodiscoides hominis* (Gastrodiscidae), *Watsonius watsoni* y *Fischoederius elongatus* (Paramphistomidae). Mientras que la *F. hepatica* y *F. gigantica* son hepáticas, las otras cuatro especies son parásitos intestinales. Los fasciólidos y los gastrodisídicos causan zoonosis importantes y están distribuidas en muchos países, mientras que *W. watsoni* y *F. elongatus* se han detectado sólo accidentalmente en los seres humanos. El clima actual y los cambios globales parecen afectar cada vez más las helmintiasis transmitidas por el caracol, que dependen en gran medida de factores ambientales. La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria emergente/re-emergente en muchos países, como consecuencia de muchos fenómenos relacionados con los cambios ambientales. La capacidad de propagación de la *F. hepatica* está relacionada con su capacidad de colonizar y adaptarse a nuevos huéspedes y ambientes, incluso en grandes alturas. Las Fasciolopsiasis y Gastrodiscoidiasis pueden controlarse junto con otras parasitosis transmitidas por los alimentos, Fasciolopsiasis sigue siendo un problema de salud pública en muchas zonas endémicas a pesar que hay programas de control. Fasciolopsiasis se ha convertido en una infección re-emergente en los últimos años y Gastrodiscoidiasis, se restringe a los países asiáticos, ahora está reportándose en países africanos (Mas-Coma et al., 2005).

Los parásitos tremátodos viven en el hígado, el estómago, en los vasos sanguíneos de una amplia gama de animales y humanos. La mayoría de ellos tienen una importancia económica y veterinaria especial. En las ovejas y otras especies de animales la más común es la *F. hepatica*. Fasciolosis hepática se

produce en todo el mundo, donde las condiciones climáticas son adecuadas para la supervivencia de los caracoles acuáticos huéspedes intermedios. También es de importancia para los rumiantes, en algunas partes del mundo la *Fasciola gigantica* y el *Fascioloides magna*. Otros tremátodos que infectan a los rumiantes incluyen el *Dicrocoelium dendriticum*; *Eurytrema pancreaticum* y *Eurytrema coelomaticum*. Los Paramphistomidae, algunas especies pueden infectar a las ovejas y otros rumiantes. Finalmente, *Schistosoma spp.* se encuentran en los vasos sanguíneos de los rumiantes y son de menor importancia en las regiones templadas (Rojo-Vázquez et al., 2012).

El parásito de *F. hepatica* es la responsable de la enfermedad en zonas templadas y, concretamente en España, *F. hepatica* parasita a numerosas especies de mamíferos, si bien se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres. Así pues, en España se ha encontrado parasitando ovejas, cabras, vacas, alpacas, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres y también el hombre (Rojo y Ferre, 1999).

### **Etiología**

La Fasciolosis es causada por un helminto hermafrodita llamado *Fasciola hepatica*, cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

- Phylum : Platyhelminthes.
- Subphylum : Cercomeria.
- Superclase : Cercomeridea.
- Clase : Trematoda.
- Subclase : Digenea.
- Orden : Fascioliformes.

- Superfamilia : Fascioloidea.
- Familia : Fasciolidae.
- Subfamilia : Fasciolinae.
- Genero : *Fasciola*.
- Especies : *hepatica, gigantea*.

(Citado por Cordero et al., 1999).

### **Morfología**

El parásito adulto presenta forma aplanada, con apariencia carnosa y extremo anterior saliente en forma de cono, con una ventosa oral y otra ventral. Mide aproximadamente de 2 a 3 cm de largo y 1 cm de ancho. Son parásitos hermafroditas y ambas gónadas se encuentran bien desarrolladas con forma ramificada. El aparato digestivo se encuentra formado por la faringe, el esófago y el ciego, este último dividido en dos tubos ramificados. Este tremátodo habita en los conductos hepáticos o biliares de sus hospederos definitivos, en los que pone huevos ovalados de gran tamaño, que oscilan entre los 130-150 × 60-90 μm y presentan un opérculo en uno de sus extremos (Martínez et al., 2012).

El parásito adulto es hermafrodita, mide de 18 a 50 mm por 4 a 14 mm, el cuerpo es aplanado dorso ventralmente de forma foliácea, ancha anteriormente formando un cono posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas. Posee una ventosa oral en el extremo superior, otra ventral a la altura de lo que se podría llamar hombros. El tubo digestivo se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo, abriéndose debajo de la ventosa ventral el poro genital (Urquart et al., 2001)



## **Ciclo biológico**

La *Fasciola hepatica* tiene un ciclo biológico indirecto, necesita de un hospedero intermediario que es un caracol donde se desarrollan y multiplican las etapas asexuadas. Los parásitos adultos producen los huevos que pasan al duodeno con la bilis y salen del huésped con las heces. Una fasciola adulta pone entre 20 mil a 50 mil huevos/día. El tiempo de desarrollo y nacimiento del miracidio depende en gran parte de la temperatura, a 26°C eclosionan en 9 días, pero a 10°C no se desarrollan pero permanecen viables por un largo período; es ciliado y mide 150 x 40 micras, abandona el huevo por el opérculo, para su posterior desarrollo es necesario un huésped intermediario, ya que puede sobrevivir más de 24 horas en vida libre. La acción fototrópica pasiva de la mancha ocular atrae al miracidio a la superficie del agua; nada de un lado a otro hasta que llega al caracol del género *Lymnaea* (Quiroz, 2005).

Los huevos salen al intestino con la bilis y son eliminados con la materia fecal al medio. Para estos embriones es indispensable que caigan al agua dulce, en la cual dan origen a la primera forma larvaria que se denomina miracidio, y sale a través del opérculo. Este miracidio ciliado nada libremente en el agua e invade un molusco de la familia *Lymnaeidae*. Este molusco se comporta como hospedero intermediario de este parásito (Martínez et al., 2012).

En el interior del caracol el parásito se reproduce y se desarrollan las formas larvarias de esporoquistes, redias y cercarias; estas últimas tienen cuerpo redondeado y cola no bifurcada, abandonan el caracol y nadan en el agua para buscar plantas a las cuales se adhieren y se transforman en metacercarias de aproximadamente 0,5 mm. Los hospederos definitivos se infectan al ingerir

estas plantas contaminadas con metacercarias. En el intestino delgado se libera el parásito inmaduro, que atraviesa la pared intestinal, el peritoneo y la cápsula hepática, para luego buscar los canales biliares en donde se desarrolla a adulto en 3 a 4 meses (Martínez et al., 2012). Los animales, al igual que el hombre se infectan por medio de la ingestión de pastos y aguas contaminadas con metacercarias (González et al., 2011).

### **Patogenia**

La Fasciolosis hepática aguda y crónica se produce por diferentes estadios de *Fasciola hepatica* en el hígado. La forma aguda se puede presentar de 5-6 semanas post infección por la ingesta de gran cantidad de metacercarias, desencadenando una invasión rápida de fasciolas jóvenes en el hígado; esto causa una destrucción del parénquima hepático dando lugar a una insuficiencia hepática aguda, hepatitis traumática hemorrágica aguda, hemorragia de la cavidad peritoneal, presencia de exudado serofibrinoso y disminución en la síntesis de albumina. Las fasciolas inmaduras se alimentan de tejido hepático, pero pueden ingerir una pequeña cantidad de sangre lo que produce una anemia durante las 4 a 5 semanas de infestación. La Fasciolosis crónica se desarrolla lentamente, debida a la actividad de las fasciolas adultas en los conductos biliares, estas producen colangitis hiperplásica, obstrucción biliar, destrucción del tejido hepático, fibrosis hepática y anemia (Blood y Radostits, 1992).

### **Diagnóstico**

**Clínico:** Esto se hace mediante la observación de la sintomatología, el síndrome clínico más frecuente es la forma crónica; y afecta principalmente a los animales jóvenes. Los síntomas más característicos son pérdida de peso,

anorexia, palidez de las mucosas, puede aparecer anemia, debilidad, emaciación y edemas (Cordero et al., 1999). Puede aparecer varios animales jóvenes muertos en el rebaño en posición de cubito pectoral, los ollares apoyados sobre el suelo; dolor a la palpación del hipocondrio derecho, distensión abdominal, problemas digestivos de tipo indigestión, algunas veces con diarrea, ictericia, atonía ruminal, estreñimiento con apetito variable, disminución de la producción de leche, reducción del proceso reproductivo (Quiroz, 1999). Fundamentalmente depende de la cantidad y frecuencia de ingestión de metacercarias, siendo los síntomas más frecuentes inapetencia, anemia, pérdida de peso menores índices productivos (Rojas, 1990).

