

Artículos Originales //

Brote familiar de fascioliasis en Venezuela

Belkisyolé Alarcón de Noya¹, Elina Rojas², Cecilia Colmenares¹, Carmen Morales², Rosa Contreras¹, Sharon Kay Valero³, Dalila Hernández², Sonia Briceño², Jose Vicente Scorza² & Oscar Noya¹

De los 9 casos de fascioliasis humana registrados en Venezuela, 4 han sido publicados en los últimos 10 años, siendo 2 de éstos procedentes de la región andina. El riesgo de endemidad frecuente en bovinos y la condición clínica de una niña de 14 años, con malestar abdominal, vómitos, eosinofilia y antecedentes de ingestión abundante de berros, motivó realizar un estudio en su lugar de procedencia (Timotes, Edo. Mérida), para conocer la exposición de la comunidad al riesgo de infección. Se evaluaron 65 personas, a quienes se les realizó historia clínica, con consentimiento previa información, toma de muestras de sangre, exámenes de heces (n=37) y ecografía abdominal (n=33). Se practicó ELISA con extracto soluble de adultos de *Fasciola hepatica* (ELISA-AFhES), resultando 9 personas positivas. Se practicó "Western blot" (WB) a todos los sueros positivos en ELISA, de los cuales 5 reconocieron moléculas específicas de 9, 14, 27 y 65 kDa, lo que constituye un patrón de positividad al WB. Los cuatro sueros restantes, con débil reactividad al ELISA, no reconocieron estas moléculas. Por estudios coprológicos se encontraron *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* y *Ascaris lumbricoides*. Tres de las 5 personas positivas por ELISA-AFhES y WB-AFhES resultaron con huevos de *Fasciola hepatica* en las heces. Los 5 casos positivos corresponden a niñas de una familia, todas hermanas, cuyos padres resultaron sin infección, a pesar de que todos ingieren berros y ensaladas con productos de la región. El presente estudio constituye el primer reporte de transmisión a humanos en una población de un área bien delimitada en la región andina venezolana.

Palabras claves: fascioliasis, Venezuela., ELISA, "Western blot".

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada principalmente por *Fasciola hepatica*, la cual afecta humanos y animales herbívoros, distribuida en Europa, África, América y Oceanía y por *Fasciola gigantica* en África y Asia. Actualmente esta parasitosis presenta un alto grado de expansión constituyéndose en una patología emergente y re-emergente en muchos países y presentando un

incremento en prevalencia e intensidad, por la gran capacidad de colonización de su agente causal y especies de vectores (Mas-Coma, 2004; 2005). Por otra parte, cuando la fascioliasis afecta bovinos, ocasiona pérdidas considerables en la industria pecuaria y alimenticia (Fredes, 2004). En algunos países constituye un verdadero problema de salud pública en humanos, reportándose casos en los 5 continentes en áreas endémicas con rangos que van desde hipo a hiperendémicas (Mas-Coma *et al.*, 1999a; Mas-Coma, 2005). Una de las características epidemiológicas singulares de la fascioliasis es su presencia en regiones de elevada altitud (Mas-Coma *et al.*, 2005), como es el caso del Altiplano Boliviano, descrito como un área de hiperendemicidad en humanos (Mas-Coma *et al.*, 1999b; Esteban *et al.*, 1999; Mas-Coma, 2005).

¹ Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Zona Postal 1041-A, Apdo. 47623, Caracas, Venezuela.

² Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" NURR-Universidad de Los Andes; Edo. Trujillo, Venezuela.

³ Hospital Sor Juana Inés de Mérida, Edo. Mérida, Venezuela.

*Autor de correspondencia: belkisyole@yahoo.com.mx

El diagnóstico de la fascioliasis usualmente se basa en el hallazgo fortuito de los huevos del parásito en las heces. El diagnóstico coprológico es de baja sensibilidad, debido a que en la fase prepatente de infección, el helminto se encuentra en forma inmadura y en fase crónica la excreción de huevos es escasa e intermitente (Espino *et al.*, 2000). Las dificultades para lograr el diagnóstico parasitológico justifican la utilización de métodos inmunológicos para evidenciar la enfermedad en el hombre y los animales (Colmenares *et al.*, 2003).

