UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Tesis doctoral por compendio de publicaciones

**FASCIOSIS OVINA: ESTUDIOS CLÍNICOS Y DESARROLLO
DE NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL**

Memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria
D. José Manuel Martínez Pérez
para optar al grado de Doctor por la Universidad de León

Directores

Prof. Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez

Dra. Dña. María Martínez Valladares

LEÓN, 2014

La realización de la presente Tesis Doctoral ha tenido lugar en las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de León y del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) [centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de León].

Los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral se han realizado gracias a la financiación correspondiente a los siguientes proyectos y contratos de investigación:

- a) **“Efecto de la aplicación de un inmunomodulador (Talurón®) en la fasciolosis ovina”**. Laboratorios Ovejero, S.A. (2010-2011). Investigador responsable: Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez.
- b) **“Fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y compuestos fenólicos añadidos a la ración de corderos: Efectos sobre la respuesta inmune y sobre la calidad de la carne”**. Junta de Castilla y León (2010-2012). Investigador responsable: Dra. Dña. Sonia Andrés Llorente.
- c) **“Caracterización de la resistencia a los antihelmínticos y desarrollo de estrategias para el control antiparasitario en el marco del cambio climático. Zona noroeste”**. (Ref. RTA2010-00094-C03-02). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Ciencia e Innovación (2010-2013). Investigadora responsable: Dra. Dña. María Martínez Valladares.

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El Departamento de Sanidad Animal, como órgano responsable del programa de doctorado “Producción y Sanidad Ovina”, regulado por el R.D. 778/1998, en su reunión celebrada el día tres de septiembre de 2014, ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“Fasciolosis ovina: Estudios clínicos y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y control”**, elaborada por D. José Manuel Martínez Pérez, y dirigida por el Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez y la Dra. Dña. María Martínez Valladares.

León, a tres de septiembre de 2014

El Secretario,

Fdo.: Dr. D. Juan Miguel Fregeneda Grandes

Vº Bº El Director del Departamento

Fdo.: Dr. D. César B. Gutiérrez Martín

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez y la Dra. Dña. María Martínez Valladares, como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“Fasciolosis ovina: Estudios clínicos y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y control”**, realizada por D. José Manuel Martínez Pérez, según el programa de doctorado “Producción y Sanidad Ovina” del Departamento de Sanidad Animal, regulado por el R.D. 778/1998, emiten un informe favorable para el depósito de la misma, estimando que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

León, a treinta y uno de julio de 2014

Fdo: Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez

Fdo.: Dra. Dña. María Martínez Valladares

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento -por haberme acogido en sus Proyectos de Investigación-, a los Dres. D. Francisco A. Rojo Vázquez y Dña. María Martínez Valladares, Directores de esta Tesis Doctoral, por el tiempo que me han dedicado y por su ayuda, correcciones e indicaciones.

Igualmente, al Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE) y al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, donde se me han proporcionado los medios para realizar los ensayos experimentales. Agradezco la colaboración a los compañeros y personal adscrito de dichos centros.

Gratitud a todos mis “Maestros” de la Facultad de Veterinaria de León, ya que me han inculcado y alimentado el amor por esta gran Profesión que es la Veterinaria, así como los valores humanistas.

Especial agradecimiento a mi familia y a Isabel -a quienes dedico este trabajo-, porque con su cariño, apoyo y estímulo me han animado a seguir en la trayectoria investigadora y a desarrollarme como persona.

En fin, agradezco a todas las personas, amigos y compañeros de trabajo, que han hecho posible que este proyecto sea una realidad y vea la luz. Gracias a todos.

“Quien no te da las gracias por tu ayuda, peor te pagará cuanto más suba”

(El Conde Lucanor, Don Juan Manuel)

“De bien nacidos es ser agradecidos” (Refranero Nacional)

ÍNDICE TEMÁTICO

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
1. LA GANADERÍA OVINA.....	17
1.1 La influencia del ganado ovino en la Mesta	17
1.1.1 Generalidades.....	17
1.1.2 La Mesta y el comercio lanero.....	20
1.1.3 El fenómeno de la trashumancia	22
1.2 La ganadería española desde el s. XX.....	24
1.3 Relevancia del sector ovino en España, con especial atención a Castilla y León	26
1.4 Relevancia del sector ovino en la provincia de León.....	27
1.4.1 Condicionantes geoclimáticos de la provincia de León	27
1.4.2 Análisis específico provincial.....	30
2. FASCIOLA HEPATICA Y FASCIOSIS.....	33
2.1 Etiología.....	33
2.1.1 Nomenclatura y etimología.....	33
2.1.2 Perspectiva histórica	35
2.1.3 Morfología de <i>F. hepatica</i>	39

2.1.4 Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	41
2.2 La enfermedad.....	45
2.2.1 Importancia médico-veterinaria de la infección por <i>F. hepatica</i>	45
2.2.2 Patogenia: Mecanismos y acción patógena	48
2.2.3 Inmunopatología	53
2.2.3.1 La respuesta inmunitaria en la fasciolosis	55
2.2.3.2 Mecanismos de evasión inmunitaria de <i>F. hepatica</i>	56
2.2.4 Aspectos clínicos y anatomopatológicos.....	57
2.2.4.1 Forma aguda	58
2.2.4.2 Forma subaguda.....	59
2.2.4.3 Forma crónica	60
2.2.5 Métodos y técnicas de diagnóstico	62
2.2.5.1 Directas	62
2.2.5.2 Indirectas.....	65
2.2.6 Estrategias para el control	69
2.2.6.1 Medidas de control sobre el hospedador definitivo y su hábitat.....	69
2.2.6.2 Medidas de control sobre el hospedador intermediario y su hábitat ..	77
CAPÍTULO II.- OBJETIVOS.....	79

CAPÍTULO III.- PUBLICACIONES.....	83
I. Comparison of three different techniques to diagnose <i>Fasciola hepatica</i> infection in experimentally and naturally infected sheep. <i>Veterinary Parasitology</i> 2012; 190 (1-2): 80-86. Autores: Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. -	85
II. Effect of lipopolysaccharide (LPS) from <i>Ochrobactrum intermedium</i> on sheep experimentally infected with <i>Fasciola hepatica</i>. <i>Parasitology Research</i> 2013; 112 (8): 2913-2923. Autores: Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Valcárcel-Sancho, F.; González-Guirado, A.M.; Casanova-García de Castro, I.; Nieto-Martínez, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. -	95
III. Immunological features of LPS from <i>Ochrobactrum intermedium</i> on sheep experimentally infected with <i>Fasciola hepatica</i>. <i>Research in Veterinary Science</i> 2014 (In Press). Autores: Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. -	109
IV. Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with <i>Fasciola hepatica</i>. <i>Research in Veterinary Science</i> 2014; 97 (1): 71-79. Autores: Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Benavides, J.; Morán, L.; Andrés, S.; Giráldez, F.J.; Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. -	115
CAPÍTULO IV.- DISCUSIÓN GENERAL.....	127
CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES.....	139
CAPÍTULO VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

CAPÍTULO I

Introducción general

“Siempre la ganadería fue el alma de la alquería”

(Refranero Nacional)

1. La ganadería ovina

1.1 La influencia del ganado ovino en la Mesta

1.1.1 Generalidades

Las nuevas exigencias que demanda la población, unidas a la capitalización del sector agroalimentario que genera un modelo de producción no tan dependiente de las condiciones ambientales, originan continuas modificaciones en el censo pecuario.

La estrecha relación entre la agricultura y la ganadería adolece de un constante desequilibrio. El nacimiento de la Mesta en el s. XIII incrementó la relevancia de la ganadería ovina. Este Organismo regulaba el funcionamiento de una cabaña que, en las épocas de dureza invernal, se veía obligada a buscar tierras con mejor temperatura, lo que dio origen a la trashumancia, actividad atribuida a los íberos y cartagineses (Sabatino, 1954). A partir de este momento, la vida en el campo quedaba a merced de las exportaciones de lana, ingreso fundamental del Reino.

Etimológicamente, la palabra “mesta” deriva del latín “*animalia*” (animales) y “*mixta*” (participio pasado de “*miscēre*”, mezclar): “animales mezclados”. Igualmente, hace referencia a una antigua asociación de propietarios de reses para fines comunes (Moliner, 1981), o a un agregado de los dueños de ganados mayores y menores que cuidaban de su crianza y vendían para el común abastecimiento (RAE, 2001). El funcionamiento de la Mesta se halla recopilado por Malpartida, fiel Consejero de los Reyes Católicos en 1492, y fue ampliada por Palacios Rubios en 1511 (Klein, 1979).

La ganadería ovina fue el germen de la trashumancia, pues se consideraba nervio económico de la nación. Cuando los romanos llegaron a la Península Ibérica ya existían vías pastoriles por las que circulaban los rebaños en busca de pastos estacionales. Por los pueblos de España cruzaban las ovejas que usaron las veredas como vías pecuarias. Se trataba de los vestigios de las cañadas, aunque no se reconocieron hasta el *Fuero Juzgo* (*Liber Iudiciorum*) en León (1241) con Fernando III, el Santo; asimismo, en el *Privilegio Real* de Alfonso X, el Sabio, (1273) se determinó la anchura de las Cañadas Reales (Ciria Poza, 2008). Tres de las grandes cañadas españolas se encuentran en los reinos de León y Castilla: la “Cañada Real Leonesa”, la “Segoviana” y la “Soriana”.

Por el trazado viario de la antigua Mesta cruzan en otoño y primavera los animales escudados por los pastores. El orden de marcha corre a cargo de los mastines, adornados de buidas carlancas para los momentos en que el lobo salta a escena. En la Península Ibérica, la introducción de la raza Merina -de albos y sedosos cabos-, es atribuida a los benimerines (Klein, 1979). Los historiadores fundamentan su opinión a que, con anterioridad a este hecho, no se tenía constancia de esa raza ovina en España, introducida supuestamente por los almohades, los fenicios o los romanos en el valle del Guadalquivir (Lafuente & Vela, 2011). La transformación hacia la raza con mejores características laneras fue lograda por los ganaderos hispanos, lo que se confirma en 1442, fecha en la que Juan II cita “la Lana Merina” en las tasas de paños.

En la Edad Media, Alfonso X, el Sabio, hablaba de “El Honrado Concejo de la Mesta de Pastores” que trataba las cuestiones de jurisdicción de la Mesta (Gual, 1971). Se ha llegado a afirmar que este Organismo sirvió para afianzar la unidad nacional, contrarrestando las ideas de separatismo, en la misma línea que otros gravámenes

sobre el caballo hispano (Abad Gavín, 1984; 1999; Domínguez Sánchez & Martínez Pérez, 2006). Asimismo, en tiempos de este monarca, se establecieron diversas normativas con arreglo a la tributación pastoril como impuesto directo. La Mesta se ocupó de las dos razas ovinas españolas: la Merina de hebra blanca y la Churra de lana rojiza. Además, este Organismo hizo una labor encomiable de policía sanitaria, denunciando algunas enfermedades que siempre afectaron a la cabaña ovina, como la viruela, el carbunco, la agalaxia o la sarna (Quintana López, 1993; Cordero del Campillo, 1996). En el caso particular de la fasciolosis, entre 1844-1845, esta enfermedad supuso el sacrificio de más reses (en especial lanares) que todas las demás enfermedades de los animales. De esta época son las obras de Nicolás Casas y Sampedro *Sobre las enfermedades que ha padecido el ganado lanar en las provincias de Ciudad Real y Toledo* (1845) y *Tratado de Epizootias* (1846), donde especifica que “*las enfermedades que en los parajes pantanosos reinan con más frecuencia son, con relación a los rumiantes, la ‘morriña o caquexia acuosa’, denominada por nuestros pastores ‘sapillo’ (...)*” (Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989; Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a).

Con los Reyes Católicos se forzó la reforma agraria y la ganadería salió fortalecida. En la *Nueva Recopilación* de Felipe II se decía que “*la explotación y conservación de la ganadería es el principal sustento de estos reinos*”; opinión certera, puesto que España es un país esencialmente agrícola y ganadero, y todo lo que signifique desviarla de esa ruta es perjudicial para la renta nacional (Mallada, 1882). La ganadería nacional experimentó un extraordinario desarrollo: en 1526 ya figuraban 3.500.000 cabezas de merino. En tiempos de Felipe II y Felipe IV, pese a que las necesidades financieras obligaron a otorgar concesiones a los agricultores, la Mesta consiguió mantener sus antiguos derechos mediante edicto de 1633, alcanzando una plena jurisdicción en lo pastoril. La decadencia de la Casa de Austria influyó de un modo directamente

proporcional a la ruina de la Mesta. Asimismo, la falta de ética -por parte de personajes como el Conde-Duque de Olivares- no ayudó al Organismo. Con la llegada de la Casa de Borbón, la Mesta incorporó el característico centralismo de la administración general (García Martín, 1988). Se incorporó nuevamente el “servicio de montazgo”, esta vez a cargo de los intendentes. Con Carlos III, la Mesta cayó en picado, pues se concedía primacía a la agricultura en detrimento de la ganadería. Campomanes dio al traste con la actuación positiva de la Mesta tras la declaración de ilegalidad de la tasación de pastos y la abolición del Alcalde Entregador (Álvarez de Morales, 2003). El 31 de enero de 1836, con Fernando VII en el poder, se prohibió la denominación “Mesta” y pasó a llamarse, transitoriamente, “Asociación General de Ganaderos del Reino”, con un poder más limitado (Hernández, 1996). Tras comparar los datos del Catastro del Marqués de la Ensenada de 1749 con los del censo ganadero de 1865, el cómputo global del ganado ovino experimentó un leve crecimiento; de ahí que la reforma agraria liberal no debiera ser del todo denostada (García Sanz, 1994). Las posibilidades de crecimiento agrario de cada región determinaron la evolución de la ganadería, eliminando la rentabilidad de la trashumancia y marcando pautas para que una zona se especializara en ganado de labor, de renta, de consumo o de transporte, o todo lo contrario.