**Parasitológico:** La detección de huevos de *F. hepatica* en las heces de los animales sospechosos es útil para diagnosticar la fasciolosis crónica mediante los métodos de flotación o sedimentación (Cordero et al., 1999). Los métodos de sedimentación son los más usados para el diagnóstico coproparasitológico, ya sea de manera cualitativa y cuantitativa, esto último se consigue con el peso de las heces y el factor de dilución usado. En bovinos, la sensibilidad de la prueba es del 70% con un solo examen; mientras, un examen seriado de tres eventos aumenta a 93%. En ovinos es también del 70% en un evento y sube a 97% con tres. Los resultados encontrados no reflejan el 100% del total de animales infectados, teniendo un adicional porcentaje significativo de falsos negativos (Quiroz, 2000); siendo el método más difundido el recuento de huevos en la materia fecal mediante la prueba de sedimentación (Nari y Fiel, 2001; Kassai, 2002). Los datos obtenidos de un muestreo de materias fecales que sea representativo pueden ser expresados en forma cuantitativo (Nari y Fiel,

2001). El hallazgo de 100 a 200 huevos por gramo de heces en vacuno, indican una infección probablemente patógena, que requiere la aplicación de un fasciolicida (Cordero et al., 1999).

El diagnóstico de rutina de la Fasciolosis animal se hace mediante un examen coprológico de sedimentación, que evalúa la presencia de huevos en las heces. La adición de un colorante de contraste al sedimento permite destacar el color amarillo dorado de los huevos (Cordero et al., 1999). Como desventaja este método no detecta infecciones prepatentes y tiene una sensibilidad de sólo el 72,5% en ovinos; 76,6% en los porcinos y 83,3% en los equinos. Esto se debe a que el método solo detecta huevos a partir de los tres meses, por lo tanto no detecta infecciones agudas ni prepatentes. Además es una técnica que detecta menos positivos cuando la carga parasitaria es baja y cuando existe una eliminación de huevos en forma intermitente. El examen coprológico demora alrededor de 20 minutos por muestra, lo que es mayor al tiempo empleado por muestra con técnicas serológicas (Gorman et al., 1990).

**Necropsia:** La distomatosis aguda se caracteriza por producir hepatitis aguda traumática y en los animales afectados se hallan coelomas sanguinolentos en la cavidad abdominal, el hígado hemorrágico y friable presenta acúmulos de fibrina y túneles provocados por las fasciolas durante la migración y también peritonitis fibrinosa. En la distomatosis crónica el parénquima hepático se hallará fibrótico y duro, mientras que los canalículos biliares estarán engrosados, fibrosos y pueden presentar depósitos calcáreos (Vignau et al., 2005). Si se trata de Fasciolosis aguda, se encuentran hemorragias en el parénquima hepático, producidas por la migración de los parásitos inmaduros

durante las primeras 8 semanas post-infección. Hay una gran inflamación del hígado, con trayectos hemorrágicos en el parénquima. Hay además hematomas subcapsulares, congestión venosa y peritonitis. Si se corta el hígado en láminas de 1 cm se pueden encontrar en el parénquima gran cantidad de formas jóvenes del parásito. En la Fasciolosis crónica los síntomas dependen del número de parásitos existentes. Se manifiesta con colangitis, fibrosis hepática, ganglios linfáticos agrandados y al corte de los canales biliares se les ve engrosados y con depósitos calcáreos (en bovinos) con la presencia de parásitos adultos (Boray, 1994).

En un estudio realizado en Chile, donde se observó la estructura macro y microscópica del hígado de 6 llamas adultas (*Lama glama*), 4 machos y 2 hembras, se determinó que el hígado se ubica en la región abdominal craneal, a la derecha del plano mediano. Carece de vesícula biliar y el conducto hepático se une al conducto pancreático mayor, a unos 3 cm del duodeno, formando el conducto hepato-pancreático, el cual desemboca mediante el trayecto intramural en la segunda curva de la ese sigmoidea del duodeno. En los lobulillos hepáticos, el tejido conectivo de soporte es escaso, se halla limitado al espacio porta. Los estudios morfológicos brindan un soporte estructural para la realización de técnicas de diagnóstico específicas de este órgano, como por ejemplo, la biopsia hepática (Castro et al., 2001).

### **Tratamiento con Triclabendazol**

**Descripción.** El Triclabendazol pertenece a la familia química de los benzimidazoles; su nombre químico es 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxil)-2-metiltio-1H-benzimidazol. (Adams, 2003).

**Farmacodinamia.** El sitio más usual de metabolismo es el hígado, donde comúnmente ocurren reacciones de oxidación y separación. Su acción es producida por un derivado metabólico: sulfóxido de Triclabendazol el cual después de ejercer su acción a nivel de parénquima hepático y conductos biliares, es eliminado conjuntamente con la bilis. Todos los benzimidazoles actúan sobre los parásitos interfiriendo su metabolismo generador de energía, la gran mayoría inhibiendo la enzima Fumarato reductasa. El bloqueo del paso de la Fumarato reductasa inhibe la generación de la energía mitocondrial en la forma de adenosin trifosfato (ATP) (Booth y McDonald, 1987). El Triclabendazol además de bloquear la Fumarato reductasa, también se fija a la tubulina de los parásitos, lo que impide la unión de las subunidades de proteínas alfa y beta de la tubulina y altera la función y la estructura de los microtúbulos de las células de los parásitos. Los microtúbulos son estructuras intracelulares con varias funciones relacionadas con el movimiento de los cromosomas durante la división celular, la absorción de nutrientes, la movilidad y el soporte estructural de la célula, el movimiento de partículas intracelulares, la exocitosis y la comunicación intracelular (Márquez, 2007).

**Farmacocinética.** Después de que se administra por vía oral, se absorbe bien. La  $C_{p_{max}}$  se alcanza a las 8 horas; se metaboliza hasta 95% de la dosis administrada y los principales metabolitos encontrados en plasma son sulfóxido y el Triclabendazol sulfona. Se elimina principalmente en heces, el resto en orina y leche (Sumano, 1996). Son variantes pequeñas las que existen entre estos benzimidazoles, salvo su espectro, que en este caso es más eficaz contra

fasciolas adultas de más de seis semanas (100%) y con otras formas inmaduras de hasta una semana de edad (99%) (Adams, 2003).

**Dosificación.** En lo general, se recomienda dosis de 5mg/kg en cabras, de 10 mg/kg en las ovejas y de 12mg/kg en el ganado vacuno (Adams, 2003).

Bovinos y ovinos: la dosis es de 10 a 15mg/kg por vía oral, intrarruminal, intraabomasal o subcutánea (Sumano y Ocampo, 1997).

**Indicaciones y eficacia.** En las ovejas se pueden conseguir eficacias del 98-100% contra *F. hepatica* con dosis de 15mg/kg en los trematodos de 1 día, de 15 mg en trematodos de 1-4 semanas, de 10 mg/kg en los trematodos de 6 a 8 semanas, de 5mg/kg en los trematodos de 10 semanas y de 2,5 mg/kg en los trematodos de 12 semanas (Adams, 2003). Quizá el efecto más importante en este producto sea el residual, ya que después de una sola aplicación no existen huevos de *Fasciola* hasta por 11 semanas, lo que permite desarrollar un plan para erradicar al parásito en la granja. Con solo cuatro aplicaciones/año es factible eliminar la metacercaria de la pastura (Sumano y Ocampo, 1997).

**Toxicidad.** La dosis máxima tolerada es de 200mg/kg por lo cual los animales pueden presentar incoordinación hasta por 3 días. Se informa que consecuente a la aplicación del Triclabendazol se puede presentar reacciones en piel por fotosensibilidad, la cual se manifiesta por inflamación de la piel y de la ubre; esto se considera un efecto de toxicidad, del cual no está bien definida la causa. Se indica que puede existir lesión en el área de piel donde se aplique el producto

por vía subcutánea, sin que esto sea una limitante para su uso. No produce efectos teratógenos (Sumano y Ocampo, 1997).

**Tiempo de retiro.** El tiempo de retiro para carne de ovino y bovino es de 28-42 días, y para leche es de 7 días (Sumano y Ocampo, 1997)

**Grado de eficacia de un fármaco.** La W.A.A.V.P. recomienda lo siguiente, como: muy eficaz (más del 98%), eficaz (90-98%), moderadamente eficaz (80-89%) o insuficientemente activos (menos de 80%). Esta clasificación se debe utilizar para la calificación de los productos para los nematodos, trematodos y cestodos (Wood et al., 1995).

### **Resistencia antihelmíntica**

La resistencia a los antihelmínticos se define como un aumento significativo en la capacidad que tiene una fracción de una población de vermes para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de la misma especie (Booth y McDonald, 1987); siendo la heredabilidad de la resistencia la característica más importante de este fenómeno (Kassai, 2002).