Los métodos indirectos de diagnóstico como son las imágenes obtenidas por radiografía, ultrasonido convencional y endoscópico, tomografía computarizada ó resonancia magnética nuclear, permiten encontrar hepatomegalias y otras imágenes útiles para mantener el diagnóstico y darle soporte al seguimiento de la enfermedad (Fredes, 2004; Zali *et al.*, 2004). Sin embargo, estos exámenes resultan costosos y algunas veces inaccesibles a las poblaciones de bajos recursos.

El primer reporte en Venezuela data de 1910 (Risqueuz 1929), luego del cual se han detectado sólo 8 más (Risqueuz, 1929; Barroeta, 1911; Rodríguez & González, 1975; Abdul-Hadi *et al.*, 1996; Scorza *et al.*, 1999; Incani *et al.*, 2002; Alarcón de Noya *et al.*, 2006), perteneciendo dos de ellos a la región andina.

Los casos de fascioliasis en Venezuela, se han presentado de manera esporádica como consecuencia del hallazgo de adultos del parásito en procedimientos imagenológicos o quirúrgicos, como también de huevos en hígado o heces por análisis histopatológicos o coproparasitológicos. Al disponer del diagnóstico inmunológico (Colmenares *et al.*, 2003), para la búsqueda activa de casos, las posibilidades de detectar esta infección parasitaria aumentan considerablemente.

En este trabajo se identifica un brote familiar de *F. hepatica*, en la población de Timotes, ubicada en los andes venezolanos, al norte del Estado Mérida, siendo una zona de clima frío, un poco más húmeda, pero con características ecológicas similares a las encontradas en el Altiplano Boliviano. La detección de infección en una niña hospitalizada por presentar dolor abdominal, fiebre y alta eosinofilia, nos incentivó a investigar la presencia de esta parasitosis en su comunidad de procedencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio

Se trabajó en una comunidad situada en los alrededores de la ciudad de Timotes, a 2.050 m sobre el nivel del mar, en el municipio Miranda del Estado Mérida, al occidente de Venezuela. Se comunicó a la población por intermedio de sus líderes naturales la existencia de esta parasitosis y la importancia de su participación en el presente estudio. Se implementó un consentimiento informado el cual cumplió con los requisitos de informar a la población sobre el propósito del muestreo, su importancia y el compromiso de las partes involucradas. Todos los niños estaban acompañados de sus representantes y se hizo hincapié en el acto voluntario de permitir la obtención y evaluación de muestras biológicas. El presente trabajo contó con la aprobación de la Comisión de Bioética del Centro de Investigaciones “José Witremundo Torrealba” del Núcleo Universitario “Rafael Rangel” de la Universidad de Los Andes. La evaluación clínica consistió en la recopilación de datos epidemiológicos, antecedentes de importancia médica, interrogatorio funcional, síntomas actuales, examen físico y ecografía. Por razones logísticas, estos dos últimos se practicaron sólo a aquellas personas quienes manifestaron síntomas de malestar abdominal (dolor, llenura post-pandrial, vómitos frecuentes, diarreas). La ecografía abdominal se practicó con un transductor curvo de 3,75 MHz de un equipo portátil marca Toshiba. Se exploró hígado, vías biliares, páncreas, riñones y abdomen en general, también útero y anexos en las mujeres.

Muestras

Se colectaron muestras de sangre por punción venosa en tubos sin anticoagulante y sin agregar preservativos post-centrifugación, para la obtención de sueros. Con una gota de sangre lograda inmediatamente después de la punción se realizaron extendidos sanguíneos. Se recogieron muestras de heces, las cuales fueron preservadas en solución de Railliet-Henry a razón de 2 gr de heces aproximadamente en 2 cm³ (Pessôa & Martins, 1982). Los sedimentos se examinaron exhaustivamente post-centrifugación. Los extendidos sanguíneos obtenidos fueron fijados con metanol por 5 minutos y posteriormente coloreados con Giemsa, para determinar la fórmula sanguínea.

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

Se extrajeron parásitos adultos de *F. hepatica* de los conductos biliares de bovinos infectados. Luego de lavarlos en solución salina estéril, se procedió según está señalado en los trabajos de Cesari & Alarcón de Noya (1987), Espino *et al.* (2000) y Colmenares *et al.* (2003).

