



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS
PARA EL CONTROL DE LA
FASCIOSIS BOVINA: PRUEBA
DIAGNÓSTICA POR AMPLIFICACIÓN
ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE Y
ACTIVIDAD TREMATICIDA DEL
EXTRACTO DE *ALLIUM SATIVUM*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

CESAR ABEL BURGA CISTERNA

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

PhD, MSc, QF. Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño

CO-ASESORES

PhD, MSc, MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

Dr, Mg, QF. Américo Jorge Castro Luna

JURADO DE TESIS

DRA. MEDDLY LESLYE SANTOLALLA ROBLES

PRESIDENTE

DR. CESAR MIGUEL GAVIDIA CHUCAN

VOCAL

DR. IVAN KARLOS BEST CUBA

SECRETARIO

*A mis padres y hermana por su
eterna confianza y apoyo incondicional
en los momentos más difíciles*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Mónica Pajuelo, por su guía y constante apoyo en este largo proceso.

Al Dr Américo Castro, por su incondicional apoyo en los momentos más críticos.

Al Dr Enrique Serrano, por siempre confiar en mi persona y creer siempre en mis
habilidades.

A Lucero Merino y Lucero Mascaró, por acogerme cálidamente en el laboratorio.

A Edith Málaga y Solange Custodio, por hacerme sentir uno más de ustedes y
enseñarme tanto.

A la Dra Manuela Verástegui, por haberme brindado todas las facilidades para el
desarrollo del presente estudio.

Al Dr Genaro Chaparro y al Dr Ramón Antezana, por haberme permitido el
ingreso a sus instalaciones y haber creído siempre en este proyecto.

Al Dr Willy Lescano, por brindarme la oportunidad y confianza para ser parte de
este programa de becas.

FINANCIAMIENTO

Un agradecimiento especial al programa de becas FONDECYT, del Ministerio de
la Producción del Perú, que financió el desarrollo de este proyecto.

EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL DE LA FASCIOSIS BOVINA: PRUEBA DIAGNÓSTICA POR AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE Y ACTIVIDAD TREMÁTICA DEL EXTRACTO DE ALLIUM SATIVUM

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	4 %
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
3	Submitted to University of Wolverhampton Trabajo del estudiante	<1 %
4	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
5	www.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
6	Submitted to Universidad Catolica Los Angeles de Chimbote Trabajo del estudiante	<1 %
7	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
III. CAPITULO 1: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE UN NUEVO LAMP OPTIMIZADO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOLOSIS BOVINA.....	16
III.1 Introducción	16
III.2 Pregunta de Investigación	19
III.3 Hipótesis.....	19
III.4 Objetivos	19
III.5 Materiales y Métodos.....	20
III.5.1 Diseño	20
III.5.2 Población y muestra	21
III.5.3 Recolección y conservación de muestras	23
III.5.4 Procesamiento de muestras biológicas.....	24
III.5.5 Características analíticas y diagnósticas de LAMP	34
III.5.6 Cálculo de tamaño de muestra	35
III.5.7 Procesamiento y análisis estadístico	35
III.5.8 Aspectos éticos.....	36
III.6 RESULTADOS.....	37
III.6.1 Optimización de las condiciones de lisis de huevos de <i>F. hepatica</i>	37
III.6.2 Optimización del ensayo LAMP.....	38

III.6.3	Sensibilidad analítica	41
III.6.4	Especificidad analítica	43
III.6.5	Protocolo final del LAMP Optimizado	44
III.6.6	Evaluación de la precisión diagnóstica	45
III.6.7	Comparación de la precisión diagnóstica entre la nueva prueba LAMP y la técnica de microscopía	46
III.7	DISCUSIÓN	48
IV.	CAPITULO 2: EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FASCIOLICIDAS DEL EXTRACTO ACUOSO Y ACEITE ESENCIAL DE ALLIUM SATIVUM L.	53
IV.1	Introducción	53
IV.2	Pregunta de Investigación	56
IV.3	Hipótesis.....	56
IV.4	Objetivos	56
IV.5	Materiales y Métodos.....	57
IV.5.1	Diseño	57
IV.5.2	Criterios de selección	57
IV.5.3	Muestreo.....	58
IV.5.4	Procesamiento de muestras biológicas.....	59
IV.5.5	Optimización del cultivo de <i>F. hepatica</i>	66
IV.5.6	Eficacia fasciolicida de los extractos de ajos	70
IV.5.7	Evaluación dosis – respuesta de los extractos de ajos en <i>F. hepatica</i>	70
IV.5.8	Evaluación de la citotoxicidad	71
IV.5.9	Variables de estudio	72

IV.5.10 Análisis estadístico	73
IV.5.11 Cálculo de tamaño de muestra.....	74
IV.5.12 Aspectos éticos	74
IV.6 RESULTADOS.....	76
IV.6.1 Eficacia fasciolicida de los extractos de ajos	76
IV.6.2 Evaluación Dosis-respuesta	77
IV.6.3 Citotoxicidad.....	81
IV.7 Discusión.....	83
V. CONCLUSIONES GENERALES.....	88
VI. RECOMENDACIONES GENERALES.....	89
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
VIII. ANEXO	

RESUMEN

La fasciolosis es una de las parasitosis hepáticas más importantes del país. Actualmente, las principales limitaciones del control de esta enfermedad son el correcto diagnóstico y la progresiva resistencia al triclabendazol, que es el fármaco recomendado para su tratamiento. Por tal motivo, el presente trabajo propone i) desarrollar y evaluar la precisión diagnóstica de LAMP (Loop-Mediated isothermal amplification) aplicando una optimización en la extracción de ADN en heces de bovinos y ii) evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* de los extractos de ajo.

Investigación 1: Estudio donde se desarrolla una nueva prueba LAMP optimizando la extracción de ADN evaluando su precisión diagnóstica. Se optimizó la técnica de extracción de ADN para *F. hepatica* combinando la técnica coprológica de sedimentación (concentración de huevos de *F. hepatica*) y la técnica de lisis con perlas de Zirconia/Silica en un homogenizador de alta velocidad a 6m/s durante 40 seg; estas dos técnicas se acoplaron a kits de extracción de ADN comerciales. Para el desarrollo de la prueba LAMP se diseñaron primers específicos para la región ITS-1 optimizando las condiciones de la prueba para ejecutarlo a 60°C por 40 min. Para la evaluación de la precisión diagnóstica de LAMP, se utilizó un diseño de casos y controles colectando 139 muestras de heces de bovinos sacrificados en el “Frigorífico camal San Pedro” en Lurín-Perú. Las muestras se clasificaron como positivas y negativas usando la inspección hepática post mortem y la microscopía de huevos en bilis. LAMP optimizado con la técnica de extracción de ADN logró una sensibilidad del 87.8% (IC 95%: 80.4% - 93.2%) y especificidad del 100 % (IC 95%: 85.8% - 100%), con un likelihood ratio negativo de 0.12 (IC95: 0.08 - 0.19).

Investigación 2: Estudio experimental donde se evaluó la eficacia trematicida de extractos de ajos *in vitro*. Estadios adultos de *F. hepatica* fueron incubados durante 48 h expuestos a 10 µg/ml de aceite esencial de ajo, 10 µg/ml de extracto acuoso de ajo y 15 µg/ml de triclabendazol sulfóxido usando 112 fasciolas por cada tratamiento. La eficacia se evaluó con el porcentaje de fasciolas totalmente paralizadas por cada grupo. Los adultos de *F. hepatica* incubados con triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml) mostraron un mayor porcentaje de fasciolas paralizadas con respecto al extracto acuoso (16.9 vs 0 %; $P < 0.002$) y aceite esencial (16.9 vs 4.5%; $P < 0.001$). Adicionalmente, se hizo una evaluación de dosis-respuesta determinando que la concentración letal 50 (CL₅₀) del aceite esencial de ajo fue de 0.066 mg/ml, mientras que el CL₅₀ del extracto acuoso de ajo fue de 8.37 mg/ml, estas concentraciones no mostraron efectos citotóxicos.

Se concluye que la técnica LAMP con la extracción optimizada de ADN es una prueba diagnóstica sensible y altamente específica para el diagnóstico de la fasciolosis bovina y que el extractos acuoso y aceite esencial de ajo a concentración de 10 µg/ml muestra una actividad fasciolicida *in vitro* inferior al triclabendazol sulfóxido a 15 µg/ml. No obstante, a mayores concentraciones, los extractos de ajos si evidencian actividad fasciolicida sin actividad citotóxica.

Palabras clave: *In vitro*, LAMP, Precisión diagnóstica, *Fasciola hepatica*, Perú.

ABSTRACT

Fasciolosis is one of the most important liver parasitosis in the country. Currently, the main limitations in the control of this disease are the correct diagnosis and the progressive resistance to triclabendazole, which is the drug recommended for its treatment. For this reason, the present work proposes i) to develop and evaluate the diagnostic accuracy of LAMP (Loop-Mediated isothermal amplification) applying an optimization in the extraction of DNA in bovine feces and ii) to evaluate the *in vitro* fasciolicide efficacy of the extracts of garlic.

Investigation 1: Study where a new LAMP test is developed, optimizing DNA extraction, evaluating its diagnostic accuracy. The DNA extraction technique for *F. hepatica* was optimized by combining the stool sedimentation technique (*F. hepatica* eggs concentration) and the lysis technique with Zirconia/Silica beads in a high-speed homogenizer at 6m/s for 40 sec; these two techniques were coupled with commercial DNA extraction kits. For the development of the LAMP test, specific primers were designed for the ITS-1 region, optimizing the test conditions to run it at 60°C for 40 min. For the evaluation of the diagnostic accuracy of LAMP, a case-control design was used, collecting 139 fecal samples from bovines slaughtered in the "Frigorífico camal San Pedro" in Lurín-Perú. Samples were classified as positive and negative using postmortem liver inspection and egg in bile microscopy. LAMP optimized with the DNA extraction technique achieved a sensitivity of 87.8% (95% CI: 80.4% - 93.2%) and a specificity of 100% (95% CI: 85.8% - 100%), with a negative likelihood ratio of 0.12. (CI95: 0.08 - 0.19).

Investigation 2: Experimental study where the trematocidal efficacy of garlic extracts was evaluated *in vitro*. Adult stages of *F. hepatica* were incubated for 48 h

exposed to 10 µg/ml garlic essential oil, 10 µg/ml aqueous garlic extract and 15 µg/ml triclabendazole sulfoxide using 112 flukes for each treatment. Efficacy was evaluated with the percentage of totally paralyzed flukes for each group. Adults of *F. hepatica* incubated with triclabendazole sulfoxide (15 µg/ml) showed a higher percentage of paralyzed flukes with respect to aqueous extracts (16.9 vs 0%; $P < 0.002$) and essential oils (16.9 vs 4.5%; $P < 0.001$). Additionally, a dose-response evaluation was made, determining that the lethal concentration 50 (LC50) of the essential oil of garlic was 0.066 mg/ml, while the LC50 of the aqueous extract of garlic was 8.37 mg/ml; these concentrations were not showed cytotoxic effects.

In conclusion, LAMP technique with optimized DNA extraction is a sensitive and highly specific diagnostic test for the diagnosis of bovine fasciolosis and that the aqueous extracts and essential oil of garlic at a concentration of 10 µg/ml show fasciolicidal activity *in vitro* lower than triclabendazole sulfoxide at 15 µg/ml. However, at higher concentrations, garlic extracts do show fasciolicidal activity without cytotoxic activity.

Keywords: In vitro, LAMP, Diagnostic accuracy, Fasciola hepatica, Peru

I. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria ampliamente distribuida a nivel mundial causada por el trematodo *Fasciola spp.* Se estima que en las últimas dos décadas la fasciolosis ha afectado a aproximadamente 17 millones de personas y ha tenido un impacto negativo en la economía de la ganadería, generando pérdidas anuales de 3 billones de dólares a nivel mundial (1,2). El impacto de la fasciolosis tanto en la salud animal como en la salud pública ha llevado a que la OMS la clasifique como una enfermedad tropical desatendida y que deba de ser abordada desde un enfoque de una sola salud (3).

Hospederos y ciclo de vida

La fasciolosis en el Perú es causado por *Fasciola hepatica*, un trematodo que se transmite por vegetales y agua. *F. hepatica* tiene un ciclo indirecto necesitando de hospederos intermediarios (que permiten el desarrollo de estadios larvarios) y definitivos (que permiten el desarrollo hasta su fase adulta). Se ha reportado una amplia lista de hospederos definitivos como bovinos (4), caprinos, ovinos, suinos (5), camélidos sudamericanos (6), cánidos (7,8), cérvidos (9), equinos (10) y el hombre (11,12). Estos hospederos son infectados por *F. hepatica* al consumir vegetales o aguas contaminadas con el estadio infectante (metacercaria) (13).

F. hepatica tiene como hospederos intermediarios a caracoles de la familia *Lymnaeidae* que tienen distribución a nivel mundial. En el Perú se conocen tres especies de caracoles limneidos que han sido naturalmente infectados por las formas larvarias de *F. hepatica*: *Pseudosuccinea columella* reportado en Tingo

María (14), Ucayali, Cajamarca, la Libertad (15) Cusco, Puno (16) y en la zona amazónica con frontera con Brasil (17); *Lymnaea diaphana* reportado en Arequipa (18) y *Lymnaea viatrix* reportado en Cajamarca, Valle del Mantaro (19) y sierra sur del Perú (16). Estas especies han sido clasificadas en base a su morfología; no obstante, se han reportado otras especies clasificadas por técnicas moleculares. *Galba truncatula* y *Lymnaea neotropicans* han sido reportada en Cajamarca a través del secuenciamiento del ITS-2, pero también se ha reportado la presencia de *L. schirazensis*, este último sin evidencia de forma larvaria de *F. hepatica*, pero presente en zonas endémicas (20,21). Estos caracoles son conocidos como el grupo *Galba/Fossaria* y se caracterizan por ser el vector de *F. hepatica* con morfología pequeña (2 - 10 mm de largo), dextrógiros, de concha cónica- piramidal estando distribuidos en todos los continentes. Sin embargo, los caracoles del género *Radix* tienen morfología semejante a los del grupo *Galba/Fossaria*, pero con mayor tamaño (11 – 20 cm de largo) siendo vectores de *F. gigantica* distribuidos principalmente en África y Asia; cabe resaltar que el género *Radix* no han sido reportado en el Perú al igual que *F. gigantica* (16,22,23).

El ciclo de vida se lleva a cabo de igual manera en todos los hospederos. El estadio adulto de *F. hepatica* libera huevos no embrionados en los conductos biliares, estos llegan a la vesícula biliar donde son liberados al intestino para salir al medio ambiente por las heces. Cuando los huevos llegan al exterior necesitan caer en fuentes de agua para poder embrionar. Una vez embrionado, se forma el miracidio que sale al exterior después de 9-21 días a 15-25°C. El miracidio es un estadio larvario con motilidad, que nada en busca de los caracoles limneidos (hospederos intermediarios) para ingresar dentro de ellos. Una vez dentro del

caracol, el miracidio se desarrolla a esporocisto, redia y finalmente cercaria en 6 a 7 semanas (24). La cercaria es un estadio móvil, el cual sale del caracol alcanzando fuentes de agua donde nada por corto tiempo (1 h) hasta encontrar superficies sólidas como plantas acuáticas, donde pierde su cola (que le brinda motilidad) y forma una capa quística denominada metacercaria. La metacercaria se vuelve infectiva para los hospederos definitivos a partir de las 24 a 72 h de su formación. Es común encontrar metacercarias adheridas a la superficie de plantas acuáticas, pero también puede encontrarse flotando en la superficie del agua. Esta forma quística les brinda características resistentes a los factores físicos logrando sobrevivir hasta más de un año en el medio ambiente. Los hospederos definitivos se infectan con *F. hepatica* al consumir plantas o aguas contaminadas con la metacercaria (25).

Cuando la metacercaria ingresa al hospedero definitivo por la vía oral, llega al intestino y por acción de las enzimas digestivas se libera el estadio juvenil o inmaduro dentro de ella. El estadio juvenil perfora el intestino en solo unas horas, migra por la cavidad peritoneal y llega al hígado en 6-10 días aproximadamente, donde perfora la cápsula de Glisson (26,27). Una vez dentro del hígado, el estadio juvenil de *F. hepatica* vive en el parénquima alimentándose de hemorragias y tejido hepático destruido debido a su actividad migratoria. Esta actividad migratoria se lleva a cabo en 6 a 8 semanas aproximadamente, donde finalmente migra hacia los conductos biliares. La forma adulta de *F. hepatica* es alcanzada en los conductos biliares y es ahí donde deposita cerca de 20 000 a 24 000 huevos por día que serán liberados hacia la vesícula biliar, luego al intestino y finalmente al exterior a través

de las heces. El estadio adulto se alimenta de la sangre, bilis y tejidos hepáticos del hospedero, logrando vivir hasta por más de 10 años (28) (Figura 1).

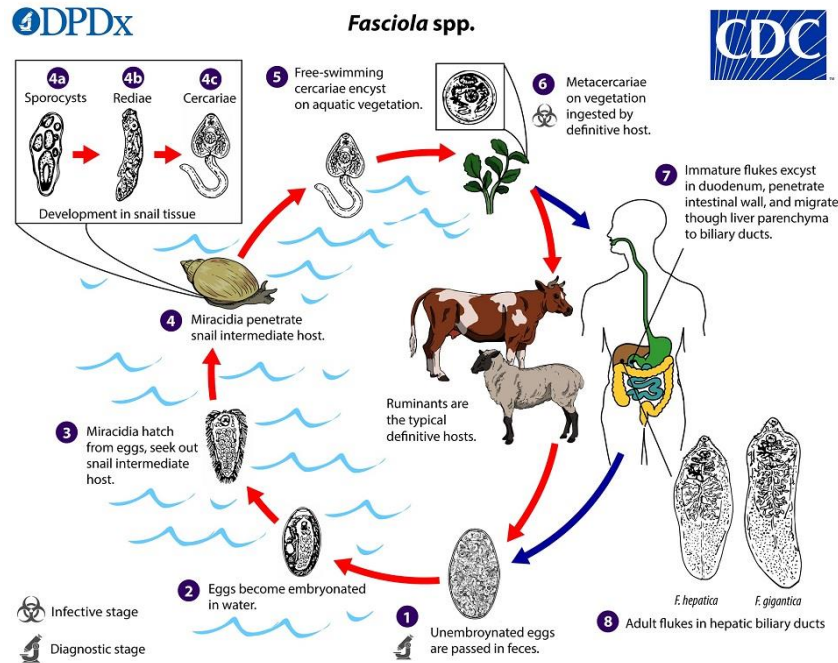


Figura 1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*. Fuente: CDC.gov

Epidemiología

Fasciola hepatica es un parásito que está distribuido a nivel mundial. Los países sudamericanos que albergan comunidades rurales andinas con altos niveles de pobreza presentan una de las prevalencias más elevadas alcanzando prevalencias mayores del 50% en rumiantes (29,30) y del 10% en humanos (2,31,32). Estas zonas endémicas tanto de fasciolosis humana y animal han sido reportadas en Ecuador (33), Argentina (34,35), Colombia (30,36) Bolivia (37,38) y Perú (4,29,32,39).

La amplia distribución de la fasciolosis a nivel mundial se debe a la capacidad de adaptación a condiciones adversas de los caracoles vectores (familia *Lymnaeidae*). Los caracoles necesitan de aguas frescas para su desarrollo, estas

fuentes de agua las obtienen de fuentes naturales como las lluvias, ríos, lagos, pero también de fuentes artificiales como las irrigaciones para fines agrícolas. Estas fuentes artificiales de agua generan ambientes favorables para los caracoles, donde en presencia de la ganadería, logran cerrar el ciclo biológico (28). Los caracoles de la familia *Lymnaeidae* pueden vivir en amplios rangos altitudinales desde alturas bajo el nivel del mar hasta alturas mayores a 4000 m.s.n.m. (16,40). También se conoce que los caracoles vectores de *F. hepatica* tienen predilección a climas templados como los valles andinos, no obstante, en los últimos años se ha reportado su adaptación a climas tropicales como los de la Amazonía (41), donde han infectado a especies nativas nunca antes reportadas (8). La reciente aparición de esta enfermedad en zonas no reportadas se asocia a las modificaciones medioambientales debido al cambio climático, cambios demográficos, generación de nuevas zonas agrícolas muchas veces con importación de ganado (42,43) entre otros factores que aún siguen en investigación.

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria con prevalencias oscilantes que pueden variar drásticamente en distintas regiones. En base a la frecuencia de los casos, se ha clasificado a la fasciolosis humana como hipoendémica en regiones con prevalencias menores al 1% y con un promedio de huevos por gramos por heces (hpg) menor de 50; regiones mesoendémicas con prevalencias entre 1 al 10% con cargas parasitarias promedio de 100 – 300 hpg y zonas hiperendémicas con prevalencias mayores al 10% y con cargas parasitarias promedio mayores a 1000 hpg (3). Sin embargo, esta clasificación difiere en la fasciolosis animal, donde al presentar mayores prevalencias en rumiantes que en humanos, se clasifican como zonas hipoendémicas aquellas que presentan prevalencias menores al 10%,

mesoendémicas a regiones con prevalencias entre 10 a 50% e hiperendémicas en aquellas regiones con prevalencias mayores al 50% (29).

Patología y presentación clínica

La fasciolosis tanto humana como animal es variable en su presentación clínica, siendo algunos casos sintomáticos y asintomáticos. La presentación clínica toma mucha relevancia en la fasciolosis humana mientras que en la fasciolosis animal se considera más las pérdidas económicas y reducción de los parámetros productivos. La presentación clínica ha sido clasificada tradicionalmente en 2 fases: La fasciolosis aguda y crónica (44). La fasciolosis aguda corresponde a las primeras 8 semanas hasta 3 meses de infección y está asociado a las lesiones causadas por migración del estadio juvenil del intestino hasta el hígado. En este proceso migratorio, el parásito genera acciones traumáticas en diferentes órganos (intestino, cavidad peritoneal e hígado). Una vez en el hígado puede producir lesiones hemorrágicas, abscesos, necrosis, fibrosis manifestándose en signos clínicos como fiebre, anorexia, dolor abdominal y alteraciones gastrointestinales. En la fase crónica, *F. hepatica* alcanza su estadio adulto y se localiza en los conductos biliares, donde la acumulación de estos parásitos y la secreción de enzimas digestivas causan obstrucción biliar y colangitis con hiperplasia epitelial, produciendo cuadros clínicos con cólico biliar, dolor epigástrico e ictericia. La fase crónica puede durar años teniendo en cuenta que el parásito tiene una esperanza de vida de más de 10 años (27,28,45) .

Diagnóstico

Los avances en las últimas décadas en las tecnologías diagnósticas apuntan a mejorar los programas de control y a incrementar el conocimiento sobre esta parasitosis. La microscopía sigue siendo una herramienta diagnóstica fundamental en el control de la fasciolosis. Su bajo costo, su gran nivel de evidencia (se observa directamente la presencia del parásito) y fácil implementación en laboratorios de bajo presupuesto lo han llevado a ser considerado como la prueba gold estándar. El diagnóstico microscópico para la fasciolosis se basa en la observación de huevos en heces de los individuos infectados. Las muestras fecales pasan por la técnica coprológica de “sedimentación”, que consiste en dejar sedimentar los huevos en agua, debido al gran tamaño de los huevos (46) . Esta técnica ha recibido diversas modificaciones que han sido adaptadas a la necesidad de cada laboratorio o investigador (47,48). No obstante, las limitaciones de esta técnica radican en la necesidad de un personal altamente capacitado que logre identificar correctamente los huevos de *F. hepatica*, tampoco se puede realizar el diagnóstico durante la fase pre-patente (estadio juvenil) debido a que el parásito todavía no produce huevos y presenta una baja sensibilidad diagnóstica asociado a la carga de hpg (49). Dependiendo de la modificación usada, la técnica de microscopia puede alcanzar sensibilidades diagnósticas del 30 al 70% (47,50); sin embargo, diversos estudios han demostrado que el análisis seriado de heces (por triplicado) o el análisis de ≥ 30 g de heces puede aumentar la sensibilidad hasta en un 90% (51).

La serología es una alternativa diagnóstica a la microscopía mucho más sensible y capaz de detectar la fase aguda o migratoria de *F. hepatica*. La serología se basa en la detección de anticuerpos contra antígenos específicos de *F. hepatica*,

estos antígenos son productos de secreción/excreción (S/E) y son usado por muchos laboratorios para la fabricación de sus propios kits de ELISA (52). En el Perú, la Unidad de Biotecnología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia desarrolló una prueba diagnóstica de ELISA usando como antígeno el Fas 2, que es una cisteína proteinasa (53,54). El Fas2 ELISA, ha logrado alcanzar una sensibilidad del 96.8% y especificidad del 91.2% (47). Otros estudios han reportado sensibilidades del 90 – 97 % y especificidades del 95-97% de pruebas de ELISA usando también antígenos S/E (55–57). A pesar de los beneficios de prueba de ELISA, esta tiene la limitación de solo poder detectar la exposición y se ha reportado reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados (57,58).

Las técnicas moleculares son una alternativa para el diagnóstico de la fasciolosis pero con costos elevados. La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es la técnica molecular más usada en la parasitología y ha sido aplicada para el diagnóstico de la fasciolosis tanto humana como animal (34,59–62). Una de las ventajas de las técnicas moleculares es que pueden detectar la presencia de *F. hepatica* desde 2 a 5 semanas post infección en muestras de heces (59,63), a diferencia de la microscopía que solo puede detectar la presencia en la fase patente que es a partir de la 7ma u 8va semana post infección (28). Con respecto a la precisión diagnóstica, se ha obtenido sensibilidades del 66% y especificidades del 100% (60), necesitando de modificaciones para aumentar su sensibilidad (61,64). Sin embargo, una de las principales limitaciones de la PCR es que necesita de equipos costosos para su ejecución como termocicladores y equipos de

electroforesis, necesita de 3 horas en promedio para su ejecución y requiere de un personal capacitado para la interpretación de resultados (65).