1.1.2 La Mesta y el comercio lanero

La influencia de la Mesta en el comercio interior y exterior de la lana fue innegable, pues los ejemplares merinos se distinguían mundialmente por sus finos vellones. La villa de Medina del Campo era el centro donde se depositaba la lana hacia los puertos de embarque, como Bilbao, San Sebastián o Santander. Mientras tanto, en los

consulados se anotaban los cargamentos que, desde Medina, Burgos o Segovia, serían expedidos al extranjero. Además, se fueron forjando cofradías marineras al amparo del comercio de la lana con el beneplácito de la Corona (Gerbet, 2003). El rey Alfonso XI prohibió la exportación de ganado fuera de las fronteras para primar la producción de la cabaña castellana (Klein, 1979), y durante el reinado de los Reyes Católicos, la exportación lanera experimentó gran auge tras la expulsión de los judíos para contrarrestar los efectos de la injerencia de éstos en la economía nacional. Con este fin de compensación se crearon los consulados de Burgos (1494) y Bilbao (1511) (Aguirre Prado, 1963) cuyo objetivo era organizar todo lo referente a la ganadería, desde los pastos al mercado de la lana, y conseguir el mayor grado de beneficio regulando la expedición lanera.

Como consecuencia de la enorme cantidad de oro y plata que llegaba desde América, los precios se vieron incrementados en las postrimerías del reinado de Carlos I. En la misma línea afectó al comercio lanar, lo que influyó en la depreciación del ganado trashumante (Anes, 1982). Felipe II pretendió fiscalizar la industria de la lana y, al fracasar en esta idea, decidió recobrar el derecho sobre el “diezmo del mar” en 1559, con lo que la lana de exportación aumentaba su precio.

La Mesta intentó formalizar un monopolio que pudiera controlar el comercio interior y exterior antes de la llegada de Campomanes (Marín Barriguete, 1989). El último intento tuvo lugar en el s. XVIII, tras la constitución de la “Compañía de los Cinco Gremios”, con sede en Madrid. Esta organización pretendió comerciar a nivel mundial, pero fracasó por la incapacidad de sus gestores (García Sanz, 1978). Entre las instituciones señeras de España, siempre figurará la Mesta por su significado pecuario, influencia social y repercusión en la economía.

1.1.3 El fenómeno de la trashumancia

El origen etimológico del vocablo “*trashumancia*” deriva del latín “*trans*” (de la otra parte) y “*humus*” (tierra): pasar el ganado con sus conductores desde las dehesas de invierno a las de verano, y viceversa (RAE, 2001).

La faena trashumante era organizada con arreglo a las observancias generacionales. En las zonas del norte, el mes de septiembre se iniciaba la preparación de los rebaños, ya que se acercaba la hora de emprender la marcha a tierras que ofrecían seguridad en el tiempo adverso. Para la identidad de los ovinos, cada uno de los propietarios poseía su yerro: hierro y geométrica señal con almagre, como elementos determinativos de propiedad. La cabaña estaba formada por el conjunto de reses lanares, así como vacas, cerdos, caballos o asnos, y la impedimenta necesaria. El conjunto de cabañas particulares formaban la Cabaña Nacional o Real. El Mayoral se encargaba de las cabañas particulares, divididas en rebaños de unas 1.000 cabezas, protegidos por mastines. Los rebaños más pequeños se denominaban hatos, manadas o pastorías. Los perros ejercían tal importancia en el ajetreo trashumante que cualquier daño causado a uno de ellos era motivo de una sanción mínima de cinco ovejas.

La cuantía de los rebaños ha sido difícil de contabilizar, ya que los informes anteriores al s. XVI referentes a Portazgos Reales sobre ganado ovino no están completos. De las rigurosas anotaciones en la Mesta se desprendía el auge ganadero de la institución. El número de ovejas que, en 1512 se fijó en 2.500.661, pasó a 3.177.669 en 1519, y a 3.453.168 en 1526. Estas cantidades experimentaron ligeras oscilaciones durante todo el s. XVI, manteniéndose alrededor de los 3.000.000 a finales del mismo (Aguirre Prado, 1963).

Durante la marcha, todos los rebaños estaban preparados para el cambiante otoñal. Los de León y Soria tenían que recorrer más de 800 km; los de Cuenca y Segovia, de 270 a 400 km. El cómputo diario era de unos 10 km, y de unos 25 km cuando el terreno era de cultivo y había que pasar de largo. En el mes de abril, se iniciaba la vuelta durante la cual se esquilaban las reses; y en mayo, los rebaños se hallaban de nuevo en las alturas serranas, con lo que se daba por cumplido el rito de la trashumancia.

Figura 1. *Cañadas, cordeles y veredas. Provincia de León (Cordero del Campillo, 1983)*

Los vestigios de la trashumancia en la provincia de León se evidencian a través del Puerto de la Mesa al que se accede por una antigua calzada romana que aún conserva las losas en algún trayecto. También en la localidad de Pinos, cuya tradición ganadera se aprecia en sus rebaños trashumantes que encuentran buenos pastos en

los Puertos de Naves. Igualmente en las montañas de Riaño, donde el cordel de merinas que pasa por Prioro o Riaño muestra la importancia del fenómeno hasta donde llegaba un ramal de la “Cañada Leonesa”. Finalmente estaría la “Cañada de la Vizana”, “Cañada Real Coruñesa” o “Calzada de los Gallegos” -con llegada hasta la cabecera del Órbigo (Domínguez Sánchez, 2002) (*Figura 1*).

1.2 La ganadería española desde el s. XX

Con anterioridad se ha mencionado la disolución del “Honrado Concejo de la Mesta” en 1836 y el fin de la supremacía española sobre el comercio de la lana. En consecuencia, la ganadería perdió auge frente a la agricultura que comenzó a explotarse a un nivel antes desconocido y que estuvo favorecida por las sucesivas desamortizaciones y el desarrollo de las industrias relacionadas con el cultivo de cereales (Fernández Clemente, 1986). Este espectacular interés por la agricultura en detrimento de la ganadería ha ido manteniéndose durante el s. XX, con la aparición de nuevas máquinas y técnicas agrarias capaces de incrementar los rendimientos.

A principios del s. XX se hacía necesario aunar la producción de cereales y su relación con la alimentación del ganado, debido a las demandas poblacionales del momento. Ello exigía la transformación de muchos de los cultivos en “producción de carne”. Se explotaban cada vez más superficies de terreno con el fin de aumentar las toneladas de carne dirigidas a la población. Esta armonía entre ganadería y agricultura fue posible hasta los años sesenta. A partir de esa década, la tendencia de la ganadería se desligó, en parte, de la producción agrícola y fue encauzada hacia un modelo más intensivo. Se pretendía importar productos derivados agrícolas, como cereales y soja de otros países, para incrementar el consumo de carne, especialmente

de vacuno y ovino. El resultado fue un desvío al alza de los precios que ocasionó un aumento en el consumo de carne de ave y porcino.

Esta política puso de manifiesto el modelo ganadero español, caracterizado por las deficiencias técnicas, los escasos rendimientos productivos o la heterogeneidad racial. A partir de este momento se inició una nueva política encaminada a la introducción de razas mejoradoras y técnicas más novedosas. Surgieron medidas para soslayar este problema con la ayuda de subvenciones que permitieran continuar con las explotaciones extensivas, especialmente en las zonas montañosas. Se pretendía compaginar la producción agrícola así como la ganadería de corte industrializado, y evitar la desaparición de razas autóctonas. El proceso iniciado en la década de los años setenta sigue vigente en la actualidad.

El verdadero desarrollo de la ganadería comenzó durante el s. XX cuando, en la Asamblea Nacional Veterinaria celebrada en Madrid en 1922, se propuso la creación de la “Dirección General de Ganadería” adscrita al Ministerio de Fomento, de la cual dependerían los planes relacionados con el estudio y propaganda pecuaria. En 1928 se fundó la “Junta Central de Fomento de la Ganadería Nacional”, aunque fue suprimida en 1929.

En el año 1931, un Decreto de la Presidencia de Gobierno regulaba las acciones sobre ganadería y establecía las bases generales para su organización (*Gaceta de Madrid, de 5 de mayo de 1931*); su redacción fue llevada a cabo por insignes veterinarios, coordinados por Félix Gordón Ordás (Martínez Rodríguez *et al.*, 2009). A partir de este momento se crearon: a) las Estaciones Pecuarias Regionales, que en la actualidad han pasado a denominarse “Centro Nacional de Selección y Reproducción Animal” (CENSYRA); b) las paradas de sementales; c) las normas básicas de rendimientos y

los libros genealógicos, aún vigentes; d) el registro pecuario como base estadística; e) la legislación sobre mejora y conservación de las vías pecuarias; f) la regulación de las ferias y mercados; g) la realización de los reglamentos de los concursos ganaderos; h) la estructuración de la cría caballar; y, por último, i) el “Instituto de Biología Animal” (IBA), disuelto y reemplazado en 1952 por el denominado “Patronato de Biología Animal” (PBA), dependiente del Ministerio de Agricultura, integrado en el “Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias” (INIA) y “transformado” en 1993 en el “Centro de Investigación en Sanidad Animal” (CISA). Por otra parte, tuvo gran influencia en el desarrollo de la ganadería la creación de los títulos de Ganaderías Diplomadas (*Decreto de 10 de febrero de 1940*), así como la de formación del “Instituto de Inseminación Artificial Ganadera” (IIAG) (*Decreto de 22 de septiembre de 1947*) y de la “Junta Coordinadora de la Mejora Ganadera” (*Decreto de 28 de octubre de 1955*).

1.3 Relevancia del sector ovino en España, con especial atención a Castilla y León

La distribución de la ganadería a nivel nacional ha visto incrementado su censo desde el siglo pasado, a la par que los rendimientos productivos, debido al cambio en su estructura interna. Esto ha llevado a un reparto desigual de las especies según el área geográfica, también determinado por los núcleos poblacionales adyacentes y las industrias que producen derivados de la propia producción.

Las explotaciones ovinas españolas se dedican, predominantemente, a la producción cárnica (43,7%). El sector ovino nacional tiene una enorme relevancia sobre el cómputo de la Unión Europea, puesto que en la actualidad supone el 20% del total

con 17.003.000 cabezas y ocupa el segundo lugar detrás del Reino Unido, aunque en los últimos veinte años el censo se ha reducido un 4% (INE, 2009; MAGRAMA, 2012).

Lo mismo ocurre cuando se comparan las estadísticas de Castilla y León con los datos del resto de España. Esta comunidad mantiene cifras de 3.408.569 cabezas, lo que significa un 20% del total nacional y un primer puesto “compartido” con Extremadura. Asimismo, se ha visto reducido este porcentaje en un 4% desde principios de los años noventa (INE, 2009; MAGRAMA, 2012).

1.4 Relevancia del sector ovino en la provincia de León

1.4.1 Condicionantes geoclimáticos de la provincia de León

Existe una estrecha relación entre el sector ganadero y el entorno geográfico donde se desarrolla su actividad. La gran diversidad climática originada por los contrastes orográficos y geológicos del terreno condiciona el asentamiento de las poblaciones humana y animal.

La provincia de León se encuentra a una altitud media de 914 m sobre el nivel del mar. Desde el punto de vista de la explotación agroganadera en relación a la climatología, en León pueden distinguirse diez áreas (Rodríguez Rodríguez, 1955) (*Figura 2*) que, en orden de extensión, son:

- a) Montaña (4.403 km²). Los cultivos fundamentales son forrajes y patatas. Presenta una gran riqueza en prados y bosques. Predominan los grandes y pequeños rumiantes, junto con los équidos.
- b) Tierra de Campos (2.622 km²). Se cultivan cereales y viñas. Están presentes los grandes y pequeños rumiantes, al igual que los équidos.

- c) Tierras de León (1.496 km²). Además de prados, cereales y forrajes, existen cultivos hortofrutícolas. Se encuentran grandes y pequeños rumiantes.
- d) El Bierzo (1.399 km²). Los bosques se intercalan con cultivos de carácter hortofrutícola y las viñas. Destacan los grandes rumiantes y los équidos.
- e) Montaña de El Bierzo (1.341 km²). Aparte de los bosques, se siembra forraje y patatas. La diferencia con el anterior es la explotación de ganado caprino.
- f) Maragatería (1.224 km²). A su vez se divide en áreas de regadío y de montaña. Mientras en la primera se explotan los pequeños rumiantes, en la segunda se hace lo propio con los grandes. Los cultivos se centran en los cereales, las legumbres y las patatas.
- g) Cabrera (948 km²). Se cultivan cereales y patatas. Están presentes los pequeños rumiantes.
- h) Tierras Bañezanas (703 km²). Los cultivos hortofrutícolas se unen a los de cereales, patatas, remolacha, legumbres y viñas. Además de los grandes y pequeños rumiantes, existen explotaciones de équidos.
- i) Páramo (697 km²). Se cultivan cereales y viñas. Se pueden encontrar grandes y pequeños rumiantes.
- j) Ribera del Órbigo (544 km²). La calidad del terreno es muy alta. Se cultivan legumbres, remolacha, hortalizas, patatas, lúpulo y cereales. Los grandes y pequeños rumiantes comparten el espacio con los équidos.

En cuanto a la temperatura, conviene recordar que la media anual se encuentra alrededor de los 11°C; las temperaturas máximas se registran en el mes de julio y las mínimas en enero, lo que da lugar a una oscilación térmica media de 16,5°C y

extrema de hasta 28°C (MAGRAMA, 2014). Estas diferencias se agudizan en las zonas de alta montaña, con medias de 10°C y mínimas de casi 20°C bajo cero, que contrastan con máximas estivales de hasta 30°C. Las áreas de la meseta norte tienen un clima más templado con menores diferencias térmicas por sus temperaturas medias superiores.

Figura 2. Mapa comarcal de la provincia de León

La pluviometría se incrementa durante los meses de invierno, con máximos de hasta 70 mm en diciembre (humedad relativa máxima del 83%). La nieve es abundante en la montaña desde noviembre hasta mayo. Los valores mínimos se registran en verano, en concreto en agosto con 24 mm (humedad relativa mínima en julio del 55%). Por tanto, aunque el clima de la provincia de León se encuadra en semihúmedo

- con un total anual de 555 mm - y de transición - por su humedad relativa media anual del 68% -, habría que diferenciar dos zonas: meseta norte y montaña noroeste. El promedio anual de horas de sol al año se estima en 2.622, con mínimas en diciembre (3,9 horas diarias) y máximas en julio (11,7 horas diarias). En cuanto al régimen de vientos, las principales corrientes son de dirección nordeste y provocan fuertes heladas y frecuentes nieves, con grandes ventiscas en el invierno. En cambio, los vientos de dirección sudeste u oeste son templados y húmedos, con lo que originan abundantes lluvias (MAGRAMA, 2014).