Inmunoensayo enzimático con AFhES (ELISA-AFhES)

Para su realización se siguió la técnica de Voller *et al.* (1976) con algunas modificaciones, las placas Nunc-Immuno Maxi Sorp fueron sensibilizadas con 50 µL/pozo de AFhES a una concentración de 10 µg/µL, luego de 18 h a 4°C, las placas se lavaron dos veces con buffer salino fosfato (PBS) con 0,05% de Tween 20. Para el bloqueo se colocaron 150 µL/pozo de solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05% por 1 h. Luego se secaron y guardaron a 4°C hasta su uso.

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

Electroforesis y Western blot con AFhES (WB-AFhES)

Se realizó electroforesis con 72 µg de AFhES en 300 µL de buffer de muestra, en gel de poliacrilamida al 12,5 % bajo condiciones disociantes y no reductoras, luego se transfirió a papel de nitrocelulosa (NC) (Cleveland *et al.*, 1977; Towbin *et al.*, 1979). A continuación, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0,05%, al término de lo cual se secaron y guardaron a -20 °C hasta su uso.

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

Tratamiento

Las personas que resultaron positivas en este estudio recibieron triclabendazole (Egaten®) a razón de 10 mg/kg de peso en dosis única y en presencia del médico tratante.

RESULTADOS

Se evaluaron 65 personas en un rango de edad de 2,5 a 59 años, 43 del sexo femenino y 22 del masculino. Del interrogatorio se conoció que 38% se quejaron de dolor abdominal persistente ó frecuente y 10,6% tenían diarrea al momento ó en los últimos días previos al examen. Se practicó ultrasonido abdominal a 33 personas quienes tenían síntomas y también algunos niños bajo riesgo de infección, en la mitad de ellas (48%) se encontraron alteraciones ecográficas del área hepato-biliar (engrosamiento de pared vesicular 18%, imágenes hiperecogénicas dentro de vesícula biliar 6%, colédoco dilatado hiperecogénico 18% y otras alteraciones como hígado graso y hepatomegalia).

De las muestras recolectadas, se obtuvieron 65 sueros, se realizaron 60 extendidos y solamente se colectaron 37 muestras de heces. Todos declararon la ingestión frecuente y diaria de vegetales crudos (lechuga, berros, etc.) provenientes de la misma área en la cual habitan. En general presentaron muy baja prevalencia de parásitos intestinales. *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* se presentaron con frecuencias, cada una de ellas menor o igual a 5,4%. Los huevos de *Ascaris lumbricoides* se observaron en 2,7% y los de *F. hepatica* en 8% de las muestras examinadas. El 27% presentaron al menos un parásito en las heces.

Fig. 1. ELISA-AFhES de sueros de personas de una comunidad bajo riesgo de infección con *Fasciola hepatica*, Timotes, Edo. Mérida, 2005.