Ante las limitaciones de la PCR, se han generado alternativas moleculares isotérmicas. Las técnicas moleculares isotérmicas pueden amplificar el material genético a una misma temperatura, evitando la necesidad de usar termocicladores (66). Dentro de las pruebas diagnósticas más usadas se tiene a LAMP (Loop-Mediated isothermal amplification o amplificación isotérmica mediada por bucles), esta técnica molecular ha ganado popularidad en los últimos años debido a su sencillez, rapidez, gran especificidad y bajo costo en comparación a la PCR. LAMP se caracteriza por usar 3 pares de primers, necesita de una temperatura constante que oscila entre 60 – 65°C para su ejecución y este proceso toma en promedio de 30 a 60 minutos; además, sus resultados se pueden interpretar de diversas formas ya sea por colorimetría, electroforesis o fluorescencia (67). Existen reportes del uso de LAMP para el diagnóstico de la fasciolosis logrando detectar concentraciones mínimas de ADN de 10^{-4} ng/ μ l y sin reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados; sin embargo, se necesitan de modificaciones a la técnica para aumentar la sensibilidad diagnóstica en muestras fecales (68–70).

Tratamiento

Triclabendazol es el tratamiento de elección para la fasciolosis siendo efectivo tanto para los estadios adultos y juveniles (71). El triclabendazol es un benzimidazol que tiene como mecanismo de acción la unión a las α y β tubulina causando despolimerización de los microtubulos citoplasmáticos, generando una parálisis de *F. hepatica* con inhibición de los procesos de alimentación y digestión

(72). Se conoce que el triclabendazol tiene un espectro antiparasitario muy específico para pocas especies parasitarias como *F. hepatica*, *F. gigantica* (73) y *Fascioloides magna* (74); pero poca efectividad en nematodos y cestodos (75,76). El triclabendazol fue utilizado como fasciolicida desde los años 80, mostrando gran efectividad durante más de 20 años (71). La dosis recomendada para el tratamiento de la fasciolosis es de 10 mg/kg con intervalos de una o dos dosis de 12-24 h (FDA); no obstante, se han reportado diferentes protocolos de dosificación (77-79). Diversos estudios han evidenciado la eficacia de triclabendazol contra la fasciolosis humana en un 60% en una sola dosis y del 75 – 100% en dos dosis (77,80,81). No obstante, en casos de fasciolosis animal, se han reportado eficacias del 100% a solo una dosis de 10-12 mg/kg (82,83).

Debido a la gran eficacia del triclabendazol, éste se ha usado masivamente durante más de 30 años generando reportes de resistencia a nivel mundial. En la última década, se han reportado diversos casos de resistencia de fasciolosis humana y animal en Inglaterra (84) , Escocia, Países bajos (85,86) Australia (87), Chile (88,89), Argentina (90) entre otros países. En el Perú, se han reportado diversos casos de resistencia en rumiantes, evidenciando reducidas eficacias del triclabendazol hasta en un 31% en Cajamarca (79) y 34% en Jauja (91), ambas eficacias fueron evaluadas con la prueba de reducción de recuento de huevos (FECRT). La situación es igual de preocupante con la fasciolosis humana, en el Perú, se han reportado casos de resistencia donde el 30 – 50% de los individuos tratados no obtuvieron una cura parasitológica aún después de más de 2 dosis (92-94),

Por otro lado, también existen otros tratamientos farmacológicos alternativos al triclabendazol, pero sin la misma eficacia. Albendazol es otro benzimidazol que tiene buena eficacia contra *F hepatica* pero solo en estadios adultos, alcanzando eficacias del 95% a dosis de 7.5mg/kg (95); no obstante, también existe evidencia de resistencia a este fármaco (96,97). Clorsulón es una sulfonamida que ha mostrado eficacias mayores al 90% en bovinos y ovinos (98); sin embargo, su eficacia también se limita a estadios adultos (>8 semanas) y se ha reportado casos de resistencia a este fármaco (97,99). Nitroxynil es un fenol halogenado que representa una alternativa viable al triclabendazol, ha mostrado eficacias del 80 – 90% pero solo en fasciolas adultas (88,100). Si bien, los fármacos alternativos han mostrado algunas limitaciones, se han reportado buenos resultados en combinación entre ellos así como el albendazol y clorsulón, sin registro aún de resistencia (97).

Ante la aparición de resistencia a diversos fármacos utilizados para el control de la fasciolosis, se ha incrementado el interés en el uso de recursos naturales. Se tiene conocimiento que las plantas tienen componentes bioactivos que han sido usados ancestralmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas (101). Estos recursos naturales, también han sido utilizadas como tratamiento antiparasitario en cestodos, nematodos y trematodos (102). Dentro de la gran biodiversidad vegetal, el ajo es una planta ancestral usada para tratar diversos problemas parasitarios; además, es una planta de distribución mundial, producida a gran escala en Latinoamérica y de bajo costo. Existe diversa evidencia científica que confirma sus propiedades antiparasitarias, así se ha encontrado eficacia contra cestodos como *Echinococcus granulosus* (103,104); nematodos

como *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomun* spp, *Trichostrngylus* spp, *Strongyloides* spp (105,106); protozoarios como *Eimeria vermiformis* (107), *Trypanosoma* spp, *Leishmania* spp (108); y trematodos como *Schistosoma* spp (109,110) y *Fasciola gigantica* (111,112). Esta evidencia propone al ajo como una alternativa de tratamiento contra la fasciolosis, necesitando de estudios para evidenciar sus propiedades trematicidas contra *F. hepatica*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La fasciolosis es una de las parasitosis hepáticas más importantes en el Perú. Afecta a ovinos (30,113), caprinos (114), camélidos sudamericanos (6), bovinos (4) y accidentalmente al hombre (11,12). La fasciolosis bovina tiene una distribución a nivel mundial con altas prevalencias en Latinoamérica, siendo Perú uno de los países más afectados. La frecuencia de la fasciolosis bovina en el Perú es oscilante en diferentes zonas geográficas, reportando prevalencias desde 30% hasta 90% en las regiones alto andinas (4,29,115,116). La fasciolosis bovina genera un gran impacto negativo en la ganadería peruana. Las pérdidas económicas se estiman superiores a los 50 millones de dólares al año basados en decomiso de hígados, baja en la productividad y los costos del tratamiento (117).

Para desarrollar un efectivo programa de control contra la fasciolosis bovina, se necesitan de varios elementos, dentro de ellos una herramientas diagnósticas de alta precisión y reducido costo (2). Las pruebas diagnósticas serológicas son herramientas de gran sensibilidad y especificidad, pero solo detectan la exposición a *F. hepatica* (55). La microscopía, es la herramienta diagnóstica más usada; no obstante son pruebas de baja sensibilidad que necesitan de un personal altamente calificado (118). Las técnicas moleculares son una importante alternativa diagnóstica con buen desempeño, pero necesitan de equipos costosos y demandan mayor tiempo para su ejecución (59). Las técnicas moleculares isotérmicas, como la de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), nos permiten una ejecución rápida, sin la necesidad de equipos costosos y con resultados fáciles de interpretar por colorimetría (67,119,120). No obstante, los huevos de *F. hepatica* en heces son difíciles de romper; además, las muestras

coprológicas presentan múltiples componentes que inhiben las reacciones moleculares (121). Ante esta situación, se han reportado nuevas estrategias de extracción de ADN en huevos de *F. hepatica* de muestras de fecales de rumiantes, aumentando significativamente la eficiencia diagnóstica en PCR (61,64). Estos nuevos protocolos de extracción, podría ser una oportunidad para mejorar la técnica de LAMP en el diagnóstico de la fasciolosis bovina, teniendo en cuenta que LAMP es una herramienta diagnóstica molecular versátil que se puede implementar en programas de control en zonas endémicas rurales o cerca de ellas.

Otro componente importante para el control de infección es un tratamiento eficaz. El triclabendazol es el fármaco recomendado para tratar la fasciolosis. No obstante, en los últimos 20 años se han reportado diversos casos de resistencia al triclabendazol tanto en personas (77,93,122) como en ganado (79,91,123). Ante esta situación, es importante la búsqueda de alternativas como el uso de plantas con propiedades antiparasitarias que se han usado desde épocas ancestrales de manera artesanal, siendo el ajo es una de ellas. En la actualidad, existe diversa evidencia científica que confirma las propiedades antiparasitarias del ajo en trematodos como *Gigantocotyle explanatum* (124), *Schistosoma mansoni* (125) y *Fasciola gigantica* (111,112). Ante esta evidencia, las propiedades trematicidas de los extractos de ajos generan una oportunidad en investigaciones de alternativas terapéuticas, teniendo en cuenta que *F. hepatica* también es un parásito de la clase de los trematodos y se podría esperar resultados similares.

El no contar con el correcto diagnóstico y un eficaz tratamiento contra *F. hepatica* son dos de los principales problemas para el control de esta parasitosis. Por estas razones, el presente proyecto busca desarrollar y mejorar la precisión

diagnóstica de la técnica molecular de LAMP para su aplicación en laboratorios de bajo presupuesto para el diagnóstico de la fasciolosis bovina; además, de evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* del extracto del ajo (*A. sativum*) contra *F. hepatica*.

III. CAPITULO 1: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE UN NUEVO LAMP OPTIMIZADO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOSIS BOVINA

III.1 Introducción

La fasciolosis es generada por *Fasciola hepatica*, un trematodo que parasita rumiantes y accidentalmente al hombre. La fasciolosis tiene una importancia económica en la ganadería peruana que debido a que genera aproximadamente 50 millones de soles al año en pérdidas económicas asociadas al decomiso de hígados, al descenso de parámetros productivos y a los gastos por tratamiento (117). La prevalencia de fasciolosis bovina en el Perú es elevada, reportando prevalencias que van desde el 30 % al 90% en los valles altoandinos (4,29,126). Esta alta prevalencia se debe a la capacidad de los caracoles del género *Lymnaea* (hospedero intermediario) para adaptarse a condiciones inhóspitas, donde muchas veces se desarrolla la ganadería (127).

En la actualidad existe una amplia gama de técnicas diagnósticas para la fasciolosis. La detección microscópica de huevos en heces son las pruebas más usadas para el diagnóstico de un individuo infectado; no obstante, la sensibilidad depende de la carga parasitaria, del periodo pre-patente y de contar con un personal capacitado para el proceso diagnóstico. Las pruebas serológicas son una alternativa diagnóstica muy utilizada, pueden detectar infecciones agudas desde las 2 semanas post infección; sin embargo, la serología solo puede detectar la exposición al parásito (55,118). En los últimos años, las pruebas moleculares se han mostrado como una importante alternativa para el diagnóstico de la infección de *F. hepatica*. Las pruebas moleculares como la PCR, logran identificar el ADN de *F. hepatica* en heces desde 1 semana post infección y con un buen desempeño diagnóstico

(59,128); pero necesitan de equipos costosos y de mayor tiempo para su ejecución. Las técnicas moleculares isotérmicas son una alternativa diagnóstica de la PCR pero de bajo presupuesto. La técnica molecular de LAMP, es una técnica de amplificación de ADN isotérmica que permite una ejecución sin la necesidad de equipos costosos (termocicladores y equipos de electroforesis), necesitan menos tiempo de ejecución que la PCR y presentan una fácil interpretación de resultados basados en colorimetría (119,129).

El desarrollo de LAMP para el diagnóstico de *F. hepatica*, ha dado buenos resultados en condiciones controladas más no en condiciones de campo. Diversos estudios han mostrado la gran sensibilidad y especificidad analítica de esta prueba; no obstante, cuando se trabaja en muestras fecales su sensibilidad diagnóstica se reduce drásticamente hasta un 18% (68,69,130). La baja sensibilidad encontrada en estos estudios se asocia a la dureza de los huevos y a inhibidores propios de la materia fecal que no son tratados apropiadamente en el proceso de extracción de ADN. En la actualidad, existen técnicas optimizadas de extracción de ADN en huevos de *F. hepatica* aplicadas a PCR basadas en la sedimentación como técnica de concentración de huevos y la lisis de los mismos con perlas, logrando maximizar la sensibilidad de la PCR hasta en un 99% y detectando muestras de heces con menos de 10 huevos por gramo de heces (hpg) (61,64). Sin embargo, estas nuevas técnicas de extracción no han sido aplicadas a LAMP, proponiendo una gran oportunidad para mejorar la precisión diagnóstica de esta versátil técnica.

Por esta razón, el presente trabajo busca desarrollar y evaluar la precisión diagnóstica de la prueba de LAMP en heces de bovinos aplicando una técnica de

extracción de ADN optimizada, con la finalidad de obtener una prueba diagnóstica molecular rápida, versátil y de gran eficiencia en el diagnóstico de la fasciolosis.

III.2 Pregunta de Investigación

¿La nueva prueba diagnóstica LAMP puede alcanzar una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99% para el diagnóstico de la fasciolosis bovina en muestras de heces?

III.3 Hipótesis

La nueva prueba diagnóstica LAMP optimizada alcanzará una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99% para el diagnóstico de la fasciolosis bovina.

III.4 Objetivos

Objetivo general

- Desarrollar una técnica LAMP optimizada específica para el diagnóstico de la fasciolosis bovina.

Objetivos específicos

- Optimizar la técnica de extracción de ADN en huevos de *F. hepatica* en muestras fecales.
- Diseñar y estandarizar la prueba diagnóstica LAMP para la detección de *F. hepatica* en condiciones controladas.
- Evaluar la precisión diagnóstica de la técnica LAMP optimizada con la nueva técnica de extracción de ADN en heces de bovinos naturalmente infectados con *F. hepatica*.
- Comparar la precisión diagnóstica de LAMP optimizado con la técnica de microscopía.

III.5 Materiales y Métodos

III.5.1 Diseño

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una nueva prueba diagnóstica LAMP optimizando la extracción de ADN; además de evaluar su precisión diagnóstica para la detección de *F. hepatica* en muestras fecales de bovinos. Para lograr este objetivo, primero se estandarizó una nueva técnica de extracción de ADN para muestras fecales usando como método de concentración de huevos la técnica de sedimentación y con su posterior lisis usando perlas de Zirconia/Silica en un homogenizador de alta velocidad que fueron acopladas al protocolo de kits comerciales de extracción de ADN. Luego se diseñaron primers de LAMP específicos para la región ITS-1 de *F. hepatica* y se optimizaron los parámetros para su correcta ejecución. Finalmente, se colectaron muestras de heces de bovinos sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro”, localizado en el distrito de Lurín de la provincia de Lima, para ejecutar la evaluación de precisión diagnóstica del nuevo LAMP usando un diseño de casos y controles (131). Se identificó primero a las muestras fecales positivas y negativas en base a la evaluación hepática post mortem en el camal y un posterior análisis de microscopía del contenido vesicular del bovino sacrificado en el laboratorio; además, las muestras positivas fueron colectadas de animales procedentes de zonas hiper-endémicas de fasciolosis (Provincia de Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica y Cusco) y las muestras negativas procedentes de zonas hipo-endémicas (Lima) (Figura 1).

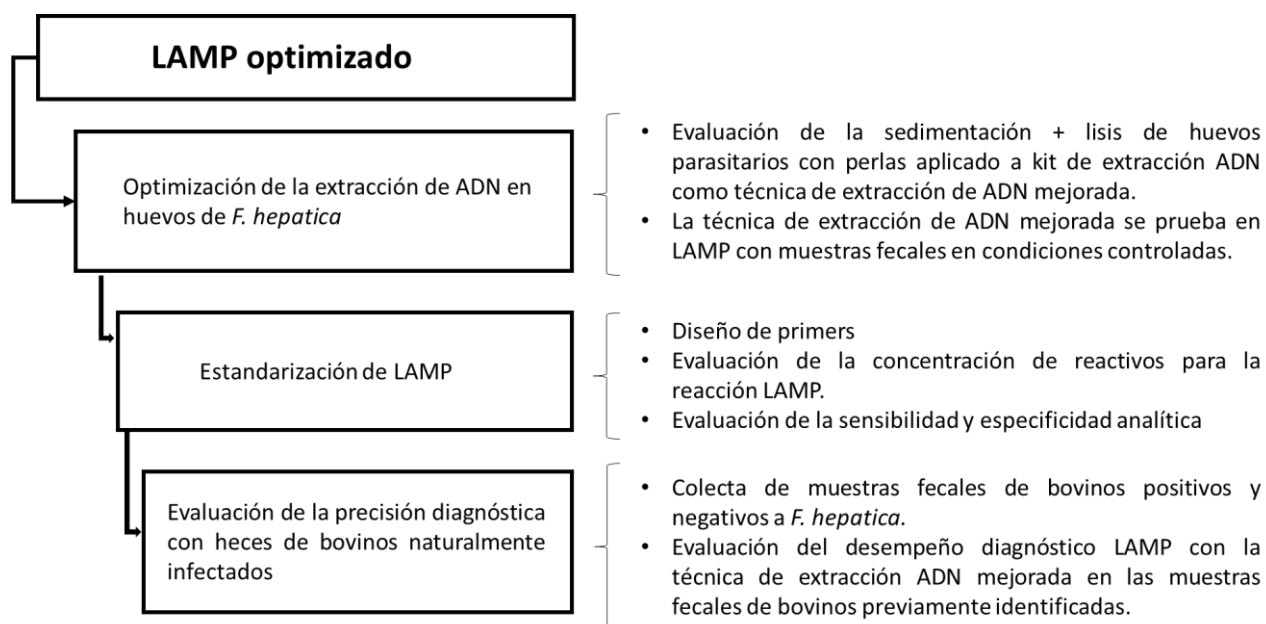


Figura 1. Resumen de la metodología aplicada en el estudio.

III.5.2 Población y muestra

Todas las muestras utilizadas para la fase de evaluación de la precisión diagnóstica provinieron de bovinos sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro” de Lurín, Lima, Perú. Los bovinos fueron procedentes de zonas endémicas de fasciolosis (Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica, Cusco y Lima). El muestreo se llevó a cabo entre los meses de octubre del 2019 a febrero del 2020 aplicando un muestreo no probabilístico por conveniencia según el estado parasitario del animal en la evaluación post mortem.

III.5.2.1 Criterios de selección

Se incluyeron a los bovinos sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro” con conocimiento previo de su estado parasitario de fasciolosis según el análisis post mortem.

Criterios de inclusión

- Bovinos positivos a *F. hepatica*: Se aplicó una evaluación *post mortem* del hígado por el Médico Veterinario del camal con posterior evaluación por microscopia del contenido vesicular en el laboratorio, como un “método de referencia compuesto” (MRC) para definir el caso. El MRC se aplica cuando el método *gold* estándar no es perfecto, combinando diversas técnicas diagnósticas (132). Además, los bovinos eran procedentes de zonas hiperendémicas (Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica y Cusco).
- Bovinos negativos a *F. hepatica*: Bovinos que procedían de zonas hipoendémicas (Lima) donde no se visualizó macroscópicamente la presencia de *F. hepatica* en el hígado después del análisis post mortem realizado por el Médico Veterinario del camal y tampoco se encontró huevos del parásito por la evaluación por microscopía de la vesícula biliar, este último analizado posteriormente en el laboratorio (MRC).

Criterios de exclusión:

- Se excluyeron los bovinos que hubieran salido positivos a la evaluación hepática post-mortem pero posteriormente negativos a la prueba de

microscopía del contenido vesicular para los controles positivos o bovinos negativos a la evaluación hepática post-mortem y positivos a la prueba de microscopía de contenido vesicular para los controles negativos.

III.5.3 Recolección y conservación de muestras

Las muestras de heces fueron colectadas a nivel del recto y colocadas en frascos de plásticos de boca ancha previamente rotuladas. Adicionalmente se colectó la vesícula biliar realizando un corte en el conducto cístico con previo amarre a nivel del cuello de la vesícula para ser almacenadas en bolsas plásticas rotuladas hasta su procesamiento. Las muestras fecales y vesiculares fueron transportadas a temperatura ambiente durante 3 horas aproximadamente hacia el laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia donde fueron almacenadas a 6-8°C hasta su procesamiento.

III.5.3.1 Inspección post mortem de los bovinos

Los hígados de los bovinos sacrificados fueron examinados como rutina para la identificación de *F. hepatica* por el Médico Veterinario del camal. Este proceso se lleva a cabo inmediatamente después del eviscerado del bovino. La evaluación post-mortem del hígado consiste en la visualización y palpación del órgano entero buscando alguna alteración organoléptica compatible con una lesión parasitaria (fibrosis, hiperplasia de los conductos biliares, abscesos, etc), seguido de incisiones transversales para confirmar el caso a través de la observación macroscópica de *F. hepatica*.

III.5.4 Procesamiento de muestras biológicas

Todas las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias ambos procedentes de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

III.5.4.1 Microscopía

Técnica de Sedimentación

Todas las muestras de heces fueron evaluadas con la técnica de sedimentación que fue usada como técnica de concentración de huevos para la extracción de ADN y para el conteo de huevos por gramo de heces (hpg). El protocolo de sedimentación se desarrolló basándose en el protocolo de Calvani *et al* (61) con algunas modificaciones:

1. Se pesan 2 gramos de muestras fecales.
2. Se mezclan los 2 gramos de heces con agua de grifo y se homogeniza en un frasco de 100 ml.
3. Se tamiza la solución a través de un tamiz de metal de 270 μm que desemboca en un vaso cónico de 200 ml. Inmediatamente se cubre con agua hasta 1 cm por debajo del borde del vaso y se deja sedimentar durante 15 minutos.
4. Pasados los 15 minutos, se eliminan 2/3 partes del sobrenadante.
5. Se vuelve a llenar el vaso de agua y se deja sedimentar durante 5 - 10 minutos (repetir este procedimiento hasta que el sobrenadante quede limpio).

6. *Para la cuantificación de huevos (hpg): Se pasa todo el sedimento del paso 5 en una placa Petri y observar en un estereoscopio a 10X. El total de huevos contabilizados se divide por 2.
7. *Para la extracción de ADN, se pasa el sedimento obtenido (ya cuantificado en hpg) en un tubo Falcon de 50 ml, se centrifuga por 2 minutos a 10 000 rpm para formar un pellet en el sedimento, del cual se toman 250 mg para la extracción de ADN.

La técnica de sedimentación también se aplicó al contenido vesicular de todos los bovinos seleccionados, para confirmar su estado parasitario y poder obtener huevos limpios para la fase de estandarización, usando el siguiente protocolo:

1. Todo el contenido vesical se vierte en vasos cónicos de 200 ml.
2. Se deja sedimentar durante 30 minutos (debido al grado de turbidez de la bilis).
3. Se elimina 2/3 partes del sobrenadante e inmediatamente se cubre con agua hasta por 1 cm por debajo del borde del vaso.
4. Se deja sedimentar durante 30 minutos.
5. Repetir el paso 4 varias veces hasta que el sobrenadante quede limpio).
6. Evaluar el sedimento en un microscopio a 10X. La presencia de 1 huevo compatible con la estructura de *F. hepatica* confirma el caso positivo (46).

III.5.4.2 Recolección de huevos limpios de *F. hepatica*

Para el aislamiento de huevos limpios de *F. hepatica* se aplicó la técnica de sedimentación previamente detallada en la sección III.5.5.1 con el contenido

vesical. Posterior al paso 5 de mencionada sección, los huevos sedimentados fueron recolectados, lavados con solución PBS y almacenados entre 6 – 8°C en frascos de boca ancha rotulados. Estos huevos fueron usados para la estandarización de la técnica de extracción de ADN y LAMP.

III.5.4.3 Optimización de la extracción de ADN de huevos de *F. hepatica*

III.5.4.3.1 Evaluación de la calidad de ADN extraído de huevos de *F. hepatica* con kits comerciales

Antes de iniciar la optimización de la extracción de ADN, se evaluó la eficacia de diversos kits comerciales en la extracción de ADN en huevos de *F. hepatica* previamente aislados (sección III.5.5.2). Se utilizó el kit comercial Qiamp® Power fecal® Pro DNA kit (Qiagen, Usa) y el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, Usa). Cada kit comercial se probó en aproximadamente 600 huevos limpios de *F. hepatica* siguiendo los protocolos del fabricante. La calidad y concentración de ADN extraído se evaluó con el Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, USA). El análisis de calidad de ADN evidencia que no se logra una extracción de ADN exitosa con ninguno de los kits de extracción de ADN utilizados (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la calidad del ADN extraído de huevos limpios de *F. hepatica* con diferentes kits comerciales

Repeticiones (600 huevos de <i>F. hepatica</i> por repetición)	A260/A280		DNA extraído (ng/μl)	
	Kit	Kit	Kit	Kit
	Qiagen	Promega	Qiagen	Promega
1	0.16	0.97	-3.1	-1.4
2	0.16	0.7	0.3	0.9
3	0.1	0.65	0.5	-0.2

III.5.4.3.2 Optimización de lisis de huevos de *F. hepatica*

Para la optimización de la extracción de ADN en huevos de *F. hepatica*, se evaluó la técnica de ruptura con perlas de zirconia/silica para extraer el ADN en el interior del huevo. Se usó como referencia el protocolo de Calvani *et al* (61) probando perlas de distintos diámetros (0.1 mm, 0.5 mm y 1mm) y distintas cantidades (0.2, 0.5, 1 g en crioviales de 2 ml). Cada una de estas diferentes combinaciones se probaron en 800 μl de solución PBS conteniendo aproximadamente 1000 huevos de *F. hepatica* limpios (sección III.5.5.2). Los huevos de *F. hepatica* junto con las perlas en un criovial de 2 ml, fueron agitados en un homogenizador de alta velocidad (Fast-Prep FP120 – Thermo Electron Corporation, USA) durante 40 segundos a potencia de 6 m/s. Finalmente, los 800 μl conteniendo los huevos fueron retirados con una pipeta y observados en un microscopio a 40X para confirmar su total ruptura.