El alcance total de la resistencia antihelmíntica de los nematodos en los animales de granja no se conoce. La resistencia puede ser detectada con la prueba de recuento de reducción de huevos y con dos ensayos in vitro, la eclosión de los huevos y las pruebas de desarrollo de las larvas. La sensibilidad de estos dos ensayos in vitro se puede aumentar mediante el uso de dosis



discriminantes. Sólo bencimidazol se puede detectar la resistencia con las pruebas basadas en la PCR debido a que los mecanismos moleculares de la resistencia a levamisol y las lactonas macrocíclicas siguen siendo desconocidos. La detección de resistencia es importante porque permite elaborar estrategias para ser puesto en su lugar. El desarrollo de la resistencia se retrasa por mantener parásitos suficientes en refugios (no expuesta a antihelmíntico). La puesta en cuarentena de animales para evitar la introducción de helmintos resistentes a la granja es importante. Se requiere amplias investigaciones para manejar la resistencia, especialmente en el control de la resistencia en *F. hepatica* (Coles, 2005).

Se han descrito métodos para ayudar en la detección de la resistencia antihelmíntica en los nematodos estrogilidos de los rumiantes, caballos y cerdos. Para lo cual se recomiendan dos pruebas, una prueba in vivo, la prueba de reducción de huevos en heces en los animales infectados, y un ensayo in vitro, la prueba de eclosión de los huevos para la detección de la resistencia a los benzimidazoles en los nematodos que eclosionan poco después de la embrionación. Estas pruebas permiten ser comparables en todo el mundo (Coles et al., 1992).

En cuanto a TCBZ se refiere, los mecanismos de resistencia son específicos para este fármaco, numerosos estudios aportan evidencias de que los sistemas enzimáticos de metabolización podrían estar alterados o sobreexpresados en los individuos de *F. hepatica* resistentes a TCBZ. En este punto se ha señalado que la flavin monooxigenasa y el citocromo P-450 son los responsables fundamentales de la metabolización del TCBZ en sus principales

metabolitos activos (Mottier et al., 2004) y se ha demostrado que esta actividad metabólica es significativamente mayor en las cepas resistentes (Álvarez et al., 2005).

Existen varios mecanismos moleculares por los cuales se presenta resistencia de *Fasciola hepatica* al TCBZ, entre ellos se encuentra: a) la lenta reducción de la oxidación del TCBZ a Triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) que es el metabolito activo, b) la unión del TCBZ a proteínas no específicas restringe la habilidad del fármaco a unirse al sitio de acción, y c) el eflujo mediado por transportadores donde se sobreexpresa la acción de la Gp-P permitiendo la eliminación del fármaco desde las células (Álvarez et al., 2005). Otros procesos relacionados con la dinámica del fármaco en los tejidos parasitarios también pudieran contribuir al desarrollo de la resistencia. Así, se ha demostrado que mientras la absorción del TCBZ y el TCBZ.SO en las cepas resistentes es significativamente menor que en las susceptibles (Álvarez et al., 2005; Mottier et al., 2006), este resultado sugiere que el mecanismo de resistencia es específico para el TCBZ, pudiendo estar implicada una proteína transportadora de membrana, la glicoproteína-P (Gp-P), que impediría a la molécula antiparasitaria alcanzar concentraciones activas en el lugar de acción. La sobreexpresión de la Gp-P se ha relacionado con el desarrollo de resistencias frente a diferentes clases de antihelmínticos (Prichard y Roulet, 2007)

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la Gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la Gp-P limita la absorción y difusión trans epitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos

administrados por vía oral. Esta glicoproteína, no solo se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción, como en la superficie apical de los enterocitos, sino también en tejidos de órganos involucrados en la eliminación de fármacos como superficie canalicular de los hepatocitos y superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal. (Lin, 2003).

La resistencia al TCBZ, es una amenaza actual y está generalizada en la producción ganadera, su prevalencia es tan alta en algunas regiones; es un fármaco de elección para el tratamiento de la Fasciolosis en los seres humanos y es concebible que podría suponer un riesgo para la salud humana, especialmente en áreas del Perú y Bolivia donde hay una alta incidencia. Las diferencias metabólicas entre las cepas resistentes y susceptibles al TCBZ, han sido reportados en la sulfoxidación de TCBZ a TCBZ.SO y a TCBZ.SO<sub>2</sub>, lo que sugiere que el proceso de absorción este alterado en su flujo de salida, y/o el metabolismo de TCBZ que tiene un papel importante en el TCBZ resistente en los procesos basados en la tubulina. La actividad de la Gp-P también se ha demostrado que tiene un efecto sobre la absorción y la eficacia de TCBZ in vitro utilizando los aislados tanto resistentes y susceptibles. (Kelley et al., 2016).

La segunda edición de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP), incluye una guía actualizada sobre los procedimientos parasitológicos estándar, ajuste de la dosis, la confirmación de la dosis y los ensayos clínicos, y proporciona directrices para la evaluación de productos para la eficacia contra los parásitos resistentes a antihelmínticos, la persistencia de la actividad y la actividad profiláctica. Se incluyen pruebas para la eficacia contra nemátodos, tremátodos y céstodos (Wood et al., 1995).

La (WAAVP) ha elaborado nuevos métodos para la detección de resistencia antihelmíntica en los nemátodos de los rumiantes, caballos y cerdos, como base para la discusión y con la finalidad de que se evalúan a nivel internacional para determinar si se podría en el futuro ser recomendados. Se describe una prueba de resistencia para el Bencimidazol (BZ) por la eclosión de los huevos, y otra para el desarrollo de larvas para el Bencimidazol y Levamisol (Coles et al., 2006).

La Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP), ha elaborado una guía para evaluar el correcto uso de productos en lo que respecta a las dosis, que contienen dos o más ingredientes activos antihelmínticos para el tratamiento de infecciones por nemátodos en rumiantes y caballos. En la actualidad, las políticas reguladoras sobre la aprobación de estos productos varían entre jurisdicciones, y estas directrices deberían permitir la armonización de los requisitos. Esta guía hace recomendaciones claras sobre las normas mínimas necesarias (Geary et al., 2012).

El uso intensivo de antihelmínticos para controlar los nemátodos gastrointestinales se ha convertido en un problema importante en muchos países europeos. La presencia de cepas resistentes de nemátodos a Benzimidazoles, imidazotiazoles y/o lactonas macrocíclicas se ha informado en varias ocasiones, en particular para los tres géneros más importantes, *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Teladorsagia*. La experiencia hasta ahora nos dice, que no deben confiarse con el sólo uso de antihelmínticos, hay que usar otros productos químicos, sin descuidar el manejo en el medio ambiente y la inmunología (Papadopoulos et al., 2012).

La terapéutica de la Fasciolosis debe ir dirigida tanto contra las fasciolas adultas localizadas en los conductos biliares, como contra las formas inmaduras que migran por el parénquima hepático, con el fin de restaurar la función hepática. En la Fasciolosis aguda y subaguda se puede utilizar el TCBZ, por su alta eficacia sobre fasciolas inmaduras, también puede utilizarse el Clorsulón, Closantel, Albendazol, Nitroxinil, Rafoxanida, etc. (Cordero et al., 1999).

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis

El Triclabendazol tiene una eficacia menor al 90% en el control de *Fasciola hepatica* en alpacas de Cajamarca, infectadas artificialmente.

#### 3.2. Diseño metodológico

La investigación fue netamente experimental, ya que se manipuló la variable independiente (tratamiento con TCBZ), y en la fase *in vivo* hubo dos grupos formados: tratado y control sin tratamiento, distribuidos aleatoriamente.

#### 3.3. Localización

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con alpacas provenientes de la Cooperativa Agraria “Atahualpa Jerusalén” de Trabajadores Ltda., Granja Porcón; el trabajo de campo se realizó en las instalaciones del fundo Tartar Pecuario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca y el trabajo de laboratorio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias, en el Laboratorio de Inmunología e Investigación y Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca presenta las condiciones climatológicas siguientes (\*):

- Altitud promedio : 2536 msnm.
- Latitud sur : 7°10'36".
- Longitud oeste : 78°30'36".
- Temperatura promedio anual : 15,4 °C.
- Temperatura mínima promedio anual : 8,9 °C.
- Temperatura máxima promedio anual : 22,04 °C.
- Precipitación pluvial : 707,4 mm.
- Presión barométrica : 740,5 milibares.
- Humedad relativa promedio anual : 62.9 %.

### **3.4. Unidad de análisis, universo y muestra**

Para el estudio se utilizó 10 alpacas, las cuales fueron distribuidas 5 para el grupo control sin tratamiento y 5 para el grupo tratado con el TCBZ.

### **3.5. Descripción del diseño de investigación**

#### **Cultivo y mantenimiento de caracoles**

Este proceso consistió en recolectar caracoles dextrógiros, usando pinzas de plástico y de metal de la zona del distrito de Polloc – Cajamarca; los mismos que fueron llevados al Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNC; donde se siguió con el Protocolo respectivo, (Ver Anexo 2 y Foto 1).