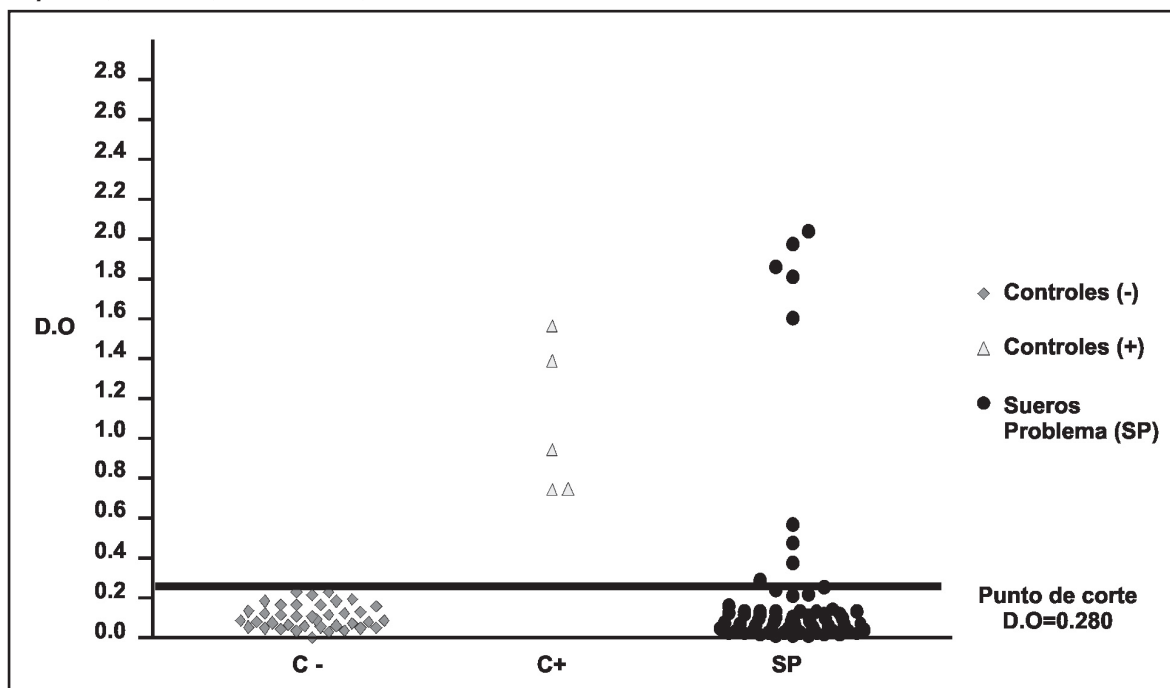
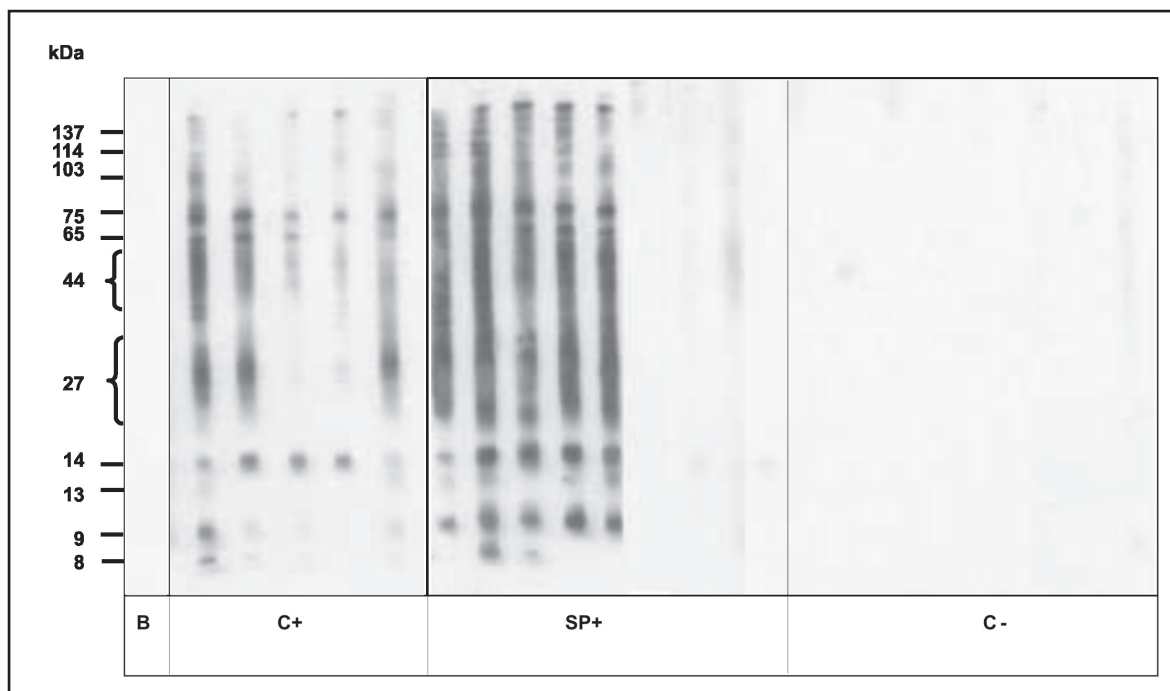


Fig. 2. “WB”-AFhES de sueros de personas positivas por ELISA-AFhES de una comunidad bajo riesgo de infección con *Fasciola hepatica*, Timotes, Edo. Mérida. C+= sueros controles positivos, C- = sueros controles negativos, SP+ = sueros de personas positivas por ELISA-AFhES .