III.5.4.3.3 Extracción optimizada de ADN en huevos de *F. hepatica* en muestras fecales.

La optimización de la extracción de ADN en muestra fecales se basa en la aplicación de la técnica de sedimentación (sección III.5.5.1), como técnica de concentración de huevos para aumentar la sensibilidad diagnóstica (61,64) y lisis de huevos contenidos en el sedimento obtenido, previamente estandarizada (sección III.5.5.3.2) reemplazando los 800 µl de solución PBS por 800 µl de buffer de lisis del kit Qiamp® Power fecal® Pro DNA. Posteriormente se siguió con el protocolo de extracción según las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido con esta técnica, se aplica en la prueba de LAMP específico para *F. hepatica* (sección III.5.5.4.2).

III.5.4.4 Desarrollo de la prueba diagnóstica LAMP

III.5.4.4.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Los oligonucleótidos cebadores o “*primers*” específicos para *F. hepatica* usados en el ensayo LAMP fueron diseñados en base a regiones conservadas del espaciador transcrito interno 1 (ITS - 1). Las secuencias de nucleótidos usadas para diseñar los oligonucleótidos se descargaron de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Se usaron diversas secuencias (Tabla 2) de la región ITS 1 de *F. hepatica* aisladas en el Perú (Cajamarca) y publicadas en el Genbank de las cuales se alinearon usando el programa bioedit ® 7.2.6 para obtener la secuencia consenso.

Tabla 2 Secuencias de nucleótidos de ITS - 1 de *F. hepatica* peruana publicados en el genbank y usados para la creación de los oligonucleótidos cebadores de LAMP.

Código Genbank	Especie procedencia	Tamaño Pb
KJ689334.1	<i>Sus scrofa domestica</i>	433
KJ689333.1	<i>Sus scrofa domestica</i>	433
KJ689332.1	<i>Sus scrofa domestica</i>	433
KJ689329.1	<i>Ovis aries</i>	433
KJ689328.1	<i>Ovis aries</i>	433
KJ689327.1	<i>Ovis aries</i>	433
KJ689320.1	<i>Bos taurus</i>	433
KJ689324.1	<i>Bos taurus</i>	433
KJ689323.1	<i>Bos taurus</i>	433
KJ689322.1	<i>Bos taurus</i>	433
KJ689333.1	<i>Bos taurus</i>	433

Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el software Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp>). Los oligonucleótidos fueron diseñados teniendo en cuenta las siguientes características: ΔG (estabilidad) de los extremos de los oligonucleótidos menor o igual a -4.0 kcal, teniendo un mayor énfasis en los extremos 3' de F2/B2, F3/B3 y LF/LB y el 5' del F1c/B1c por su importancia en la amplificación del material genético. Contenido de CG entre 50 – 60%. La Temperatura de *melting* de cada región entre 64- 66°C para F1c y B1c, entre 50 – 61°C para F2, B2, F3 y B3 y entre 64-66°C para los oligonucleótidos bucle. También, se evaluó la formación de estructuras secundarias y dímeros con los

oligonucleótidos diseñados usando el software Multiple Primer Analyzer (www.thermofisher.com). Finalmente, la evaluación de la especificidad *in silico* de los oligonucleótidos se realizó con el software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El BLAST comparó los primers creados con toda la base de datos estándar del programa para confirmar la especificidad de los mismos en la detección del gen ITS-1 de *Fasciola hepatica*. El software BLAST evidencia reacciones cruzadas con *Fasciola gigantica*; no obstante, solo *Fasciola hepatica* ha sido reportado en el Perú. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en el Tabla 3.

Tabla 3. Detalles de los oligonucleótidos del ensayo LAMP para la detección de *Fasciola hepatica*.

Oligonucleótido cebador	Longitud	Secuencia 5' - 3'
F3 (Forward outer primer)	20	GACCGTCATGTCATGCGATA
B3 (Backward outer primer)	20	CCTAGCACTACCAATCGTGG
FIP (F1c + F2) (Forward inner primer)	40	GTAGGCACCCCATCAGTGTTTCG - ATTTGCGGACGGCTATGC
BIP (B1c + B2) (Backward inner primer)	42	ACTCCGATGGTATGCTTGCGTC - AGTACAACCCGTTCTCCTGG
LF (Loop forward primer)	20	TGCTGTGACCTCAATGAGCC
LB (Loop backward primer)	17	TCGGGGCGCTTGTCCAA

III.5.4.4.2 Optimización del ensayo LAMP

El ensayo LAMP se ejecutó inicialmente con un volumen de reacción de 25 μl a concentraciones de 0.8M de Betaina (Sigma-Aldrich, USA), 6 mM de MgSO_4 (New England BioLabs, UK), Buffer de amplificación isotérmica 1x (conteniendo 2 mM de MgSO_4) (New England BioLabs, UK), 1.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Invitrogen, USA), 8U de 2.0 Warm Start Bst-DNA polimerasa (New England BioLabs, UK), templado de ADN (2 μl de ADN) y 1.5 μl de 1000X SYBR Green I concentrado en DMSO (Sigma-Aldrich, USA). Los oligonucleótidos tuvieron una concentración de 0.2 μM para cada F3/B3 primer, 1.6 μM para cada FIP/BIP primers y 0.8 μM para cada LF/LB primers. Para el desarrollo del ensayo LAMP, los reactivos fueron pre-mezclados (10x LAMP primer mix, 2x LAMP mix y master mix final) acorde al protocolo de Trangoni *et al* (133) (Tabla 4, 5 y 6). Todos los reactivos fueron almacenados a -20°C .

Tabla 4. Preparación de la pre-mezcla 10x *LAMP primer mix* para el desarrollo de LAMP

Componentes	Solución Stock (μM)	1x LAMP primer mix (μM)	10x LAMP primer mix (μM)	Volumen* (μl)
Agua libre nucleasas	-			48
Primer F3	100	0.2	2	2
Primer B3	100	0.2	2	2
Primer FIP	100	1.6	16	16
Primer BIP	100	1.6	16	16
Primer LF	100	0.8	8	8
Primer LB	100	0.8	8	8

*Volumen final 100 μl

Tabla 5. Preparación de la pre-mezcla 2x LAMP mix para el desarrollo de LAMP

Componentes	Solución	1x LAMP	2x LAMP	Volumen*
	Stock	mix	mix	(μl)
Agua libre nucleasas	-	-	-	124
betaina	5 M	0.8 M	1.6 M	160
dATP	100mM	1.4 mM	2.8 mM	14
dTTP	100mM	1.4 mM	2.8 mM	14
dCTP	100mM	1.4 mM	2.8 mM	14
dGTP	100mM	1.4 mM	2.8 mM	14
MgSO ₄	100mM	6mM	12 mM	60
Buffer amplificación 1x	10X	1X	2X	100

*Volumen final 500 μ l**Tabla 6.** Preparación del Master mix para una reacción LAMP

Componentes	Volumen total 25 μl	Volumen total 10 μl
Agua libre de nucleasas	7 μ l	2.6 μ l
2x LAMP mix	12.5 μ l	5 μ l
10x LAMP primers mix	2.5 μ l	1 μ l
Bst polimerasa	1 μ l	0.4 μ l
DNA	2 μ l	1 μ l
SYBR Green I*	2 μ l	1.5 μ l

*SYBR Green I es adicionado al terminar la reacción de amplificación.

Una vez preparadas las pre mezclas de reactivos en los respectivos microtubos se procedió a agregar el material genético para iniciar el protocolo térmico (Tabla 5). El protocolo térmico se ejecutó en un termociclador (Eppendorf AG, Alemania) y se evaluó la correcta amplificación del material genético con 2 esquemas diferentes:

- 60°C por 60 minutos (amplificación) con 80°C por 10 minutos (paralización de reacción)
- 62°C por 60 minutos (amplificación) con 80°C por 10 minutos (paralización de reacción)

Una vez seleccionada la temperatura adecuada, se procedió a modificar el volumen final de la amplificación (10 y 25 μ l) (Tabla 5) y posteriormente se probó el tiempo de incubación (60 min, 50 min, 40 min y 30 min).

Interpretación de resultados: Las muestras positivas evidencian una coloración verdosa a la observación directa y presentan fluorescencia ante la exposición a la luz UV, las muestras negativas evidencian una coloración anaranjada a la observación directa y ausencia de fluorescencia ante la exposición a la luz UV. Adicionalmente los productos amplificados fueron analizados con la electroforesis de gel de agarosa al 2% con solución tampón tris-acetato-EDTA (TAE), aplicando 100V por 1h.

III.5.5 Características analíticas y diagnósticas de LAMP

III.5.5.1 Sensibilidad analítica

La mínima cantidad de ADN de *F. hepatica* que puede detectar la reacción LAMP, fue evaluada haciendo diluciones seriadas (1:10) de ADN de *F. hepatica* adulta de 1 ng/μl hasta 1×10^{-5} ng/μl.

También se evaluó la capacidad de la prueba diagnóstica de LAMP para la detección de la mínima cantidad de huevos en muestras fecales con la técnica de extracción optimizada (sección III.5.5.3.3). Se agregaron cantidades conocidas de 1, 5, 10 y 20 huevos en 250 mg de heces de las cuales se extrajo su ADN para posteriormente ejecutar el ensayo LAMP.

III.5.5.2 Especificidad analítica (reacciones cruzadas)

La especificidad del LAMP para la detección exclusiva de *F. hepatica*, fue evaluada con ADN extraído de especímenes previamente identificados como *F. hepatica* (control positivo), *Moniezia benedeni*, *Trichostrongylus axei*, *Cyclocoelum mutabile* y *Ogmogaster* spp. Los especímenes de *Moniezia benedeni* y *Trichostrongylus axei* fueron obtenidos del laboratorio de Parasitología Animal de FAVEZ-UPCH. Las muestras de *Cyclocoelum mutabile* y *Ogmogaster* spp fueron donados por el Laboratorio de Epidemiología y Economía Veterinaria de la FAMEV-UNMSM. El ADN de todas las muestras parasitarias fue extraído con el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, Usa) en el Laboratorio de Parasitología Animal de la UPCH.

III.5.5.3 Evaluación de la precisión diagnóstica

Para evaluar la precisión diagnóstica de LAMP desarrollado y acoplado con el método optimizado de extracción de ADN fecal (sección III.5.5.3.3), se analizaron las muestras de heces positivas y negativas, las cuales fueron clasificadas según el “método de referencia compuesto” (sección III.5.2.1).

III.5.6 Cálculo de tamaño de muestra

Se necesitó un total de 139 muestras de heces de bovinos, siendo 115 positivas y 24 muestras negativas, para estimar un 95% de sensibilidad y 99% de especificidad con una precisión de 4% con un intervalo de confianza del 95%. Se espera una alta especificidad según los resultados de Arifin y calvani (61,68), también se espera lograr aumentar la sensibilidad de LAMP hasta un 95%, este aumento de sensibilidad se reporta en el estudio de Calvani pero con la PCR (61). Para determinar el tamaño de muestra se utilizó la fórmula para estimar la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica según Hajian-Tilaki (134).

III.5.7 Procesamiento y análisis estadístico

Para determinar la precisión diagnóstica de LAMP con el método de extracción de ADN optimizado, se estimó la sensibilidad, especificidad, likelihood ratio positivo y likelihood ratio negativo con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Se usó como referencia el método MRC, compuesto por la evaluación hepática post mortem y la técnica de sedimentación en el contenido vesicular, para confirmar la presencia o ausencia de *F. hepatica* en los bovinos evaluados. Se comparó la precisión diagnóstica entre LAMP y la técnica de microscopía utilizando la prueba de McNemar tanto para las muestras positivas y negativas;

también se evaluó la concordancia entre ambas pruebas con el coeficiente kappa de Cohen, donde los valores kappa se interpretan como una concordancia pobre: <0 , leve: 0-0.2, aceptable: 0.21 – 0.4, moderada: 0.41 – 0.6, sustancial: 0.61 – 0.8 y casi perfecta: 0.81 – 1 (135). Todos los análisis fueron realizados con el programa STATA 17 usando un nivel de significancia del 0.05.

III.5.8 Aspectos éticos

Este protocolo de tesis está registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), además de haber sido evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIEA-UPCH) y aprobado con el código 104002.

El presente proyecto no genera ningún riesgo animal. Las muestras obtenidas de heces de animales sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro”, centro de beneficio que cuenta con todas las licencias que impone el estado peruano. Asimismo, la confidencialidad de los datos de los ganaderos propietarios de los animales reclutados en el estudio ha sido correctamente preservadas, codificando toda la información recolectada en formato alfa-numérico, sin el registro del nombre ganadero dueño del animal parasitado ni de la razón social del centro de crianza.

III.6 RESULTADOS

III.6.1 Optimización de las condiciones de lisis de huevos de *F. hepatica*

Los huevos de *F.hepatica* previamente aislados se lisaron usando el método de perlas de zirconia/silica con un homogenizador de alta velocidad (Fast-Prep FP120 – Thermo electron corporation, USA). Esta técnica logró la lisis de huevos de *F. hepatica* a partir de 40 segundos con 6 m/s en una sola sesión. Perlas de 0.5 mm de diámetro en adelante mostraron una mayor eficacia de lisis en una sola sesión en comparación a perlas de 0.1mm. Con respecto al peso de perlas usado, 0.5 gramos de perlas en un criovial, mostró buena eficacia en la ruptura de huevos de *F. hepatica*; sin embargo, la lisis con un 1 gr de perlas dejó fragmentos más pequeños (Figura 8). En base a estos resultados, se optó por seguir con un protocolo de lisis usando de 1gr de perlas de 0.5 mm en un criovial de 2 ml con una sola sesión de Fast-Prep de 40 segundos a 6 m/s (Tabla 7).



Figura 2. Observación microscópica (40x) de lisis de huevos de *F. hepatica* con perlas de Zirconia/silica en Fast – Prep. **a.** 1 gr de perlas de 0.1 mm de diámetro con 40 seg a 6m/s no logra una total lisis de los huevos. **b.** Total lisis de huevos con 0.5 gr de perlas de 0.5 mm de diámetro con 40 seg a 6 m/s. **c.** Se evidencia una total lisis con residuos mas pequeños al usar 1 gr de perlas de 0.5 mm o 1mm de diámetro con 40 seg a 6m/s.

Tabla 7. Capacidad de las perlas de zirconia/silica para la ruptura de huevos de *Fasciola hepatica* en 1 sesión de Fast-prep a 6m/s por 40 s.

Diámetro de las perlas (mm)	Perlas en microtubo (g)		
	0.2	0.5	1
0.1	+	+	+
0.5	+	++	+++
1	+	++	+++

+: Se evidencia algunos huevos de *F. hepatica* sin romper.

++: Se evidencia la ruptura de todos los huevos de *F. hepatica*.

+++ : Todos los huevos de *F. hepatica* fueron lisados, mostrando fragmentos residuales muy pequeños.

III.6.2 Optimización del ensayo LAMP

Volumen de reacción: La evaluación del volumen total usado para cada reacción LAMP evidenció que con 25 μ l y 10 μ l se amplifica correctamente el ADN objetivo (Figura 2).

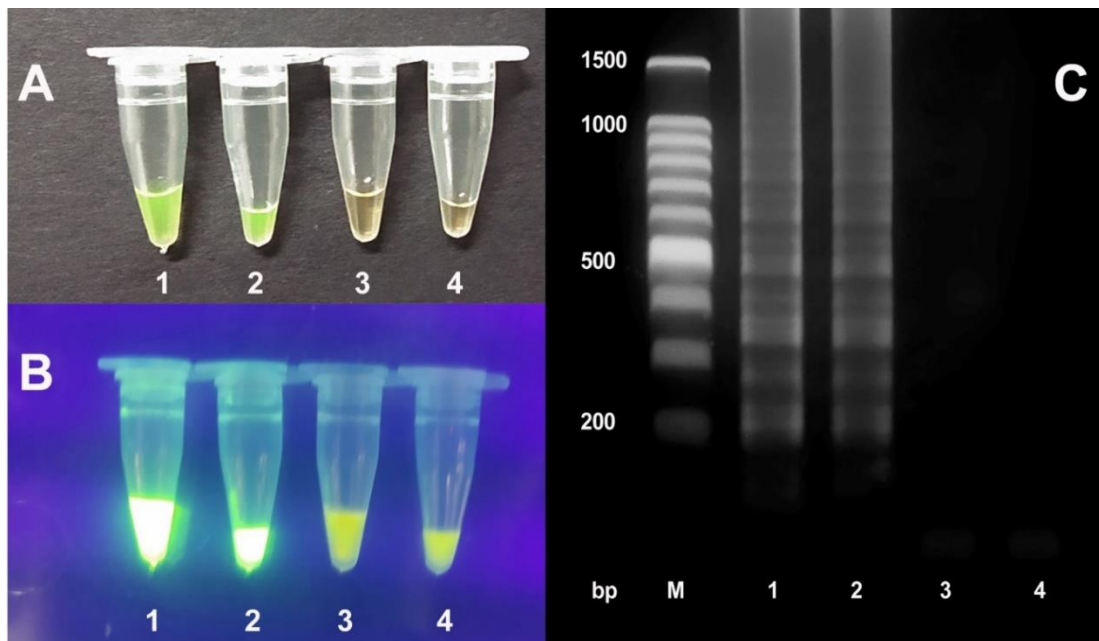


Figura 3. Reacción LAMP usando volúmenes de 25 μ l y 10 μ l. A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en los tubos de reacción;

B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con los productos LAMP. Anotaciones: 1 – control positivo 25 μ l, 2 – control positivo 10 μ l, 3 – control negativo 25 μ l, 4 – control negativo 10 μ l, M – Marcador de peso molecular.

Protocolo térmico: La evaluación de la temperatura para la amplificación de ADN con la técnica LAMP evidenció una correcta amplificación del material genético objetivo tanto con 60°C y con 62°C. En base a estos resultados se optó por usar una temperatura de 62°C (Figura 3).

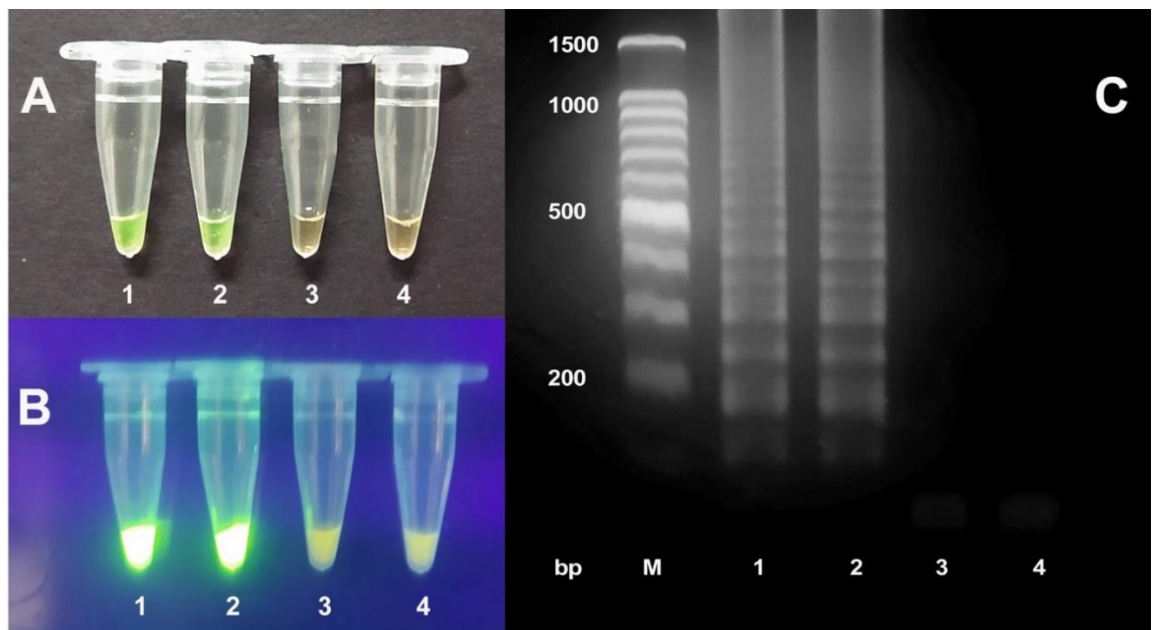


Figura 4. Reacción LAMP usando distintos protocolos térmicos. A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en los tubos de reacción; B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con productos LAMP. Anotaciones: 1 – Control positivo a 60°C por 60 min, 2 – Control

positivo a 62°C por 60 min, 3 - Control negativo sin ADN a 60°C por 60 min, 4 - Control negativo sin ADN a 62°C por 60 min, M – Marcador de peso molecular.

Tiempo de amplificación: La reacción LAMP se ejecutó correctamente con 60 min, 50 min y hasta con 40 min de amplificación a 62°C; sin embargo, se evidenció una amplificación del ADN objetivo muy débil a 30 min con 62°C (Figura 4).

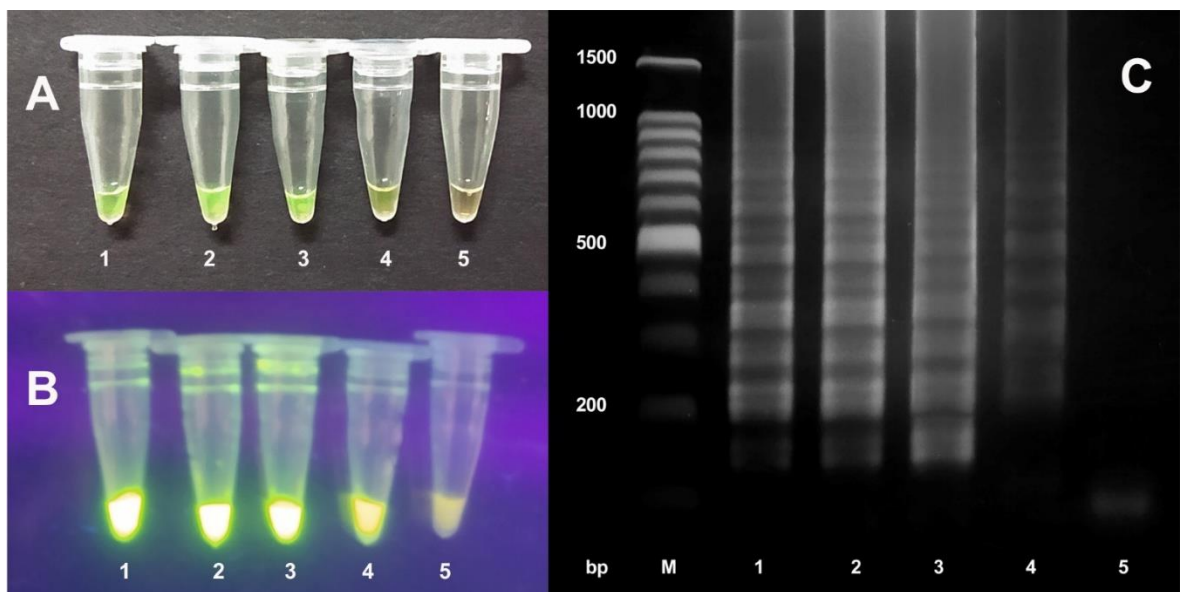


Figura 5. Reacción LAMP usando distintos tiempos para la amplificación. A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en tubos de reacción; B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con productos LAMP. Anotaciones: 1 – 62°C por 60 min, 2 – 62°C por 50 min, 3 – 62°C por 40 min, 4 – 62°C por 30 min; 5 Control negativo.

III.6.3 Sensibilidad analítica

La reacción LAMP demostró una alta sensibilidad detectando el ADN templado de *F. hepatica* hasta con 1×10^{-3} ng/ μ l (Figura 5).

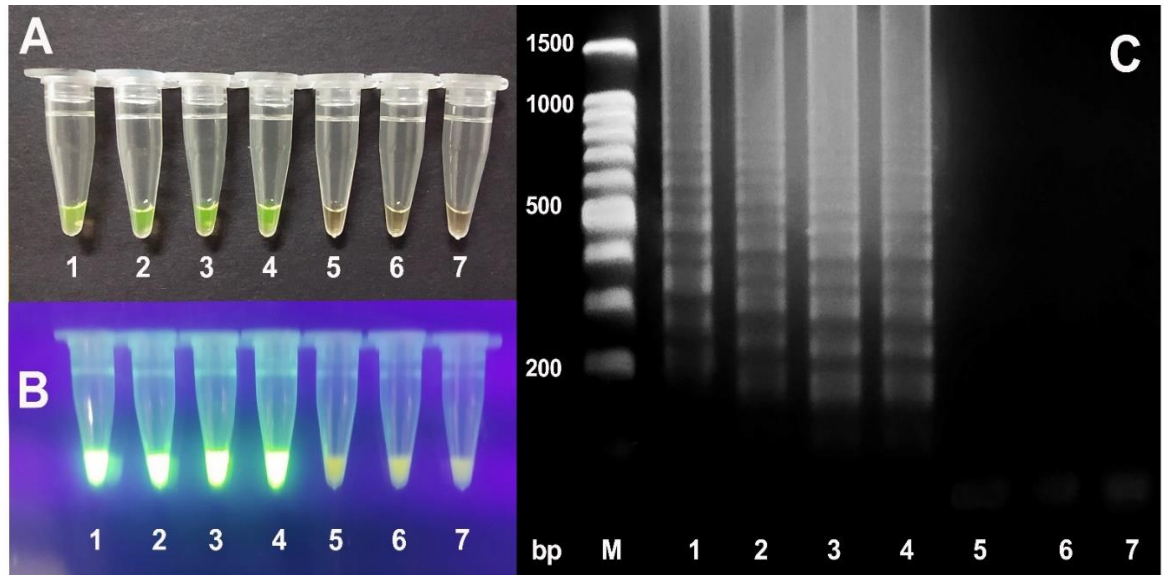


Figura 6. Sensibilidad analítica de la reacción LAMP para la detección *F. hepatica* usando diluciones seriadas del templado de ADN. A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en los tubos de reacción; B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con productos LAMP. Anotaciones: tubos 1 – 6 representan diluciones seriadas de ADN de *F. hepatica* (1 ng/ μ l a 10^{-5} ng/ μ l), tubo 7 representa un control negativo sin ADN, M – marcador de peso molecular.