---

(\*) Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) – Cajamarca - 2015

### **Obtención de fasciolas adultas e incubación de huevos**

En vista que no se logró obtener fasciolas adultas de la Granja Porcón debido a la escasa prevalencia de esta parasitosis, se hizo una visita programada al Camal Municipal de Cajamarca para obtener fasciolas adultas de hígados decomisados de ovinos, las que luego fueron sometidas a protocolo respectivo sobre incubación de huevos, para obtener los miracidios (Ver Anexo 3 y Foto 2, 3, 4 y 5).

### **Infección de los caracoles**

Luego de la obtención de los miracidios los que fueron colocados en una placa Petri y los caracoles colocados en los pocillos de la placa de ELISA, se procedió a infectar los caracoles, según el protocolo respectivo, (Ver Anexo 4 y Foto 6 y 7).

### **Estimulación de caracoles y obtención de metacercarias.**

Terminado el proceso de infección de los caracoles, los mismos que fueron colocadas en su respectiva caja de plástico, se procedió a la estimulación de los caracoles para obtener las metacercarias, siguiendo los pasos que se indican en el protocolo respectivo, (Ver Anexo 5 y Foto 8 y 9).

### **De la producción de metacercarias**

Este proceso consistió en obtener miracidios a partir de huevos de *Fasciola hepatica*, con estos miracidios se infectaron caracoles (*Lymnaea viatrix*) criados artificialmente en el Laboratorio de Inmunología de la FCV-UNC. Seis a ocho semanas posteriores a la infección de los caracoles, se



colectaron las metacercarias, las mismas que se conservaron en agua destilada a 4°C hasta ser usadas para infectar a las alpacas.

### **De las alpacas seleccionadas**

Para seleccionar a los animales se trabajó por más de 1 año, realizando muestreos de heces; de la población alpaquera (380 alpacas) de la Granja Porcón, las muestras de heces se recolectaron en bolsas de polietileno, rotuladas con plumón de tinta indeleble con el mismo código del animal. Se trasladaron las muestras en caja de tecknoport hasta el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca para su análisis respectivo, mediante la técnica de sedimentación rápida de Dennis Stone Swanson, modificada (Ver Anexo 1). Donde se determinó en 3 estudios respectivos prevalencias de 13,25%, 8.75%. y 11%. Además que, en los tres análisis realizados en fechas diferentes, en el contaje de huevos de las muestras positivas, han sido de 1, 2 o máximo 4 huevos de *Fasciola hepatica* por gramo de heces.

Con el objetivo de minimizar variaciones individuales entre los animales, se seleccionó 10 alpacas de 12 meses de edad, machos y de 20 kg peso promedio, libres de *Fasciola hepatica* y sin tratamiento antihelmíntico, (Foto 10); posteriormente fueron trasladadas al fundo Tartar Pecuario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, donde se las instaló en un ambiente apropiado (Fotos 11); los animales estuvieron en una crianza intensiva rigurosa durante 6 meses, alimentados solamente con heno de alfalfa seca, proveniente de la costa, concentrado de

engorde y agua potable ad-libitum. Luego se procedió a identificar y tomar el peso de las alpacas (Foto 12, 13).

### 3.5.3. Del diseño experimental

El diseño se realizó asignando aleatoriamente las unidades experimentales a uno de los dos grupos conformados de la siguiente manera:

**Cuadro 1. Diseño experimental**

<b>Grupo</b>	<b>Nº</b>	<b>Infección Artificial (17-02-2016)</b>	<b>Tratamiento con TCBZ (01-06-2016)</b>	<b>Sacrificio (15-06-2016)</b>
Control sin tratamiento	5	X	....	X
Con tratamiento de TCBZ	5	X	X	X

### 3.5.4. De la infección y tratamiento de los animales

Días previos a la infección artificial se tomaron muestras para realizar el análisis coproparasitológico, confirmándose la ausencia de huevos de *Fasciola hepatica*; los animales fueron pesados e identificados, y se infectaron con metacercarias; cada uno de los animales recibió un inóculo de 60 metacercarias de *Fasciola hepatica* (Foto 14).

A los 106 días de la infección artificial, antes del tratamiento, se realizó el análisis de heces de las alpacas (Tabla 3); luego los animales del grupo experimental fueron dosificados (Foto 15) con TCBZ al 12% (Bilevón<sup>®</sup>), lote 11102774, fecha de elaboración: 11/2014, vencimiento: 11/2017) en dosis de 12 mg/kg p.v. por vía oral, (Tabla 4) en tanto que los del grupo control no recibieron tratamiento.

Luego se realizó los análisis de heces a los 7 días y 14 días post tratamiento (Tabla 1). Los análisis coproparasitológicos se realizaron mediante la técnica de sedimentación rápida de Dennis Stone Swanson, modificada, expresando los resultados en número de huevos por gramo de material fecal (Foto 16).

### **3.5.5. De la necropsia de los animales**

A los 14 días de aplicado el tratamiento con TCBZ, todos los animales fueron sacrificados siguiendo los lineamientos descritos por la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) para la evaluación de antihelmínticos en rumiantes (Wood et al., 1995).

Se extrajo el hígado, donde se hizo cortes de 1 cm de espesor, para recuperar el número total de fasciolas (Tabla 2) (Foto 17, 18, 19, 20), siguiendo los procedimientos normalizados para la recopilación y el análisis de hígado (Ver Anexo 6).

### 3.5.6. De la determinación de la eficacia

El porcentaje de eficacia en términos de reducción del número de huevos en heces, se calculó mediante la fórmula (Young et al., 1999):

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{Promedio de hpg pre tratamiento} - \text{Promedio de hpg pos tratamiento}}{\text{Promedio de hpg pre tratamiento}} \times 100$$

La eficacia del tratamiento antihelmíntico a la necropsia (prueba de eficacia absoluta), se determinó comparando la carga parasitaria de fasciolas adultas, entre los animales de los dos grupos; de acuerdo a la siguiente fórmula (Wood et al., 1995):

$$\text{Eficacia} = \frac{\text{MG de } F. \textit{hepatica} \text{ en grupo control} - \text{MG de } F. \textit{hepatica} \text{ en grupo tratado}}{\text{MG de } F. \textit{hepatica} \text{ en grupo control}} \times 100$$

Donde:

MG = media geométrica.

### 3.6. Análisis estadístico

Los datos de la investigación fueron analizados a través de una estadística descriptiva: media aritmética y media geométrica, distribuidos en tabla de frecuencia. El número de huevos por gramo de heces y/o el número de fasciolas adultas en cada grupo experimental se comparó utilizando la prueba de “t” de Student, para ello se usó el programa estadístico InStat (GraphPad Software).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1.** Eficacia del Triclabendazol en alpacas (*Lama pacos*) mediante el test de reducción del número de huevos (FECRT).

Nº animales	Día 0 pre	Día 7 post	Día 14 post
	tratamiento (hpg)	tratamiento (hpg)	tratamiento (hpg)
<b>1</b>	7	24	25
<b>2</b>	3	0	0
<b>3</b>	2	4	6
<b>4</b>	4	2	4
<b>5</b>	3	2	1
<b>Σ hpg</b>	19	32	36
<b>Promedio hpg</b>	3,8	6,4	7,2
<b>Eficacia (%)</b>		<b>-68.24</b>	<b>-89.47</b>

Como se puede apreciar en la Tabla 1, la eficacia del Triclabendazol en el control de *F. hepatica*, mediante el test de reducción del conteo de huevos (FECRT) a los 7 y 14 días presenta valores negativos, lo que equivale a una nula eficacia. No existiendo una diferencia significativa ( $P > 0.05$  GraphPad Software) en el recuento de huevos en heces, entre los animales del grupo control sin tratamiento y grupo tratado.

En el presente trabajo, los resultados de la prueba de la eficacia del fármaco de TCBZ (dosis de 12 mg/kg de p.v. por vía oral), contra *F. hepatica*, obtenido por el FECRT, ha demostrado una falta de eficacia, tanto en 7 y 14 días post tratamiento. Esto se va convirtiendo en un problema grave en Cajamarca, donde los tratamientos administrados a los animales son proporcionados por los propios agricultores sin consejos de un especialista, con el riesgo de usar una dosificación incorrecta, además no hay un adecuado control en su aplicación por vía oral, tal como lo informa Ortiz et al. (2013), quienes en una investigación hecha con 11 vacas lecheras positivas a *F. hepatica* que fueron tratadas con TCBZ a la dosis de 12 mg/kg de peso vivo; a los 14 días y 30 días después del tratamiento, encontraron que la eficacia del fármaco mediante la prueba de reducción de huevos, fue de sólo 31,05% y del 13,63% respectivamente; resultados que guardan relación con la del presente estudio. La explicación podría asumirse también por el uso indiscriminado de esta droga, por muchos años en el valle de Cajamarca, tal como lo señalan Claxton et al. (1998). Esta presión de uso ha conducido a que en los últimos años se presente fenómenos de resistencia frente al TCBZ, como lo manifiesta Rojas (2009). También tiene concordancia con los estudios realizados en bovinos en el distrito de Huertas-Junín donde Chávez et al. (2012) detectaron resistencia antihelmíntica a este principio activo, donde obtuvieron el 53,4% (7 días), 53,3% (14 días) de eficacia.