Los resultados de ELISA-AFhES se muestran en la Fig. 1, en la cual 9 personas fueron positivas (14%), 4 de ellas con densidad óptica (D.O.) cercana al punto de corte y 5 resultaron francamente positivos (D.O.>1).

Se practicó WB-AFhES a todos los sueros positivos por ELISA-AFhES. Estos resultados se muestran en la Fig. 2. Los 5 sueros de personas que presentaron ELISA con D.O.>1, reconocieron las moléculas específicas de 9, 14, 65 y el área alrededor de 27 kDa del AFhES. Los restantes positivos por ELISA con valores cercanos al punto de corte fueron negativos por WB. Solamente se consideraron verdaderos casos de fascioliasis a las 5 personas cuyos sueros reconocieron este patrón de positividad por WB.

Se realizó conteo relativo de glóbulos blancos a 60 personas. Aquellas con inmunodiagnóstico positivo (ELISA + WB) presentaron de 18 a 51% de eosinófilos. Los 4 positivos por ELISA y negativos por WB tuvieron de 0 a 4% de eosinófilos. En las 51 personas restantes, se observó eosinofilia entre 0 a 39%, no atribuible a fascioliasis.

Las 5 pacientes diagnosticadas con fascioliasis recibieron tratamiento con triclabendazole (Egaten®). Estas personas resultaron ser hermanas, tres de ellas con huevos de *F. hepatica* en las heces. Cuatro meses después del tratamiento la clínica persistió y la coprología mostró huevos de *F. hepatica* en tres de los 5 casos. Por esta razón se les repitió el mismo tratamiento a todas las niñas, quienes controladas seis meses después, resultaron negativas a la coprología. Se mantiene control clínico, coprológico y serológico de estos pacientes.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró 8% de personas con huevos de *F. hepatica* en heces. Sin embargo, ELISA-AFhES fue positivo en 14%, confirmándose 5 casos por WB de los 9 positivos por ELISA. Las moléculas de 9, 14, 27 y 65 kDa presentaron reconocimiento específico, no fueron detectadas por sueros de personas sin fascioliasis, ni por aquellos con otras parasitosis. Otros estudios han reportado estas mismas moléculas como relevantes para el diagnóstico de esta enfermedad parasitaria (Díaz *et al.*, 1998; Espino *et al.*, 2000; Colmenares *et*

al., 2003; Colmenares *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003). La mayor positividad en ELISA podría explicarse por contacto con este parásito en el pasado, a través de la ingestión de verduras como ingredientes en distintas ensaladas o en jugos. Otra causa sería la reactividad cruzada con otros helmintos (Colmenares *et al.* 2005). En consecuencia, consideramos inmunodiagnóstico positivo para fascioliasis, cuando se presenten conjuntamente los dos ensayos positivos (ELISA y WB) con reconocimiento del mencionado patrón molecular por WB.

Los positivos por inmunodiagnóstico presentaron valores altos de eosinófilos (18-51%), parámetro de sospecha en los afectados por esta parasitosis. Las personas positivas por ELISA y negativas por WB tuvieron un porcentaje normal de eosinófilos en sangre. La cuantificación de eosinófilos se correspondió con los resultados obtenidos en el inmunodiagnóstico.

La presencia de imágenes ultrasonográficas relacionadas con patología hepática y biliar fue alta (48%) en personas quienes declararon molestias abdominales. En una de las pacientes se visualizó la ocupación de las vías biliares extrahepáticas por imagen móvil sugestiva de presencia de un helminto, comprobándose este caso por coprología y serología. El uso de ecografía abdominal ambulatoria debe incluirse en los programas de vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, especialmente dirigida a aquellos con sintomatología abdominal, ya que pudiera utilizarse como un indicador de patología hepato-biliar para su posterior confirmación diagnóstica.