Por otro lado, el mínimo de huevos en muestras fecales que puede detectar la prueba diagnóstica LAMP para *F. hepatica* usando el método de extracción de ADN optimizado fue de 1 huevo en 250 mg de heces (Figura 6).

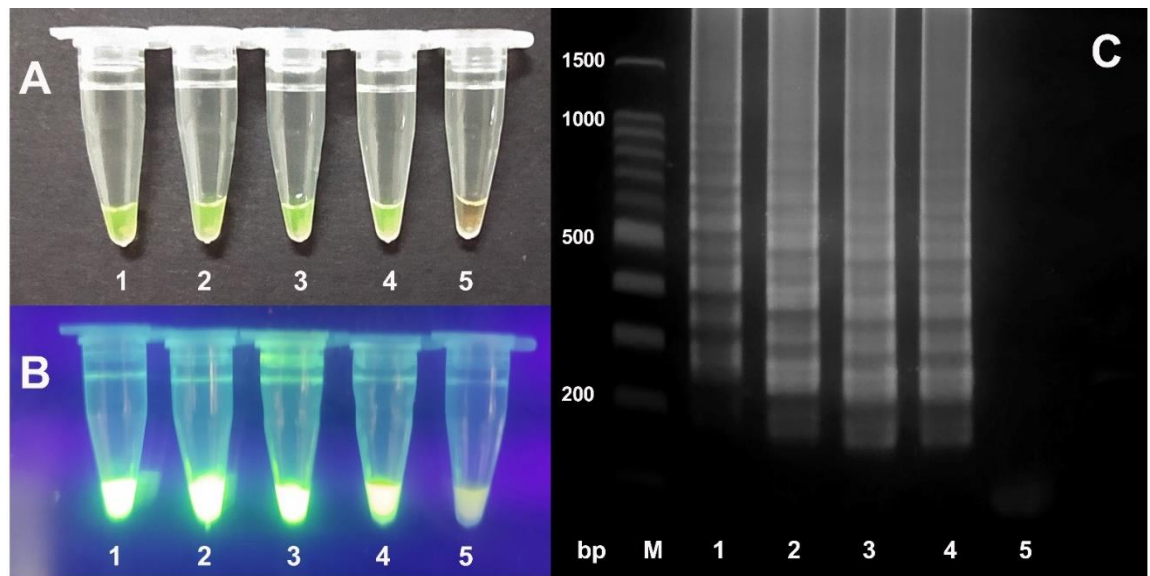


Figura 7. Límite de detección de huevos de *Fasciola hepatica* en heces por LAMP.

A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en tubos de reacción; B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con productos LAMP. Anotaciones: 1 – 1 huevo de *F.hepatica*, 2 – 5 huevos de *F. hepatica*, 3- 10 huevos de *F. hepatica*, 4 - 20 huevos de *F. hepática*, 5 – control negativo sin ADN, M – marcador de peso molecular

III.6.4 Especificidad analítica

La especificidad de los oligonucleótidos LAMP diseñados para la detección de la región ITS-1 de *F. hepatica* fue evaluada al comparar con distintas especies parasitarias relacionadas. Los resultados demostraron alta especificidad al amplificar solo el material genético de *F. hepatica*, logrando diferenciar entre otras especies parasitarias al dar resultados negativos para *Moniezia benedeni*, *Trichostrongylus axei*, *Cyclocoelum mutabile* y *Ogmogaster* spp (Figura 7).

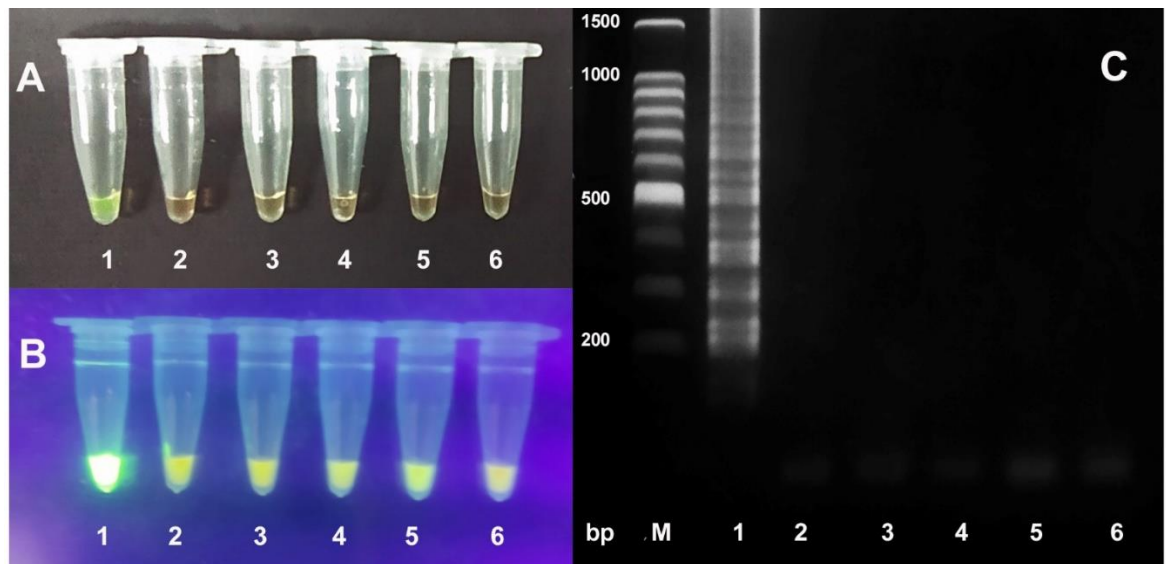


Figura 8. Especificidad analítica de la reacción LAMP para la detección *F. hepatica*. A: Visualización colorimétrica de los productos LAMP con SYBR Green en tubos de reacción; B: Productos LAMP en microtubos con luz UV; C: Gel de electroforesis con productos LAMP. Anotaciones: 1 – *Fasciola hepatica*, 2 – *Moniezia benedeni*, 3- *Cyclocoelum mutabile*, 4 – *Ogmogaster* spp, 5 – *Trichostrongylus axei*. 6 - Control negativo sin ADN.

III.6.5 Protocolo final del LAMP Optimizado

La optimización se basa en el mejoramiento de la extracción de ADN de huevos de *F. hepatica* en heces de bovino aplicado a LAMP. El resultado final de la optimización nos brinda como resultado un protocolo basado en el uso de 2 gramos de heces de bovinos donde se aplica la técnica de sedimentación (sección III.5.5.1) como técnica de concentración de huevos parasitarios con posterior lisis con perlas (sección III.5.5.3.3). Para obtener el ADN dentro de los huevos, 250mg del sedimento se liso en el Fast- Prep a 6m/s durante 40 segundos usando 1gr de perlas de 0.5 mm de diámetro de Zirconia/silica en crioviales de 2 ml. Los 250 mg de sedimento a lisar deben de estar en solución de lisis (viene con el kit de extracción de ADN); posterior a este proceso de lisis, seguir con las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN. Finalmente, el ADN obtenido se amplifica con la técnica LAMP para la región ITS-1 de *F. hepatica* desarrollada en este estudio (Figura 9).

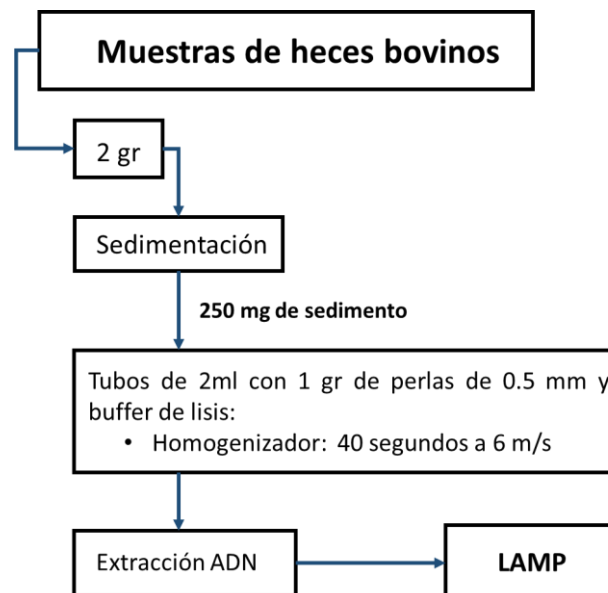


Figura 9. Esquema del proceso optimizado de extracción de ADN en huevos de *F. hepatica* en heces de bovino aplicado a LAMP.

III.6.6 Evaluación de la precisión diagnóstica

De las 115 muestras positivas previamente identificadas con el método de MRC, la técnica LAMP logró detectar 101, mostrando una sensibilidad del 87.8%. Mientras que, de las 24 muestras negativas previamente identificadas, LAMP logró clasificar correctamente como negativas a todas, evidenciando una especificidad del 100%. Estos resultados se traducen en un likelihood ratio negativo de 0.12 (Tabla 8). Esta precisión fue obtenida con muestras fecales que mostraron una mediana de hpg del 20.5 y un rango intercuartil del 8.5 – 39.5.

Tabla 8. Precisión diagnóstica de LAMP optimizado para la detección de *F. hepatica* en heces de bovinos sacrificados en el Frigorífico Camal San Pedro.

		Prueba referencia*	
		Positivo	Negativo
LAMP	Positivo	101	0
	Negativo	14	24

Sensibilidad : 87.8 % (IC 95%: 80.4% - 93.2%)

Especificidad : 100 % (IC 95%: 85.8% - 100%)

Likelihood ratio + : -

Likelihood ratio - : 0.12 (IC95: 0.08 - 0.19)

* Evaluación hepática post-mortem más microscopía del contenido vesicular (MRC).

III.6.7 Comparación de la precisión diagnóstica entre la nueva prueba

LAMP y la técnica de microscopía

El análisis de muestras pareadas entre LAMP y la técnica de microscopía evidencia que las sensibilidades y especificidades obtenidos por ambas pruebas son distintas. Se observan que la sensibilidad para LAMP es de 87.8% y 73.9% para microscopía ($p < 0.01$; Tabla 9 a) siendo estadísticamente distintas. Mientras que al analizar solo las muestras negativas se observa que no hay diferencias entre las especificidades (100%) de ambas pruebas diagnósticas (Tabla 9 b). Al analizar la concordancia entre ambas pruebas diagnósticas, se evidencia una concordancia sustancial ($k=0.64$), resaltando un mayor desempeño por parte de LAMP (Tabla 9c).

Tabla 9. Frecuencia por pares de los resultados obtenidos por LAMP y microscopía (sedimentación) en muestras fecales de bovinos para la identificación de *F. hepatica*

Microscopía	LAMP		Total	Valor p
	+	-		
Comparación de sensibilidades solo con muestras parasitadas (a)				
+	82	3	85	<0.001*
-	19	11	30	
Total	101	14	115	
Comparación de especificidades solo con muestras no parasitadas (b)				
+	0	0	0	-
-	0	24	24	
Total	0	24	24	
Muestras de animales parasitados y no parasitados (c)				
+	82	3	85	p <0.001* k= 0.64**;
-	19	35	54	
Total	0	24	24	

*Valor p obtenido con la prueba de McNemar.

**Coeficiente Kappa

III.7 DISCUSIÓN

Las técnicas moleculares coprológicas en la parasitología son una alternativa diagnóstica, pero han presentado limitaciones principalmente en la sensibilidad. Las técnicas diagnósticas moleculares isotérmicas proponen una alternativa de rápida ejecución de bajo presupuesto permitiendo su implementación en laboratorios en zonas endémicas. Ante esta situación, el presente estudio desarrolla y evalúa la precisión diagnóstica de LAMP con un proceso optimizado de extracción de ADN en muestras fecales para la detección de *F. hepatica* en heces de bovinos; logrando que LAMP alcance una sensibilidad del 87.8% y especificidad del 100% para el diagnóstico de la fasciolosis bovina.

Diversos estudios han evaluado la precisión diagnóstica de herramientas moleculares en muestras fecales, obteniendo distintos resultados. Arifin en el 2016 (68), evalúa la precisión diagnóstica de LAMP para la fasciolosis en rumiantes, alcanzando un 17.9% de sensibilidad y 100% de especificidad; esta baja sensibilidad se asocia al uso exclusivo de técnicas de extracción de ADN comerciales sin procesos físicos adicionales para la lisis de huevos parasitarios. Cabada en el 2017 (60), al evaluar la precisión diagnóstica en heces humanas con otra técnica isotérmica (Amplificación por Recombinasas y Polimerasas), encuentra una sensibilidad del 87% y una especificidad del 100%. Calvani (61), logra aumentar la sensibilidad de la PCR hasta en un 100%, extrayendo el ADN de *F. hepatica* en heces de rumiantes con kits comerciales complementados con técnicas de concentración de huevos parasitarios y lisis con perlas. Asimismo, el presente estudio aplica la técnica de extracción de ADN de Calvani a LAMP alcanzando una sensibilidad del 87%. Por otro lado, la variabilidad de la precisión diagnóstica

encontrada en los estudios mencionados puede asociarse al sesgo de desafío limitado. Este sesgo genera la sobreestimación de las medidas de precisión debido a que usa muestras de individuos muy representativos de la enfermedad (los más enfermos de los enfermos y sanos entre los sanos) (131). Los estudios de Cabada y Calvani usan como gold estándar la técnica de microscópica de sedimentación, técnica diagnóstica de baja sensibilidad que necesita de muestras con alta carga parasitaria (hpg) para poder detectar a un positivo; el uso de esta técnica como gold estándar en los estudios previamente mencionados, podría haber sobreestimado la sensibilidad encontrada. No obstante, el presente estudio usó como método de referencia la combinación de necropsia con microscopía del contenido vesical, logrando visualizar directamente al parásito y sus huevos en el animal en estudio, permitiéndonos una correcta clasificación del estado parasitario de los bovinos sin depender de la carga parasitaria (hpg); aun así, obteniendo una alta precisión diagnóstica de LAMP.

La técnica de LAMP, es una prueba molecular altamente sensible, capaz de detectar mínimas cantidades de ADN. Nuestros resultados encuentran un límite de detección de ADN similar a otros estudios, donde muestran límites de detección de 10^{-3} ng/ μ l (68,128,136) hasta 10^{-4} ng/ μ l de ADN (69). Estudios donde se evalúa el límite de detección de ADN en PCR, logran detectar concentraciones de 10 a 100 veces mayores que en LAMP, donde PCR logra detectar concentraciones desde 10^{-1} ng/ μ l hasta 10^{-2} ng/ μ l de ADN tanto en *F. hepatica* como de otros patógenos (34,137,138), encontrando una mejor capacidad para la detección de ADN en LAMP. A la alta sensibilidad de la prueba, se adiciona la nula reactividad cruzada que tuvimos con otras especies parasitarias de otros géneros. Esta especificidad

analítica se basa en el diseño de *primers* para la región ITS, siendo una región con baja variabilidad intraespecífica pero alta interespecífica, utilizado con éxito para la detección molecular de diferentes especies parasitarias como *Paraphistomum cervi*, *Fascioloides magna* (139) *Toxocara Cati* (140) o *Echinococcus granulosus* (141), y *Fasciola hepatica* (34,139,142). A pesar de su especificidad inter especies, se logró observar reacción cruzada con *Fasciola gigantica* en el análisis *in silico*; no obstante, *F. gigantica* es una especie parasitaria que no ha sido reportada en el Perú.

Las pruebas diagnósticas moleculares usadas en la coprología parasitaria necesitan de una correcta técnica de extracción de ADN para aumentar su rendimiento. Estudios donde extraen ADN de huevos de *F. hepatica* con kits comerciales basados solo en procedimientos químicos, han mostrado una reducida precisión diagnóstica con técnicas moleculares alcanzando hasta un 18% de sensibilidad (34,68,70). Nuestros resultados evidencian que se puede alcanzar un 87.8 % de sensibilidad en LAMP cuando se aplica una optimización en la extracción de ADN parasitario. El uso de métodos físicos, como la lisis de huevos parasitarios con perlas en la extracción de ADN, es una técnica que ha sido usada con éxito en la PCR, aplicado para el diagnóstico de diversas especies parasitarias como *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris Suum*, *Trichhuris trichuria*, *Echinococcus multinocularis* y *F. hepatica* (61,64,143–146). Ante esta situación, el presente estudio, utiliza esta técnica de lisis optimizando algunas características como el peso y tamaño de perlas de Zirconia/Silica mínimo necesario para lograr una lisis perfecta específicamente para huevos de *F. hepatica*. Estos detalles técnicos no han sido optimizados en estudios previos como el de Calvani, donde también aplica esta

técnica de lisis en *F. hepatica* en PCR, pero sin definir el tamaño de perla usado y sin confirmar la ruptura adecuada de los huevos con la microscopía (61). Además, se aplicó la técnica de concentración de huevos de “sedimentación”, que en conjunto con la técnica de lisis de huevos con perlas, aumentan las probabilidades de encontrar ADN parasitario en los animales infectados (64,147). Estas modificaciones pueden ser acopladas fácilmente a cualquier protocolo de extracción de ADN comercial, permitiendo un abanico de oportunidades para la mejora e implementación de estos nuevos protocolos en laboratorios.

La técnica LAMP con extracción de ADN optimizada, ha demostrado tener una buena precisión diagnóstica para la fasciolosis bovina; sin embargo, el presente estudio contiene algunas limitaciones. El presente estudio se basa en un diseño de casos y controles para pruebas diagnósticas, este tipo de diseños se asocia al sesgo de desafío limitado (131) , donde si las muestras proceden de animales muy parasitados podría sobreestimar la sensibilidad obtenida. Las muestras positivas y negativas obtenidas en este estudio fueron seleccionadas usando el MRC (necropsia y sedimentación de bilis), el uso del MRC permite detectar animales positivos con bajas cargas parasitarias, colectando en este estudio muestras de heces hasta con un hpg. Además, la dificultad de encontrar huevos de *F. hepatica* en heces de bovinos, aun estando parasitados, siempre está presente. Rapsch *et al.* (51) reporta una sensibilidad del 69% cuando evalúa la sedimentación coprológica en bovinos, pero encuentra un 93.4% de sensibilidad al aplicar la técnica de sedimentación pero con el contenido vesicular. Está marcada diferencia en la precisión diagnóstica, evidencia que aún el bovino siendo parasitado, no presenta una liberación de huevos constante en heces o no libera la cantidad suficiente para ser detectado por diversos

métodos diagnósticos (148). A pesar de estas limitaciones, el presente estudio logró detectar analíticamente hasta un huevo de *F. hepatica* y alcanza una sensibilidad del 87.8%, evidenciando que la técnica LAMP con el método de extracción optimizado aumenta significativamente las posibilidades de identificar a un bovino parasitado. Otra limitación identificada, es la falta de información sobre tratamientos pasados con triclabendazol u otros antiparasitarios en los animales evaluados. Ante esta situación, la clasificación del estado parasitario de las muestras se basó en la identificación directa de *F. hepatica* en hígados y en la microscopía de contenido vesicular para confirmar la presencia de huevos parasitarios en el animal infectado y la viabilidad de los parásitos.

En conclusión, el presente estudio desarrolla una prueba diagnóstica LAMP con una extracción de ADN optimizada para el diagnóstico de la fasciolosis bovina obteniendo una buena precisión diagnóstica, que necesita solo de 40 minutos para su ejecución y con resultados de fácil interpretación. Esta técnica de extracción de ADN optimizada, provee una flexibilidad metodológica capaz de ser aplicado con distintos protocolos de extracción de ADN comerciales. Además, la técnica LAMP, es una herramienta molecular que no necesita de equipos costosos permitiendo su aplicación en laboratorios de bajo presupuesto, cerca de las regiones rurales afectadas.

IV. CAPITULO 2: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES FASCIOLICIDAS DEL EXTRACTOS ACUOSO Y ACEITE ESENCIAL DE *ALLIUM SATIVUM* L.

IV.1 Introducción

Fasciola hepatica es un trematodo que genera la fasciolosis, una de las zoonosis parasitarias más importantes en el país. *F. hepatica* tiene un ciclo de vida indirecto donde los hospederos intermediarios son caracoles del género *Lymnaea* y el hospedero definitivo es el ganado (149). La infección por *F. hepatica* se adquiere por el consumo de hierbas sin cocción o agua contaminada (de acequias o ríos) con metacercarias (estadio larvario infectivo) (150). Cuando la metacercaria llegar al intestino por vía oral, se transforma en fasciola joven donde viaja por la cavidad abdominal alcanzando el hígado. El estadio juvenil se desarrolla en el parénquima hepático y cuando llega a los conductos biliares, consigue su forma adulta donde empieza a producir huevos (28). Las principales lesiones que genera la fasciolosis en el hospedero definitivo son colangitis (con hiperplasia y marcada fibrosis), colecistitis, cuadros obstructivos biliares (por presencia de fasciolas adultas en los conductos), abscesos, necrosis y hemorragias (45,151–154). En base a estas lesiones, los hígados parasitados son constantemente decomisados en los centros de beneficios, generando pérdidas millonarias en el sector pecuario (117). Teniendo en cuenta el impacto de la fasciolosis, contar con un tratamiento efectivo es fundamental para generar programas de control.

El tratamiento de elección de la fasciolosis es el farmacológico en base a Benzimidazoles. Triclabenzol, es el fármaco más usado desde comienzos de 1980, con una efectividad mayor al 98% en todos los estadios (71,155). Sin embargo, su

intensivo uso en el sector pecuario por más de 30 años está generando reportes frecuentes de resistencia en humanos y animales a nivel nacional (79,91,156) e internacional (84,87,88,90). El reporte de esta resistencia no solo se evidencia con el triclabendazol, sino también con otros fármacos como el albendazol y clorsulon. Albendazol, es otro benzimidazol fasciolicida muy usado en el sector pecuario, pero también se ha reportado resistencia fasciolicida a nivel mundial (91,96,157). Clorsulon, es un fármaco que ha presentado eficacias mayores al 90% en estadios adultos, pero también se ha reportado casos de resistencia en estos últimos años en rumiantes (97,99). Ante esta situación, el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas son necesarias para mejorar el control de la fasciolosis.

Se tiene conocimiento desde épocas ancestrales, que las plantas pueden ser usadas como tratamiento contra enfermedades parasitarias, basado en las propiedades de sus metabolitos secundarios (102,158,159). Entre las diversas alternativas terapéuticas basadas en plantas, *Allium sativum* (ajo) es una especie vegetal con gran actividad antiparasitaria. En diversos estudios, se ha encontrado propiedades trematicidas del extracto del ajo contra como *Gigantocotyle explanatum* (124), *Schistosoma mansoni* (125) y *Fasciola gigantica* tanto *in vitro* como *in vivo* (111,112). Estas propiedades se basan en los componentes sulfurados que tiene el ajos, siendo los más abundantes la alicina, ajoeno, sulfuros de alilo, S-alil-cisteinas, entre otros (160,161). Sin embargo, se necesitan de estudios para demostrar sus propiedades trematicidas en *F. hepatica*. En base al constante reporte de resistencia farmacológica de *F. hepatica*, es necesario realizar investigaciones en nuevas alternativas terapéuticas de baja toxicidad y eco-amigables. Por lo tanto, el presente proyecto propone evaluar la eficacia fasciolicida de los extractos de

Allium sativum contra *F. hepatica in vitro*. Los conocimientos obtenidos en este estudio serán aplicados en futuras investigaciones como una alternativa terapéutica al constante reporte de resistencia de fármacos usados contra la fasciolosis.

IV.2 Pregunta de Investigación

¿Los extractos de *A. sativum* L. tendrán una eficacia fasciolicida *in vitro* no inferior a la eficacia del triclabendazol?

IV.3 Hipótesis

La eficacia *in vitro* de extractos de *A. sativum* L. contra *F. hepatica* no es inferior a la eficacia del triclabendazol en un 10%.

IV.4 Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la eficacia fasciolicida del extracto del extracto acuoso y aceite esencial de *Allium sativum* L. *in vitro* en comparación con el triclabendazol.

Objetivos específicos

- Evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* del aceite esencial y extracto acuoso (10 µg/ml) de ajo en comparación con el triclabendazol (15 µg/ml) a 48 h de incubación.
- Estimar la concentración letal del extracto acuoso y aceite esencial de *Allium sativum* L.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto acuoso y aceite esencial de *Allium sativum* L.