Esto se podría explicar porque, existen varios mecanismos moleculares por los cuales se presenta resistencia de *Fasciola hepatica* al TCBZ, entre ellos se encuentra: a) la lenta reducción de la oxidación del TCBZ a Triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) que es el metabolito activo, b) la unión del TCBZ a proteínas no específicas restringe la habilidad del fármaco a unirse al sitio de acción, y c) el eflujo mediado por transportadores donde se sobreexpresa la acción de la Gp-P permitiendo la

eliminación del fármaco desde las células (Álvarez et al., 2005); la Gp-P también se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción (células epiteliales de intestino), distribución (barrera hematoencefálica) y eliminación de fármacos (superficie canalicular de los hepatocitos, superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal y superficie apical de los enterocitos) (Lin, 2003).

Estos resultados encuentran apoyo además, en la falta de control de calidad de las formulaciones orales a base de TCBZ, ya que en un estudio se encontró diferencias en la concentración de la biodisponibilidad de diferentes fármacos comerciales a base de este producto, medidos a través de metabolitos de TCBZ en sangre, como lo manifiestan Ortiz et al. (2011). Otros hechos que puede explicar los resultados obtenidos es que la cepa de *Fasciola hepatica* utilizada para la infección de las alpacas podría haber sido resistente al TCBZ; este resultado se corrobora cuando se analiza la Tabla 2, en la cual se observa que el porcentaje de reducción de fasciolas adultas fue nula.

**Tabla 2.** Eficacia absoluta del Triclabendazol en alpacas (*Lama pacos*) mediante la necropsia.

<b>N° animales</b>	<b>Control sin tratamiento (N° fasciolas)</b>	<b>Triclabendazol (N° fasciolas)</b>
<b>1</b>	1	7
<b>2</b>	1	3
<b>3</b>	4	3
<b>4</b>	4	9
<b>5</b>	1	4
<b>Σ Fasciolas adultas</b>	11	26
<b>Promedio geométrico</b>	1,74	4,69
<b>Eficacia (%)</b>		<b>-169,3</b>

En la Tabla 2, observamos que el porcentaje de eficacia del TCBZ, a la dosis de 12 mg/kg de p.v. por vía oral, en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, al día 14 post tratamiento, mediante la prueba de eficacia absoluta es negativa, lo que equivale a una nula eficacia. Por lo que no existe una diferencia estadística significativa ( $P > 0,05$ ) entre el número de fasciolas adultas encontradas en los animales del grupo control y grupo tratado; demostrando que TCBZ no es eficaz para el tratamiento de la Fasciolosis en alpacas en Cajamarca. Estos datos no pueden ser discutidos a nivel regional, ni nacional ya que no existen trabajos de investigación similares a éste. Sin embargo Wood et al. (1995), señalan que la prueba de eficacia



controlada o absoluta es el método más fiable para evaluar la eficacia antihelmíntica de los antiparasitarios en rumiantes. Podría decirse que coincide con un trabajo realizado por Ortiz et al. (2013), realizado con 11 ovejas positivas a *F. hepatica*, artificialmente infectadas, tratadas con TCBZ a la dosis de 10 mg/kg de peso vivo, quienes mostraron una eficacia del fasciolicida de 25,2%; los mismos que están fundados en lo que indica Wood et al. (1995), quienes mencionan que un antihelmíntico que tiene una eficacia por debajo del 80%, se considera como no eficaz. En el caso de la presente investigación, la cepa utilizada para la infección de las alpacas fue obtenida de fasciolas provenientes del hígado de un ovino, posiblemente resistente al TCBZ, por el uso frecuente de diferentes formulaciones comerciales y por mucho tiempo en el valle de Cajamarca, lo cual ha dado lugar a confirmar el fenómeno de resistencia de la *Fasciola hepatica* al fármaco estudiado.

Este resultado es concordante con lo manifestado por Álvarez et al. (2005) y por Lin (2003), quienes manifiestan que existen varios mecanismos moleculares por los cuales disminuye la eficacia de TCBZ frente a *Fasciola hepatica*, entre ellos el eflujo mediado por transportadores donde se sobreexpresa la acción de la Gp-P; o por lo reportado por Kelley et al. (2016), que dicen que la Gp-P tiene efecto sobre la absorción y la eficacia de TCBZ *in vitro* utilizando los aislados tanto resistentes como susceptibles. Además Prichard y Roulet (2007), manifiestan que la sobreexpresión de la Gp-P se ha relacionado con el desarrollo de resistencias frente a diferentes clases de antihelmínticos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES

#### Conclusiones:

1. La eficacia del TCBZ a la dosis de 12 mg/kg. de p.v. por vía oral en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, mediante la prueba de reducción del número de huevos en heces, fue nula a los 7 y 14 días post tratamiento, respectivamente.
2. La eficacia del TCBZ a la dosis de 12 mg/kg. de p.v. por vía oral en alpacas artificialmente infectadas con *F. hepatica*, mediante la prueba de eficacia absoluta fue nula.
3. Quedó demostrado que la eficacia absoluta del TCBZ es “insuficientemente activa”, en el control de Fasciolosis en alpacas de Cajamarca.
4. Los resultados encontrados en la presente investigación, sugieren que la hipótesis planteada ha sido corroborada, en razón de que el uso del TCBZ no mostró eficacia alguna.

#### Recomendaciones:

1. Seguir investigando sobre la eficacia absoluta, del Triclabendazol en el control de la *Fasciola hepatica*, en otras especies, con cepas sensibles y resistentes, en otros lugares de la Región Cajamarca.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Adams, H. 2003. "Farmacología y Terapéutica Veterinaria", 2 ed. S. A. Acribia, ed., Zaragoza-España.: pp. 1-1294.
- Álvarez L; Solana, H; Mottier L; Virkel G; Fairweather; Lanusse C. 2005. Altered drug influx/ efflux and enhanced activity in triclabendazole resistant liver flukes. *Parasitology*, 131: pp. 501-510.
- Blood D. C. y Radostits O. M. 1992. *Medicina Veterinaria*. 7ª Edición. México: Interamericana McGraw-Hill. pp. 110 – 116.
- Boray, J. 1986, "Trematode infections of domestic animals.," In: Campbell WC. ed. Rew RS *Chemotherapy of parasitic disease*. London: Planum Press.: pp. 401-425.
- Boray, J. 1994. *Diseases of domestic animals caused by flukes*. FAO, Roma, pp. 1-32.
- Booth, N. y McDonald, L. 1987. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 5ª Edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España. p. 836.
- Cabrera, M., Ortiz, P., Llanos P. 2013. Situación actual de las parasitosis gastrointestinal y hepática en alpacas (*Lama pacos*) y vicuñas (*Vicugna vicugna*) en Cajamarca, Perú. WAAVP. Australia. 25 – 29 August. p. 536.
- Cafrune, M., Aguirre, D., & Freytes, I. 2004. Fasciolosis en vicuñas (*Vicugna vicugna*) en semi-cautiverio de Molinos, Salta, Argentina, con notas de otros helmintos en éste hospedador. *Vet. Arg.*, 21, pp. 513-520.

- Cafrune, M., Rebuffi, E., Cabrera, R., & Aguirre, D. 1996. *Fasciola hepatica* en llamas (*Lama glama*) de la Puna Argentina. *Vet. Arg.*, 23, pp. 570-574.
- Castro, A., Ghezzi, M., Alzola, R., Lupidio, C., & Rodríguez, J. 2001. Morfología del hígado de llamas (*Lama glama*). *Rev.Chil.Anat.*, 19, (3) pp. 1-6
- Chávez, V.A., Sánchez, R.L., Arana, D.C., & Suárez, A.F. 2012. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Rev.Inv.Vet.Perú.*, 23, (1) pp. 90-97.
- Cipriani, A. 2007. Determinación del grado de lesión con respecto al grado de infección causada por Distomatosis Hepática en alpacas de Ayacucho. APPA – ALPA – Cusco, Perú. pp. 1-6.
- Claxton, J., Zambrano, H., Ortiz, P., Delgado, E., Ecurra, E., Clarkson, M. 1998. Strategic control of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Vet. Rec.* 143: pp. 42–45.
- Coles, G.C. 2005. Anthelmintic resistance - looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, 78, (2) pp. 99-108.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., & Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 44, (1-2) pp. 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., & Vercruysse, J. 2006. The detection of

anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136, (3-4) pp. 167-185.