El efecto de administración periódica de albendazole en programas contra las helmintiasis intestinales en escuelas y consultas médicas se reflejó en la baja frecuencia de helmintos encontrados en este estudio. El primer tratamiento con triclabendazole (Egaten®) fue insuficiente en algunos de los afectados, persistiendo en éstos la sintomatología y huevos en las heces. Al repetirse el tratamiento la cura fue total. En Venezuela no se dispone de triclabendazole de uso humano, dificultando la terapéutica.

Llama la atención que los 5 casos positivos corresponden a niñas de una familia, todas hermanas y cuyos padres no tienen la infección. Toda la familia ingirió berros y ensaladas con productos de la región. Pudiese existir otra fuente de infección adicional

a la ingestión de hortalizas como ocurre en Bolivia donde se ha descrito transmisión de la parasitosis por ingestión de agua contaminada con metacercarias del parásito (Mas-Coma *et al.* 1999b). Esta hipótesis no pudo demostrarse en esta investigación, pues ambos factores de riesgo (ingestión de berros y consumo de agua no tratada) fueron admitidos por todas las personas encuestadas. Es importante destacar que muestreos recientes (octubre 2005) sobre la fauna malacológica de esta área demostró la presencia de abundantes caracoles del género *Lymnaea*, cuya ubicación taxonómica es objeto de estudio (Pointier & Noya: com. pers.).

El estudio integral de la infección humana por *F. hepatica* debe ser multifactorial, incluyendo clínica, hematología, ecografía, coprología e inmunodiagnóstico. Los resultados demuestran la utilidad de combinar dos técnicas inmuno-serológicas que permiten un despistaje inicial de la población con ELISA-AFhES y un examen confirmatorio para llegar al diagnóstico definitivo a través del WB-AFhES, superando así la baja sensibilidad de los estudios coprológicos.

Hasta ahora el diagnóstico de fascioliasis se ha logrado por coprología, detectándose casos fortuitos aislados. Desde que se cuenta en el país con metodologías adecuadas, nuestro grupo ha diagnosticado 9 casos mas en 3 años, incluyendo los presentes. Esta aproximación podría ser una forma de abordaje de comunidades bajo riesgo de infección, siendo el presente trabajo el primer estudio de este tipo que propone una estrategia de vigilancia epidemiológica para esta trematodiasis en Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

A los representantes comunales, quienes organizaron de manera eficiente las jornadas de trabajo en el campo. A la compañía NOVARTIS de Venezuela por el suministro gratuito del medicamento. Proyecto FONACIT F-2005000199.

Family outbreak of fascioliasis in Venezuela

SUMMARY

Of the 9 cases of human fascioliasis recorded in Venezuela, 4 have been published in the last 10

years, 2 of them originating from Andean region. The well known transmission of fascioliasis in cattle and the clinical condition of a 14-year-old girl with abdominal discomfort, vomiting, eosinophilia and previous abundant ingestion of watercress, motivated the field study in the site of occurrence (Timotes, Edo. Mérida in the Andean region) to learn the risk of community infection. Sixty-five people were evaluated clinically and serologically. Coprology was done in 37 and abdominal ultrasound in 33 persons. ELISA with adult *Fasciola hepatica* soluble extract (AFhES-ELISA) was performed with 9 persons being positive. Western blot (WB) was carried out on all ELISA positive sera, resulting in 5 that recognized 9, 14, 27 and 65 kDa specific molecules. The remaining four sera, with weak reactivity by ELISA, did not have this recognition pattern. By stool examination, we found *Entamoeba coli*, *E. histolytica/dispar*, *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* and *Ascaris lumbricoides*. Three of the 5 positive people by AFhES-ELISA and AFhES-WB had *F. hepatica* eggs in their feces. The 5 positive cases are girls of a family, sisters and whose parents do not have the infection, although all consume watercress in salads with other vegetables from that region. The present study constitutes the first report of a well established focus of fascioliasis with human repercussion in Venezuela.

Key words: Fascioliasis, Venezuela, ELISA, Western blot.