IV.5 Materiales y Métodos

IV.5.1 Diseño

El presente trabajo es un estudio experimental *in vitro* donde se evaluó la eficacia trematicida de los extractos de *Allium sativum* en *Fasciola hepatica*. Para lograr el objetivo se colectaron fasciolas adultas directamente de los conductos biliares de bovinos sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro”. Las fasciolas se incubaron a 37°C con 5%CO₂ en medio RPMI 1640 adicionando el tratamiento a evaluar en el mismo medio. Los tratamientos fueron triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml) como el tratamiento estándar, el extracto acuoso de ajo (10 µg/ml) y aceite esencial de ajo (10 µg/ml). La eficacia se define con la pérdida de viabilidad de las fasciolas, determinado por la total ausencia de motilidad confirmado con un estereoscopio a 10 X, comparando el porcentaje de fasciolas totalmente paralizadas en cada grupo experimental a las 48 horas de incubación. Adicionalmente, se determinó la concentración letal (CL₅₀, CL₉₀, CL₉₉) y la citotoxicidad del extracto acuoso y aceite esencial.

IV.5.2 Criterios de selección

La muestra del estudio se basó en estadios adultos de *F. hepatica* que fueron obtenidos directamente del hígado de bovinos naturalmente infectados y que fueron sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro” de Lurín, Lima, Perú. Los bovinos evaluados en este estudio proceden de los departamentos de Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica y Cusco que son zonas endémicas de fasciolosis bovina.

- **Criterios de inclusión:** *F. hepatica* adulta con vitalidad (presencia de motilidad y coloración rosácea) que fueron obtenidos directamente de los conductos biliares de bovinos.
- **Criterios de exclusión:** *F. hepatica* adulta que no tengan vitalidad (inmóviles y coloración blanquecina) antes de iniciar el experimento.

IV.5.3 Muestreo

IV.5.3.1 Colecta de *F. hepatica*

El presente estudio aplicó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Las fasciolas fueron obtenidas según el proceso de sacrificio de bovinos en el “Frigorífico Camal San Pedro” y según la aparición de hígados con presencia de *F. hepatica*. Todas las fasciolas fueron obtenidas directamente de los conductos biliares de bovinos recién sacrificados. Las fasciolas colectadas fueron almacenadas en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (bencilpenicilina 1000 UI/ml y gentamicina 100 µg/ml) y transportados a 37 ± 2 °C (por 3 horas aproximadamente) hacia el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas del departamento de Ciencias Celulares y Moleculares de la UPCH para su inmediata incubación.

IV.5.3.2 Colecta de ajos

Las muestras de ajos a evaluar en el estudio fueron obtenidas del mercado “UNICACHI” en el distrito de La Victoria, Lima. Los ajos obtenidos mostraron las siguientes características morfológicas: bulbo morado-blanquecino, con forma desuniforme, con un peso de bulbo aproximado de 40g, con 11 – 15 dientes de ajos por bulbo y con 40 mm de diámetros aproximadamente siendo compatibles con la

morfología de la variedad Napuri (162). Para confirmar la taxonomía de las muestras vegetales obtenidas, dos bulbos de ajos, de los 20 kg obtenidos en el mercado, fueron germinados y cultivados hasta su maduración (Figura 10) para ser analizados por un experto en taxonomía botánica. El informe del experto concluyó que las muestras vegetales obtenidas son ajos de la variedad Napuri (Anexo VIII.1.3).



Figura 10. Especímenes de *Allium sativum* germinados y cultivados para su posterior identificación taxonómica.

IV.5.4 Procesamiento de muestras biológicas

IV.5.4.1 Preparación de los extractos de ajos

Los extractos de ajos fueron elaborados en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

IV.5.4.2 Preparación del aceite esencial

El aceite esencial fue obtenido con la técnica de destilación por arrastre de vapor. Inicialmente, los bulbos de ajos fueron lavados con agua de grifería y posteriormente con agua bidestilada. Luego, se procedió a secar los ajos y aplicar un proceso de molido parcial con un mortero. Los ajos parcialmente molidos fueron procesados por la técnica de destilación por arrastre de vapor el cual duró 3 horas aproximadamente. El aceite esencial se colectó por decantación para luego agregar sulfato de sodio anhídrido para eliminar el agua residual. Una vez obtenido el aceite esencial, se almacenó en frascos estériles herméticos ámbar a 4°C hasta su uso. El rendimiento obtenido fue de 1 ml por cada kilogramo de ajo (0.1% v/p).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Volumen aceite esencial obtenido (ml)}}{\text{Peso inicial de ajos (gr)}} \times 100$$

Los componentes del aceite esencial del ajo, se identificaron mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) como un servicio especializado de la Unidad de Investigación de Productos Naturales, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Tabla 10)

Tabla 10. Composición química del aceite esencial de *Allium sativum* L. analizados por GC-MS

Componentes	T _R (min)	Porcentaje en la muestra
Dialil disulfuro	18.15	50.24
Alil trisulfuro	24.89	17.06
Alil metil trisulfuro	20.05	11.03
1Alil metil disulfuro	12.76	9.04
(1E)-1-propen-1-il 2-propen-1-il disulfuro	18.69	3.11
1-Alil-2-isopropildisulfano	18.49	1.65
Desconocido (C ₁₁ H ₁₄ O ₂)	27.17	1.44
2-Vinil-1,3-diti-4-eno	22.42	1.26
4 Dimetil trisulfuro	14.57	1.21
3H-1,2-Ditiol	14.16	1.18
1,2,3-Tritia-4-ciclohexeno	22.14	0.76
3-Vinil-1,2-ditiaciclohex-4-eno	21.68	0.73
Dialil tetrasulfuro	31.51	0.5
Metil 1-propenil disulfuro	13.46	0.43
1-Alil-3-propiltrisulfano	25.19	0.35

IV.5.4.3 Preparación del extracto acuoso

Los extractos acuosos del ajo se ejecutaron acorde el protocolo de Abid-Essefi *et al* (163) con algunas modificaciones. Los bulbos de ajo se lavaron con agua de grifería y posteriormente con agua bidestilada. Los bulbos de ajo (1 kg) se licuaron con agua bidestilada (500 ml). El licuado se filtró con telas (tocuyo y tul) y posteriormente con papel de filtro Whatman (125 mm diámetro) a través de una bomba de vacío. Los extractos fueron deshidratados a través de un rotoevaporador (RE 100 Pro - DLAB) y posteriormente en estufa a 40°C hasta su total desecación. Del procesamiento de 1 kg de ajos se logró obtener 100 g de extracto acuoso, alcanzando un porcentaje de rendimiento del 10% (p/p).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto seco}(gr)}{\text{Peso inicial ajos}(gr)} \times 100$$

Los componentes del extracto acuoso de ajo, se identificaron mediante la cromatografía líquida de ultra-alta performance acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) como un servicio especializado de la Unidad de Investigación de Productos Naturales, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Tabla 11).

Tabla 11. Composición química del extracto acuoso de *Allium sativum* L. analizados por UHPLC-MS.

Componente	T _R (min)	Fórmula
Glutamil-S-metilcisteina	1.75	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₅ S
N-gamma-Glutamil-S-allilcisteina	1.78	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S
S-(2-carboxipropil)glutathiona	2.44	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₈ S
Gamma-Glutamil-S-allilthio-Cisteína	7.66	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂
Gamma-Glutamyl-leucina	3.57	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅
Histidina	1.29	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂
Ornitina	1.3	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
Arginina	1.3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
Glutamil-fenilalanina	1.75	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅
Lauril dietanolamina	14.9	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂
Hexasacarina	1.37	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₁
Tetrasacárido	1.4	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁
Trisacárido	1.4	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆
Disacárido	1.44	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Ácido málico	1.63	C ₄ H ₆ O ₅
Ácido cítrico	1.69	C ₆ H ₈ O ₇
9,12,13-trihidroxi-10-ácido-octadecenoico	14.32	C ₁₈ H ₃₄ O ₅
Dietiltoluamida	15.14	C ₁₂ H ₁₇ NO
7-butiloxepan-2-1	15.69	C ₁₀ H ₂₀ O ₁₂

Gingerol	15.92	C ₁₇ H ₂₆ O ₄
----------	-------	--

IV.5.4.4 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo a usar en este estudio fueron RPMI 1640 y Hedon-Fleig. El medio RPMI 1640 se preparó según la tabla 13, adicionando penicilina (1'000,000 UI) y gentamicina (100 mg), ajustando el medio a un ph de 7.4. Finalmente el medio se filtró con membranas de 0.22 µm (MF Millipore™) en cabina de flujo laminar para ser almacenado a 6-8°C hasta su uso.

Tabla 12. Componentes del medio de cultivo RPMI 1640 para *F. hepatica*

Componente	Cantidad
RPMI 1640	10.4 gr (1 frasco)
Bicarbonato de Sodio	2 gr
Hepes	5.9 gr
Agua Mili Q	1 lt

El medio Hedon – Fleig se preparó según la tabla 14 adicionando penicilina (1'000,000 UI) y gentamicina (100 mg), ajustando a un pH de 7.4. Finalmente, el medio se filtró con membranas de 0.22 µm (MF Millipore™) en cabina de flujo laminar para ser almacenado a 6- 8°C hasta su uso.

Tabla 13. Componentes para preparar el medio de cultivo Hedon – Fleig para *F. hepatica*

Componente	Medida
Glucosa	1 gr
Cloruro de sodio	7 gr
Cloruro de potasio	0.3 gr
Cloruro de calcio	0.1 gr
Bicarbonato de sodio	1.5 gr
Sulfato de magnesio	0.3 gr
Agua mili-Q	1 lt

IV.5.4.5 Evaluación de la viabilidad de *F. hepatica*

La estandarización del cultivo de *F. hepatica* como la evaluación de los tratamientos se evaluó midiendo la viabilidad en base a la motilidad del parásito. Para medir la motilidad, se creó una nueva escala de motilidad específica para *F. hepatica* usando como referencia las escalas de medición de motilidad de Kiuchi *et al* (164) y Duthaler *et al* (165) donde:

Puntaje 3 – Buena motilidad (movimientos rápidos y con buena intensidad).

Puntaje 2 – Motilidad reducida (se evidencia movimientos lentos y con poca intensidad, reducidos en un 50%).

Puntaje 1 – Motilidad muy reducida (mueve solo partes del cuerpo, generalmente en zonas periféricas).

Puntaje 0 – Inmóvil (Muestra una total parálisis y una coloración pálida, se confirma con un estereoscopio a 10X).

IV.5.5 Optimización del cultivo de *F. hepatica*

IV.5.5.1 Optimización del medio transporte de *F. hepatica*

Se probaron cuatro medios para evaluar el mantenimiento de la viabilidad de las fasciolas durante el transporte hacia el laboratorio de investigación de Enfermedades Infecciosas - UPCH. Los medios a evaluar fueron DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma Aldrich), Hedon-Fleig, RPMI-1640 (Sigma – Aldrich, USA) y solución PBS. Las fasciolas fueron recolectadas directamente de los conducto biliares y almacenadas en tubos Falcon de 50 ml conteniendo los distintos medios de cultivo. Cada tubo contenía aproximadamente 15 fasciolas y se transportaron a temperatura ambiente, 37°C y temperaturas mayores a 38°C. La viabilidad fue evaluada con escala de motilidad (sección IV.5.4.5). Todas fasciolas lograron llegar con buena vitalidad al laboratorio (3 horas de viaje aproximadamente) con todos los medios de cultivos mientras estuvieran en aproximadamente 37°C. Finalmente, se optó por utilizar el medio RPMI-1640 suplementado con antibióticos por mantener una buena vitalidad durante su traslado (Tabla 14).

Tabla 14. Viabilidad de *Fasciola hepatica* según diferentes condiciones de transporte durante 3 horas de viaje

Temperatura	Medio			
	RPMI 1640 (n=90)*	DEMEN (n=90)*	Hedon-Fleig (n=90)*	PBS (n=90)
Temperatura ambiente (18°C)*	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
37°C*	3 (0)	3 (0)	2 (0)	2 (0)
>38°C*	1 (1)	1 (0)	1 (1)	0 (0)

*Se presenta la mediana (rango intercuartil) de la viabilidad medida según la siguiente escala de motilidad: 0, totalmente paralizada, 1 motilidad muy reducida, 2 motilidad reducida, 3 buena motilidad. Por cada interacción se evaluaron 15 estadios adultos de *F. hepatica* por duplicado.

IV.5.5.2 Selección del medio de cultivo para la incubación de *F. hepatica*

Una vez llegadas las fasciolas al laboratorio, se procedía a su lavado. Este proceso se llevó a cabo varias veces con el medio Hedon – Fleig y la última lavada se realizaba con el medio RPMI 1640 (Gibco, NY). Las fasciolas que presentaban vitalidad (buena motilidad y coloración rosácea) posterior al lavado se incluían en el estudio (Figura 11).



Figura 11. Estadios adultos de *F. hepatica* con buena viabilidad (coloración rosácea y buena motilidad) después del proceso de lavado

Para el cultivo de *F. hepatica* se evaluaron tres medios de cultivo: DMEM, Hedon-Fleig y RPMI-1640 en placas de 6 (con área de crecimiento celular de 9.5 cm² y con un volumen máximo de 17 ml por pocillo) y 24 pocillos (con área de crecimiento celular de 1.9 cm² y con un volumen máximo de 3.5 ml por pocillo), con diversos volúmenes de cultivo (2, 2.5, 3, 4 y 5 ml por pocillo) a 37°C, con 5% CO₂ y con 95% de humedad. Se usó 1 fasciola por pocillo en las placas de 24 pocillos y 2 fasciolas por pocillo en las placas de 6 pocillos, ejecutando este experimento por duplicado. La viabilidad fue evaluada con escala de motilidad (sección III.12.4.3). El medio DMEN y Hedon-Fleig logró mantener con gran viabilidad a las fasciolas con una mediana de 4 días; mientras que el medio RPMI logró mantener con vida a las fasciolas con una mediana de 5 días; finalmente algunas fasciolas presentaron mortalidad a las 72 horas con todos los medios de cultivo. En base a los resultados se optó por utilizar el medio RPMI con 3 ml por pocillo para el cultivo de *F. hepatica* (Tabla 15).

Tabla 15. Viabilidad de *F. hepatica* en diversas condiciones de cultivo

Viabilidad de <i>Fasciola hepatica</i> adulta a las 48 horas de incubación*										
Medio de cultivo	Volumen de medio de cultivo usado									
	2ml		2.5ml		3ml		4ml		5ml	
	1.9cm²†	9.5cm²†	1.9cm²	9.5cm²	1.9cm²	9.5cm²	1.9cm²	9.5cm²	1.9cm²	9.5cm²
RPMI-1640	1	1	2	2	3	3	-	3	-	3
DMEM	1	1	2	2	3	3	-	3	-	3
Hedon-Fleig	1	1	2	2	2	2	-	3	-	3

*Se presenta la mediana de la viabilidad de estadios adultos de *F. hepatica*, evaluados con la siguiente escala de motilidad: 0, totalmente paralizada, 1 motilidad muy reducida, 2 motilidad reducida, 3 buena motilidad.

†1.92cm²: Área de crecimiento por pocillo correspondiente a placas de cultivo de 24 pocillos; 9.5cm²: Área de crecimiento por pocillo correspondiente a placas de cultivo de 6 pocillos.

IV.5.5.3 Dilución de los tratamientos

Triclabendazol sulfóxido (Sigma - Aldrich) se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) obteniendo una solución madre o stock (10mg/ml). La solución madre fue agregada al medio RPMI 1640 obteniendo 15 µg/ml como concentración final con DMSO no mayor al 0.2%.

El aceite esencial puro se agregó al medio RPMI 1640 obteniendo 10 µg/ml como concentración final con una concentración de DMSO no mayor al 0.2%. El

extracto acuoso puro se agregó directamente al medio RPMI 1640 sin DMSO obteniendo 10 µg/ml como concentración final.

Se evaluó el triclabendazol sulfóxido debido a que es el metabolito activo del triclabendazol, siendo 15 µg/ml la concentración plasmática obtenida en rumiantes a dosis oral de 10mg/kg (166). Por otro lado, se utilizó 10 µg/ml de extractos de ajos, simulando concentraciones plasmáticas de sus metabolitos secundarios en base a estudios de concentración plasmática en roedores (167,168) y en los resultados de los análisis fitoquímicos obtenidos en este estudio.

IV.5.6 Eficacia fasciolicida de los extractos de ajos

La evaluación fasciolicida se llevó a cabo con la incubación de *F. hepatica* en medio RPMI 1640 durante 48 horas a condiciones de 37°C con 5% de CO₂ y con 95% de humedad. Bajo estas condiciones se evaluaron 3 tratamientos:

Grupo 1: Triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml)

Grupo 2: Aceite esencial de ajo (10 µg/ml)

Grupo 3: Extracto acuoso de ajo (10 µg/ml)

IV.5.7 Evaluación dosis – respuesta de los extractos de ajos en *F. hepatica*

Adicional a la evaluación *in vitro* de la eficacia de los extractos de ajos con el triclabendazol previamente mencionados, también se evaluó la concentración letal (CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉) del extracto acuoso y aceite esencial del ajo.

Se desarrolló el ensayo de CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉ evaluando diferentes concentraciones del aceite esencial (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml) y del extracto acuoso (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml) de *Allium sativum* durante 48 horas de incubación a 37°C con 5% CO₂ y

95% humedad. El medio RPMI 1640 fue usado como control negativo para el extracto acuoso y el mismo medio con DMSO 0.2% fue usado como control negativo para el aceite esencial. En cada concentración evaluada se utilizó 4 fasciolas y se desarrolló por triplicado, así también para los controles negativos. La CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉ se evaluó en base al porcentaje de fasciolas totalmente paralizadas a las 48 h de incubación, siendo evaluadas macroscópicamente y confirmado la parálisis con un estereoscopio a 10X. Adicionalmente, se describió la motilidad de las fasciolas durante las 12, 24 y 48 horas de incubación.

IV.5.8 Evaluación de la citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos de ajos mediante el método cuantitativo de proliferación celular con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), basado en el protocolo de Rahman *et al* (169). Para el ensayo se empleó células Vero y se cultivaron en medio RPMI sin rojo de fenol (Sigma Aldrich, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma Aldrich, USA) en microplacas de cultivo celular de 96 pocillos. Las condiciones de cultivo durante todo el ensayo fueron de 37°C con 5% CO₂ y 95% de humedad. Se inició con la adición de 100 µl de células Vero (12 x 10⁴ células) en cada pocillo incubando por 24 horas. Luego de la incubación, se expuso a diferentes diluciones de extractos de ajos obteniendo concentraciones finales de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg/ml para el extracto acuoso y de 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml para el aceite esencial en un volumen final de 200 µl por pocillo. Las diluciones se incubaron durante 72 horas, luego se agregó 25 µl de MTT (5 mg/ml) incubando por 5 horas. Se usó como control negativo DMSO para el aceite esencial y solución salina al 0.9% estéril para el extracto acuoso. Posteriormente, se eliminó

el medio de cultivo y se agregó 100 µl de isopropanol. La absorbancia se mide con un lector de microplacas a 570 nm. El porcentaje de viabilidad de las células se calcula analizando la absorbancia (A) con la siguiente fórmula: $(\text{muestra A } 570 \text{ nm} / \text{control negativo A } 570 \text{ nm}) \times 100$. El 50% de inhibición del crecimiento celular (GI₅₀) fue estimado con una regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 9.4.1.

IV.5.9 Variables de estudio

Tabla 16. Operacionalización de las variables

Variable	Definición		Valores posibles	Criterios de medición	Tipo de variable
	Conceptual	Operacional			
Eficacia del tratamiento	Porcentaje de fasciolas paralizadas	Porcentaje de fasciolas totalmente inmóviles observadas por estereoscopio a 10X	0 al 100	De razón	Dependiente
Tratamientos fasciolicidas	Sustancias que modifican la viabilidad de <i>F. hepatica</i> .	Tratamiento 1: Triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml) 2: Extracto acuoso de ajo (10 µg/ml) 3: Aceite esencial de ajo (10 µg/ml)	Tratamiento 1, 2 y 3	Nominal	Independiente

Variable dependiente

La eficacia fasciolicida se basó en el porcentaje de fasciolas totalmente paralizadas posterior a las 48 horas de incubación. La total parálisis se definió como la ausencia de movimiento identificados macroscópicamente y confirmados por un estereoscopio a 10X.

Variable independiente

Los tratamientos a evaluar en este estudio son el triclabendazol (15 µ/ml), el extracto acuoso (10 µg/ml) y el aceite esencial de *Allium sativum* (10 µg/ml).

IV.5.10 Análisis estadístico

El presente trabajo evaluó la eficacia fasciolicida *in vitro* de extractos de *Allium sativum* comparándolo con triclabendazol. La no inferioridad del extracto acuoso (10 µg/ml) y el aceite esencial del ajo (10 µg/ml) en comparación con el triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml) se evaluó mediante la construcción de un intervalo de confianza al 95% de las diferencias de las eficacias de los tratamientos. Se declara la no inferioridad si el límite inferior del IC fue superior al -10 % (para el aceite esencial o el extracto acuoso menos el triclabendazol sulfóxido). Además, el porcentaje de fasciolas totalmente paralizadas entre los distintos tratamientos se analizó con la prueba de chi cuadrado. El análisis estadístico se ejecutó con el programa STATA 17 usando un nivel de significancia del 0.05.

Para determinar las concentraciones letales (CL₅₀, CL₉₀, CL₉₉) se aplicó una regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism 9.4.1, basados en la formula $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + (\text{EC50}/X)^{\text{HillSlope}})$; donde EC50 = $\text{ECF} / (F / (100 - F))^{(1/\text{HillSlope})}$, siendo ECF la concentración efectiva del agonista que se desea evaluar en F porcentaje esperado (concentración letal en 50, 90 y 99%),

bottom o el valor mínimo (valor de Y en ausencia del agonista), top el valor más alto (valor de Y producido por la concentración más alta del agonista); y “Hillslope” o factor de la pendiente, que describe la forma de la pendiente (<1 la curva sigmoidea es un poco aplanada, >1 la curva sigmoidea es más profunda y 1 = curva sigmoidea estándar). Para determinar la citotoxicidad en base a la concentración de inhibición del crecimiento celular (GI₅₀), se utilizó el modelo no lineal a través del software GraphPad Prism 9.4.1, basándose en la fórmula $Y=100/(1+(IC50/X)^{HillsSlope})$, donde IC50 es la concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular y “Hillslope” que describe la forma de la pendiente (170).

IV.5.11 Cálculo de tamaño de muestra

Se estimó un tamaño de muestra de 336 fasciolas viables designando 112 para cada tratamiento para demostrar que no existe inferioridad entre la eficacia fasciolicida de los extractos de ajos con el triclabendazol *in vitro*. Se aplica un 80% de poder de prueba y un nivel de significancia del 0.05 usando una fórmula para estimar no inferioridad en muestras independientes (171). El porcentaje de eficacia *in vitro* del tratamiento estándar (triclabendazol) contra *F. hepatica* se asume que es del 90% a más (82,172) y se espera que la eficacia del nuevo tratamiento (*Allium sativum*) sea igual o no sea inferior en un 10% (111,112).

IV.5.12 Aspectos éticos

Este protocolo de tesis está registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), además de haber sido evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIEA-UPCH) y aprobado con el código 104002.

El presente proyecto no genera ningún riesgo animal. Las muestras obtenidas son parásitos de animales naturalmente infectados que fueron sacrificados en el “Frigorífico Camal San Pedro”, centro de beneficio que cuenta con todas las licencias que impone el estado peruano. Asimismo, la confidencialidad de los datos de los ganaderos propietarios de los animales reclutados en el estudio ha sido correctamente preservadas, codificando toda la información recolectada en formato alfa-numérico, sin el registro del nombre ganadero dueño del animal parasitado ni de la razón social del centro de crianza.

IV.6 Resultados

IV.6.1 Eficacia fasciolicida de los extractos de ajos

Las fasciolas tratadas con triclabendazol mostraron un mayor porcentaje de fasciolas paralizadas en comparación con el aceite esencial (16.9% vs 4.5%, $p=0.002$). El límite inferior del IC95% para las diferencias de las eficacias de estos tratamientos excedió el margen de no inferioridad del 10% previamente establecido (diferencia -12.5, IC95%: de -20.4 a -4.6), por lo tanto, se evidencia que el aceite esencial del ajo fue inferior al triclabendazol. Por otro lado, el extracto acuoso no generó parálisis en ningún espécimen adulto de *F. hepatica*. Finalmente, al comparar el aceite esencial con el extracto acuoso, se evidencia una mayor eficacia por parte del aceite esencial (4.5% vs 0%, $p=0.024$).

Tabla 17. Eficacia fasciolicida *in vitro* de los extractos de ajos durante 48 h de incubación

Tratamientos	<i>F. hepatica</i> paralizadas		<i>F. hepatica</i> no paralizadas		Diferencia de eficacia (IC95%)	Valor p*
	n	%	n	%		
Aceite esencial (10 µg/ml)	5	4.5	107	95.5	-12.5 (-20.4, -4.6)	0.002
Triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml)	19	16.9	93	83.1		
Extracto acuoso (10 µg/ml)	0	0	112	100	-16.9 (-23.9, -10.1)	<0.001
Triclabendazol sulfóxido (15 µg/ml)	19	16.9	93	83.1		
Aceite esencial (10 µg/ml)	5	4.5	107	95.5	4.4 (0.6, 8.2)	0.024
Extracto acuoso (10 µg/ml)	0	0	112	100		
Grupo control (RPMI 1640 + DMSO 0.2%)	0	0	112	0	-	-

* Valor p obtenido con la prueba de chi cuadrado

IV.6.2 Evaluación Dosis-respuesta

IV.6.2.1 Evaluación según escala de motilidad

Aceite esencial

Los efectos del aceite esencial de ajo en la viabilidad de las fasciolas tratadas *in vitro* son mostradas en la Figura 12. Las fasciolas que no recibieron tratamiento (control), se mantuvieron activas con gran motilidad (puntaje 3) durante las 48 horas de incubación.