1.4.2 Análisis específico provincial

En la provincia de León, el censo actual es de 456.672 cabezas de ovino, lo que supone un 2,7% del cómputo nacional y un 13,4% sobre las cifras regionales, - por detrás únicamente de las provincias de Zamora y Salamanca (INE, 2009; MAGRAMA, 2012). La evolución del censo ovino en León ha seguido una tendencia a la baja desde principios del s. XX. Razas autóctonas como la Merina o la Castellana están muy adaptadas a las condiciones cambiantes de la meseta norte. Aunque la explotación en intensivo del ovino presenta ciertas dificultades, se ha conseguido compaginar la producción de carne con la de leche y la demanda de lana.

El análisis de la dispersión animal en el conjunto de la nación española obliga a utilizar como algoritmo el *Índice de Concentración de Gini* (Ruiz-Maya, 1978), cuyos valores están englobados entre 0 y 1, siendo 0 una distribución uniforme, y 1 una concentración alta de una especie concreta (*Figura 3*).

A partir de la mitad del s. XX se tiende hacia una mayor homogeneidad en las cuencas mediterránea y cantábrica. La modificación se acentúa en la década de los

ochenta por la adhesión a la Unión Europea. Las especies ovina (0,46) y bovina (0,53-0,54) son las mejor distribuidas a nivel nacional (*Figura 3*), especialmente la segunda, cuya explotación continúa siendo eminentemente extensiva.

Figura 3. Índice de Gini en rumiantes y équidos a nivel nacional (1960/1985)

Por otro lado, de sobra son conocidas las diferencias inter e intra-provinciales en cuanto a preponderancia de algunas especies animales en detrimento de otras. Los principales factores que llevaron a esta situación fueron fruto del desarrollo tecnológico, como la aplicación de los sistemas de conservación, los transportes o los circuitos comerciales, en aras de hacer las producciones más rentables. El estudio censal en un rango provincial exige la validación mediante el *Coefficiente de Localización de Sargent-Florence* (Segrelles Serrano, 1993). Los valores del coeficiente serán superiores o inferiores a 1, siendo mayores cuando la especie tenga un peso específico más importante en el área circunscrita que el correspondiente del país, y viceversa. La diferencia con el índice anterior es que éste exige una uniformidad entre los elementos a relacionar y proporciona datos más exactos (*Figura 4*).

El peso específico del ganado ovino leonés respecto al nacional fue idéntico en los años sesenta (0,99), y se vio incrementado un cuarto de siglo después (1,49) (*Figura 4*), del mismo modo que el ganado equino. La homogeneidad en su distribución queda

claramente definida. El censo pecuario ha evolucionado desde posiciones de carácter extensivo a la intensificación, y los pequeños rumiantes continúan concentrados en el interior continental aprovechando los eriales y matorrales.

Figura 4. Datos del Coeficiente de Localización de Sargent-Florence para León (1960/1985)

El censo de grandes y pequeños rumiantes en la provincia de León se ha mantenido constante, aunque en moderada disminución desde sus máximos en los años cuarenta (ovino y caprino) y sesenta (bovino) del s. XX. En comparación con esas décadas, la reducción más significativa ha ocurrido en el ganado caprino (82,1%), mientras que en los otros rumiantes ha sido similar (ovino: 42%; bovino: 35,5%) (MAGRAMA, 2009).

2. *Fasciola hepatica* y Fasciolosis

2.1 Etiología

2.1.1 Nomenclatura y etimología

La fasciolosis es una parasitosis ocasionada por las especies del género *Fasciola*, que en la fase adulta se localizan en los conductos biliares del hígado, donde provocan obstrucciones y hepatomegalia. Esta parasitosis suele ser crónica e ir acompañada de trastornos nutritivos (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). La enfermedad ha recibido múltiples denominaciones, como: “caquexia acuosa”, “podredumbre del hígado”, “comalía”, “papo”, “papuza” o “mal del hígado”; y el parásito, por su parte, se conoce con los nombres de “coscojo”, “caracolillo”, “palomita”, “galápago”, “gálamo”, “sapillo”, “duela hepática” o “distoma del hígado” (Arroyo *et al.*, 1981; Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989; Díez Baños, 2011).

Históricamente, este parásito ha recibido diversas denominaciones, aunque en la actualidad sus acepciones más comunes son fasciola o duela hepática. En España, la acepción “comalía” fue citada por Gabriel Alonso de Herrera en su *Obra de Agricultura* (1513); Dalmacio García Izcara la denomina “caquexia acuosa” en sus trabajos: *La caquexia acuosa simple en el ganado cabrío* (1902) y *¿La epizootia que padece el ganado de Castilla es la caquexia acuosa u otra enfermedad?* (1917) (Sanz Egaña, 1927). Ambos apelativos fueron también utilizados por Martín Anguiano en 1883 en su obra *De la caquexia acuosa o Comalía en los animales domésticos*. Por otro lado, la denominación “distoma hepático” sería empleada por Martín de la Calle en la especie humana en 1890 (*Un caso de distoma hepático en el hombre*) (Cosme *et al.*, 2001). Asimismo, Juan Antonio Montes utilizó en 1789 el término “papuza” en su *Tratado de*

las enfermedades endémicas, epidémicas y contagiosas de toda especie de ganados [...]. Como ya se ha indicado, Casas y Sampedro denominaba “caquexia acuosa” y “sapillo” a la fasciolosis en su *Tratado de Epizootias* de 1846 (Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989; Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a).

El término latino “*fasciola*” significa filete o pequeña banda, en el sentido de “*fasciculus*” (haz) (Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas, 2004). El nombre científico evolucionó desde Linneo, pasando por Goeze, Retzius y Abildgaard. La nomenclatura designada por estos dos últimos (*Distoma hepatica*) fue aceptada en las clasificaciones de Zeder (1800), Rudolphi (1808-1810) y Dujardin (1845), y modificada por Diesing (*Distomum hepaticum*) en 1849-1851 (Grove, 1990). Finalmente, quedó la primera acepción tras la reunión del “Comité Internacional sobre Nomenclatura Zoológica” (ICZN) en 1925. Por tanto, el catálogo identitario de *F. hepatica* (Linnaeus, 1758) abarcó *Distoma hepaticum* (Linnaeus, 1758), *Planaria latiuscula* (Goeze, 1782), *Distoma hepatica* (Retzius, 1786; Abildgaard, 1790), *F. hominis* (Gmelin, 1788-1793), *Distomum hepaticum* (Diesing, 1849-1851), *F. californica* o *halli* (Sinitsin, 1933).

La denominación “*duela*” parece que proviene del francés (“*douelle*”), en relación a la estructura de madera curvada de las cubas o barriles. También podría derivar de “*douve*” o “*dauve*” por la hoja de una hierba indicada en las descripciones de Jean de Brye en 1379 (*Le bon Berger*, reeditado en 1879 en París); esta planta podría ser una especie ranunculácea (Grove, 1990; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Por último, el vocablo “*distoma*” o “*distomum*” tendría un origen griego con el prefijo “*di-*” (dos veces, doble) y la raíz “*stoma*” (boca), por la presencia de sus dos características ventosas (Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas, 2004).

2.1.2 Perspectiva histórica

La fasciolosis es una de las “(...) enfermedades e infecciones en que puede existir relación animal-hombre y viceversa, bien sea directamente o a través del medio ambiente, incluidos portadores, reservorios y vectores” (OMS, 1965). Específicamente, se clasifica dentro de las antropozoonosis y, según su modo de transmisión, es una metazoonosis. Se trata de un ejemplo característico de parasitosis emergente como consecuencia del cambio climático y del efecto del hombre (Mas-Coma *et al.*, 2005; Martínez-Valladares *et al.*, 2013). Las zoonosis suponen daños para la salud, la economía y la sociedad en general, por eso su abordaje debe ser desde el máximo rigor sanitario implicando las ramas humana y veterinaria, como aseguraba Martin Kaplan en 1950 en la OMS, a propósito de la cita en una comunicación personal de James H. Steele (Kahn *et al.*, 2007). En la actualidad tiene una gran repercusión en el sudeste asiático y la región oeste del Pacífico (Keiser & Utzinger, 2005).

Según Laureano Saiz Moreno, la primera evidencia de este parásito tuvo lugar en la Península Ibérica a mediados del s. IX, cuando Muhammed Ibn Ahi Hizman citaba un proceso hepático (“Kebet”), -“presumiblemente” causado por un verme plano- en su obra *Kitab-Wal-Baitara* (comunicación personal a F.A. Rojo-Vázquez, 1989). Puede ser que hubiera una mención del parásito en el s. X en Gales, así como una descripción en la obra titulada *Black Book of Chirk* (ca. 1200) (Froyd, 1969).

En 1379, Jean de Brye describió una enfermedad que afectaba a las ovejas tras el consumo de “(...) una hoja pequeña, redondeada y verde (...)” en relación a la supuesta ranunculácea mencionada con anterioridad (Carroll & Wilson, 2012); según este ganadero, el hígado de las ovejas se pudría y criaba gusanos grandes y planos, de modo que “los pastores deben evitar que las ovejas pasten en zonas pantanosas que son bajas

y húmedas, pues en ellas crece una planta muy peligrosa (...) que les gusta mucho a las ovejas, pero que es muy dañina y nociva para ellas" (Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989; Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a). Las descripciones de Jean de Brye fueron esenciales, aunque no llegó a describir el parásito ni supo si era la causa o la consecuencia de la patología observada. Unos años antes, a finales del s. XIII, parece ser que Pietro di Abano sí consiguió describir el parásito, aunque su obra no sería publicada hasta 1472 por motivos religiosos (Eycleshymer & Schoemaker, 1917).

Ya en la Edad Moderna, el abogado inglés Anthony Fitzherbert menciona nuevamente el parásito en un libro sobre producción animal editado en 1523 (*A new Tracte or Treatyse moost profytable for all Husbandemense*) (Cole, 1944). Entre 1547 y 1549, el patólogo italiano Hieronymus Gabucinus puntualizaría el tamaño de los gusanos (como pepitas de calabaza), así como su aparición también en los "vasos hepáticos" de las cabras (*De lumbricis alvum occupantibus ac de ratione eurandi eos, qui ab illis infestantur; Commentarius de lumbricis alvum occupantibus et eorum cura*). Johann Conrad Gesner sería el encargado de certificar, por medio de su obra cumbre *Historia Animalium* (1551-1558), las observaciones de Jean de Brye: la ingestión de hierba en las proximidades del agua incrementaba las posibilidades de aparición del verme (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Unos treinta años después, sería Cornelius Gemma quien atribuiría a esta trematodosis la causa de una importante epizootia ocurrida en Holanda en 1552.

Se cree que fue John Faber quien, en 1670, situó correctamente las fasciolas en los conductos biliares (Reinhard, 1957), al igual que observó los huevos dentro de los parásitos adultos. Este hecho fue esencial para su teoría de la infección a partir de la ingesta de los vermes o sus huevos, y de su llegada al hígado por vía sanguínea. El s.

XVII culminará con un hallazgo fundamental, la ilustración morfológica del trematodo a partir de fasciolas recogidas de hígados de carnero (1668) y liebre (1684) por Francesco Redi; él mismo especificó su localización en la bilis y su parecido al de un lenguado (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a).

Godefridus Bidloo observó los huevos por primera vez, y amplió el espectro en 1698 a otras especies (vaca, ciervo, hombre), al igual que señalaron investigadores como Borel o Malpighi (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a). Finalmente, fue Pierre Pallas quien extrajo las fasciolas de los conductos biliares de un hígado humano, tras una necropsia en Berlín en 1760 (Foster, 1965; Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a). Aunque durante este siglo se detallaron estructuras internas del parásito, habría que esperar hasta el s. XIX para obtener descripciones más exhaustivas por parte de Mehlis, Blanchard o Sommer (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Antonio van Leeuwenhoek analizó concienzudamente el proceso de la infección a partir del agua y los pastos cercanos a colecciones de agua entre 1700 y 1704, aunque con escaso éxito. El s. XVIII, marcado por el inicio de estudios epidemiológicos, trajo el descubrimiento de algunos estadios intermediarios (cercaria, redia) a mediados de siglo por parte de Jan Swammerdam (1737) (Fournier, 1990) a partir de un caracol de la especie *Paludina vivipara* (Andrews, 1999). Frank Nicholls, en 1755, relacionó el agente con sus efectos patógenos al indicar que los conductos biliares de novillos o terneros afectados presentaban una especie de “pared de piedra”, es decir, una calcificación. A finales de siglo (1790), Peter Christian Abildgaard sería el primero en elucubrar sobre la existencia de más de un hospedador, hecho fundamental para futuras investigaciones (Andrews, 1999; Cox, 2002).

A pesar de los descubrimientos, aún se creía que las fasciolas eran la consecuencia de la enfermedad y no la causa, en el mismo sentido que Jean de Brye veía a la hierba “*douve*” o “*dauve*” como origen -y no reservorio- de la enfermedad. El pionero en indicar que ciertos insectos o sus huevos llegaban junto con la hierba al estómago y al canal intestinal del animal, desde donde iban a la sangre, fue Jabez Hogg entrado el s. XIX (Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989). Otto Müller observaría las cercarias al microscopio (1773), y Christian Nitzsch su enquistamiento (1817) tras el hallazgo de miracidios en otros trematodos por parte de Johann Zeder (1803). Ludwig Bojanus volvió, en 1818, sobre las teorías de Swammerdam y denominó “*redia*” a la fase del ciclo biológico en los caracoles acuáticos, en honor a Francesco Redi (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999; Andrews, 1999). Esta circunstancia fue corroborada por Karl von Baer en 1827 (Grove, 1990). Durante esos años, muchos otros científicos continuaron la estela de los anteriores, entre ellos Creplin, Eichhorn, Wagener, Hermann,... A Johannes Steenstrup se debe la teoría de la “alternancia generacional” (1845), confirmada por Carl von Siebold en 1854 (Andrews, 1999; Díez Baños, 2011). Más adelante se comprobó que la denominada *Cercaria echinifera* no evolucionaba en vertebrados cuando tenía cola, pero si se enquistaba y la perdía daba lugar al “distoma” (*Monostomum flavum*) en el intestino de gorriones y otros pájaros (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). En este siglo también destacó el hallazgo del helmintólogo David Weinland en 1875. A partir de las hipótesis de Swammerdam, Weinland descubrió que el hospedador intermediario era el molusco pulmonado *Lymnaea (Galba) truncatula* (Taylor, 1937; Reinhard, 1957), lo cual fue confirmado siete años después por Thomas Leuckart. Las investigaciones de éste -junto con los hallazgos de Algernon Phillips Thomas (1882-1883) (Thomas, 1883) y Adolph Lutz (1892)- determinaron definitivamente el ciclo biológico (Foster, 1965).