Cordero del Campillo, M., Rojo Vásquez, F., Martínez Fernández, A., Sánchez Acedo, C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, J., Díez Baños, P., Quiroz Romero, H. y Carvalno Valera, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Primera Edición en español. Editorial Interamericana-España. Capítulo 18: pp. 260-271.

Dennis, W.R.; Stone, W.M.; Swanson, L. E. 1954. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in faeces. *J. Am.Vet.Med.Assoc.* 124: pp. 47-50.

Díez, B. P. 2011, "Fasciola y Fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias.," Santiago de Compostela ed. España: pp. 1-214.

Espinoza, J., Terashima, A., Herrera-Velit, P., & Marcos, L. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev.Perú.Med.Exp.Salud Pública*, 27, (4) pp. 12-604

Gaasenbeek, C.P.H., Moll, L., Cornelissen, J.B.W.J., Vellema, P., & Borgsteede, F.H.M. 2001. An experimental study on Triclabendazole resistance of *F. hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 95, (1) pp. 37-43.

Geary, T.G., Hosking, B.C., Skuce, P.J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W., & Vercruyse, J. 2012. (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Veterinary Parasitology*, 190, (1-2) pp. 306-316.

- González, M., Pérez, M., Guerra, H., Solano, R., Casanova, M. 2011. Fasciolosis: presentación de dos casos. *Rev. Ciencias Médicas*. Abril – jun. 15 (2): pp. 311-319.
- Gorman, T., Wenzel, J., Lorca, M., Ibarra, L., San Martín, B., Alcaíno, H. 1990. Pruebas de inmunoprecipitación y hemoaglutinación indirecta en el diagnóstico de la Fasciolosis ovina. *Parasitol. al Día* 14; (3-4): pp. 51-56.
- Hanna, R.E.B., Edgar, H.W.J., McConnell, S., Toner, E., McConville, M., Brennan, G.P., Devine, C., Flanagan, A., Halferty, L., Meaney, M., Shaw, L., Moffett, D., McCoy, M., & Fairweather, I. 2010. *Fasciola hepatica*: Histological changes in the reproductive structures of Triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes after treatment in vivo with TCBZ and the related benzimidazole derivative, Compound Alpha. *Veterinary Parasitology*, 168, (3-4) 240-254.
- Hanna, R.E.B., Scarcella, S., Solana, H., McConnell, S., & Fairweather, I. 2012. Early onset of changes to the reproductive system of *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with Triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, 184, (2-4) 341-347.
- Ibarra, F., Vera, Y., Quiroz, H., Cantó, J., Castillo, R., Hernández, A., & Ochoa, P. 2004. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology*, 120, (1-2) pp. 65-74.
- Kassai, T. 2002, "Helminología Veterinaria.," 1 ed. S. A. Acribia, ed., Zaragoza-España.: pp. 1-296.

- Kelley J., Elliott T., Beddoe T., Anderson G., Skuce P., Spithill T. 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. Trends in Parasitology. Australia. Vol. 32, (6). pp. 458-469.
- Lin JH. 2003. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. AdvDrug Deliv Rev. 55: 53-81.
- Londoño, B.P., Chávez, V.A., Li, E.O., Suárez, A., & Pezo, C.D. 2009. Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvarias de *Fasciola hepatica* en altitud sobre los 4000 msnm en la sierra sur del Perú. Rev Inv Vet Perú, 20, (1) pp. 58-65.
- Márquez D. 2007. Resistencia a los Antihelmínticos. CORPOICA. Colombia: PRODUMEDIOS. pp. 3 - 25.
- Martínez, R., Domenech, I., Millán, J., Pino, A. 2012. Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. Vol.50 N°1. Ciudad de la Habana ene.-abr.
- Mas-Coma, S., Valero, M., & Bargues, M. 2009. *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. Advances on parasitology, 69, pp. 40-146
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., & Valero, M.A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. International Journal for Parasitology, 35, (11-12) pp. 1255-1278.

- McConville, M., Brennan, G.P., Flanagan, A., Edgar, H.W.J., Hanna, R.E.B., McCoy, M., Gordon, A.W., Castillo, R., Hernández-Campos, A., & Fairweather, I. 2009. An evaluation of the efficacy of compound alpha and Triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 162, (1-2) pp. 75-88.
- Mottier, L.; Virkel, G.; Solana, H.; Álvarez, L.; Salles, J.; Lanusse, C. E. 2004. Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidised metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, 34: pp. 1043-1057.
- Mottier L; Álvarez L; Fairweather L; Lanusse C. 2006. Resistance induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *Journal of Parasitology*, 92: pp. 1355 – 1360.
- Nari A. y Fiel C. 2001. Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo - Uruguay: Editorial Hemisferio Sur. pp. 230 – 240.
- Oliveira, D., Ferreira, D., Stival, C., Romero, F., Cavagnolli, F., Kloss, A., Araújo, F., & Molento, M. 2008. Resistencia al Triclabendazol de la *F.hepatica* en ovejas y cabras durante un brote en Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. *Parasitología Veterinaria*, 17, (1) pp. 149-153.
- Ortiz, O.P., Castope, L.N., Cabrera, N.M., Farias, P.C., Alvarez, R.L., Suarez, V.G., Lanusse, L.C., 2011. Comparative systemic availability of Triclabendazole after administration of different oral formulations in dairy cattle. In: Proceedings of the XXIII World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Buenos Aires, Argentina.



- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P., & Solana, H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*, 195, (1-2) pp. 118-121.
- Papadopoulos, E., Gallidis, E., & Ptochos, S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A review. *Veterinary Parasitology*, 189, (1) pp. 85-88.
- Prichard, R. K.; Roulet, A. 2007. ABC transporters and  $\beta$ -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, 134: pp. 1123-1132.
- Quiroz, H. 1999, "Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos," Limusa S.A. México ed. pp. 232-264.
- Quiroz, H. 2000. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Primera Edición. Editorial Limusa. México. p. 151, 152,153.
- Quiroz, H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Editorial Limusa S.A., México. pp. 232-251.
- Rojas M. 1990. Parasitismo de los Rumiantes Domésticos. Lima –Perú: MAIJOSA. pp. 112-116.
- Rojas, J. 2009. Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en Bovinos de la Campiña de Cajamarca. *Revista Veterinaria Argentina*. pp. 1-6
- Rojas, J. 2012. Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en bovinos de Cajamarca – Perú. <http://www.engormix.com/MAGanaderiacarne/sanidad/articulos/resistencia-Fasciola-hepatica-triclabendazol-t4052/165-p0.htm>.

- Rojo Vázquez, F. A. & Ferre Pérez I. 1999, "Fascicles. En: Parasitological Veterinaria," Editores. McGraw-Hill Interamericana ed. pp. 21-272.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., & Martínez-Valladares, M. 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, (1) pp. 15-38.
- Sanyal, P.K. & Gupta, S.C. 1996. Efficacy and pharmacokinetics of triclabendazole in buffalo with induced Fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 63, (1-2) pp. 75-82.
- Sumano, H., 1996. *Farmacología Clínica en Bovinos*. 1ª Edición, Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. p. 652.
- Sumano, H. y Ocampo, 1997. *Farmacología Veterinaria*. 2ª Edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 290-300.
- Timoteo, O., Maco, J., Maco, V., Neyra, V., Yi, P.J., Leguía, G., & Espinoza, J.R. 2005. Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106, (1-2) pp. 77-86.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A., Jennings, F. 2001. *Parasitología Veterinaria*. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España). pp. 117-127.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., & Vercruyse, J. 1995. (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of

anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58, (3) pp. 181-213.

Vaughan J. 2013. Liver fluke in alpacas. Australia. Artículo. <http://www.criagenesis.cc/>. pp. 1-7.

Vignau, M., Venturini, L., Romero, J., Eiras, D., Basso, W. 2005. *Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. 1° Ed. Buenos Aires – Argentina. pp. 65-69.

Young, K., Garza, V., Snowden, K., Dobson, R., Powel, D., Craig, T. 1999. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Vet. Parasitol.* 85: pp. 205-214.