A las 12 horas de incubación, las fasciolas incubadas a concentraciones de 10 a 75 $\mu\text{g/ml}$ mostraron gran motilidad (puntaje 3), esta motilidad fue descendiendo a partir de concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones de 750 $\mu\text{g/ml}$ el 33% de fasciolas estaban totalmente paralizadas mientras que el 67 % restante presentaban motilidad muy reducida (puntaje 1). Todas las fasciolas incubadas a 1 mg/ml estuvieron totalmente paralizadas (puntaje 0).

A las 24 horas, las fasciolas incubadas a concentraciones de 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ mostraron gran motilidad (puntaje 3) mientras que a concentraciones de 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ mostraron un descenso en la motilidad. A concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ el 16% y 66% de las fasciolas incubadas, respectivamente, presentaron una parálisis total (puntaje 0); mientras que a partir de concentraciones de 750 $\mu\text{g/ml}$, el 100% de las fasciolas estuvieron totalmente paralizadas.

A las 48 horas, el 58% de las fasciolas incubadas a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ muestran escasa motilidad (puntaje 1) y un 8% están paralizadas. La motilidad se reduce a medida que aumentan las concentraciones, donde el 33 y el 58% de las fasciolas están totalmente paralizadas a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 75 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; mientras que el resto de fasciolas sobrevivientes a mencionadas concentraciones muestran escasa motilidad (puntaje 1). El 92% de las fasciolas incubadas a 100 $\mu\text{g/ml}$ estuvieron totalmente paralizadas; mientras que a partir de concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ se evidenció que el 100% de las fasciolada incubadas estaban totalmente paralizadas.

Las fasciolas paralizadas en este estudio, no recuperaron la motilidad aún después de 3 lavados con medio Hedon-Fleig y una posterior incubación de 24 horas con medio RPMI 1640.

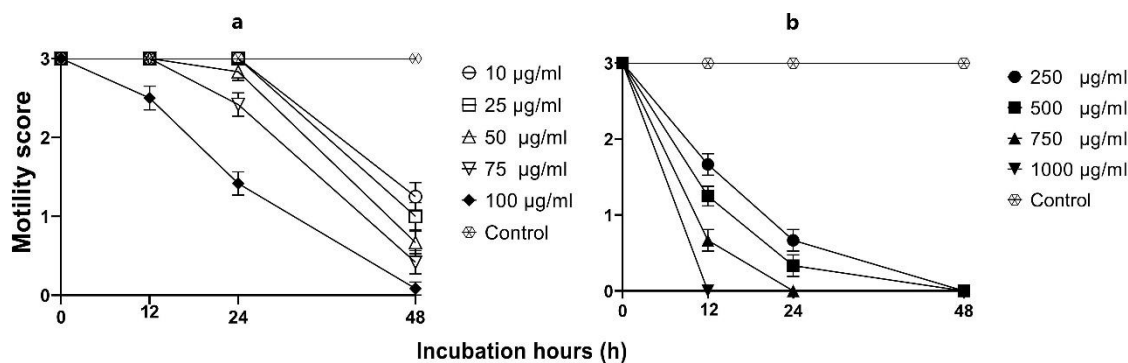


Figura 12. Efectos *in vitro* de diferentes concentraciones del aceite esencial de ajo en *Fasciola hepatica* adulta. (a) concentraciones de 0.01 a 0.1 mg/ml; (b) concentraciones de 0.25 a 1 mg/ml.

Extracto acuoso

Los efectos del extracto acuoso de ajos en la viabilidad de las fasciolas tratadas *in vitro* son mostradas en la Figura 13.

Las fasciolas que no recibieron tratamiento (control), se mantuvieron activas con motilidad de todo el cuerpo durante las 48 horas de incubación. A las 12 horas, las fasciolas incubadas a concentraciones de 100 µg/ml hasta 7.5 mg/ml presentaron gran motilidad (puntaje 3). Por otro lado, las fasciolas incubadas a concentraciones de 10 a 25 mg/ml mostraron una reducción en su motilidad (puntaje 2), mientras que a concentraciones de 50 mg/ml se observó una total parálisis del 33% de las fasciolas (puntaje 0). Concentraciones de 75 a 100 mg/ml generaron la parálisis del 100% de las fasciolas incubadas (puntaje 1).

A las 24 horas, las fasciolas incubadas a concentraciones de 100 µg/ml hasta 750 µg/ml, presentaron gran motilidad (Puntaje 3). Las fasciolas cultivadas a concentraciones de 1 mg/ml a 7.5mg/ml redujeron su motilidad (puntaje 2), mientras que a concentraciones de 10 mg/ml a 25 mg/ml presentaron motilidad en

solo partes de su cuerpo (puntaje 1). Concentraciones a partir de 50 mg/ml generaron la total parálisis del 100% de las fasciolas (puntaje 0).

A las 48 horas, las fasciolas incubadas a concentraciones de 100 μ g/ml hasta 500 μ g/ml mostraron gran motilidad (puntaje 3). Las fasciolas cultivadas a concentraciones de 750 μ g/ml a 1mg/ml redujeron su motilidad (puntaje 2) mientras que las fasciolas incubadas a concentraciones de 2 mg/ml a 5mg/ml vieron reducida su motilidad progresivamente hasta solo mover parte de su cuerpo (puntaje 1). El 33 % de las fasciolas incubadas a concentraciones de 7.5 mg/ml presentaron una total parálisis, mientras que el 83% de las fasciolas incubadas con 10 mg/ml presentaron total parálisis.

Las fasciolas paralizadas en este estudio, no recuperaron la motilidad aún después de 3 lavados con medio Hedon-Fleig y una posterior incubación de 24 horas con medio RPMI 1640.

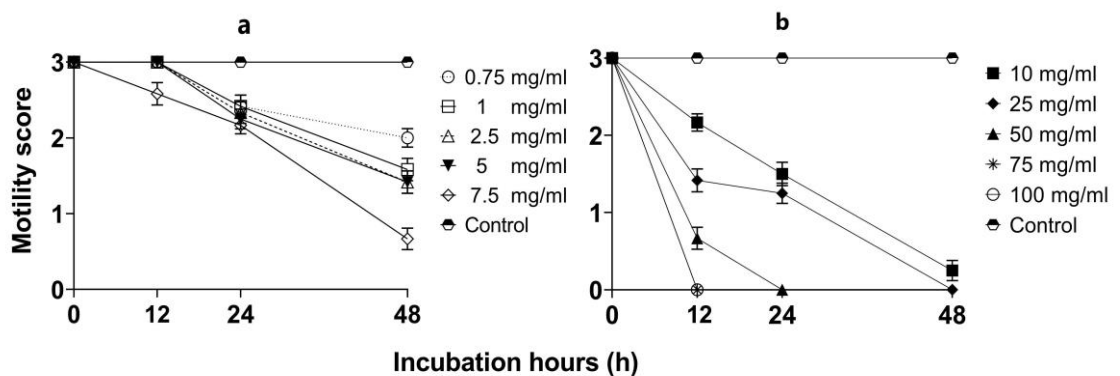


Figura 13. Efectos *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto acuoso de ajo en *Fasciola hepatica* adulta. (a) concentraciones de 0.75 a 7.5 mg/ml; (b) concentraciones de 10 a 100 mg/ml.

IV.6.2.2 Concentración letal

Aceite esencial

Se analizaron los efectos de las diferentes concentraciones (0.01 – 1 mg/ml) del aceite esencial para lograr la completa parálisis de *F. hepatica* a 48 horas de incubación. El análisis concluye que a 0.066 mg/ml se obtiene una letalidad del 50% de las fasciolas incubadas. A concentraciones de 0.119 y 0.228 mg/ml se obtiene una letalidad del 90% y 99% de las fasciolas respectivamente (Tabla 18).

Extracto acuoso

Se analizaron los efectos de las diferentes concentraciones (0.1 – 100 mg/ml) del extracto acuoso para lograr la completa parálisis de *F. hepatica* a 48 horas de incubación. El análisis concluye que a 8.37 mg/ml se logra una letalidad del 50% de las fasciolas incubadas. A concentraciones de 11.76 y 17.03 mg/ml se logra una letalidad del 90% y 99% de las fasciolas respectivamente (Tabla 18).

IV.6.3 Citotoxicidad

La citotoxicidad del aceite esencial y extracto acuoso del ajo fueron evaluados usando células Vero. La concentración inhibitoria al 50% (GI₅₀) del aceite esencial fue de 0.459 mg/ml mientras que para el extracto acuoso fue mayor a 100 mg/ml (Tabla 18).

Tabla 18. Evaluación de las propiedades fasciolicidas *in vitro* de extractos de ajos en *Fasciola hepatica* adulta

Extracto <i>Allium sativum</i>	Propiedades fasciolicidas <i>In vitro</i>			Citotoxicidad <i>in vitro</i> (Células Vero)
Tipo de extracto	CL* 50 (IC 95%**)	CL* 90 (IC 95%**)	CL* 99 (IC 95%**)	GI[†]50 (IC 95%**)
Extracto acuoso (mg/ml)	8.375 (8.127 – 8.631)	11.761 (11.053 – 12.635)	17.03 (15.150 – 19.571)	> 100
Aceite esencial (mg/ml)	0.066 (0.056 - 0.075)	0.119 (0.096 - 0.173)	0.228 (0.146 – 0.509)	0.459 (0.424 – 0.495)

*Concentración letal

** Intervalo de confianza al 95%

† Inhibición del crecimiento celular

IV.7 Discusión

El presente estudio evalúa las propiedades fasciolicidas de los extractos de ajos (*A. sativum*) *in vitro*. Nuestros resultados evidencian que el aceite esencial a 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron significativamente menos eficaces que a 15 $\mu\text{g/ml}$ de triclabendazol a las 48 horas de incubación. Se conoce que 15 $\mu\text{g/ml}$ de triclabendazol sulfóxido es la máxima concentración plasmática del metabolito activo alcanzada en rumiantes con una dosis oral de 10mg/kg (166), siendo esta la dosis recomendada por la OIE. No obstante, el porcentaje de eficacia fasciolicida del triclabendazol resultó menor a lo esperado, confirmando los constantes casos de resistencia a este fármaco a nivel nacional (79,91) e internacional (85,90). Esta resistencia también ha sido reportada en algunos estudios *in vitro*, donde especímenes de *F. hepatica* incubadas a 15 $\mu\text{g/ml}$ de triclabendazol sulfóxido evidencian un bajo porcentaje de parálisis a las 48 horas (165). No obstante, se tiene evidencia que a mayores concentraciones plasmáticas obtenidas por mayores dosis orales de triclabendazol (2 dosis de 10 mg/kg) *in vivo*, se alcanza una buena actividad fasciolicida, siendo la recomendación actual en el tratamiento contra la fasciolosis (122,173).

Por otro lado, sí se encontró actividad fasciolicida *in vitro* de los extractos de ajos a concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados son consistentes con otros trabajos, que evaluaron la eficacia de los extractos de ajos en *F. hepatica* y otros parásitos. Los trematodos como *Fasciola gigantica* han evidenciado una total parálisis con el extracto acuoso al 5% a las 3 horas de incubación (111) y aceite esencial con 3 mg/ml a los 15 minutos (112); estos efectos también se evidencian con la incubación de *Gigantocotyle explanatum* a 3 mg/ml durante 15 minutos y

con *Cotylophoron cotylophorum* a 1mg/ml por 24 horas ambos con extractos etanólicos de ajos (174). Las propiedades antiparasitarias del ajo también se han demostrado en cestodos y nematodos como *Echinococcus granulosus* (104,175), *Hymenolepsis nana* (176), *Strongylus* spp (177) y *Haemonchus contortus* (106). Estos estudios son concordantes con nuestros resultados, donde a concentraciones de 17.03 mg/ml de extracto acuoso y a 0.228 mg/ml de aceite esencial, se logra una total parálisis en todas las fasciolas evaluadas a las 48 horas de incubación. No obstante, nuestros resultados necesitaron de mayores concentraciones para obtener la actividad antiparasitaria. Estas variaciones en las concentraciones letales podrían asociarse a diferencias de las mismas especies parasitarias evaluadas y a las diferencias de los cultivares de ajos utilizados.

Las propiedades antiparasitarias del ajo se asocian principalmente a la presencia de componentes sulfurados, que inhiben diversas vías metabólicas. Se ha demostrado que los compuestos sulfurados del ajo tienen afinidad por el grupo tiol de las enzimas, esta afinidad permite su alteración estructural inhibiendo la actividad enzimática e interfiriendo en diversas vías metabólicas (178,179). Estudios en protozoarios (*Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* y *Entamoeba histolitica*) demostraron la capacidad de la alicina y sus derivados sulfurados (sulfuros, ajoenos y vinil ditiinas) para inhibir cisteína proteasas, enzimas necesarias para el procesamiento de proteínas (180,181). Estudios con extractos etanólicos, encuentran una inhibición de la producción de enzimas del metabolismo de carbohidratos en *Haemonchus contortus*, impidiendo el normal desarrollo todas las vías energéticas (182). También se ha reportado la reducción del consumo de glucosa en *Gigantocotyle explanatum* y *Fasciola gigantica*

incubados con extractos etanólicos de ajos (183). Si bien el mecanismo de acción de los extractos de ajos todavía no está del todo elucidado, existe evidencia de sus propiedades antiparasitarias, siendo necesario más estudios para su total comprensión.

En los extractos de ajos obtenidos en este estudio, se logró identificar una gran variedad de componentes sulfurados. Los componentes fitoquímicos del aceite esencial presentaron una gran diversidad de componentes sulfurados, siendo los más abundantes el dialil disulfuro (50.2 %) y alil trisulfuro (17.1%), estos componentes sulfurados concuerdan con lo reportados en otras investigaciones, principalmente en el dialil disulfuro. Hoda *et al.*, al extraer aceite esencial de ajo en Egipto obtiene un 45.7% de dialil disulfuro y un 15.6% de dialil trisulfuro en ajos de cultivar de piel-blanca, encontrando diferencias con el cultivar de piel-morada con un 58.5 % de dialil disulfuro y un 22.4% dialil trisulfuro (184). Plata-Rueda *et al.*, encuentran que el dimetil trisulfuro (19.9%) y el dialil disulfuro (18.6%) son los componentes más abundantes de aceites esenciales de ajos en Brasil (185). Jardim *et al.*, encuentra que en el aceite esencial de ajo, los componentes más abundante son el dialil trisulfuro (66.7%) y al dialil di sulfuro (21.3%) (186). Por otro lado, el extracto acuoso obtenido en este trabajo estuvo compuesto por solo 4 elementos sulfurados (Glutamil-S-metilcisteína, N-gamma-Glutamil-S-allilcisteína, S-(2-carboxipropil) glutatona y Gamma-Glutamil-S-allitio-cisteína. Componentes sulfurados semejantes han sido extraídos en otros estudios en extractos acuosos, siendo el S-alil-L-cisteína, gamma-glutamil-S-alilcisteína y S-alil-mercaptocisteína, componentes sulfurados no volátiles comúnmente encontrados (160,187). A pesar de existir semejanzas en los componentes extraídos

en otros estudios, se observa variaciones cuantitativas y cualitativas, esto se asocia a las diferencias que pueden existir en el uso de distintas variedades de ajos y a las condiciones de cultivo con distintas condiciones geo-ecológicas (188,189).

El presente estudio evalúa la actividad fasciolicida de los extractos de ajos encontrando propiedades antiparasitarias a concentraciones mayores de 10 µg/ml; sin embargo, el actual estudio presenta algunas limitaciones. La generalización de los resultados a una situación *in vivo* resulta distante, basándose en la omisión de muchas condiciones como el metabolismo hepático de los componentes del ajo, la concentración y tiempo en plasma de los metabolitos, entre otros factores no evaluados en este estudio. No obstante, nuestros resultados son fundamentales para generar los primeros conocimientos sobre estos nuevos principios activos y conocer las concentraciones necesarias para producir un efecto fasciolicida. Otra limitación identificada, es la falta de información sobre tratamientos pasados con triclabendazol u otros antiparasitarios en los animales evaluados por ser obtenidos en un camal. No obstante, las fasciolas incluidas en este estudio pasaron por un criterio de viabilidad (motilidad y coloración) antes de iniciar el experimento, asegurando las mejores condiciones de viabilidad de las fasciolas seleccionadas. Por otro lado, el presente estudio no tuvo como objetivo evaluar la eficacia acorde a la provincia de procedencia. Sin embargo, se obtuvieron especímenes de *F. hepatica* de diversas regiones de zonas endémicas del Perú (Provincia de Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica y Cusco), brindándonos una perspectiva sin restricciones geográficas de su eficacia para su aplicación en diversas regiones del país en investigaciones futuras.

Finalmente, en base a las CL₅₀ obtenidos en este estudio, se puede sugerir su aplicación para el control de los estadios larvarios de *F. hepatica* en los hospederos intermediarios (caracoles lymneidos). Estudios en *Fasciola gigantica* evidencian que los metabolitos secundarios del ajo como la alicina o el dialil disulfuro tienen propiedades fasciolicidas contra sus estadios larvarios (redias y cercarías) (190,191). Estos resultados generan oportunidades para el control de la fasciolosis en hospederos intermediarios, debido a que se podrían implementar en las zonas agrícolas debido a su poca toxicidad para el medio ambiente.

En conclusión, el presente estudio encuentra que los extractos de ajos tienen poca actividad fasciolicida siendo inferior al triclabendazol; no obstante, a concentraciones mayores de 10 µg/ml se observan propiedades trematicidas contra *F. hepatica*.

V. CONCLUSIONES GENERALES

- El presente trabajo evidencia que la prueba molecular LAMP creada en este estudio puede detectar el material genético de *F. hepatica* a concentraciones mínimas de 1×10^{-3} ng/ml, sin reacción cruzada con otras especies parasitarias y con un tiempo de ejecución de solo 40 minutos. Este nuevo LAMP aplicado con la nueva técnica de extracción de ADN para muestras fecales desarrollada en este estudio, logra alcanzar una sensibilidad del 87.7% y especificidad del 100% en bovinos naturalmente infectados con *F. hepatica*.
- Las propiedades fasciolicidas *in vitro* del aceite esencial y extracto acuoso de ajo a 10 µg/ml son inferiores al triclabendazol sulfóxido a 15 µg/ml. No obstante, en la evaluación de dosis-respuesta se evidencia que el CL₅₀ y CL₉₉ del aceite esencial es de 66 µg/ml y 228 µg/ml respectivamente; mientras que el CL₅₀ y CL₉₉ del extracto acuoso es de 8.37 mg/ml y 17.03 mg/ml respectivamente a las 48 horas de incubación, estas concentraciones no evidenciaron citotoxicidad.

VI. RECOMENDACIONES GENERALES

- Con respecto a la primera investigación. Se conoce que, para aumentar aún más la sensibilidad diagnóstica se necesita analizar mayor cantidad de muestra fecal, de esta forma, se recomienda seguir investigando nuevas técnicas de extracción de ADN que puedan analizar mayor cantidad de muestra fecal a bajo costo. Por otro lado, se conoce las limitaciones de tener acceso a pruebas diagnósticas de alta precisión cerca de las zonas endémicas de fasciolosis; por lo tanto, se recomienda realizar estudios donde se implemente esta prueba diagnóstica en laboratorios de bajo presupuesto y evaluar su desempeño en las mismas comunidades campesinas que son afectadas por la fasciolosis.
- En base a las propiedades fasciolicidas de los extractos de *Allium sativum*, se recomienda realizar estudios donde se evalúe la eficacia antiparasitaria en estadios larvarios de *F. hepatica* tanto *in vitro* como *in vivo* en los hospederos intermediarios (caracoles lymneidos). Esta recomendación es necesaria debido a que el control en hospederos intermediarios es una pieza clave en la continuidad del ciclo biológico, el intento de su control con molusquicidas ha generado efectos perjudiciales para el medio ambiente, siendo los extractos de ajo una alternativa de control eco-amigable. Además, se recomienda realizar estudios *in vivo* en bovinos y otros rumiantes, evaluando la eficacia fasciolicida y un análisis farmacocinético para conocer las concentraciones plasmáticas de los metabolitos secundarios obtenidas ante diversas dosis orales, además de comprender mejor el comportamiento de estos metabolitos a través del tiempo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb Pathog.* 2017;109:253–62. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.006>
2. Caravedo MA, Cabada M. Human Fascioliasis: Current Epidemiological Status and Strategies for Diagnosis, Treatment, and Control. *Res Rep Trop Med.* 2020;Volume 11:149–58. <http://doi.org/10.2147/rrtm.s237461>
3. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis. *Digenetic Trematodes.* 2019. 71–103 p. <http://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6>
4. Livia-Córdova G, Burga-Cisterna C, Quiroz-Dávila A, Rentería-Samamé B, Mercado-Gamarra A, Del Solar-Vela M, et al. Prevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *Fasciola hepatica* en bovinos de comunidades campesinas de Huancabamba (Piura- Perú). *Rev Investig Vet del Peru.* 2021;32(1):1–8. <http://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19510>
5. Sarkari B, Mansouri M, Noorpisheh-Ghadimi S, Abdolahi-Khabisi S, Doshmanziari A. Molecular evaluation of a case of *Fasciola hepatica* in wild boar in Southwestern Iran: A case report. *Iran J Parasitol.* 2018;13(1):149–55.
6. Flores B, Pinedo R, Suarez F, Angelats R, Chavez A. Prevalencia de fasciolosis en llamas y alpacas en dos comunidades rurales de Jauja, Perú. *Rev Inv Vet Peru.* 2014;25(2):284–92.
7. Dittmar K. Arthropod and Helminth Parasites of the Wild Guinea Pig, *Cavia aperea*, from the Andes and the Cordillera in Peru, South America. *J*

- Parasitol. 2002;88(2):409. <http://doi.org/10.2307/3285601>
8. Labruna M, Costa F, Port-Carvalho M, Oliveira A, Souza S, Castro M. Lethal Fascioliasis in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J Parasitol.* 2018;104(2):173–6. <http://doi.org/10.1645/17-114>
 9. Gomez-Puerta LA, Angulo-Tisoc JM, Pacheco JI, Lopez-Urbina MT, Gonzalez AE. Natural infection of *Fasciola hepatica* in cervids from Peru. *Rev Peru Biol.* 2019;26(1):143–8. <http://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15918>
 10. Quigley A, Sekiya M, Egan S, Wolfe A, Negredo C, Mulcahy G. Prevalence of liver fluke infection in Irish horses and assessment of a serological test for diagnosis of equine fasciolosis. *Equine Vet J.* 2017;49(2):183–8. <http://doi.org/10.1111/evj.12577>
 11. L'Ollivier C, Eldin C, Lambourg E, Brouqui P, Lagier JC. Case report: First molecular diagnosis of liver abscesses due to *Fasciola hepatica* acute infection imported from Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102(1):106–9. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0671>
 12. Akbulut S, Sahin TT, Kolu M, Isik B, Bayindir Y, Yilmaz S. Living liver donor with *Fasciola hepatica*: First case report in the literature. *Exp Clin Transplant.* 2021;19(3):276–9. <http://doi.org/10.6002/ECT.2017.0318>
 13. Valero MA, Mas-Coma S. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol (Praha).* 2000;47(1):17–22. <http://doi.org/10.14411/fp.2000.004>
 14. Tantalean M, Gutierrez D, Juarez D. *Lymnaea columella* a new intermediate host of *Fasciola hepatica* in Peru. *Trop Med Semin.* 1976;

15. Larrea H, Florez M, Vivar R, Huamán P, Velásquez J. Hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* en el Perú. Rev Horiz Médico. 2007;7(1):39–46.
16. Londoño P, Chávez A, Li O, Suárez F, Pezo D. Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvarias de *Fasciola hepatica* en altitudes sobre los 4000 msnm en la sierra sur del Perú. Rev Investig Vet del Perú. 2009;20(1):58–65.
17. Medeiros C, Scholte R, D'Ávila S, Caldeira RL, Carvalho O dos S. Spatial distribution of Lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(3):235–52. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652014000300010>
18. Cordova E, Naquira F, Naquira C. Lymnaea diaphana King como huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en Arequipa (Perú). Arch Per Patol Clin. 1961;15:165–72.
19. Grados O, Ibañez N. Huésped intermediario de *Fasciola hepatica* en Cajamarca. Arch Per Pat Clin. 1971;25:185–90.
20. Barges D, Artigas P, Khoubbane M, Ortiz P, Naquira C, Mas-Coma S. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. Parasites and Vectors. 2012;5(1):1–16. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-174>
21. Bardales-Valdivia J, Barges M, Hoban-Vergara C, Bardales-Bardales C, Goicochea-Portal C, Bazán-Zurita H, et al. Spread of the fascioliasis endemic

- area assessed by seasonal follow-up of rDNA ITS-2 sequenced lymnaeid populations in Cajamarca, Peru. *One Heal.* 2021;13. <http://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100265>
22. Bargues M, Artigas P, Mera Y Sierra R, Pointier J, Mas-Coma S. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007;101(7):621–41. <http://doi.org/10.1179/136485907X229077>
 23. Dung BT, Doanh PN, The DT, Loan HT, Losson B, Caron Y. Morphological and molecular characterization of lymnaeid snails and their potential role in transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. *Korean J Parasitol.* 2013;51(6):657–62. <http://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.6.657>
 24. Andrews S. The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Dalton JP, editor *Fasciolosis* Wallingford (United Kingdom): CAB Internationa. 1999. p. 1–29.
 25. Dixon K. The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology.* 1966;56(3):431–56.
 26. Dawes B, Hughes D. Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Adv Parasitol.* 1935;2:97–168.
 27. Sukhdeo M, Sukhdeo S. Fixed behaviours and migration in parasitic flatworms. *Int J Parasitol.* 2002;32(3):329–42. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00334-4](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00334-4)
 28. Moazeni M, Ahmadi A. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol.* 2016;169:81–9.