El último hito llegó en 1914, cuando Dimitri Sinitsin confirmó la ruta de migración del parásito desde la pared intestinal al hígado, ratificada posteriormente por Shirai, Susuki o Shaw, entre otros (Andrews, 1999). El ciclo de *F. hepatica* fue modelo para el análisis de otros trematodos digeneos, con descubrimientos de nuevas ubicaciones y hallazgos de otros hospedadores intermediarios desconocidos (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Este año 2014 es el centenario del descubrimiento del ciclo biológico completo de *F. hepatica*.

2.1.3 Morfología de *F. hepatica*

Las especies *F. hepatica* y *F. gigantica* son sus máximos exponentes a nivel mundial, aunque existen otras más circunscritas (*F. tragelaphi*, *F. jacksoni* y *F. nyanzae*). En este trabajo, *F. hepatica* es el trematodo digeneo eje de estudio, que parece ser la única especie denunciada en España (Cordero del Campillo *et al.*, 1980).

La situación geográfica nacional hace que el valle del Guadalquivir sea una frontera natural para los principales hospedadores intermediarios de *F. hepatica* y *F. gigantica*, es decir, *Galba truncatula* y *L. auricularia*, respectivamente, aunque la primera de las limneas podría albergar a ambas especies del trematodo (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Asimismo, también podrían tener importancia epidemiológica como hospedadores intermediarios de *F. hepatica* las especies *L. palustris* (De Lourdes Sampaio *et al.*, 1968; Escudero Díez, 1970; Díez y Díez, 1981) y *L. limosa* (Cordero del Campillo *et al.*, 1980). Existen posibilidades de que ambos digeneos coexistan, así como casos por *F. gigantica* por contacto con Portugal y norte de África (Cruz e Silva *et al.*, 1971; Alasaad *et al.*, 2007).

Figura 5. Microscopio electrónico de barrido: **a)** Microfotografía de la superficie ventral del cono cefálico de un adulto de *F. hepatica*, señalando la ventosa oral (OS), la ventosa ventral o acetábulo (VS) y el poro genital (GP). El resto del cuerpo muestra las pequeñas espinas dirigidas hacia atrás; **b)** Detalle de las espinas de la superficie (S) en un adulto de *F. hepatica* a mayor resolución (Halferty *et al.*, 2009).

Las características morfológicas de los adultos de *F. hepatica* aparecen descritas en todos los tratados de Parasitología, tanto general como aplicada. *F. hepatica* tiene un tegumento que mantiene la integridad del parásito e interviene en funciones de absorción-secreción, osmorregulación, protección, nutrición y de tipo sensorial. Sirve de barrera en la interacción del parásito con el sistema inmunitario del hospedador (Trudgett *et al.*, 2000) al mismo tiempo que interviene en funciones bioquímicas y fisiológicas del parásito (Fairweather *et al.*, 1999). Se compone de una gruesa cutícula con espinas triangulares móviles dirigidas hacia atrás, sobretudo ventrales (Boray, 1982), y que varían en número dependiendo de la fase de desarrollo y migración (Bennett, 1975a, 1975b; Fairweather *et al.*, 1999) e irritan el parénquima hepático y los conductos biliares del hospedador definitivo (Figura 5). Aquí, las fasciolas pueden permanecer vivas hasta 12 años (Andriamanantena *et al.*, 2005).

Microscópicamente, su estructura es un sincitio, una capa protoplasmática de entre 15-20 μm conectada a células tegumentales localizadas bajo las capas de músculo longitudinal y circular (Bennett & Threadgold, 1975; Fairweather *et al.*, 1999). Estas células especializadas producen vacuolas de inclusión que son transportadas a través de las tres capas, superpuestas al mesénquima sincitial, hasta la zona apical donde liberan su secreción (Threadgold & Brennan, 1978). La membrana apical está cubierta de un fino glucocálix donde se producen los principales cambios morfo-fisiológicos durante la migración del trematodo hacia los conductos biliares.

A medida que avanza el desarrollo del parásito en el hospedador definitivo, las vesículas formadas y su contenido son modificados (Hanna, 1980b); los cuerpos de secreción contenidos en el sincitio varían si son juveniles recién desenquistados, fasciolas en proceso de emigración, y formas localizadas ya en los conductos biliares (Bennett & Threadgold, 1975; Fairweather *et al.*, 1999).

2.1.4 Ciclo biológico de *F. hepatica*

El ciclo comprende dos etapas. Por un lado, su desarrollo en el hospedador intermediario y el medio ambiente tras la excreción de los huevos por el hospedador definitivo (fase exógena); y, por otro, sus efectos tras ingresar en el mismo (fase endógena) (*Figura 6*).

a) Fase exógena

Las formas adultas de *F. hepatica* se localizan en los conductos biliares del hospedador definitivo, donde ponen huevos de tamaño grande (130-150 x 70-90 µm), que son elipsoidales, operculados y no embrionados. Los huevos pasan a vesícula biliar y son excretados al exterior con las heces. Necesitan liberarse de la masa fecal para continuar su desarrollo, que se completa en condiciones adecuadas de temperatura (10-30°C), humedad, oxigenación, pH (4,2-9), composición iónica, salinidad y turbidez en el agua, formándose en el interior una larva denominada miracidio que eclosiona tras un estímulo lumínico (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). A 26°C se completa el proceso en 12 días, aunque en condiciones de campo se requieren varias semanas (hasta dos meses) a una temperatura media de 10-12°C (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). En las siguientes 24 horas, el miracidio nada e intenta encontrar, guiado por un fototropismo positivo, a un caracol que actúa como hospedador intermediario (*G. truncatula*); la penetración se produce gracias a la secreción de enzimas proteolíticas (Smyth & Halton, 1983) y a la acción mecánica (Dawes, 1960).

Inmediatamente después de penetrar en el hospedador intermediario, el miracidio se transforma *in situ* en esporocisto y, a partir de éstos, se originan una o dos generaciones de redias. Finalmente, las redias se transforman en cercarias que abandonan el molusco, nadan hacia la vegetación y pierden la cola, se enquistan y se convierten en metacercarias (250-300 µm) (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). Un pequeño porcentaje (10%) se enquista en el agua ("flotantes"), por lo que la infección también puede producirse por ingestión de agua en manantiales contaminados (Mas-Coma *et al.*, 2005). Las metacercarias son muy sensibles a las altas temperaturas y a la

desección, aunque pueden sobrevivir durante todo el invierno (Over y Dijkstra, 1975; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Figura 6. Ciclo biológico de *F. hepatica* (modificación del realizado por Wetzel en 1947)

b) Fase endógena

El hospedador definitivo se infecta al ingerir metacercarias con la hierba fresca o con el agua de bebida, pero también con alimentos mal ensilados (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Al llegar las metacercarias al intestino delgado, aproximadamente una hora

después de la ingestión, se desenquistan (Dawes & Hughes, 1964) y atraviesan la pared duodenal. Este proceso se ve activado previamente en el rumen por una elevada concentración de dióxido de carbono, ambiente reductor y temperatura de unos 39°C, y también por el contacto con la bilis en la desembocadura del conducto colédoco (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Dos horas después, aproximadamente, las formas juveniles (adolescarias) comienzan a emigrar por la cavidad abdominal (Dalton, 1999), llegan a la cápsula de Glisson, la perforan y alcanzan el parénquima hepático a las 90 horas post-infección (Sinclair, 1967). En algunas ocasiones se han descrito migraciones ectópicas en ganglios linfáticos, pulmón, páncreas, timo o útero (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999).

Sobre la 6ª semana post-infección, las fasciolas se instalan en los conductos biliares, donde finalizan el desarrollo y alcanzan la fase adulta; a partir de los 55-56 días post-infección comienza la excreción fecal de huevos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), pudiendo producir una fasciola adulta una media de 2.000-5.000 huevos al día, con máximos diarios de 20.000 huevos (Durbin, 1952). La tasa de éxito de implantación hepática es variable: entre 25-60%, con una media del 40% (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999).

Hay que recordar que el número de huevos eliminados no sólo depende del parásito, sino también de la receptividad del hospedador, de las posibles reinfecciones (“efecto multitudinario”), de la intensidad y de la duración de la infección, entre otros factores. Aunque la excreción fecal de huevos tiene lugar durante todo el año (Manga *et al.*, 1990), los valores máximo y mínimo tienen lugar en marzo-mayo y enero-febrero, respectivamente (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 2009).

Los rumiantes domésticos y silvestres son los principales hospedadores definitivos de *F. hepatica*. En España, también pueden encontrarse parasitados los asnos,

caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres, gamos y los humanos (Cordero del Campillo *et al.*, 1980; Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). Por otra parte, la receptividad de estos hospedadores frente al parásito es diferente. Unas especies reaccionan con rapidez ante la infección e impiden el desarrollo del parásito, como el cerdo, jabalí, perro, gato o criceto; otras, como los bóvidos, los équidos y los humanos, responden frente al trematodo tras su implantación en el hígado; por último, los pequeños rumiantes y los lagomorfos son muy receptivos.

2.2 La enfermedad

2.2.1 Importancia médico-veterinaria de la infección por *F. hepatica*

Los perjuicios que originan las parasitosis en la cabaña ganadera siguen teniendo una enorme transcendencia, tanto médica como económica. En el caso particular de la fasciolosis, la casuística es muy variable dependiendo del área geográfica, pero se considera muy relevante en los bovinos y ovinos.

Su estudio requiere una colaboración estrecha entre varias especialidades además de la Patología, como la Ecología, la Inmunología, la Farmacología, la Terapéutica o la Meteorología. En este sentido, el cambio climático modifica la incidencia y la distribución de muchas enfermedades infectocontagiosas (Rodríguez Ferri, 2012), ampliándose el rango de hospedadores y la gravedad de la enfermedad por el incremento de la capacidad de desarrollo y la tasa de transmisión del agente, con especial repercusión en los procesos transmitidos por fómites y vectores vivos u hospedadores intermediarios (Reiter, 2001; Martínez Valladares *et al.*, 2013).

El fenómeno de emergencia en varias enfermedades, algunas de ellas zoonosis, guarda relación con ciertas regiones geográficas de la Tierra, existiendo entre 1940 y 2004 más de 335 brotes de los que un 3,3% fue debido a helmintos parásitos (Jones *et al.*, 2008). Las áreas más afectadas en cuanto a emergencia de patógenos y nuevas enfermedades son zonas de clima tropical y subtropical, como América Central, África Tropical y el Sur de Asia (Woolhouse, 2008).

Es necesario citar la existencia de métodos meteorológicos de predicción y demás sistemas de información geográfica que simulan las condiciones climáticas y pronostican la evolución de la incidencia y la gravedad de los brotes de la enfermedad (Malone *et al.*, 1987; Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b).

La fasciolosis producida por *F. hepatica* es un proceso cosmopolita, con unos 600-700 millones de animales en condiciones de riesgo (Ramajo *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2009; Liu, 2012). Además, el parásito afecta también a los humanos (Haroun & Hillyer, 1986) y, como ya se ha mencionado, es responsable de una zoonosis emergente en algunas zonas (Mas-Coma *et al.*, 2009). Su repercusión en la cabaña ganadera es considerable, en especial por los decomisos de órganos y canales en los mataderos, así como por los gastos en antihelmínticos para su control (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Las áreas geográficas más afectadas se relacionan con las zonas donde las condiciones climáticas permiten la existencia del hospedador intermediario *G. truncatula*. La enfermedad se puede hallar en regiones tropicales y subtropicales (Soulsby, 1986; Krämer & Schnieder, 1998), el norte de América, el norte de África y Europa (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

En Europa existe diversidad en los datos obtenidos. A pesar de que la prevalencia hallada en países mediterráneos como Grecia (16,2%) (Kantzoura *et al.*, 2011) o Italia

(12,4%) (Biggeri *et al.*, 2007), y naciones del norte de Europa como Alemania (1,7%) (Epe *et al.*, 2004) o Noruega (18,8%) (Domke *et al.*, 2013), es inferior al 20%, el patrón epidemiológico está cambiando paulatinamente en la zona norte con un incremento de la prevalencia (Daniel & Mitchell, 2002), lo que parece indicar que las metacercarias están presentes en los pastos todo el invierno, ya que los animales están expuestos a la infección durante largos periodos de tiempo (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). De hecho, el mantenimiento de las metacercarias en la época invernal es menos importante en la zona mediterránea (Luzón-Peña *et al.*, 1994b; 1995) que en los países del norte, como se aprecia en los recientes valores de prevalencia de Polonia (34,9%) (Kozak-Cieszczyk, 2006) o Inglaterra (47%) (McCann *et al.*, 2010), expandiéndose desde algunas áreas de Escocia hasta la práctica totalidad del Reino Unido como consecuencia del cambio climático (Kenyon *et al.*, 2009).

En España, cerca del 30% del total de las explotaciones ovinas del noroeste peninsular están infectadas, siendo la prevalencia individual superior al 50% (García-Pérez & Juste-Jordán, 1987; Ferre *et al.*, 1995).

Si se desglosa por regiones, los valores de prevalencia varían en el noreste peninsular, muy dependientes del tipo de explotación y condiciones climáticas (regadío: 77%; seco: 28,5%) en Aragón (Luzón-Peña *et al.*, 1994a) donde por término medio la prevalencia se sitúa entre el 13-22% (Uriarte *et al.*, 1985). En Navarra y la Comunidad Autónoma Vasca, la prevalencia es superior, alcanzando el 63% (García-Pérez & Juste-Jordán, 1987).