REFERENCIAS

- Abdul-Hadi S., Contreras R., Tombazzi C., Alvarez M. & Melendez M. (1996). Hepatic fascioliasis: case report and review. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **38**: 69-73.
- Alarcón de Noya B., Sosa V. L., Colmenares C., Beker B., Contreras R. & Meo P. M. (2006). Localización pancreática de *Fasciola hepatica* en un caso humano autóctono proveniente del Edo. Bolívar, Venezuela. *GEN Rev. Soc. Venezolana Gastro*. **60**: 134-137.
- Barroeta J. F. (1911). *Gaceta Médica de Caracas*. **18**: 35-37.
- Cesari I. M. & Alarcón de Noya B. (1987). *Esquistosomiasis mansoni*. *Diagnóstico y Control*.

- Manual de campo y laboratorio. CEG. IVIC. Caracas, Venezuela.
- Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W. & Laemmli U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**: 1102-1106.
- Colmenares C., Castellano A., Méndez L., Bruces A. C., García F. & Alarcón de Noya B. (2003). Inmunodiagnóstico de Fascioliasis bovina y humana en Venezuela. *Acta Científica Venezolana*. **54** (Supl. 1): 221.
- Colmenares C., Méndez L., Díaz Z. & Alarcón de Noya B. (2005). Fraccionamiento del antígeno de excreción-secreción de adultos de *Fasciola hepatica* y su utilización en inmunodiagnóstico por Western Blot. *Parasitología Latinoamericana, FLAP*. **60**: 294.
- Díaz A., Li-Eliás O., Otero O., García C. & Espino A. M. (1998). Identificación, mediante "Western blot", de inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *Rev. Cubana Med. Trop.* **50**: 12-17.
- Espino A. M., Borges A. & Dumenigo B. E. (2000). Fecal antigens of *Fasciola hepatica* potentially useful in the diagnosis of fascioliasis. *Rev. Panam. Salud Pública*. **7**: 225-231.
- Esteban J. G., Flores A., Angles R. & Mas-Coma S. (1999). High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz Valley, Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 151-156.
- Fredes F. (2004). La Fascioliasis animal y humana. *Mon. Electr. Patol. Vet.* **1**: 38-67.
- Incán R. N., Vieira J. M., Pacheco M., Planchart S., Amarista M. & Lazdins J. (2002). Human infection by *Fasciola hepatica* in Venezuela: report of geriatric case. *Invest. Clin.* **44**: 255-260.
- Kim K., Yang H. J. & Chung Y. B. (2003). Usefulness of 8 kDa protein of *Fasciola hepatica* in diagnosis of fascioliasis. *Korean J. Parasitol.* **41**: 121-123.
- Mas-Coma S. (2004). Human fascioliasis. En: *World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. pp. 305-322. Eds. Crotruvo J. A., Dufour A., Rees G., Bartram J., Carr R., Cliver D. O. *et al.* IWA Publishing, London, UK.
- Mas-Coma S. (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology*. **79**: 207-216.
- Mas-Coma S., Esteban J.G. & Bargues M.D. (1999a). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull WHO*. **77**: 340-346.
- Mas-Coma S., Angles R., Esteban J. G., Bargues M. D., Buchon P., Franken M. *et al.* (1999b). The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Trop. Med. Int. Health*. **4**: 454-467.
- Mas-Coma S., Bargues M. D. & Valero M. A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1255-1278.
- Pessoa S. B. & Martins A. V. (1982). *Parasitología Médica*. 11 ed. Editorial Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- Risquez J. R. (1929). Estado actual de la parasitología en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*. (1904-1911). **25** (Nº extraordinario): 38-41.
- Rodríguez A. & González H. (1975). Sobre un nuevo caso humano de fascioliasis hepática en Venezuela. *Rev. Inst. Nac. Hig.* **8**: 111-114.
- Scorza J. V., Villegas E. & Morales C. (1999). Fascioliasis hepática en el Estado Trujillo, Venezuela: un segundo caso clínico. *Arch. Venez. Med. Trop.* **3**: 9-13.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **76**: 4350-4354.

- Voller A., Barlett A. & Bidweel D. (1976). Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**: 98-105.
- Zali M.R., Ghaziani T., Shahraz S., Hekmatdoost A. & Radmehr A. (2004). Liver, spleen, pancreas and kidney involvement by human fascioliasis: imaging findings. *BMC Gastroenterology*. **4**: 15-17.

Recibido el 18/05/2006

Aceptado el 14/01/2007