<http://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.010>

29. Valderrama AA. Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Rev Med Vet.* 2016;32:121. <http://doi.org/10.19052/mv.3861>
30. Pinilla JC, Florez AA, Uribe N. Prevalence and risk factors associated with liver fluke *Fasciola hepatica* in cattle and sheep in three municipalities in the Colombian Northeastern Mountains. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2020;19(June 2019):100364. <http://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100364>
31. Cabada MM, Morales ML, Webb CM, Yang L, Bravenec CA, Lopez M, et al. Socioeconomic factors associated with *Fasciola hepatica* infection among children from 26 communities of the cusco region of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(5):1180–5. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0372>
32. Lopez M, White AC, Cabada MM. Burden of *Fasciola hepatica* infection among children from Paucartambo in Cusco, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(3):481–5. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0448>
33. Trueba G, Guerrero T, Fornasini M, Casariego I, Zapata S, Ontaneda S, et al. Detection of *Fasciola hepatica* infection in a community located in the Ecuadorian andes. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(4):518. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.518>
34. Carnevale S, Pantano ML, Kamenetzky L, Malandrini JB, Soria CC, Velásquez JN. Molecular diagnosis of natural fasciolosis by DNA detection in sheep faeces. *Acta Parasitol.* 2015;60(2):211–7. <http://doi.org/10.1515/ap-2015-0030>
35. Bargues MD, Malandrini JB, Artigas P, Soria CC, Velásquez JN, Carnevale

- S, et al. Human fascioliasis endemic areas in Argentina: Multigene characterisation of the lymnaeid vectors and climatic-environmental assessment of the transmission pattern. *Parasites and Vectors*. 2016;9(1):1–20. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1589-z>
36. Wilches C, Jaramillo JG, Muñoz D, Robledo S, Vélez ID. Presencia de infestación por *Fasciola hepatica* en habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. *Rev Infect*. 2009;13(2):92–9.
37. Mas-Coma S, Buchon P, Funatsu IR, Angles R, Artigas P, Valero MA, et al. Sheep and Cattle Reservoirs in the Highest Human Fascioliasis Hyperendemic Area: Experimental Transmission Capacity, Field Epidemiology, and Control Within a One Health Initiative in Bolivia. *Front Vet Sci*. 2020;7(October):1–14. <http://doi.org/10.3389/fvets.2020.583204>
38. Parkinson M, O'Neill S, Dalton J. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol Infect*. 2007;135(4):669–74. <http://doi.org/10.1017/S095026880600728X>
39. Marcos L, Maco V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantalean M, et al. Hiperendimicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: Factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepatica*. *Rev Gastroenterol Perú*. 2004;24:158–64. <http://doi.org/mdl-15241494>
40. Ashrafi K, Valero MA, Peixoto R V, Artigas P, Panova M, Mas-Coma S. Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: Relationships between zonal overlap and phenotypic traits. *Infect Genet Evol*. 2015;31(January):95–109. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.009>

41. Cabada M, Castellanos-Gonzalez A, Lopez M, Caravedo MA, Arque E, White AC. *Fasciola hepatica* infection in an indigenous community of the peruvian jungle. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(6):1309–12. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0769>
42. Fox NJ, White PC, McClean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR. Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. *PLoS One.* 2011;6(1):19–21. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016126>
43. Bargues MD, Angles R, Coello J, Artigas P, Funatsu IR, Cuervo PF, et al. One Health initiative in the Bolivian Altiplano human fascioliasis hyperendemic area: Lymnaeid biology, population dynamics, microecology and climatic factor influences. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2021;30(2):e025620. <http://doi.org/10.1590/S1984-29612021014>
44. Blancas G, Terashima A, Maguiña C, Vera L, Alvarez H, Tello R. Fasciolosis humana y compromiso gastrointestinal: Estudio de 277 pacientes en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. 1970-2002. *Rev Gastroenterol del Perú.* 2004;24:143–57.
45. Dusak A, Onur M, Cicek M, Firat U, Ren T, Dogra V. Radiological imaging features of *Fasciola hepatica* infection – A pictorial review. *J Clin Imaging Sci.* 2012;2(1):2. <http://doi.org/10.4103/2156-7514.92372>
46. Tantale M, Angulo J, Quispe M, Díaz S. Diferenciación morfológica de huevos de tres especies de trematodos en rumiantes del Perú. *Peruv j parasitol.* 2012;20(2):78–82.
47. Maco V, Marcos L, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Espinoza J, et al. Fas2-ELISA y la técnica de sedimentación rápida modificada por

- Lumbreras en el diagnóstico de la infección por *Fasciola hepatica*. Rev Médica Hered. 2002;13(2):49–57.
48. Terashima A, Marcos LA, Maco V, Canales M, Samalvides F, Tello R. Técnica de sedimentación en tubo de alta sensibilidad para el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Gastroenterol Perú. 2009;29:305–10.
49. Gonzalez-Lanza C, Manga-Gonzalez Y, Del-Pozo-Carnero P, Hidalgo-Argüello R. Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. Vet Parasitol. 1989;34(1–2):35–43. [http://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90162-3](http://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90162-3)
50. Tengase D, Kebede A, Taqaba E. Comparison on Sensitivity of Coprological and Post Mortem Examination in Diagnosis of Bovine Fasciolosis: Prevalence of the Disease in Bedele Municipal Abattoir. African J Basic Appl Sci. 2018;8(1):63–72. <http://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2016.8.1.23412>
51. Rapsch C, Schweizer G, Grimm F, Kohler L, Bauer C, Deplazes P, et al. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. Int J Parasitol. 2006;36(10–11):1153–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.001>
52. Jefferies JR, Campbell AM, Rossum AJV, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* products. Proteomics. 2001;9861(April):1128–32.
53. Cordova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Naquira C, Guerra H, et al. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human

- fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(6):660–6.
54. Córdova M, Reátegui L, Espinoza J. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(1):54–7. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90178-5](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90178-5)
 55. Salimi-Bejestani M, McGarry J, Felstead S, Ortiz P, Akca A, Williams D. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res Vet Sci.* 2005;78(2):177–81. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.08.005>
 56. Kuerpick B, Schnieder T, Strube C. Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 2013;193(1–3):206–13. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.021>
 57. Cornejo H, Oblitas F, Cruzado S, Quispe Wi. Evaluación de una prueba de ELISA con antígeno metabólicos de *Fasciola hepatica* para el diagnóstico de fasciolosis humana en cajamarca, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):569–74.
 58. Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Boersma W, Borgsteede FHM, Van Milligen FJ. Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Int J Parasitol.* 1999;29(5):685–96. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00017-X](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00017-X)
 59. Martínez-Pérez J, Robles-Pérez D, Rojo-Vázquez F, Martínez-Valladares M. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Vet Parasitol.*

- 2012;190(1–2):80–6. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.002>
60. Cabada MM, Malaga JL, Castellanos-Gonzalez A, Bagwell KA, Naeger PA, Rogers HK, et al. Recombinase polymerase amplification compared to real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Fasciola hepatica* in human stool. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(2):341–6. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0601>
61. Calvani NED, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Scrambled eggs: A highly sensitive molecular diagnostic workflow for *Fasciola species* specific detection from faecal samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(9):1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005931>
62. Ayaz S, Ullah R, Abdel-Salam NM, Shams S, Niaz S. *Fasciola hepatica* in Some Buffaloes and Cattle by PCR and Microscopy. *Sci World J.* 2014;2014. <http://doi.org/10.1155/2014/462084>
63. Kozak M, Garbacewicz A, Wędrychowicz H. The performance of a PCR assay for the detection of *Fasciola hepatica* DNA in fecal samples. *Wiadomości Parazytol.* 2008;54(Supplement 31):2008.
64. Calvani NE, Cheng T, Green C, Hughes P, Kwan E, Maher E, et al. A quick and simple benchtop vortex egg-disruption approach for the molecular diagnosis of *Fasciola hepatica* from ruminant faecal samples. *Parasitol Res.* 2018;117(8):2685–8. <http://doi.org/10.1007/s00436-018-5926-3>
65. Carriço J, Sabat A, Friedrich A, Ramirez M. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: Databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Eurosurveillance.* 2013;18(4):1–8. <http://doi.org/10.2807/ese.18.04.20382-en>

66. Karami A, Gill P, Kalantar Motamedi M, Saghafinia M. A review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and disadvantages. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(3):293–302. <http://doi.org/10.4103/0974-777X.83538>
67. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63--e63.
68. Arifin MI, Höglund J, Novobilský A. Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Vet Parasitol.* 2016;232:8–11. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.003>
69. Ai L, Li C, Elsheikha HM, Hong SJ, Chen JX, Chen SH, et al. Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Vet Parasitol.* 2010;174(3–4):228–33. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.005>
70. Amiri S, Shemshadi B, Shirali S, Kheirandish F, Fallahi S. Accurate and rapid detection of *Fasciola hepatica* copro-DNA in sheep using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. *Vet Med Sci.* 2021;7(4):1316–24. <http://doi.org/10.1002/vms3.455>
71. Boray JC, Crowfoot PD, Strong MB, Allison JR, Schellenbaum M, Von Orelli M, et al. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec.* 1983;113(14):315–7.
72. Stitt AW, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in

- adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol Res.* 1993;79(7):529–36.
73. Suhardono S, Widjajanti S, Stevenson P, Carmichael I. Control of *Fasciola gigantica* with triclabendazole in Indonesian cattle. *Trop Anim Health Prod.* 1991;23(4):217–20.
74. Qureshi T, Craig T, Drawe D, Davis D. Efficacy of triclabendazole against fascioloidiasis (*Fascioloides magna*) in naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis.* 1989;25(3):378–83. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-25.3.378>
75. Maingi N, Otieno R, Weda E, Gichohi V. Effects of three anthelmintic treatment regimes against *Fasciola* and nematodes on the performance of ewes and lambs on pasture in the highlands of Kenya. *Vet Res Commun.* 2002;26(7):543–52. <http://doi.org/10.1023/A:1020291531858>
76. Vargas-Calla A, Gomez-Puerta LA, Calcina J, Gonzales-Viera O, Gavidia C, Lopez-Urbina MT, et al. Evaluation of activity of triclabendazole against *Taenia solium* metacestode in naturally infected pigs. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(1):23–6. <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.005>
77. Maco V, Marcos L, Delgado J, Herrera J, Nestares J, Terashima A, et al. Efficacy and tolerability of two single-day regimens of triclabendazole for fascioliasis in Peruvian children. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):445–53. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0148-2015>
78. Villegas F, Abgles R, Barrientos R, Barrios G, Valero M, Hamed K, et al. Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Negl*

- Trop Dis. 2012;6(8):e1720. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001720>
79. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Vet Parasitol.* 2013;195(1–2):118–21. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001>
80. Millán J, Mull R, Freise S, Richter J, Cañas C, Marrero P, et al. The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(5–6):264–9. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.264>
81. Webb CM, Cabada MM. Recent developments in the epidemiology, diagnosis, and treatment of *Fasciola* infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(5):409–14. <http://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000482>
82. Shokier K, Aboelhadid S, Waleed M. Efficacy of five anthelmintics against a natural *Fasciola* species infection in cattle. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 2013;2(1):41–5. <http://doi.org/10.1016/j.bjbas.2013.09.006>
83. Craig T, Huey R. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in naturally infected calves. *Am J Vet Res.* 1984;45(8):1644–5.
84. Kamaludeen J, Graham-Brown J, Stephens N, Miller J, Howell A, Beesley NJ, et al. Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. *Vet Rec.* 2019;184(16):1–6. <http://doi.org/10.1136/vr.105209>
85. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH. Resistance of *Fasciola*

- hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol.* 2000;91(1–2):153–8. [http://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00267-3](http://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00267-3)
86. Winkelhagen AJ, Mank T, de Vries PJ, Soetekouw R. Apparent Triclabendazole-resistant human *Fasciola hepatica* infection, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(6):1028–9. <http://doi.org/10.3201/eid1806.120302>
87. Kelley JM, Rathinasamy V, Elliott TP, Rawlin G, Beddoe T, Stevenson MA, et al. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. *Vet Parasitol.* 2020;277(October 2019):109019. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.109019>
88. Romero J, Villaguala C, Quiroz F, Landaeta-Aqueveque C, Alfaro G, Pérez Fernández R. Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of Triclabendazole and Nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019;28(1):164–7. <http://doi.org/10.1590/s1984-296120180089>
89. Gil LC, Díaz A, Rueda C, Martínez C, Castillo D, Werner A. Resistant human fascioliasis: report of four patients. *Rev Med Chil.* 2014;142(10):1330–3.
90. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol.* 2011;178(3–4):364–6.

<http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.047>

91. Chávez A, Sánchez L, Arana C, Suárez F. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de jauja, Perú. *Rev Investig Vet del Peru*. 2012;23(1):90–7.
92. Morales ML, Tanabe MB, White AC, Lopez M, Bascope R, Cabada MM. Triclabendazole treatment failure for *Fasciola hepatica* infection among preschool and school-age children, Cusco, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(7):1850–7. <http://doi.org/https://doi.org/eid2707.203900>
93. Cabada MM, Lopez M, Cruz M, Delgado JR, Hill V, White AC. Treatment failure after multiple courses of triclabendazole among patients with fascioliasis in Cusco, Peru: A case series. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004361>
94. Terashima A, Canales M, Maco V, Marcos LA. Observational study on the effectiveness and safety of multiple regimens of triclabendazole in human fascioliasis after failure to standard-of-care regimens. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;25:264–7. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.023>
95. Johns D, Dickeson S. Efficacy of albendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Aust Vet J*. 1979;55(9):431–2.
96. Mamani W, Condori R. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a albendazol y triclabendazol, La Paz – Bolivia. *Rev Investig Vet del Perú*. 2012;20(2):254–62. <http://doi.org/10.15381/rivep.v20i2.619>

97. Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez F. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Exp Parasitol.* 2014;136(1):59–62. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.010>
98. Malone J, Ramsey R, Loyacano A. Efficacy of clorsulon for treatment of mature naturally acquired and 8-week-old experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Am J Vet Res.* 1984;45(5):851–4.
99. Coles G, Stafford K. Activity of oxyclozanide, nitroxynil , clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet Rec.* 2001;148:723–4. <http://doi.org/10.1136/vr.148.23.723>
100. Martínez-Valladares M, Del Rosario Famularo M, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Cordero-Peréz C, Rojo-Vázquez FA. Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol Res.* 2010;107(5):1205–11. <http://doi.org/10.1007/s00436-010-1989-5>
101. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* 2012;6(11):1–5. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
102. Cock IE, Selesho MI, Van Vuuren SF. A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of selected parasite infections affecting humans. *J Ethnopharmacol.* 2018;220:250–64. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.001>
103. Moazeni M, Nazer A. In vitro effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Surg.* 2010;34(11):2677–81. <http://doi.org/10.1007/s00268-010-0718-7>

104. Moazeni M, Nazer A. In vitro effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Surg.* 2010;34(11):2677–81.
105. Kanojiya D, Shanker D, Sudan V, Jaiswal AK, Parashar R. Assessment of in vitro and in vivo anthelmintic potential of extracts of *Allium sativum* bulb against naturally occurring ovine gastrointestinal nematodiosis. *Vet Q.* 2015;35(4):200–6. <http://doi.org/10.1080/01652176.2015.1099080>
106. Palacio- Landín J, Mendoza-de Gives P, Salinas-Sánchez DO, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Hernández-Velázquez VM, et al. In vitro and in vivo nematocidal activity of *Allium sativum* and *tagetes erecta* extracts against *Haemonchus contortus*. *Türkiye Parazitolojii Derg.* 2015;39(4):260–4. <http://doi.org/10.5152/tpd.2015.4523>
107. Khalil AM, Yasuda M, Farid AS, Desouky MI, Mohi-Eldin MM, Haridy M, et al. Immunomodulatory and antiparasitic effects of garlic extract on *Eimeria vermiformis*-infected mice. *Parasitol Res.* 2015;114(7):2735–42. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4480-5>
108. Krstin S, Sobeh M, Braun M, Wink M. Anti-parasitic activities of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Trypanosoma b. brucei* and *Leishmania tarentolae*. *Medicines.* 2018;5(2):37. <http://doi.org/10.3390/medicines5020037>
109. Luna CMB, Freitas FI de S, Lima de Morais LC, Dos santos MG, Da Silva LF, Ribeiro RJ, et al. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):327–30.
110. Wan K, Wang P, Zhang L. In vivo and in vitro activity of oil extract of garlic

- (*Allium sativum* linnaeus) against *Schistosoma japonicum* cercariae. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(1):126–9. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0301-2016>
111. Jeyathilakan N, Murali K, Anandaraj A, Abdul Basith S. In vitro evaluation of anthelmintic property of ethno-veterinary plant extracts against the liver fluke *Fasciola gigantica*. *J Parasit Dis.* 2012;36(1):26–30. <http://doi.org/10.1007/s12639-011-0064-1>
112. Singh TU, Kumar D, Tandan SK, Mishra SK. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol.* 2009;123(4):302–8. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.002>
113. Batista M, Rauta B, Barros A, Freire I, de Carvalho L, Barbour F. Microscopic alterations in *Fasciola hepatica* from sheep treated with albendazole. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019;28(1):33–9. <http://doi.org/10.1590/s1984-296120180095>
114. Pérez-Creo A, Díaz P, López C, Béjar JP, Martínez-Sernández V, Panadero R, et al. *Fasciola hepatica* in goats from north-western Spain: Risk factor analysis using a capture ELISA. *Vet J.* 2016;208:104–5. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.033>
115. Chávez A, Casas E, Suárez F. Prevalencia de fascioliasis y paramfistomiasis en el ganado lechero de Oxapampa, Pasco. *Rev Investig Vet del Perú.* 2011;21(1):87–92. <http://doi.org/10.15381/rivep.v21i1.314>
116. Ticona D, Chávez A, Casas G, Chavera A, Li O. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos de Vilcashuamán, Ayacucho. *Rev Investig Vet*

- del Perú, RIVEP. 2010;21(2):168–74.
117. Espinoza J, Terashima A, Herrera-Velit P, Marcos L. Fasciolosis humana y animal en el Perú : Impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010;27(4):604–12.
 118. Mas-Coma S, Bargues M, Valero M. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: Update for the present global scenario. *Parasitology*. 2014;141(14):1918–46.
<http://doi.org/10.1017/S0031182014000869>
 119. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*. 2017;107:54–61. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.016>
 120. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015;53(1):1–5. <http://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
 121. Rapp D. DNA extraction from bovine faeces: Current status and future trends. *J Appl Microbiol*. 2010;108(5):1485–93.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04606.x>
 122. Terashima A, Marcos LA. Fracaso de dosis única de triclabendazole para el tratamiento de fasciolosis humana. 2016;33(3):228–31.
 123. Rojas D, Cartín JA. Prevalencia de *Fasciola hepatica* y pérdidas económicas asociadas al decomiso de hígados en tres mataderos de clase A de Costa Rica. *Agron Costarric*. 2016;40(2):53–62.
<http://doi.org/10.15517/rac.v40i2.27366>
 124. Singh T, Kumar D, Tandan S. Paralytic effect of alcoholic extract of *Allium*

- sativum and Piper longum on liver amphistome, *Gigantocotyle explanatum*. *Indian J Pharmacol*. 2008;40(2):64.
125. Mantawy MM, Ali HF, Rizk MZ. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in schistosoma mansonii experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(3):155–63. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652011000300007>
126. Chavez-Arce E, Zumarán G. Frecuencia de fascioliasis en ganado y de *Fasciola hepatica* en caracoles Lymnaeidae en el distrito de Huanca , Arequipa , Perú. *Rev Investig Vet del Peru*. 2021;32(3):1–17.
127. Fürst T, Duthaler U, Sripa B, Utzinger J, Keiser J. Trematode infections. Liver and lung flukes. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):399–419. <http://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.008>
128. Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):73. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1355-2>
129. Javouhey E, Mialhes P, Potinet V, Kaczorowski F, Bienvenu AL, Sow F, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite*. 2017;24:53. <http://doi.org/10.1051/parasite/2017054>
130. Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasites and Vectors*. 2016;9(1):2–6. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1355-2>

131. Rutjes AW, Reitsma JB, Vandenbroucke JP, Glas AS, Bossuyt PM. Case-control and two-gate designs in diagnostic accuracy studies. *Clin Chem.* 2005;51(8):1335–41. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2005.048595>
132. Allonzo T, Pepe M. Using a combination of reference tests to assess the accuracy of a diagnostic test. *Stat Med.* 1999;18:2987–3003. <http://doi.org/10.1002/sim.762>
133. Trangoni M, Gioffré A, Cravero S. A closed-tube loop-mediated isothermal amplification assay for the visual endpoint detection of *Brucella* spp. and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Bacteriol.* 2017;1616:221–9. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7037-7_14
134. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform.* 2014;48:193–204. <http://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.02.013>
135. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977;33(1):159–74. <http://doi.org/https://doi.org/10.2307/2529310>
136. Melville L, Kenyon F, Javed S, McElarney I, Demeler J, Skuce P. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Haemonchus contortus* eggs in ovine faecal samples. *Vet Parasitol.* 2014;206(3–4):308–12.
137. Ai L, Dong SJ, Zhang WY, Elsheikha HM, Mahmmmod YS, Lin RQ, et al. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola species*: Their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010;104(1):65–72.

<http://doi.org/10.1179/136485910X12607012373713>

138. Wang Y, Wang Y, Xu H, Dai H, Meng S, Ye C. Rapid and sensitive detection of *Listeria ivanovii* by loop-mediated isothermal amplification of the smcL gene. PLoS One. 2014;9(12):1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115868>
139. Bazsalovicsová E, Králová-Hromadová I, Špakulová M, Reblánová M, Oberhauserová K. Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. Helminthologia. 2010;47(2):76–82. <http://doi.org/10.2478/s11687-010-0011-1>
140. He X, Lv MN, Liu GH, Lin RQ. Genetic analysis of *Toxocara cati* (Nematoda: Ascarididae) from Guangdong province, subtropical China. Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Seq Anal. 2018;29(1):132–5. <http://doi.org/10.1080/24701394.2016.1258404>
141. Fadakar B, Tabatabaei N, Borji H, Naghibi A. Genotyping of *Echinococcus granulosus* from goats and sheep indicating G7 genotype in goats in the Northeast of Iran. Vet Parasitol. 2015;214(1–2):204–7. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.029>
142. Shahbakhsh M, Nabavi R, Ganjali M. Molecular Characterization of *Fasciola* Samples Using Sequences of Second Internal Transcribed Spacer-rDNA in Different Geographical Localities of Sistan and Balouchestan Province, Iran. Int J Enteric Pathog. 2016;4(1). <http://doi.org/10.17795/ijep33362>

143. Andersen L, Röser D, Nejsum P, Nielsen HV, Stensvold CR. Is supplementary bead beating for DNA extraction from nematode eggs by use of the nuclisens easymag protocol necessary. *J Clin Microbiol.* 2013;51(4):1345–7. <http://doi.org/10.1128/JCM.03353-12>
144. Ayana M, Cools P, Mekonnen Z, Biruksew A, Dana D, Rashwan N, et al. Comparison of four DNA extraction and three preservation protocols for the molecular detection and quantification of soil-transmitted helminths in stool. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(10):1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007778>
145. Kaiser MM, Brienen E., Djuardi Y, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Verweij JJ, et al. Improved diagnosis of *Trichuris trichiura* by using a bead-beating procedure on ethanol preserved stool samples prior to DNA isolation and the performance of multiplex real-Time PCR for intestinal parasites. *Parasitology.* 2017;144(7):965–74. <http://doi.org/10.1017/S0031182017000129>
146. Maksimov P, Schares G, Press S, Fröhlich A, Basso W, Herzig M, et al. Comparison of different commercial DNA extraction kits and PCR protocols for the detection of *Echinococcus multilocularis* eggs in faecal samples from foxes. *Vet Parasitol.* 2017;237:83–93. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.015>
147. Lumbreras H, Cantella R, Burga R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, su evaluación y uso en el campo. *Rev Med Per.* 1962;31:167–74.
148. Giraldo JC, Díaz AM, Pulido MO. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en

- bovinos sacrificados en la planta de beneficio del municipio de Une, Cundinamarca, Colombia. *Rev Investig Vet del Perú*. 2017;27(4):751. <http://doi.org/10.15381/rivep.v27i4.12572>
149. Cwiklinski K, O'Neill SM, Donnelly S, Dalton JP. A prospective view of animal and human Fasciolosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(9):558–68. <http://doi.org/10.1111/pim.12343>
150. Carmona C, Tort J. Fasciolosis in South America: Epidemiology and control challenges. *J Helminthol*. 2017;91(2):99–109. <http://doi.org/10.1017/S0022149X16000560>
151. Timoteo O, Maco V, Maco V, Neyra V, Yi PJ, Leguía G, et al. Characterization of the humoral immune response in alpacas (*Lama pacos*) experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases Fas1 and Fas2 and histopathological findings. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;106(1–2):77–86. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.01.007>
152. Galtier P, Eeckhoutte C, Larrieu G. *Fasciola hepatica*: Liver enzymes in rats and interaction with chemical inducers. *Exp Parasitol*. 1987;63(2):189–94. [http://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90161-5](http://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90161-5)
153. Yilmaz B, Köklü S, Gedikoğlu G. Case report: Hepatic mass caused by *Fasciola hepatica*: A tricky differential diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(6):1212–3. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0085>
154. Rana S, Bhasin D, Nanda M, Singh K. Parasitic infestations of the biliary tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2007;9(2):156–64.
155. Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol*.