## **ANEXOS**

**Anexo 1. Técnica de Dennis Stone Swanson modificada** (Dennis et al., 1954)

- Pesar 2 g de heces en una balanza.
- Disolver las heces en aproximadamente 50 ml de agua.
- Filtrar en el embudo tamiz metálico de 86 hilos por pulgada y recibirlo en el vaso cónico de vidrio de 250 ml y llenar con agua.
- Dejar sedimentar por 10 minutos.
- Eliminar las  $\frac{3}{4}$  partes de agua y dejar el sedimento.
- Llenar nuevamente con igual cantidad de agua y dejar sedimentar.
- Repetir el mismo procedimiento, hasta que el agua este un poco clara y eliminar el sobrenadante, dejando unos 3 ml de sedimento.
- Agregar una gota de azul de metileno al 1%, agitar
- Vaciar el sedimento en una placa Petri rayada y observar en el estereoscopio.
- Contar el número de huevos de fasciolas en todo el sedimento.

## **Anexo 2. Protocolo cultivo y mantenimiento de caracoles**

(Laboratorio de Inmunología e Investigación “Grupo de Investigación en Tremátodos” UNC.)

### **Materiales:**

- Depósitos de plástico
- Pinzas de plástico y metal
- Tamiz
- Agua corriente
- Placas Petri
- Cajas de plástico de 5 lt
- Calcio para tortuga comercial
- Sistema de aireación
- Lechugas molidas y deshidratadas
- Estereoscopio

### **Procedimiento:**

1. Recolección de caracoles dextrógiros, en el campo, usando una pinza de plástico o bien de metal pero teniendo cuidado de no dañarlos.
2. En el laboratorio los caracoles colocarlos en un tamiz y proceder a lavarlos con agua corriente por unas 3 o cuatro veces, y luego pasarlos a varias placas Petri para identificarlos bajo el estereoscopio.
3. Se prepara cajas de plástico (5 lt), con agua declorada en un volumen de 4lt y agregamos calcio para tortuga comercial, de similar forma llevamos el procedimiento en las cajas pequeñas.
4. Colocar simultáneamente el sistema de aireación para ir acondicionando el agua.

5. Una vez limpios los caracoles, separarlos por tamaños y proceder a colocarlos en el medio a razón de 15 a 25 caracoles por caja. La alimentación se realiza con una dieta a base de plantas verdes molidas y deshidratadas.
6. Tapar las cajas y mantenerlas bajo la luz artificial por 4 horas y foto periodo 12h/12h.
7. Terminado este proceso, en su respectiva caja se controla la ovoposición. Al encontrar masas de huevos (normalmente entre el 5<sup>to</sup> y 9<sup>to</sup> día) se retira los caracoles y se deja las masas de huevos, en lo posible se evita tocarlas, también se cambia el agua de los recipientes para así eliminar las heces y nuevamente se agrega agua, calcio y alimento.
8. Las masas de huevos eclosionan entre 11 y 15 días post ovoposición, esto depende de la temperatura (temperatura ambiente de 21°C). Al eclosionar, colocar alimento en las cajas y dejar que los caracoles vayan creciendo, evitar cambiar el agua por unas 2 semanas, solo agregar sulfato de calcio y la cantidad de agua que se evapore.

### **Anexo 3. Protocolo incubación de huevos de *Fasciola hepatica***

(Laboratorio de Inmunología e Investigación “Grupo de Investigación en Tremátodos” UNC.)

#### **Materiales:**

- Pipeta Pasteur.
- Vaso plástico de 100 ml.
- Papel de aluminio
- Agua destilada
- Huevos lavados (\*)
- Estereoscopio
- Propipeta

#### **Procedimiento:**

(\*)Primero con los huevos obtenidos de bilis de ovinos o de fasciolas incubadas en suero realizar una sedimentación, al inicio con agua de caño y seguidamente con agua destilada, hasta observar que los huevos van quedando limpios.

1. Colocar el contenido de la bilis de ovino o de fasciolas incubados con suero en un vaso plástico de 150 ml. Dejar sedimentar durante 15 minutos (el tiempo al inicio es mayor por la cantidad de detritos).
2. Descartar el sobrenadante con el uso de la propipeta hasta tener 20 ml en el vaso, luego agregar agua destilada hasta completar el vaso, dejar sedimentar durante 10 minutos y repetir el paso por 5 a 6 veces.



3. Al momento de terminar con el último descarte de sobrenadante dejar sedimentar un par de minutos y observar al estéreo para asegurarnos que no haya detritos, de no ser así seguir lavando.
4. En un vaso de 100 ml colocar 2 a 3 ml de huevos lavados de *Fasciola hepatica* (esto va a depender de la cantidad de huevos que observemos luego del lavado) y completar con agua destilada hasta la medida 90 ml de vaso.
5. Forrar el vaso totalmente con papel aluminio (no colocar la tapa del vaso) y seguidamente identificar.
6. Dejar incubar por 15 a 20 días a temperatura ambiente en oscuridad, para obtener los miracidios.

#### **Anexo 4. Protocolo infección de caracoles**

(Laboratorio de Inmunología e Investigación “Grupo de Investigación en Tremátodos” UNC.)

##### **Materiales:**

- 2 Pipetas Pasteur (vidrio)
- 1 Pipetas Pasteur de plástico
- Pinza de plástico
- Pincel
- 2 Placas Petri
- Estereoscopio
- Agua destilada
- Placa de ELISA limpia
- Caracoles
- Vasos con huevos incubados

##### **Procedimiento.**

1. Sacar los vasos incubados y abrir la cubierta de aluminio evitando que les llegue la luz directamente. Introducir la pipeta de plástico y dejar el contenido, para de esta forma homogenizar los huevos, luego extraer 2ml del incubado en una placa Petri, completar la placa con agua destilada y colocar a la luz durante 5 minutos.
2. Con la pinza de plástico sacar los caracoles y colocarlos en la placa Petri, luego con la pipeta de plástico rociarles agua destilada sobre la concha, esto para limpiar los caracoles de tierra y/o heces, ayudarse con el pincel, luego observar bajo

estereoscopio que hayan quedado limpios. Caso contrario descartar el agua y repetir.

3. Llevar al estereoscopio y observar que estén libres de detritos (heces, tierra, etc), así mismo observar que los huevos hayan eclosionado. Una vez confirmado este paso ayudado por la pipeta pasteur de vidrio (la que tiene la punta doblada), atrapar los miracidios, para luego colocarlos en cada uno de los pocillos de la placa de ELISA (2 a 3 miracidios por pocillo, seguidamente completar cada pocillo con agua destilada, evitando derramar el contenido.
4. Ayudado de la pinza de plástico tomar un caracol y colocar en cada pocillo que contiene 3 miracidios. Observar al estereoscopio y observar la presencia de miracidios. Así sucesivamente con todos los caracoles que queramos infectar, siempre con ayuda del pincel mantenerlos dentro del pocillo. Finalmente tapar y mantener sumergidos durante 4 a 6 horas, después nuevamente observar al estéreo para asegurar que no haya la presencia de miracidios.

Terminado este proceso, colocar los caracoles en su respectiva caja de plástico.

## **Anexo 5. Protocolo estimulación de caracoles y obtención de metacercarias**

(Laboratorio de Inmunología e Investigación “Grupo de Investigación en Tremátodos” UNC.)

### **Materiales:**

- Pipeta Pasteur
- Bolsa de plástico de 100 ml
- Agua destilada helada (4°C)
- Caracoles infectados
- Estereoscopio
- Guantes de nitrilo (color distinto al crema)
- Placa Petri
- Hoja de bisturí
- Vaso plástico de 100ml
- Tijeras
- Piceta con agua destilada
- Microtubos de 1.5ml

### **Procedimiento:**

1. Con la pinza de plástico sacar los caracoles y colocarlos en la placa Petri, luego con la pipeta de plástico rociarles agua destilada sobre la concha, esto para limpiar los caracoles de tierra y/o heces, ayudarse con el pincel, luego observar bajo estereoscopio que hayan quedado limpios. Caso contrario descartar el agua y repetir.

2. Llenar una bolsa con 50 ml aproximadamente de agua destilada helada (4°C), con ayuda de la pinza plástica colocar la cantidad de caracoles prevista (3 a 5 caracoles por bolsa).
3. Torcer el lado abierto de la bolsa, retirando de esta manera el aire de la parte que contiene agua, **ES MUY IMPORTANTE** evitar que quede aire, ya que si esto sucede los caracoles se pegarían y no producirían metacercarias.
4. Luego del paso anterior envolver la parte torcida en un gancho y colocar la bolsa en oscuridad por 24 hrs.
5. Pasadas las 24 hrs observar la presencia de metacercarias, de observarse alguna cercaría sin enquistar dejar por unas horas más.
6. Sacar el gancho de la bolsa y soltar la torsión, colocar la bolsa dentro del vaso y con las tijeras cortar la parte sobrante del plástico que no ha tenido contacto con el agua. Fijándose en el filo de unión de la bolsa cortar hasta llegar la final de la bolsa y dejar caer el agua en el vaso, así mismo caerán los caracoles y otros estarán pegados en la bolsa.
7. Lavar el plástico de la presencia de algún detrito, esto con la piceta, suavemente evitando desprender las metacercarias enquistadas. Terminado este paso siempre cerrar la bolsa con los lados interiores cara a cara, esto para evitar que alguna metacercaria se desprenda.
8. Colocar la bolsa en una placa Petri y observar al estereoscopio, a este tiempo contar las metacercarias y cortar la bolsa por la mitad con el uso del bisturí y la pinza.