En el centro y sur peninsulares, la prevalencia es más baja. Mientras en Castilla-La Mancha puede llegar al 4,4% (Luzón-Peña, 1991; Luzón-Peña *et al.*, 1994a; 1997), en Extremadura presenta un máximo del 3,3% (Reina *et al.*, 1987). En Andalucía, varía

entre el 2% y el 50% según las zonas (Luzón-Peña *et al.*, 1994a), aunque si se tienen en cuenta los valores en caprino (1,9% aproximadamente) (Martínez-Cruz *et al.*, 1993; Alasaad *et al.*, 2008), se podría establecer la analogía con el ovino.

En la comunidad gallega, la prevalencia – mediante análisis coprológico – es del 30,4% (Paz-Silva *et al.*, 2003; Pedreira *et al.*, 2003), aunque estos valores se elevan hasta el 39,1% o el 56% cuando se utilizan, las técnicas de “Enzimoinmunoanálisis” (ELISA)-sándwich y ELISA indirecto, respectivamente (Paz-Silva *et al.*, 2003). Recientemente se han visto reducidos los valores hasta el 6% (Vázquez *et al.*, 2008) y el 9,4% (Cienfuegos *et al.*, 2009). En las explotaciones de la provincia de León, la prevalencia a nivel de rebaño ha descendido desde los años sesenta, cuyos valores eran del 95,5-100% (Del Río Lozano, 1967), hasta el 14,87% en los años ochenta (Manga-González *et al.*, 1990) y del 12,8-26,7% en los años noventa (Ferre *et al.*, 1993; Ferre *et al.*, 1995). En el resto de Castilla y León, la prevalencia por provincias es muy variable, con valores del 0,5% en Segovia (Ferre *et al.*, 1991), del 11,4% en Burgos (Hidalgo *et al.*, 1995) y del 9% de media en Salamanca, aunque puede alcanzar el 52% en zonas de regadío (Ramajo-Martín & Simón-Vicente, 1989; Ramajo-Martín *et al.*, 1996). En la actualidad, los valores medios de prevalencia en las provincias de León, Zamora y Salamanca son del 59,3%, siendo en León del 60,5% (Martínez-Valladares *et al.*, 2013).

2.2.2 Patogenia: Mecanismos y acción patógena

Aunque los daños producidos por *F. hepatica* en el hospedador suelen circunscribirse al hígado, también se producen alteraciones en otros órganos. Las fasciolas inmaduras pueden originar lesiones en su trayecto desde el intestino al hígado. En

los conductos biliares hay una acción expoliadora y hematófaga por parte de las fasciolas adultas. En el curso de la fasciolosis, el hígado se encuentra en un estado hipercinético respecto a las proteínas plasmáticas, con un marcado incremento de la síntesis de hemoglobina, albúmina e inmunoglobulinas (Ferre-Pérez, 1994; Ferre & Rojo-Vázquez, 1994). El incremento de la concentración plasmática de diferentes enzimas de origen hepático es de relevancia diagnóstica (Rowlands & Clampitt, 1979) y característica en las dos fases de la infección, que son:

a) *Pre-hepática*

Implica el periodo desde que las fasciolas juveniles atraviesan la pared del duodeno, sobre las 72 horas post-infección (Kendall & Parfitt, 1962), y alcanzan definitivamente el hígado. Durante esta emigración a través de la cavidad abdominal, apenas existen signos por la escasa destrucción celular (Dalton, 1999). Como ya se ha mencionado anteriormente, durante esta fase pueden ocurrir emigraciones ectópicas a ganglios linfáticos, pulmón, páncreas, timo, útero, bazo, diafragma o peritoneo (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

b) *Hepática*

La llegada al hígado ocurre a partir de las 90 horas de la infección (Sinclair, 1967). Esta fase se divide en dos etapas: parenquimatosa y biliar. Durante la primera, los parásitos perforan la cápsula de Glisson y comienzan a alimentarse de parénquima hepático, destruyéndolo y provocando hemorragias. De hecho, es la ventosa oral la principal vía de nutrición del parásito; mediante ella, las jóvenes fasciolas (adolescarias) rompen los hepatocitos y aspiran los restos celulares hasta su faringe

(Dawes & Hughes, 1964). Asimismo, las espinas y las ventosas de la superficie externa del trematodo ocasionan una importante irritación e inflamación, con la consecuente fibrosis y muerte celular. Este fenómeno puede prolongarse hasta ocho semanas. Dentro de una misma muestra hepática pueden encontrarse tanto lesiones crónicas como recientes, puesto que una fasciola puede trascurrir varias veces por dicha zona durante su fase parenquimatosa (Zafra, 2007). Por otro lado, las fasciolas excretan productos de carácter tóxico que permiten la digestión del hepatocito y facilitan la emigración intraparenquimatosa (Chauvin & Boulard, 1996).

El efecto patógeno es mayor en el lóbulo izquierdo, más cercano al área duodenal, originándose una hipertrofia vicariante en los lóbulos derecho, en el cuadrado y en el proceso papilar del lóbulo caudado (Shirai *et al.*, 2006), lo que conlleva a un aumento significativo del tamaño del órgano (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

En la etapa biliar, las fasciolas consiguen instalarse en los conductos biliares a partir de la 6ª semana post-infección. La dosis infectante es determinante, puesto que, si es elevada, las lesiones son más severas y existe mayor riesgo de muerte del hospedador, ocurriendo una cronicidad en el caso contrario (Behm & Sangster, 1999). De hecho, dosis bajas suelen provocar hepatitis asociada a colangitis hiperplásica, derivando en fibrosis y calcificación de los canalículos biliares (*Figura 7*).

La fibrosis hepática presenta cuatro mecanismos patogénicos (Murray, 1973; Symons, 1989; TDC, 1974; Murray & Rushton, 1975), que son: a) *Fibrosis post-necrótica*, tras la migración de las fasciolas, con la definitiva destrucción tisular de los hepatocitos. Se forman unas bandas de fibrosis que tratan de conectar los trayectos parasitarios con los canales portales adyacentes, las venas hepáticas centrales y la cápsula de Glisson; b) *Fibrosis isquémica*, adyacente a los trayectos migratorios. Se origina como

consecuencia del intento de reconstrucción de las áreas de necrosis coagulativa y los microtrombos debidos al avance de las fasciolas (Ferre-Pérez, 1994); c) *Fibrosis peribiliar*, resultado de la reacción inflamatoria producida por el avance y erosión de la mucosa biliar por parte de las fasciolas; y d) *Fibrosis monolobular*, consistente en la conexión de los canales portales con tejido fibrótico. Queda claramente delimitado el lóbulo afectado (*Figura 7*), con flebitis de la vena porta e infiltraciones de linfoblastos y eosinófilos, indicadores de respuesta inmunitaria del hospedador (Ferre & Rojo-Vázquez, 1994). Los infiltrados de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos suelen estar presentes en trayectos hemorrágicos recientes (Martínez-Moreno *et al.*, 1999), mientras que la presencia de fibrocitos, fibroblastos, linfocitos y monocitos en la tríada portal son el resultado de la migración de adoleoscarias (Talukder *et al.*, 2010).

Por tanto, la fibrosis puede restringir el movimiento de las fasciolas debido a la inflamación epitelial de los conductos biliares y las áreas de parénquima hepático adyacentes (Behm & Sangster, 1999). A este fenómeno habría que sumar la acción de la prolina, liberada en grandes cantidades por el trematodo, que actúa mediando la colangitis hiperplásica (*Figura 7*), así como estimulando la deposición de colágeno (Wolf-Splenger & Isseroff, 1983). Posteriormente, la obstrucción de los conductos produciría colangiectasia (*Figura 7*), ictericia y colestasis, con los consecuentes trastornos en la digestión de las grasas y la formación de cálculos biliares. Finalmente, pueden originarse abscesos hepáticos alrededor de las fasciolas tras la reacción inflamatoria y reemplazarse el tejido sano por cicatricial (Lapage, 1981).

En consecuencia, los signos clínicos de la fasciolosis serían: anemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia; además, dependiendo de la intensidad y la duración de la infección en los ovinos, puede existir hiper o hipoproteinemia (Dargie,

1987). A nivel general, la fasciolosis causa una disminución del apetito, de la ganancia de peso media diaria y de la producción de leche y lana, provocando efectos negativos sobre la fertilidad, con unos valores elevados de morbilidad y mortalidad (Wamae & Ihiga, 1991; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). La acción negativa sobre los animales es directamente proporcional al desarrollo de las fasciolas inmaduras y maduras, e igualmente depende de la duración y la intensidad de la infección, así como de la situación nutricional y del estado inmunitario del hospedador definitivo (Dargie, 1987).

Figura 7. *Fasciolosis experimental ovina (cara visceral). Signos de colangitis hiperplásica, microabscesos, trayectos hemorrágicos-infiltrados y fibróticos-calcificados (lóbulo izquierdo)*

La receptividad de los ovinos a manifestar la patología hace que el parásito pueda asentarse y desarrollarse con más facilidad en éstos antes que en otras especies (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). Además, se ha demostrado que dosis infectantes bajas pero repetidas inducen lesiones hepáticas más graves que una única dosis, aunque la carga parasitaria sea equivalente (Pérez *et al.*, 2002), con lo que la respuesta inmunológica local puede contribuir a potenciar el daño hepático.

2.2.3 Inmunopatología

La respuesta inmunitaria se puede clasificar en natural y adquirida. Mientras la primera es inespecífica, no genera memoria inmunológica y funciona mediante el sistema del complemento y la inflamación tras el contacto con el agente extraño, la segunda es más lenta, específica, genera memoria y está mediada por linfocitos B y T tras exponerse un antígeno en una célula presentadora de antígeno, que suelen ser macrófagos (Roitt, 2006; Mendes, 2010). Los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral, y los linfocitos T de la inmunidad de tipo celular (Roitt, 2006).

Los linfocitos T, colaboradores o “helper” (Th), se diferencian a partir de los Th0 según la estimulación antigénica que reciben y darán lugar a distintas respuestas inmunitarias en función de las citoquinas que produzcan (Mosmann & Coffman, 1989b; Abbas *et al.*, 1996; Jankovic *et al.*, 2001a). Así, el perfil Th1 será de carácter proinflamatorio (Berger, 2000), activando los macrófagos, produciendo inmunoglobulina (Ig) G y estimulando respuestas de hipersensibilidad retardada (Spithill *et al.*, 1997) e inflamatorias de carácter citotóxico (Mosmann & Coffman, 1989a). La respuesta Th1 es eficaz frente a infecciones intracelulares y está caracterizada por la producción de interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis

tumoral-beta (TNF- β), interleucina-2 (IL-2) e IL-12. En cambio, los linfocitos del tipo Th2 potencian la proliferación de IgE, de eosinófilos y de células cebadas (Mosmann & Coffman, 1989a; Jankovic *et al.*, 2001a), y presentan un componente antiinflamatorio (Berger, 2000); sus citoquinas asociadas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13) también cooperan con los linfocitos tipo B (Dalton, 1999). De esta forma, el IFN- γ y la IL-12 potencian la respuesta Th1 e inhiben la Th2, y la IL-4 se encarga de solapar la actuación del IFN- γ e incrementar la acción de los linfocitos Th2 en perjuicio de los linfocitos Th1 (Hsieh *et al.*, 1992; Seder & Paul, 1994).

Los linfocitos Th2 inducen la proliferación de mastocitos, mediante la estimulación de las IL-3 e IL-4, y de eosinófilos, promovido por la IL-5, lo que conlleva a la producción de diferentes inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas, originadas a su vez por los linfocitos B (Mosmann & Coffman, 1989a, 1989b; Estes *et al.*, 1995; Abbas *et al.*, 1996). En presencia de helmintos parásitos, este tipo de respuesta Th2 se caracteriza por la producción de la IgE, la cual es activada por la acción de la IL-4 sobre los linfocitos B (Hagan, 1993; Tawill *et al.*, 2004). Por otra parte, los mastocitos sufren una degranulación al unir los complejos antígeno parasitario-IgE con sus receptores de alta afinidad (Brown *et al.*, 2003; Gurish *et al.*, 2004), produciéndose una liberación de aminas vasoactivas y otros mediadores inflamatorios que van a favorecer la activación y adhesión de los eosinófilos a la superficie del parásito.

La dinámica de la respuesta inmunitaria humoral en ovinos y bovinos frente a las helmintosis está caracterizada por la producción de IgG, IgM e IgA (Mendes, 2010). En cuanto a sus isotipos, aunque aparecen los dos, IgG1 e IgG2, el primero es

predominante en este tipo de respuesta y se asocia al perfil Th2, mientras que el segundo está relacionado con el perfil Th1 (Ferre *et al.*, 1997; Estes & Brown, 2002).

2.2.3.1 La respuesta inmunitaria en la fasciolosis

El desarrollo de una respuesta inmunitaria con una producción de linfocitos de tipo Th2 por parte del animal durante el transcurso de la fasciolosis puede verse favorecido por la actividad del propio parásito, en detrimento de una respuesta Th1 (Mulcahy *et al.*, 2005). Asimismo, la respuesta inmunitaria de tipo Th2 puede ser evitada por algunos parásitos por mecanismos de defensa propios del hospedador con el fin de sobrevivir dentro del mismo (Pritchard *et al.*, 1997).

La infección por *F. hepatica* induce una Th2 fuertemente polarizada, lo mismo que ocurre con las infecciones de curso crónico producidas por otros helmintos como los nematodos gastrointestinales (Brady *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005a). Este tipo de respuesta se asocia con la producción de citoquinas como la IL-4 (Viallard *et al.*, 1999), así como con una temprana respuesta de tipo Th1 relacionada con la producción de IFN- γ (Clery *et al.*, 1996; Tliba *et al.*, 2002). Cuando la respuesta Th1 disminuye, hacia las semanas 2-4 post-infección, comienzan a incrementarse las citoquinas de perfil Th2 (Flynn *et al.*, 2007, 2010), lo que conlleva una inmunidad de carácter protector y supone una reducción efectiva en la posible carga parasitaria (Moreau & Chauvin, 2010; O'Neill *et al.*, 2000). Además, la disminución del IFN- γ tras la cronificación de la fasciolosis implica una polarización de la respuesta inmunitaria en función del curso, permitiendo la supervivencia del parásito y el establecimiento de la infección crónica (Zafra, 2007). El aumento del título de la IgE y la existencia de granulocitos sugieren también un perfil de tipo Th2.