- 2016;32(6):458–69. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002>
156. Rojas J de D. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole in cattle of the Cajamarca countryside. *Rev Vet Argentina*. 2012;7:71–6.
157. Venturina VM, Alejandro MAF, Baltazar CP, Abes NS, Mingala CN. Evidence of *Fasciola* spp. resistance to albendazole, triclabendazole and bromofenofos in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Ann Parasitol*. 2015;61(4):283–9. <http://doi.org/10.17420/ap6104.20>
158. Romero-Benavides JC, Ruano AL, Silva-Rivas R, Castillo-Veintimilla P, Vivanco-Jaramillo S, Bailon-Moscoso N. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *Eur J Med Chem*. 2017;129:209–17. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>
159. A GNR. Traditional medicine in the treatment of enteroparasitosis. *Rev Gastroenterol del Peru organo Of la Soc Gastroenterol del Peru*. 1996;16(3):197–202.
160. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*. 2006;136(3):716–25. <http://doi.org/10.1093/jn/136.3.v>
161. Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*allium sativum* L.). *Foods*. 2019;8(7):1–31. <http://doi.org/10.3390/foods8070246>
162. Romero C, Acosta J. El ajo en el contexto mundial y nacional. El COVID-19 una oportunidad para las exportaciones de ajos en el Perú - MINAGRI. Lima- Perú; 2020.
163. Abid-Essefi S, Zaied C, Bouaziz C, Salem I Ben, Kaderi R, Bacha H.

- Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(7–8):689–95. <http://doi.org/10.1016/j.etp.2010.12.012>
164. Kiuchi F, Miyashita N, Tsuda Y, Kondo K, Hiroyuki Y. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principle in betel nuts. *Chem Pharm Bull.* 1987;35(7):2880–6. <http://doi.org/10.1248/cpb.36.2685>
165. Duthaler U, Smith TA, Keiser J. In vivo and in vitro sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4596–604. <http://doi.org/10.1128/AAC.00828-10>
166. Hennessy DR, Lacey E, Steel JW, Prichard RK. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 1987;10(1):64–72.
167. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper F. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med.* 1992;58(4):301–5. <http://doi.org/10.1055/s-2006-961471>
168. Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, et al. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med.* 1994;60(3):214–7. <http://doi.org/10.1055/s-2006-959461>
169. Rahman A ur, Choudhary I, Thomsen W. Bioassay techniques for drug development. Netherlands: Harwood Academic Publishers; 2001. 30 p.
170. Motulsky H, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. Oxford University

Press; 2004.

171. Flight L, Julious S. Practical guide to sample size calculations: Non-inferiority and equivalence trials. *Pharm Stat.* 2016;15:80–9. <http://doi.org/10.1002/pst.1716>
172. Paitan MA. Eficacia del triclabendazol más ivermectina en el control de endoparásitos en ovinos criollos en la comunidad campesina de San Juan de Yacan, Provincia Daniel Carrión-Pasco [Pre grado]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2010.
173. Keiser J, Sayed H, El-Ghanam M, Sabry H, Anani S, El-Wakeel A, et al. Efficacy and safety of artemether in the treatment of chronic fascioliasis in Egypt: Exploratory phase-2 trials. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(9):e1285. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001285>
174. Radwan NA, Khalil AI, Wahdan AE. In vitro evaluation of antihelminthic activity of *Allium sativum* against adult *Cotylophoron cotylophorum* (Paramphistomidae). *Paracitologist United Journal(PUJ).* 2012;5(2):135–46.
175. Eskandarian AA. Scolicidal effects of squash (*Corylus* spp) seeds, hazel (*Curcubia* spp) nut and garlic (*Allium sativum*) extracts on hydatid cyst protoscolices. *J Res Med Sci.* 2012;17(11):1011–4.
176. Soffar SA, Mokhtar GM. Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in *hymenolepiasis nana* and giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 1991;21(2):497–502.
177. Tavassoli M, Jalilzadeh-Amin G, Fard VRB, Esfandiarpour R. The in vitro effect of *Ferula asafoetida* and *Allium sativum* extracts on *Strongylus* spp. *Ann Parasitol.* 2018;64(1).

178. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subj.* 1998;1379(2):233–44.
179. Leung-Toung R, Li W, Tam T, Karimian K. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: A review. *Curr Med Chem.* 2005;9:979–1002. <http://doi.org/10.2174/0929867024606704>
180. Waag T, Gelhaus C, Rath J, Stich A, Leippe M, Schirmeister T. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(18):5541–3. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.062>
181. Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2286–8.
182. Veerakumari L, Chitra N. Effect of *Allium sativum* on the carbohydrate metabolism of *Haemonchus contortus*. *Int J Sci Res.* 2015;5(5):780–6. <http://doi.org/10.21275/v5i5.nov163388>
183. Singh TU, Kumar D, Gupta PK, Tandan SK. Inhibitory effects of alcoholic extracts of *Allium sativum* and *Piper longum* on gross visual motility and glucose uptake of *Fasciola gigantica* and *Gigantocotyle explanatum*. *J Vet Parasitol.* 2007;21(2):121–4.
184. El-Sayed HS, Chizzola R, Ramadan AA, Edris AE. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food*

- Chem. 2017;221:196–204. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.052>
185. Plata-Rueda A, Martínez LC, Santos MH Dos, Fernandes FL, Wilcken CF, Soares MA, et al. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci Rep.* 2017;7(February):1–11. <http://doi.org/10.1038/srep46406>
186. Jardim IN, Oliveira DF, Campos VP, Silva GH, Souza PE. Garlic essential oil reduces the population of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Eur J Plant Pathol.* 2020;157(1):197–209. <http://doi.org/10.1007/s10658-020-02000-1>
187. Matsuura H. Phytochemistry of garlic horticultural and processing procedures. In: *Nutraceuticals: Designer foods III: Garlic, soy and licorice.* Wiley Online Library; 2004. p. 55–69.
188. Sommano S, Saratan N, Suksathan R, Pusadee T. Chemical composition and comparison of genetic variation of commonly available Thai garlic used as food supplement. *J Appl Bot Food Qual.* 2016;89:235–42. <http://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.030>
189. Szychowski K, Rybczyńska-Tkaczyk K, Gawel-Bęben K, Aświeca M, Kara M, Jakubczyk A, et al. Characterization of active compounds of different garlic (*Allium sativum* L.) cultivars. *Polish J Food Nutr Sci.* 2018;68(1):73–81. <http://doi.org/10.1515/pjfn-2017-0005>
190. Sunita K, Singh D. Fascioliasis control: In vivo and in vitro phytotherapy of vector snail to kill *Fasciola* larva. *J Parasitol Res.* 2011;2011:1–7. <http://doi.org/10.1155/2011/240807>

191. Sunita K, Kumar P, Singh VK, Singh DK. In vitro phytotherapy of vector snail by binary combinations of larvicidal active components in effective control of fascioliasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(5):303–8. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500002>

VIII. ANEXO

VII.1 Certificados y constancias

VII.1.1 Certificado del comité de ética



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA R- 028-06-22

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité de ética aprobó la **RENOVACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del proyecto : **“Evaluación de la prueba diagnóstica amplificación isotérmica mediada por bucle y eficacia Trematicida del extracto de Allium Sativum para el control de la Fasciolosis Bovina”.**

Código de inscripción : **104002**

Investigador(es) principal (es) : **Cesar Abel Burga Cisterna**


Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada **6 meses** el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el **06 de julio del 2022** hasta el **05 de julio del 2023**.

Así mismo el Comité toma conocimiento del Informe Periódico de Avances del estudio de referencia. Documento recibido en fecha 02 de junio del 2022.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 06 de julio del 2022.


Dr. Manuel Gasco Tanta
Presidente
Comité Institucional de Ética para el uso de Animales



/mic

VII.1.2 Certificado del registro de posgrado



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ESCUELA DE POSGRADO

AMPLIACIÓN DE VIGENCIA

REGISTRO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO

Registro

Dr-00285-2019

PARTICIPANTES	CODIGO	NOMBRES	APELLIDOS
Estudiante	44273999	CESAR ABEL	BURGA CISTERNA
Asesor	10518111	MÓNICA JEHNNY	PAJUELO TRAVEZAÑO

Título del Proyecto

EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE Y EFICACIA TREMATICA DEL EXTRACTO DE ALLIUM SATIVUM PARA EL CONTROL DE LA FASCIOSIS BOVINA

Programa Académico

DOCTORADO EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

Unidad Académica

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y ADMINISTRACIÓN

Registros/Aprobación	Fecha	Detalles
Registro SIDISI	03/04/2019	Código: 104002
Aprobación CIEI - UPCH (Humanos)	No aplica	No aplica
Aprobación CIEA - UPCH (Animales)	06/08/2022	Vigencia: 05/08/2023
Aprobación ORVEI (Ni humanos ni animales)	No aplica	No aplica
Registro EPGVAC	07/08/2019	Plazo de ejecución: 3 años
Ampliación de Vigencia del Registro EPGVAC	07/08/2022	Vigencia: 07/08/2025

El proyecto de investigación deberá ser ejecutado bajo las Normas y Procedimientos del Trabajo de Investigación para la obtención de los grados académicos de Maestría o Doctorado, que se encuentran disponibles en: <http://www.upch.edu.pe/epgvac>

C.c. Vicedecano de la Facultad, Asesor, CoAsesor, Secretaría Académica EPGVAC

v.EPGVAC.UGIP2018.11.02

Av. Honorio Delgado 430, SMP
(511) 319-0000 anexo: 210403
www.cayetano.edu.pe
epgvac.ugip@oficinas-upch.pe



VII.1.3 Certificado de clasificación botánica de los ajos adquiridos en el estudio

“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”,

CONSTANCIA DE CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

El Ingeniero Agrónomo **SANTOS LITO SIGUEÑAS MONTALVO**, con experiencia en la clasificación taxonómica y selección de plantas deja constancia que:

El análisis morfológico de las plantas presentadas por el Médico Veterinario **Cesar Abel Burga Cisterna**, pertenecen a la siguiente clasificación taxonomía, según el sistema de clasificación APG IV (Angiosperm Phylogeny Group):

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridiplantae*

División: *Tracheophyta*

Subdivisión: *Spermatophytina*

Clase: *Magnoliopsida*

Superorden: *Lilianaes*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Amaryllidaceae*

Subfamilia: *Allioideae*


Género: *Allium*

Especie: *Allium sativum* L.

Cultivar: *Allium sativum* L. cv. Napuri

Nombre vulgar: “Ajo”

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para fines de investigación.


SANTOS LITO SIGUEÑAS MONTALVO
INGENIERO AGRÓNOMO
Reg. CIP. N° 144985

Lambayeque, 19 de julio del 2022

VII.2 Data colectada durante el estudio.

VII.2.1 Evaluación de la calidad de ADN extraído de las muestras de heces sedimentadas

Muestra	A260/A280*	Cantidad ADN extraído (ng/μl)
1	1.89	10.5
2	1.97	10.8
3	1.9	12.1
4	1.81	14.3
5	1.79	5.6
6	1.81	17.1
7	1.85	14.6
8	1.8	11.2
9	2.1	15.6
10	1.9	14.2
11	1.8	15
12	1.83	16.3
13	1.79	9.5
14	1.8	11.5
15	1.81	10.4
16	1.81	11.2
17	1.85	22.3
18	1.82	15.6
19	1.81	14.3
20	1.79	11.7
21	1.81	11.4
22	1.82	11.7
23	1.8	12.4
24	1.79	9.7
25	1.85	10.2
26	1.92	13.4
27	1.81	10.4
28	1.82	10.7
29	1.81	15.9
30	1.79	9.9
31	1.78	8.8
32	1.87	14.5
33	1.86	12.7

34	1.79	11.5
35	1.87	16.8
36	1.87	15.8
37	1.86	11.7
38	1.89	12.1
39	1.8	11
40	1.83	10.9
41	1.82	10.1
42	1.79	11
43	1.85	11.9
44	1.82	12
45	1.81	10.6
46	2.02	32.1
47	1.81	10.7
48	1.93	11.3
49	1.82	11
50	1.84	11.7
51	1.81	10.9
52	1.81	10.5
53	1.83	12.7
54	1.84	12.1
55	1.9	12.1
56	1.98	13
57	1.86	14.5
58	1.98	12.7
59	1.92	11.5
60	1.87	18.5
61	1.86	13.4
62	1.88	15.8
63	1.88	19.1
64	1.98	10.7
65	2.01	15.9
66	1.78	10.1
67	1.98	17.5
68	1.82	12.3
69	1.8	13.4
70	1.82	15.4
71	1.8	17.5
72	1.79	12.3
73	1.8	12.7
74	1.83	11.8
75	1.82	11.9
76	1.83	11.8
77	1.85	14.6

78	2.1	19.2
79	1.99	20.1
80	1.85	19.2
81	1.82	15.1
82	1.83	13.4
83	1.84	13.7
84	1.84	13.7
85	1.85	13.4
86	1.82	14.2
87	1.8	10.2
88	1.81	10.3
89	1.81	10.9
90	1.83	10.6
91	1.8	12.7
92	1.8	14.5
93	1.82	11.3
94	1.83	12.4
95	1.82	13.4
96	1.85	13.5
97	1.85	15.2
98	1.86	14.3
99	1.82	12.5
100	1.83	11.7
101	1.8	10.8
102	1.81	11.2
103	1.82	13.4
104	1.79	8.6
105	1.82	13.4
106	1.81	12.6
107	1.84	16.1
108	1.82	15.2
109	1.81	13.4
110	1.8	12.3
111	1.88	16.3
112	1.87	14.5
113	1.9	15.2
114	1.87	13.2
115	1.91	12.4
116	1.88	16.4
117	1.88	17
118	1.87	16.3
119	1.92	19
120	1.93	20.1
121	1.91	19.3

122	1.87	17.5
123	1.81	12.3
124	1.95	15.6
125	1.86	13.4
126	1.8	9.7
127	1.91	15.2
128	1.79	10
129	1.81	11.6
130	1.8	10.1
131	1.81	15.7
132	1.89	12.1
133	1.97	27
134	1.89	15.4
135	1.8	13.8
136	1.93	22.9
137	1.99	17.7
138	2	26.3
139	2.05	31.1

VII.2.2 Resultados de la de la citotoxicidad aplicada a los extractos de ajos en células Vero evaluada en un espectrofotómetro

• **Aceite esencial**

Concentración (mg/ml)	Valor OD 1	Valor OD 2	Valor OD 3	OD Promedio	Viabilidad promedio (%)
Control	1.454	1.4211	1.364	1.41303333	100
1	0.3623	0.3114	0.2015	0.29173333	20.5489423
0.75	0.468	0.5191	0.5229	0.50333333	35.4534996
0.5	0.594	0.6102	0.6201	0.6081	42.8329929
0.25	0.9289	0.9982	1.0647	0.99726667	70.2448874
0.1	1.3653	1.399	1.214	1.3261	93.4070578
0.075	1.4472	1.4459	1.3243	1.4058	99.0209199
0.05	1.4106	1.4792	1.4438	1.44453333	101.749196
0.025	1.4386	1.4158	1.4179	1.4241	100.309925
0.01	1.4505	1.4763	1.423	1.44993333	102.129558

OD: Densidad óptica

• **Extracto acuoso**

Concentración (mg/ml)	Valor OD 1	Valor OD 2	Valor OD 3	OD promedio	Viabilidad promedio (%)
Control	1.4118	1.3299	1.399	1.3802	100.0000
100	0.6147	0.7607	0.6924	0.6893	49.9384
75	0.8336	0.9245	0.9307	0.8963	64.9359
50	0.9249	0.8917	0.9819	0.9328	67.5852
25	1.2058	1.3006	1.2058	1.2374	89.6515
10	1.3268	1.3199	1.0268	1.2245	88.7169
7.5	1.4099	1.5184	1.4099	1.4461	104.7697
5	1.5094	1.5113	1.5493	1.5233	110.3678
2.5	1.4761	1.4955	1.4612	1.4776	107.0544
1	1.4411	1.4141	1.4411	1.4321	103.7578

VII.3 Procesamiento de la data

VII.3.1 Análisis de la precisión diagnóstica de la Prueba LAMP y

Microscopía para *F. hepatica* usando como referencia el MRC

Se utilizó el programa Stata 17:

```
. diagt GOLDSTANDAR LAMP
```

Gold Standar	LAMP		
MRC:bilis			
+necropsia	Pos.	Neg.	Total
Abnormal	101	14	115
Normal	0	24	24
Total	101	38	139

True abnormal diagnosis defined as GOLDSTANDAR = 1

		[95%	
Confidence Interval]			
Prevalence	Pr (A)	83%	75%
88.6%			
Sensitivity	Pr (+ A)	87.8%	80.4%
93.2%			
Specificity	Pr (- N)	100%	85.8%
100%			
ROC area	(Sens. + Spec.)/2	.939	.909
.969			
Likelihood ratio (+)	Pr (+ A) / Pr (+ N)	.	.
.			
Likelihood ratio (-)	Pr (- A) / Pr (- N)	.122	.0745
.199			
Odds ratio	LR (+) / LR (-)	.	42.7
.			
Positive predictive value	Pr (A +)	100%	96.4%
100%			
Negative predictive value	Pr (N -)	63.2%	46%
78.2%			

Missing values or confidence intervals may be estimated using the -sf- or -sf0- options.

. diagt GOLDSTANDAR MICROSCOPIA

Gold Standar	MICROSCOPIA		
MRC:bilis	Pos.	Neg.	Total
+necropsia			
Abnormal	85	30	115
Normal	0	24	24
Total	85	54	139

True abnormal diagnosis defined as GOLDSTANDAR = 1

		[95%	
Confidence Interval]			
Prevalence	Pr (A)	83%	75%
88.6%			
Sensitivity	Pr (+ A)	73.9%	64.9%
81.7%			
Specificity	Pr (- N)	100%	85.8%
100%			
ROC area	(Sens. + Spec.) / 2	.87	.829
.91			
Likelihood ratio (+)	Pr (+ A) / Pr (+ N)	.	.
.			
Likelihood ratio (-)	Pr (- A) / Pr (- N)	.261	.192
.355			
Odds ratio	LR (+) / LR (-)	.	17.3
.			
Positive predictive value	Pr (A +)	100%	95.8%
100%			
Negative predictive value	Pr (N -)	44.4%	30.9%
58.6%			

VII.3.2 Análisis estadístico de la eficacia fasciolicidas del triclabendazol, extracto acuoso y aceite esencial de ajo

Los análisis estadísticos se ejecutaron con el software Stata 17

```
. tab tto2 Viabilidad, row chi2
```

```
+-----+
| Key          |
+-----+
| frequency    |
| row percentage|
+-----+

                Aceite y |      Viabilidad
                extracto | Paralizado  No parali |      Total
+-----+-----+-----+-----+
Aceite esencial |          5      107 |          112
                |          4.46    95.54 |         100.00
+-----+-----+-----+-----+
Extracto acuoso |          0      112 |          112
                |          0.00   100.00 |         100.00
+-----+-----+-----+-----+
                Total |          5      219 |          224
                |          2.23    97.77 |         100.00

                Pearson chi2(1) =    5.1142    Pr = 0.024
```

```
. tab tto3 Viabilidad, row chi2
```

```
+-----+
| Key          |
+-----+
| frequency    |
| row percentage|
+-----+

                |      Viabilidad
                | Paralizado  No parali |      Total
+-----+-----+-----+-----+
Aceite esencial |          5      107 |          112
                |          4.46    95.54 |         100.00
+-----+-----+-----+-----+
                TCZ.SO |          19      93 |          112
                |          16.96   83.04 |         100.00
+-----+-----+-----+-----+
                Total |          24      200 |          224
                |          10.71   89.29 |         100.00

                Pearson chi2(1) =    9.1467    Pr = 0.002
```


. tab tto4 Viabilidad, row chi2

```
+-----+
| Key   |
+-----+
| frequency |
| row percentage |
+-----+
```

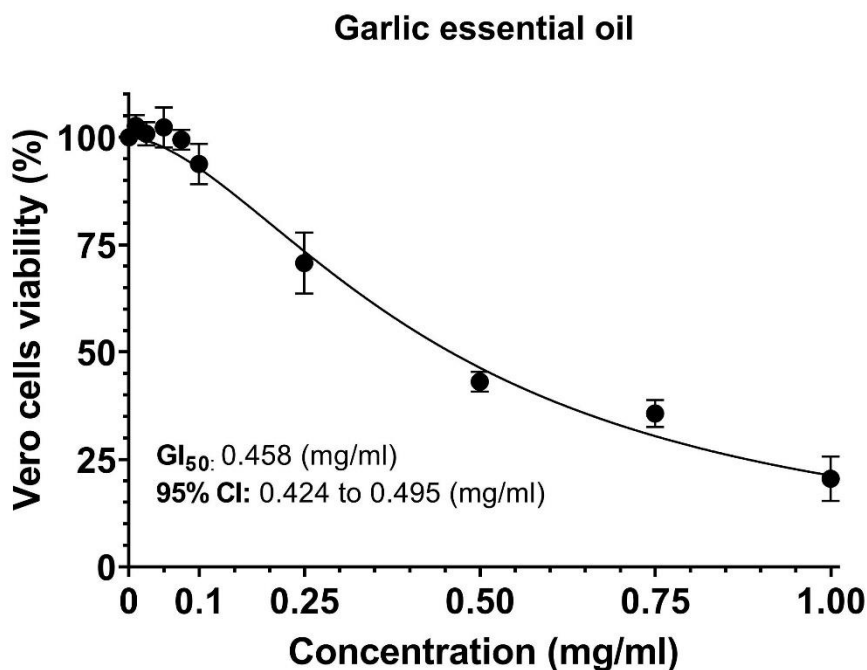
Acuoso y TCZ	Viabilidad		Total
	Paralizada	No paraliz	
Extracto acuoso	0	112	112
	0.00	100.00	100.00
TCZ.SO	19	93	112
	16.96	83.04	100.00
Total	19	205	224
	8.48	91.52	100.00

Pearson chi2(1) = 20.7610 Pr = 0.000

VII.3.3 Citotoxicidad

La data se procesó con el programa GraphPad Prism 9

- Curva de dosis-respuesta del aceite esencial de ajo en células Vero.



- Determinación del GI₅₀ de los aceites esenciales del ajo con el software GraphPad Prism 9.4.1.

[Inhibitor] vs. normalized response -- Variable slope

Best-fit values

IC₅₀ 0.4586

HillSlope -1.680

logIC₅₀ 0.3386

95% CI (profile likelihood)

IC₅₀ 0.4241 to 0.4953

HillSlope -1.898 to -1.492

logIC₅₀ -0.3726 to -0.3051

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 28

R squared 0.9787

Sum of Squares 599.9

Sy.x 4.629

Constraints

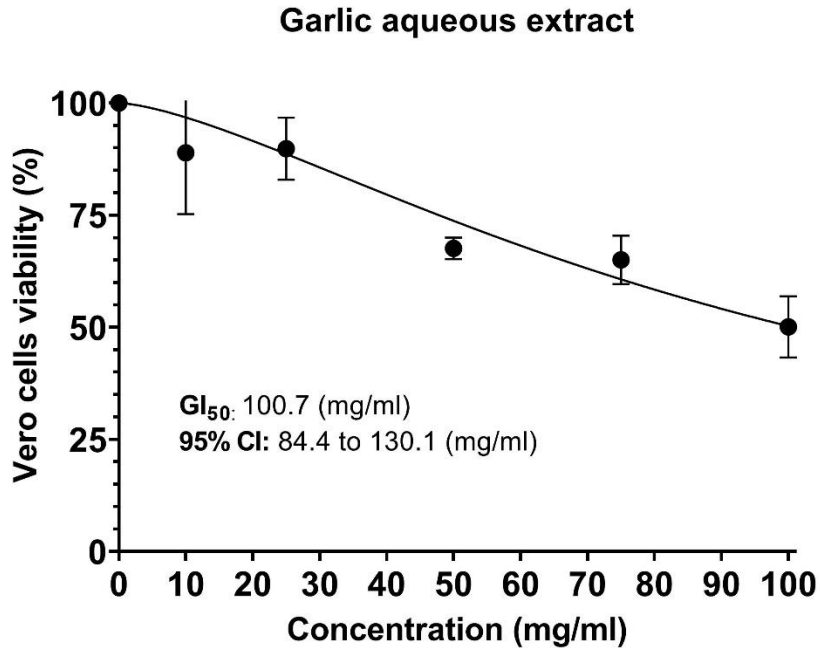
IC₅₀ IC₅₀ > 0

Number of points

of X values 30

Y values analyzed 30

- Curva de dosis-respuesta de los extractos acuosos del ajo en células Vero.



- Determinación del GI₅₀ de los extractos acuosos del ajo con el software GraphPad Prism 9.4.1.

[Inhibitor] vs. normalized response -- Variable slope

Best-fit values

IC₅₀ 100.7

HillSlope -1.474

logIC₅₀ 2.003

95% CI (profile likelihood)

IC₅₀ 84.38 to 130.1

HillSlope -2.073 to -1.073

logIC₅₀ 1.926 to 2.114

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 28

R squared 0.8440

Sum of Squares 1970

Sy,x 8.389

Constraints

IC₅₀ IC₅₀ > 0

Number of points

of X values 30

Y values analyzed 30