9. Una vez terminado el conteo colocar las bolsas dentro de los microtubos de 1.5ml, para esto ayudados con la pinza doblaremos la bolsa siempre manteniendo el lado abierto hacia arriba, introducir la bolsa en el microtubo y agregar agua destilada para evitar la desecación.
  
10. Finalmente identificar y guardar en refrigeración con la tapa del microtubo entreabierta.

Nota: Cada dos o 3 semanas observar la cantidad de agua que hay en cada tubo, de ser necesario agregarle agua destilada.

## **Anexo 6. Protocolo para recopilación y análisis de hígado**

(Laboratorio de Inmunología e Investigación “Grupo de Investigación en Tremátodos” UNC.)

### **Materiales:**

- Guantes de nitrilo
- Mandil
- Cuchillos
- Bisturís
- Pinzas
- Tabla de cortar
- Baldes pequeños
- Gasa
- Tamices
- Agua tibia

### **Procedimiento:**

1. Recoger los hígados en bolsas debidamente identificadas, de acuerdo con la secuencia de la matanza.
2. Comprobar en el laboratorio el número de identificación, y llenar un balde con agua tibia.
3. Lavar la parte interna de la bolsa y tamizar todo el contenido. Importante: el lavado y tamizado de todos los materiales es obligatorio para no perder ningún parásito especialmente las pequeñas cabezas rotas. Siempre el lavado a contracorriente del tamiz, en el balde grande etiquetar para su posterior análisis.

4. Se comenzará la búsqueda de fasciolas en el hígado y los conductos biliares engrosados. Con un bisturí, tijera o el borde de un cuchillo fino agudo, abrir longitudinalmente los conductos biliares engrosados (evitar el corte de las fasciolas), recoger las fasciolas con unas pinzas y ponerlos en suero fisiológico a 37°C).
5. Después de terminar con los conductos engrosados, o si no hay el parásito, empezar a cortar el hígado en grandes trozos (2 a 4 cm de espesor), (Foto 20).
6. Buscar los parásitos con calma y con cuidado. Recoger todas los parásitos visualizados con una pinza y ponerlos en el frasco con suero fisiológico a 37°C.
7. Apretar suavemente los conductos biliares para la expulsión de las fasciolas.  
Importante: Nunca se debe apretar un conducto biliar calcificado.
8. Apretar los cortes de hígado (suavemente), en agua tibia.
9. Luego cortar el hígado en trozos pequeños de 1 ó 2 cm, y poner en el interior de una gasa abierto, formando una bolsa (Foto 21). Un puñado de cubitos de hígado es suficiente para una bolsa.
10. Estas bolsas de gasa se apretaran de nuevo en agua a 37°C (con firmeza esta vez), los cubos son entonces dispuestos y la gasa se encuentra inmersa en la misma agua para el lavado (trematodos generalmente se adhieren a la gasa).
11. Repita el mismo procedimiento hasta que se procese todo el hígado;
12. Al final todo el contenido de la cubeta y el lavado se tamiza. Verter el contenido lentamente, el tamiz se lava a contracorriente.



13. Todo el sedimento recogido se homogeniza y se vierte sobre la bandeja oscura.
14. Recoger y buscar fasciolas y ponerlos en un frasco con agua destilada, con mucho cuidado.
15. Limpiar todos los materiales y proceder al siguiente hígado.

**Tabla 3.** Carga parasitaria expresada en hpg, día 0 antes del tratamiento en alpacas (*Lama pacos*) infectadas artificialmente con *Fasciola hepatica*.

<b>N° animales</b>	<b>Grupo control sin tratamiento</b>	<b>Grupo Triclabendazol</b>
<b>1</b>	2	7
<b>2</b>	1	3
<b>3</b>	2	2
<b>4</b>	2	4
<b>5</b>	1	3
<b>Σ</b>	8	19
<b>Promedio</b>	1,6	3,8

Los análisis coproparasitológicos realizados en ambos grupos resultaron positivos a *Fasciola hepatica*, considerándose satisfactoria la infección artificial.

**Tabla 4.** Registro de datos obtenidos en el grupo Triclabendazol

<b>Nº animales</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Edad (meses)</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Día 7 hpg</b>	<b>Día 14 hpg</b>	<b>Nº Fasciolas adultas día 14 necropsia</b>
<b>1</b>	32	18	3.2	24	25	7
<b>2</b>	31	18	3.1	0	0	3
<b>3</b>	35	18	3.5	4	6	3
<b>4</b>	29	18	2.9	2	4	9
<b>5</b>	34	18	3.4	2	1	4

**Tabla 5.** Registro de datos obtenidos en el grupo control sin tratamiento.

<b>Nº animales</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Edad (meses)</b>	<b>Día 7 hpg</b>	<b>Día 14 hpg</b>	<b>Nº Fasciolas adultas día 14 necropsia</b>
<b>1</b>	30	18	2	1	1
<b>2</b>	25	18	1	1	1
<b>3</b>	35	18	93	4	4
<b>4</b>	31	18	4	1	4
<b>5</b>	35	18	18	0	1

**Tabla 6.** Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, día 7 post tratamiento

	Control	Triclabendazol
Media	3,8	6,4
Varianza	3,7	98,8
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,894369079	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,703473915	
P(T<=t) una cola	0,260275551	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	<b>0,520551102</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644505	

No existe diferencia significativa.

Valor T: **0,520551102**

Para que exista diferencia significativa debería de ser menor a 0,05.  $P < 0,05$

En este caso es mayor.

**Tabla 7.** Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, día 14 post tratamiento

	Control	Triclabendazol
Media	3,8	7,2
Varianza	3,7	104,7
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,878965644	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,884984651	
P(T<=t) una cola	0,213078752	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	<b>0,426157505</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

No existe diferencia significativa.

Valor T: **0,426157505**

Para que exista diferencia significativa debería de ser menor a 0,05.  $P < 0,05$

**Tabla 8.** Prueba t Student para medias de dos muestras emparejadas, para la eficacia absoluta

	Control	Triclabendazol
Media	2,2	5,2
Varianza	2,7	7,2
Observaciones	5	5
Coeficiente de correlación de Pearson	0,272165527	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-2,449489743	
P(T<=t) una cola	0,035241998	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	<b>0,070483997</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Valor T: **0,070483997**

Para que exista diferencia significativa debería de ser menor a 0,05.  $P < 0,05$

No existe diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento  $P > 0,05$ .

**Anexo 8. Fotos**



**Foto 1.** Recolección de caracoles



**Foto 2.** Fasciolas adultas e incubación de huevos



**Foto 3.** Frascos de 100 ml con huevos



**Foto 4.** Frascos llevados a incubación para obtención de miracidios



**Foto 5.** Eclósión de miracidios



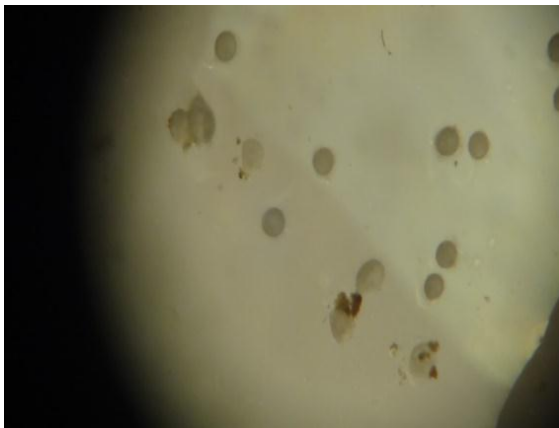
**Foto 6.** Miracidios en placa Petri



**Foto 7.** Placa de ELISA (3 miracidios por pocillo)



**Foto 8.** Estimulación de caracoles



**Foto 9.** Obtención de metacercarias



**Foto 10.** Selección de los animales



**Foto 11.** Instalación en el Fundo Tartar



**Foto 12.** Identificación de las alpacas





**Foto 13.** Pesado de las alpacas



**Foto 14.** Infección con metacercarias



**Foto 15.** Tratamiento con TCBZ



**Foto 16.** Análisis en laboratorio



**Foto 17.** Sacrificio y recolección de hígado



**Foto 18.** Conductos biliares engrosados





**Foto 19.** Conducto biliar con fasciolas



**Foto 20.** Trozos de 2 cm de espesor



**Foto 21.** Preparación bolsitas de gasa



**Foto 22.** Frasco con fasciolas.