Durante la respuesta Th2, la IL-4 estimula la producción de otras citoquinas como la IL-10 (Schmidt-Weber *et al.*, 1999) y el “Factor de crecimiento transformante beta” (TGF- β) (Kohyama *et al.*, 2001), que son fundamentales para minimizar los daños ocasionados por el parásito (Lee *et al.*, 2002). El TGF- β promueve la formación de colágeno (Cutroneo, 2007) y participa junto con la IL-10 en la inducción de fibrosis (Flynn *et al.*, 2010) para la reparación del daño tisular durante la infección. Por otro lado, durante la evolución de la infección existe un incremento de la producción de IgG1, asociada a una respuesta Th2, al mismo tiempo que disminuye la de IgG2 (Bossaert *et al.*, 2000; Clery *et al.*, 1996).

2.2.3.2 Mecanismos de evasión inmunitaria de *F. hepatica*

Como se ha mencionado con anterioridad, las fasciolas pueden permanecer vivas en el parénquima hepático y los conductos biliares del hospedador definitivo hasta 12 años (Andriamanantena *et al.*, 2005). Para ello, los parásitos deben contrarrestar la actuación del sistema inmunitario del hospedador, en especial al atravesar zonas tan inmunológicamente activas como el intestino y el parénquima hepático (Mulcahy *et al.*, 2005). De hecho, la propia emigración de las fasciolas es un mecanismo de evasión en sí mismo, puesto que se induce una respuesta inmunitaria menos efectiva que si se quedaran en una única localización (Meeusen & Brandon, 1994).

La bilis actúa favoreciendo una menor respuesta del hospedador, tanto en la fase de excreción de huevos por las fasciolas adultas como cuando los parásitos llegan a los canalículos biliares (Meeusen & Brandon, 1994; Clery *et al.*, 1996). Antes de llegar allí, en ovejas primoinfectadas, las formas juveniles son también capaces de evitar el contacto con las células del sistema inmunitario del hospedador gracias al factor

motilidad/tiempo y además pueden excretar sustancias que inhiben la quimiotaxis de los leucocitos, son linfotóxicas, al mismo tiempo que destruyen inmunoglobulinas (Goose, 1978; Carmona *et al.*, 1993; Meeusen *et al.*, 1995). Es por ello que *F. hepatica* es capaz de deprimir la inflamación local y la respuesta inmunitaria par facilitar su paso a través del parénquima hepático (Chauvin & Boulard, 1996).

La superficie de contacto entre el parásito y el hospedador será clave para la supervivencia del primero frente a la respuesta inmunitaria del segundo. El tegumento de *F. hepatica* sufre una continua renovación y cambia su composición, en especial durante la emigración tisular (Hanna, 1980a, 1980b; Glauert *et al.*, 1985; Fairweather *et al.*, 1999). El glucocálix externo también se encarga de liberar sustancias al medio que crean un flujo circulatorio que dificulta la acción de los anticuerpos (Duffus & Franks, 1980) así como otros compuestos que inhiben la activación del sistema del complemento, como el ácido siálico (Baeza *et al.*, 1993).

2.2.4 Aspectos clínicos y anatomopatológicos

La patología derivada de la infección por *F. hepatica* en los ovinos puede manifestarse clínicamente de tres formas diferentes: aguda, subaguda y crónica, siendo la última la más característica y frecuente (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999).

Estas formas clínicas se originan según la dosis infectante de metacercarias, con dependencia de la época anual y de su presencia en la vegetación (Armour, 1991); pero no sólo eso, sino que también se relacionan con la respuesta inmunitaria del hospedador y la fase y duración de la infección (Boray, 1969; Piedrafita *et al.*, 2004).

2.2.4.1 Forma aguda

El hecho fundamental para que se origine la fasciolosis de curso agudo es la ingestión de una elevada cantidad de metacercarias en un periodo breve de tiempo, principalmente primoinfecciones. Esta fase suele comenzar a desarrollarse a partir de las 2 o 3 semanas de la infección tras la ingesta de las metacercarias, pudiendo suceder episodios de muerte repentina a las pocas horas tras la aparición de la sintomatología.

Como consecuencia del carácter histiófago inherente a la migración de las formas juveniles a través de la pared del duodeno, la cápsula de Glisson y el parénquima hepático, en el cuadro agudo se evidencia emaciación, dolor abdominal, hepatomegalia, fiebre (Rojo-Vázquez et al., 2012) y anemia hemorrágica aguda normo/macrocítica y normocrómica (Reid, 1973; Ross et al., 1967). Otras indicaciones patológicas sugieren hiperglobulinemia y una concentración plasmática incrementada de la aspartato aminotransferasa (AST) (Ferre-Pérez, 1994), esta última estrechamente asociada a la carga de fasciolas juveniles (Severin et al., 2012). Por lo tanto, aun cuando los animales aparenten una correcta condición orgánica, una anamnesis ulterior evidenciaría palidez e ictericia en las mucosas, letargia, disnea al ejercicio, ascitis y hepatomegalia tras palpación abdominal. Los episodios de muerte repentina -especialmente en otoño y a principios del invierno- (Rojo-Vázquez et al., 2012), se deben quizá a la marcada anemia y a la insuficiencia hepática (Boray, 1985), así como a las hemorragias en casos de infecciones severas (Zafra, 2007). En ocasiones, durante esta forma aguda de la fasciolosis, y por predisposición de ésta, puede tener lugar la coinfección por *Clostridium oedematiens* (o *novyi*) tipo B (Rojo-Vázquez et al., 2012).

En esta fase, se observan trayectos blanquecino-amarillentos en la superficie diafragmática del hígado, los cuales se asocian a focos hemorrágicos, haciendo prominencia en la superficie (Sinclair, 1967; Rushton & Murray, 1977; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Puede aparecer flebitis y trombosis como consecuencia de la emigración de las fasciolas, así como edema que puede producir estenosis u ocluir las venas portales (Dow *et al.*, 1968; Rushton & Murray, 1977). No es de extrañar la evidencia de microabscesos en el parénquima hepático por la acumulación de neutrófilos y hepatocitos degenerados, que pueden originar granulomas (Meeusen *et al.*, 1995).

A nivel histológico, en el hígado se describe la presencia de infiltrados de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, como consecuencia de trayectos hemorrágicos recientes (Martínez-Moreno *et al.*, 1999), y de fibrocitos, fibroblastos, linfocitos y monocitos, resultado de la migración de las formas inmaduras (Talukder *et al.*, 2010). En el ganado ovino apenas aparecen depósitos de colágeno (Dow *et al.*, 1968).

2.2.4.2 Forma subaguda

El curso subagudo comienza a desarrollarse a las 6-10 semanas post-infección con una dosis relativamente elevada de metacercarias, pero en un margen temporal más amplio. La sintomatología es muy similar al proceso agudo y se debe a los daños provocados por las formas juveniles en su emigración intraparenquimatosa (50%) y por las fasciolas adultas en los conductos biliares (50%) (Ferre & Rojo-Vázquez, 1994; Ferre-Pérez, 1994). Pueden ocurrir episodios mortales -también característicos de otoño e invierno-, tras presentar signos de letargia, emaciación, indiferencia, palidez en las mucosas y dolor abdominal entre 1 y 2 semanas previas (Rojo-Vázquez *et al.*,

2012). En una proporción de los animales puede haber ascitis y edema submandibular (“papo”). En esta forma clínica, la anemia suele ser de tipo hipocrómico y macrocítico, con presencia de reticulocitos (Reid *et al.*, 1970), y se acompaña de hiperproteinemia primaria (aumento de inmunoglobulinas como respuesta antigénica) e hipoproteinemia secundaria (disminución de la albúmina). Asimismo, la elevación de los niveles séricos de las enzimas γ -glutamyl transferasa (GGT) y glutamato deshidrogenasa (GLDH) indica daños en los canalículos biliares (Sykes *et al.*, 1980; Massoud *et al.*, 2001) y en el parénquima hepático (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), respectivamente.

Ya en esta fase, los trayectos blanquecino-amarillentos de la superficie diafragmática aumentan de tamaño y se observan rojizos debido a la mayor cantidad de sangre que hay en su interior (Sinclair, 1967; Rushton & Murray, 1977; Mendes, 2010). Además, los trayectos formados por las fasciolas en su fase de emigración contienen eosinófilos rodeados de células gigantes y una capa externa de linfocitos y células plasmáticas. Si estos trayectos son antiguos, se evidencia una reabsorción de la zona central, observándose las células gigantes con un núcleo hipercromático y hemosiderina en su citoplasma, además de una reacción fibroblástica periférica y la presencia de agregados pseudofoliculares de linfocitos; en las áreas adyacentes a éstos será normal apreciar aislados de hepatocitos hiperplásicos (Sinclair, 1967; Dow *et al.*, 1968; Mendes, 2010).

2.2.4.3 Forma crónica

A diferencia de las otras dos formas clínicas anteriores, es la más frecuente y requiere una dosis infectante menor durante periodos de tiempo prolongados. Suele

presentarse a finales del invierno y principios de la primavera-verano, a partir de unos 4 o 5 meses post-infección (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Las típicas manifestaciones abarcan desde palidez de las mucosas debida a la anemia hemorrágica crónica, hasta ascitis, emaciación, depresión y edemas, cuya causa se debe a la presencia de fasciolas adultas en los canalículos biliares y la resultante hipoalbuminemia. La anemia se caracteriza por tener idénticas características a la de la forma subaguda e ir asociada también a hipoalbuminemia, aunque el valor del hematocrito puede ser incluso menor aquí, entre el 11 y el 19% (Ferre & Rojo-Vázquez, 1994; Ferre-Pérez, 1994).

Macroscópicamente, se pueden observar adherencias entre el hígado y otros órganos adyacentes. Las áreas implicadas presentan una zona central necrótica rodeada por tejido de granulación, linfocitos, plasmocitos y eosinófilos. A medida que avanza el curso crónico, la acción de los fibroblastos favorece la cicatrización de las lesiones, completándose y apareciendo el tejido fibroso (Dow *et al.*, 1968; Rushton & Murray, 1977; Mendes, 2010). Las fasciolas que no hayan conseguido alcanzar los canalículos biliares pueden permanecer enquistadas en el parénquima hepático rodeadas de macrófagos, eosinófilos y células gigantes multinucleadas; estos quistes se encuentran demarcados por una cápsula de tejido conjuntivo y pueden originar quistes caseosos que suelen mineralizarse o ser invadidos por tejido fibroso (Jubb *et al.*, 1992; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). Por otro lado, si las fasciolas han accedido finalmente a los canalículos biliares, la colangitis y colangiectasia será evidenciable al hacer prominencia sobre la cara visceral, al igual que la fibrosis periportal con infiltrado leucocitario que ocasionará un aspecto pseudolobulillar a la superficie del hígado (Meeusen *et al.*, 1995).

Por otra parte, durante el curso de la fasciolosis, los ganglios linfáticos hepáticos se aprecian aumentados de tamaño por la hiperplasia de los folículos linfoides y los cordones medulares (Martínez-Pérez *et al.*, 2013), así como por focos hemorrágicos presentes en la médula, donde también se pueden encontrar macrófagos con hemosiderina y eosinófilos (Pérez *et al.*, 1999, 2002).

Junto con el curso subagudo, la importancia de la forma crónica radica en las pérdidas productivas y la morbilidad de la enfermedad, conllevando decomisos en el matadero, utilización de antihelmínticos y otros gastos asociados (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

2.2.5 Métodos y técnicas de diagnóstico

La clasificación de los métodos de diagnóstico de la fasciolosis – basada tradicionalmente en la clínica, en el examen *post-mortem* y en la utilización de técnicas específicas (biopatológicas, parasitológicas e inmunológicas) – puede hacerse también en función de si las pruebas determinan *in situ* la presencia del parásito (directas) o si evalúan reacciones que éste pudiera producir sobre el hospedador definitivo (indirectas).

2.2.5.1 Directas

a) Diagnóstico clínico y por imagen

La observación de los signos en cada una de las formas clínicas (aguda, subaguda y crónica) de la fasciolosis es indispensable para realizar una correcta anamnesis del proceso patológico. Se han descrito con anterioridad signos como la palidez de las

mucosas, la ictericia, la letargia y marginación del individuo respecto del rebaño, la depresión, la disminución del apetito y de la condición corporal, el posible edema submandibular, la ascitis, el dolor a la palpación abdominal, la debilidad general, etc. También hay que considerar la época de aparición de tales signos, puesto que este hecho podrá ayudar a delimitar el curso clínico (Rojo-Vázquez et al., 2012).

En la actualidad, las técnicas no invasivas basadas en el diagnóstico por imagen, principalmente la ecografía, están adquiriendo una especial relevancia para la determinación de las lesiones hepáticas y del propio parásito (Richter *et al.*, 1999). Entre otras, también se encuentran la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear (Gonzalo-Orden *et al.*, 2003).

b) Coprología

El análisis coprológico se enmarca dentro de las técnicas específicas parasitológicas. El propósito de la coprología es demostrar los huevos de *F. hepatica* a partir de una muestra de heces. Aunque la observación de los huevos es concluyente y se trata de un método de cribado relativamente rápido, sencillo y barato (O'Neill *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2002; Martínez-Valladares *et al.*, 2010a; Martínez-Pérez *et al.*, 2012), tiene el inconveniente de que, en las primoinfecciones, los análisis son positivos exclusivamente durante la patencia. En esa fase, ya se han producido lesiones hepáticas en el hospedador (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). La técnica tiene valor en los casos subagudos y crónicos (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Entre los procedimientos incluidos en el diagnóstico coprológico se citan la flotación y la sedimentación, siendo este último de elección por su mayor sensibilidad, por el uso de tinciones inocuas como el azul de metileno para diferenciar los huevos del

parásito entre el resto de sedimento. Además se evita utilizar soluciones de alta densidad (sulfato de zinc, yodomercuriato potásico), que alteran irreversiblemente la forma de los huevos de *F. hepatica* y dificultan su identificación (Boray, 1969; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Por otro lado, los resultados obtenidos por sedimentación pueden no ser directamente proporcionales a la intensidad de la infección y el índice de excreción fecal de huevos suele guardar relación con la edad del animal y la primoinfección (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). En su caso, recuentos fecales de 100-200 huevos por gramo de heces (hgh) indicarían una infección grave que requerirá el uso de fasciolicidas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

c) *Examen post-mortem (necropsia)*

Este procedimiento es fundamental para esclarecer la presencia de *F. hepatica* en el hospedador definitivo, en especial en los casos agudos de fasciolosis que hayan dado lugar a la muerte del animal. Las lesiones hepáticas y en otras localizaciones (ganglios linfáticos, páncreas, peritoneo,...) son muy variables dependiendo del individuo y de la dosis infectante, entre otros aspectos. Pueden observarse desde trayectos hemorrágicos hasta colangitis, flebitis de la vena portal, fibrosis, calcificación, formación de abscesos, cirrosis, hiperplasia hepática y de los ganglios linfáticos hepáticos.

Aunque se ha comprobado que la distribución del infiltrado inflamatorio es similar en animales primo y reinfectados, las lesiones suelen ser de mayor intensidad en los segundos (Pérez *et al.*, 2005).

El diagnóstico diferencial exige contrastar el curso agudo con la enterotoxemia, la pasteurelosis y otras septicemias, acidosis y envenenamientos. En cuanto a la forma crónica, hay que descartar infecciones por nematodos gastrointestinales, paratuberculosis, encefalopatía espongiforme (scrapie), o fallos nutricionales, deficiencias de cobalto y cobre, etc. (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

2.2.5.2 Indirectas

a) Actividad plasmática de enzimas hepáticas y otros parámetros sanguíneos

Las variaciones en los niveles de proteínas plasmáticas y de determinadas enzimas hepáticas, así como en el hematocrito, el número de eritrocitos o la hemoglobina, son muy útiles para confirmar la fasciolosis durante las primeras semanas de la infección (Rowlands & Clampitt, 1979). Como ya se ha mencionado a propósito de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, una elevación en los valores de la GLDH es indicadora de daños a nivel del parénquima hepático (infección aguda o subaguda) (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), mientras que un incremento en la enzima GGT sugiere el establecimiento del parásito en los canalículos biliares (infección subaguda o crónica) (Sykes *et al.*, 1980; Massoud *et al.*, 2001). También, los niveles de otras enzimas menos hepatoespecíficas como la AST y la alanina aminotransferasa (ALT), están incrementados en el plasma debido a la emigración de formas inmaduras a través del parénquima (Severin *et al.*, 2012) e indican necrosis hepática (Burke, 2002; Ferre *et al.*, 1994). Tales elevaciones plasmáticas van unidas al marcado descenso de la albúmina (inferior a 15 g/l) y aumento de globulinas (superior a 68 g/l) (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012), y a la presencia de anemia normo/macrocítica e hipocrómica, con un hematocrito inferior al 25%, con o sin reticulocitosis (Reid *et al.*, 1970).

b) Pruebas de funcionalidad hepática

La fasciolosis produce modificaciones en la funcionalidad hepática, lo que es evidenciable mediante una serie de procedimientos. Uno de ellos es la prueba de aclaramiento plasmático de la bromosulfoftaleína, cuya disminución en sus valores es sugestiva de fasciolosis aguda a partir de la 3ª semana post-infección (Boray, 1969) y crónica a partir de la 8ª semana post-infección (Tufenkji *et al.*, 1987). De manera similar, la prueba de aclaramiento plasmático de la antipirina, cuyos niveles se hallan reducidos en el curso subagudo-crónico a partir de la 4ª semana post-infección (Tufenkji *et al.*, 1988), coincidiendo con la presencia de fasciolas en los conductos biliares y el daño parenquimático debido a la migración (Ferre *et al.*, 1996).

c) Inmunodiagnóstico

Existen varios métodos serológicos para el diagnóstico de la fasciolosis, tales como la precipitación, la aglutinación, la inmunofluorescencia o la fijación del complemento (Van Tiggele & Over, 1976; Zimmerman *et al.*, 1982). En general, la técnica de elección en la actualidad es el enzimoimmunoensayo o ELISA indirecto utilizando antígenos de excreción-secreción para la detección de anticuerpos en suero sanguíneo (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). El test de ELISA tiene gran sensibilidad, especificidad, fiabilidad y reproducibilidad, pero su utilidad es mayor a nivel de rebaños infectados de manera natural antes que en el diagnóstico individual (Pfister, 1990).

Dentro de los protocolos de ELISA, la técnica de ELISA-sándwich -que podría también clasificarse dentro de las pruebas directas (Piñeiro Fraga, 2013)-, es capaz de detectar la presencia de los antígenos del parásito durante la prepatencia, en muestras de suero desde la 1ª semana post-infección (Duménigo *et al.*, 1999; Almazán

et al., 2001) y en heces desde la 4^a (Duménigo *et al.*, 1999; Almazán *et al.*, 2001; Martínez-Pérez *et al.*, 2012) o siguientes semanas post-infección (Espino *et al.*, 1997; Moustafa *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque con el ELISA indirecto se puede detectar la infección a partir de la 1^a (Arias *et al.*, 2006) o siguientes semanas post-infección (Santiago & Hillyer, 1988; Marín Gómez, 1992; Rodríguez-Osorio *et al.*, 1998; Reichel, 2002; Mezo *et al.*, 2007), su problemática radica en que los títulos de anticuerpos pueden mantenerse elevados durante meses una vez que ha concluido la infección y dar lugar a falsos positivos (Boulard *et al.*, 1985; Estuningsih *et al.*, 2004; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Por otro lado, con el ELISA indirecto pueden detectarse hasta un 10% de falsos negativos debido a la disminución de los niveles de anticuerpos al acceder el trematodo a los canalículos biliares y aislarse en cierta medida del sistema inmunitario del hospedador. Asimismo, recientemente se está utilizando este tipo de ELISA para detectar anticuerpos en leche (Molloy *et al.*, 2005; Opreescu *et al.*, 2010).

Por lo tanto, el ELISA-sándwich es un método eficaz para valorar la eficacia de los antihelmínticos tras la administración del tratamiento, si bien en estudios epidemiológicos de relevancia y amplitud muestral se recomienda el uso de ambos procedimientos (sándwich + indirecto) (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

Otros métodos inmunodiagnósticos muy específicos, aunque limitadamente sensibles (Kooshan *et al.*, 2010) son la inmunoelectrotransferencia (“Western blot”) para la detección y separación de proteínas antigénicas de *F. hepatica*, la inmunoelectroforesis (separación de proteínas específicas del parásito y reacción con anticuerpos concretos) y las técnicas de inmunofluorescencia.

d) Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular se basan en la identificación de la presencia del ADN o ARN del agente infeccioso o parasitario gracias a la amplificación del mismo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos. La detección de la infección por *F. hepatica* en muestras de animales infectados podría consistir en un procedimiento relativamente rápido, con un gran margen de sensibilidad y especificidad. La detección del ADN del parásito en muestras fecales puede proceder de restos del tegumento de las fasciolas que liberan al medio durante la fase migratoria del mismo, es decir, durante la prepatencia de la enfermedad (Martínez-Pérez *et al.*, 2012).

En infecciones por helmintos como *Echinococcus multilocularis* en zorros (Bretagne *et al.*, 1993; Al-Sabi *et al.*, 2007), *E. granulosus* en perros (Abbasi *et al.*, 2003) y *F. gigantica* en búfalos (Ai *et al.*, 2010), esta técnica ha sido utilizada para el diagnóstico de las infecciones a partir de muestras fecales. Para ello, estos autores han amplificado diferentes genes de los parásitos, como el “ARN nuclear pequeño U1” (U1 snRNA) para detectar *E. multilocularis* (Bretagne *et al.*, 1993), la “subunidad 12S del ARN ribosomal de la matriz mitocondrial” (mt 12S rRNA) para *E. granulosus* (Al-Sabi *et al.*, 2007), o el “espaciador transcrito interno 2” (ITS 2) del ADN ribosomal en *F. gigantica* (Ai *et al.*, 2010). En la presente Tesis Doctoral se pretendió identificar un fragmento mitocondrial de 423 pares de bases (pb) – que amplificaba parte de los genes que codificaban para la enzima “citocromo C oxidasa” I (Cox I) y para la “subunidad grande del ARN ribosomal” (Lr RNA) – a partir de heces de ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*.

2.2.6 Estrategias para el control

La eficacia en el control y prevención se centra en la aplicación integrada de varias medidas con el objetivo de reducir la población de limneas y alterar sus hábitats, impedir los brotes por *F. hepatica* en los hospedadores definitivos y evitar el fenómeno de resistencias (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

2.2.6.1 Medidas de control sobre el hospedador definitivo y su hábitat

a) Quimioprofilaxis

Aunque se pueden poner en práctica diversas medidas de control, la utilización de fármacos con acción fasciolicida es el método de elección. Las estrategias terapéuticas frente a la fasciolosis exigen considerar la presencia de formas juveniles y adultas en el hospedador definitivo, con el fin de restaurar la función hepática (Ferre-Pérez, 1994). Los fasciolicidas clásicamente utilizados pueden agruparse en ocho familias, que son: hidrocarburos halogenados (tetracloruro de carbono, hexacloroetano); derivados bifenólicos (hexaclorofeno, bitionol sulfóxido); derivados nitrofenólicos (nitroxynil, niclofolán); salicilanilidas (oxiclozanida, rafoxanida, brotianida, closantel); derivados bianilinos (diamfenetida); compuestos sulfamidados (clorsulón); derivados de la nitrofenilguanidina (netobimin); y bencimidazol-carbamatos (albendazol, triclabendazol) (Roberson, 1984; Losson, 1988), siendo estos últimos los más utilizados (Martínez-Valladares *et al.*, 2014) (Tabla I).

Aunque la mayor parte de los tratamientos antihelmínticos son efectivos frente a fasciolas adultas, el uso de fasciolicidas con diana sobre formas inmaduras implica una importante reducción en la terapéutica anual (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). En este

sentido, mientras el clorsulón y el albendazol tienen una gran eficacia frente a formas maduras, su acción sobre juveniles es moderada y leve, respectivamente (Boray, 1986; Zimmerman *et al.*, 1986; Onar, 1990; Rehbein & Visser, 1999) (Tabla I). De ahí se desprende la gran utilización del triclabendazol, efectivo tanto frente a fasciolas maduras como inmaduras (Boray *et al.*, 1983; Fairweather, 2005) (Tabla I), con un amplio margen de seguridad y tolerancia (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Tabla I. Fasciolicidas y nivel de eficacia (Fairweather & Boray, 1999)

Edad del parásito en semanas														
Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bitionol, hexaclorofeno										50-70%		80-99%		
Oxyclozanida, niclofolán														
Albendazol														
Clorsulón + ivermectina (inyec.)														
Clorsulón (oral)								90-99%						
Nitroxynil, Closantel							50-90%			91-99%				
Rafoxanida				50-90%			91-99%							
Triclabendazol		90-99%		99-100%										
Diamfenetida	100-91%						80-50%							

Otros estudios demuestran que el compuesto “alfa” bencimidazólico (Ibarra *et al.*, 1997) y algunos derivados de la artemisina podrían ser utilizados en el control de la fasciolosis, al igual que las oxonidas, que muestran gran eficacia en modelos experimentales como en la rata (Favennec *et al.*, 2003; Keiser *et al.*, 2006, 2009; Keiser & Utzinger, 2007; Duthaler, 2010, 2012). En el mismo sentido actuarían la mirra (Haridy *et al.*, 2003; Soliman *et al.*, 2004) y otros antimaláricos (Tang *et al.*, 2004).

La quimioprofilaxis para el control de la fasciolosis es fundamental, aunque su uso inadecuado, unido a la subdosificación de los animales y a una rápida reinfección, ha favorecido el desarrollo de resistencias (Prichard, 1994). Para evaluar el fenómeno de la resistencia antihelmíntica hay que valorar la reducción de la eliminación de huevos de *F. hepatica* tras la administración de un tratamiento concreto, comparado con otro grupo testigo sin desparasitar o con los datos de excreción fecal de los mismos animales antes de iniciar la terapéutica (Moll *et al.*, 2000; Gaasenbeek *et al.*, 2001; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001). Existirá resistencia antihelmíntica si se demuestra una reducción inferior a la esperada para el fármaco utilizado, indicándose con un porcentaje. El estudio de las resistencias a los fasciolicidas exige considerar a los hospedadores intermediario y definitivo, la estrategia de control frente al parásito y el medio ambiente (Jackson & Coop, 2000).

El antihelmíntico triclabendazol ha sido utilizado de forma abusiva desde su comercialización, lo que ha favorecido el desarrollo de poblaciones parasitarias resistentes al mismo en múltiples áreas (Fairweather, 2005; 2009; Keiser & Utzinger, 2007), como en Australia (Overend & Bowen, 1995), Irlanda (O'Brien, 1998; Lane, 1998), Escocia (Mitchell *et al.*, 1998), Holanda (Moll *et al.*, 2000; Gaasenbeek *et al.*, 2001) y España (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2001; 2006). Por tanto, es necesario desarrollar nuevas fórmulas a partir de los fármacos fasciolicidas preexistentes (Martínez-Valladares *et al.*, 2010a, 2014).

En este sentido, la combinación y mezcla de antihelmínticos puede ser una alternativa al fenómeno de la resistencia antihelmíntica, en especial si los fármacos tienen diferentes mecanismos de acción (Anderson *et al.*, 1988). Además, el sinergismo entre los antihelmínticos podría suponer una reducción en su dosificación

y concentración final, unida a una eficacia superior y menores efectos secundarios y residuos en los tejidos del hospedador y en el medio ambiente (Meaney *et al.*, 2006). Un ejemplo es la combinación de albendazol y clorsulón, cuya eficacia puede llegar al 95% frente a fasciolas inmaduras y maduras en ovinos infectados con cepas resistentes a ambos fármacos de *F. hepatica* (Martínez-Valladares *et al.*, 2014).

Por consiguiente, es indispensable el uso estratégico de fasciolicidas, con el objetivo de impedir la contaminación de los pastos con huevos de *F. hepatica* y evitar el riesgo epidemiológico, al focalizar su atención sobre las formas juveniles (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b). La elección del fármaco, aparte de las consideraciones económicas, debe basarse en el conocimiento de su eficacia frente a las diferentes fases del desarrollo de *F. hepatica* y en la epidemiología local que nos permite conocer cuándo es mayor el riesgo de infección (Ferre-Pérez, 1994).

b) *Inmunoprofilaxis*

La problemática derivada de los residuos químicos y su presencia y persistencia en los alimentos y en el medio ambiente, así como la aparición del fenómeno de la resistencia antihelmíntica, han supuesto el creciente estudio de alternativas a los fármacos antihelmínticos ya conocidos (Mulcahy & Dalton, 2001).

Diversas sustancias con propiedades inmunoestimulantes se han considerado dentro de la estrategia de control frente a *F. hepatica* (Dalton & Mulcahy, 2001) con la meta de alcanzar una vacuna efectiva. Este campo se encuentra en constante evolución gracias a la identificación de nuevos antígenos protectores, a la aplicación de nuevas técnicas basadas en la formación de nanopartículas inmunoestimulantes así como en

la identificación de nuevos inmunomoduladores y formulaciones de adyuvantes (Martínez-Fernández *et al.*, 2004).

Sobre el sistema inmunitario pueden actuar específicamente las vacunas o inespecíficamente los inmunomoduladores (Masihi & Lange, 1988). La protección inmunitaria es capaz de incrementar la eficacia en la lucha contra el trematodo.

Entre los múltiples estudios centrados en antígenos protectores para el desarrollo de una vacuna idónea contra la fasciolosis, se incluyen los basados en las enzimas glutatión-S-transferasas –con valores de reducción del 78% en la carga parasitaria final- (Sexton *et al.*, 1990; Morrison *et al.*, 1996) o las proteasas extracelulares catepsina L/B y cisteína-peptidasa –con niveles de protección de entre el 60-81% e inducción de títulos elevados de IgG y de una respuesta inmunitaria de tipo Th1- (Dalton *et al.*, 1996; Piacenza *et al.*, 1999; Mulcahy & Dalton, 2001). Además, también existen las proteínas semejantes a las transportadoras de ácidos grasos de cadena larga –con una reducción a partir del 38% en la carga parasitaria final e inducción de una respuesta de perfil Th1- (Muro *et al.*, 1997; López-Abán *et al.*, 1999, 2007, 2008, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2004a, 2004b), y las leucina amino-peptidasas –cuya protección frente a la fasciolosis alcanza el 89% e induce altos títulos de IgG y una reducción del daño tisular hepático- (Piacenza *et al.*, 1999).

Por otro lado, también destacan algunas experiencias donde se utilizaron células de lavado peritoneal (monocitos/macrófagos, eosinófilos, linfocitos y neutrófilos) junto con suero de ovino “Indonesio de cola fina” (ITT) infectado con *F. gigantica*, observándose una reducción del 40% en la viabilidad de las formas juveniles (Piedrafita *et al.*, 2007).

Asimismo, existe la alternativa de la utilización de inmunomoduladores para modificar los mecanismos de defensa del hospedador y controlar procesos parasitarios, así como víricos, bacterianos o fúngicos. Pueden ser de diferentes tipos, desde naturales o sintéticos, hasta microbianos o citoquinas (Masihi, 2000). La administración conjunta de estos inmunomoduladores con los antígenos antes citados puede potenciar aún más la inmunogenicidad de las vacunas, estimulando la inmunidad protectora a través de la producción de anticuerpos y de linfocitos Th (Coffman *et al.*, 2010).

En la presente Tesis Doctoral se evaluó el efecto de la administración de un lipopolisacárido (LPS) obtenido de *Ochrobactrum intermedium* frente a la infección por *F. hepatica* en ovejas. Este LPS es un inmunomodulador que induce la producción de citoquinas por parte de los monocitos y macrófagos (Rietschel & Brade, 1992). Estudios anteriores basados en el uso del LPS de *Escherichia coli* frente a infecciones experimentales por nematodos gastrointestinales en ovejas habían tenido éxito en el control de la enfermedad (Abel *et al.*, 2009), al igual que con el LPS de *E. coli* K12 en ratones infectados con *E. coli* (Vuopio-Varkila *et al.*, 1988) y con *Francisella tularensis* (Dreisbach *et al.*, 2000).

c) Inmunidad y nutrición

Este concepto engloba el estudio de las interacciones entre la nutrición y la inmunidad, abarcando esta última el sistema inmunitario, las infecciones, la inflamación y los daños tisulares (Marcos-Sánchez, 2012). En condiciones de malnutrición, la morbilidad es mayor para todos aquellos desórdenes asociados con el sistema inmunitario (Carroll & Forsberg, 2007). No hay que olvidar otros factores

que influyen sobre la interacción entre la nutrición y la inmunidad, como son la actividad física y el estrés (Marcos *et al.*, 2003).

Las parasitosis inducen una relativa deficiencia proteica cuyos signos clínicos se pueden atenuar con dietas ricas en proteínas (Coop & Holmes, 1996), que puede beneficiar la resiliencia y la resistencia frente a los helmintos (Martínez-Valladares *et al.*, 2005) e incrementar el apetito de los animales (Orellana *et al.*, 1999), como los suplementos nutricionales basados en la harina de pescado (Donaldson *et al.*, 1997).

En ovinos con fasciolosis alimentados con una dieta hipoproteica, la anemia, la hipoalbuminemia y emaciación son de aparición precoz, al igual que los episodios mortales (Boray, 1969). Se sabe que una dieta rica en proteína no degradable aminora las consecuencias de las helmintosis (Van Houtert & Sykes, 1996). Los parámetros sanguíneos como el hematocrito, las proteínas séricas totales o la concentración de albúmina se ven menos alterados en animales alimentados con mayores cantidades de proteína metabolizable (Dargie *et al.*, 1968; Coop & Holmes, 1996). Estos hechos son más evidentes en animales jóvenes (Fox, 1997).

Se ha visto que diversas sustancias presentes en determinados alimentos pueden tener propiedades inmunomoduladoras, como los ácidos omega-3, cuyo consumo supone la supresión de la respuesta Th1 y la polarización consecuente hacia una de tipo Th2 (Zhang *et al.*, 2005b; Monk *et al.*, 2012). Asimismo, la administración de alimentos ricos en antioxidantes, como la vitamina E, es esencial para evitar los daños derivados del estrés oxidativo (Kolodziejczyk *et al.*, 2006; Eid *et al.*, 2008; Gabrashanska *et al.*, 2008).

En este trabajo de Tesis Doctoral se determinó el efecto de la suplementación en la dieta con aceite de linaza y vitamina E sobre la fasciolosis experimental ovina y sobre el tipo de respuesta inmunitaria generada en el hospedador.

d) Actuación sobre el hábitat de los hospedadores definitivos

La contaminación de los pastos se verá reducida si se llevan a cabo medidas frente a la presencia de limneas, así como a nivel del rebaño. La teórica erradicación de la enfermedad sería posible en un sistema ecológico acotado, con tratamientos a lo largo del periodo de prepatencia de la infección y evitando el contacto con las limneas y otros reservorios de la enfermedad. Además, el programa de rotación de pastos es esencial para la reducción del riesgo de contagio (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

En este sentido, el tratamiento quimioprofiláctico en el hospedador definitivo durante otoño, invierno y principio de la primavera supone una importante reducción en la eliminación de huevos de *F. hepatica* y evita la transmisión de la parasitosis en gran medida, contribuyendo a obtener valores de prevalencia ínfimos tras años de iniciado el procedimiento (Fawcett, 1990).

La frecuencia de los tratamientos depende del espectro de actividad del antiparasitario utilizado. Una pauta a seguir podría ser: a) desparasitar ovejas adultas al final de la primavera-inicio del verano con un antihelmíntico eficaz frente a adultos; b) desparasitar todo el rebaño en otoño con un fasciolicida frente a formas inmaduras; y c) desparasitar todo el rebaño en invierno con antihelmínticos activos contra juveniles y adultos. Además, pueden necesitarse tratamientos cada tres semanas en determinadas áreas y épocas de riesgo (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

En definitiva, la fasciolosis, por su amplia distribución entre rumiantes domésticos y otras especies silvestres, es difícilmente erradicable, aunque puede controlarse mediante la combinación de tratamientos antihelmínticos, medidas higiénicas y regulación de pastos (Cordero del Campillo, 1966; Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999), y con la nutrición, la genética y la inmunidad del hospedador.

2.2.6.2 Medidas de control sobre el hospedador intermediario y su hábitat

La eliminación del hospedador intermediario (*G. truncatula*) supondría la teórica erradicación de la fasciolosis. Mediante el uso de diferentes productos químicos se puede reducir la población de limneas, sin olvidar el impacto ambiental que esta medida supone por el potencial biótico de los caracoles y los costes humano y material (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). En caso de elegir esta opción preventiva, se recomienda comenzar a administrar los molusquicidas durante la primavera, de manera que se facilite el contacto de los molusquicidas con las limneas y éstas mueran antes de poner huevos. Un segundo tratamiento en verano permitiría la destrucción de los caracoles, ya parasitados, previamente a la formación de las cercarias (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b). Los molusquicidas más utilizados son la niclosamida, el pentaclorofenato sódico, el sulfato de cobre, la cianamida cálcica y la N-tritilmorfolina, así como fitoterápicos cuyos principios activos actúan sobre los estadios intermedios de *F. hepatica* dentro de las limneas, como el ácido cítrico, el ácido ferúlico o las umbelíferas (Sunita & Singh, 2011).

Por otro lado, las áreas de localización del hospedador intermediario pueden delimitarse mediante el vallado, impidiendo así el libre acceso y el pasto de los posibles hospedadores definitivos, en especial durante los periodos de alto riesgo

(Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). Asimismo, la eficacia en el uso de molusquicidas depende de la actuación en este sentido y de las características intrínsecas del terreno (Ferre-Pérez, 1994). El método más eficaz sobre la modificación del hábitat de los caracoles, pese a que requiere una importante financiación a largo plazo, es el drenaje de las zonas encharcadas, localización predilecta de éstos. En su lugar, la construcción de bebederos en sustitución de las charcas sería lo deseable (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b).

CAPÍTULO II

Objetivos

*“Cuando pudieres trabajar, no lo dejes,
aunque no te den lo que mereces”*

(Refranero Nacional)

En el presente proyecto de Tesis Doctoral se han pretendido desarrollar, aplicar y evaluar nuevos métodos de diagnóstico y control frente a la fasciolosis ovina.

Los objetivos parciales fueron los siguientes:

- 1) Mejorar el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* mediante el desarrollo y puesta a punto de técnicas de biología molecular basadas en la “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR).
- 2) Comparar la sensibilidad de tres métodos de diagnóstico de la fasciolosis - coprología por sedimentación, “Enzimoimmunoanálisis” (ELISA)-sándwich y PCR- a partir de muestras fecales de ovejas infectadas por *F. hepatica* de manera natural y experimental.
- 3) Buscar métodos alternativos para el control de la fasciolosis mediante la modulación de la respuesta inmunitaria, utilizando las siguientes estrategias:
 - Administración de un inmunomodulador constituido por el LPS de *O. intermedium* en ovinos infectados de forma experimental con *F. hepatica*. Para ello se determinó el efecto del inmunomodulador sobre la acción patógena del parásito, así como sobre la respuesta inmunitaria del hospedador a la infección.
 - Suplementación de la dieta con aceite de linaza y vitamina E en ovinos infectados de forma experimental con *F. hepatica*. Para ello se determinó el efecto de las dos dietas sobre la acción patógena del parásito, al igual que sobre la respuesta inmunitaria del hospedador a la infección.

CAPÍTULO III

Publicaciones

“Oveja que anda,

bocado que halla”

(Refranero Nacional)

**COMPARISON OF THREE DIFFERENT TECHNIQUES TO
DIAGNOSE *Fasciola hepatica* INFECTION IN
EXPERIMENTALLY AND NATURALLY INFECTED SHEEP**

J.M. Martínez-Pérez, D. Robles-Pérez, F.A. Rojo-Vázquez* & M. Martínez-Valladares.

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología y Enfermedades Parasitarias).

Facultad de Veterinaria de León / Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

Veterinary Parasitology 2012; 190 (1-2): 80-86.

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep

J.M. Martínez-Pérez^a, D. Robles-Pérez^a, F.A. Rojo-Vázquez^{a,b,*}, M. Martínez-Valladares^b

^a Faculty of Veterinary Medicine, University of León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain

^b Instituto de Ganadería de Montaña. CSIC-ULE, Finca de Marzanas, 24346 Grulleros, León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2012

Received in revised form 1 June 2012

Accepted 5 June 2012

Keywords:

Fasciola hepatica

Faeces

Diagnosis

Nested-PCR

Sandwich-ELISA

Sheep

ABSTRACT

The aim of this study was to compare three different techniques for the early diagnosis of the infection by *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep. The experimental group consisted of 7 sheep infected with 200 metacercariae; faecal samples were taken weekly until 12 week post-infection (wpi). Under natural conditions, 45 individual faecal samples and 2 pools of faeces were collected from three different flocks with a history of *F. hepatica* infection. The results obtained by a coprological method were compared with a commercial immunoassay and with two PCR assays in faecal samples. Faecal eggs were detected by 9 wpi in experimental infection. On the other hand, only 24 out of 45 sheep were positive in naturally infected flocks. By means of a sandwich-ELISA kit, the infection was first detected by 4 wpi in the 57.1% experimentally infected sheep and this percentage reached 100% by 8 wpi. All naturally infected animals were positive with this method. Regarding PCR, a specific 423 bp fragment of mitochondrial DNA was amplified in faecal samples. The *F. hepatica* infection was detected from 3 wpi with a standard PCR, and from 2 wpi with a nested-PCR. Only 37 sheep out of 45 were positive by the standard PCR although the infection was diagnosed in all animals by the nested-PCR. In conclusion, the sensitivity of the nested-PCR described in our study is higher than the detection of eggs in faeces as well as the commercial immunoassay. Moreover, no cross reactions were described with gastrointestinal nematodes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciola hepatica – the common liver fluke – causes an important disease from both the economical and medical point of view. The number of animals at risk, mainly ruminants, has been estimated by several authors in 600–700 million (Ramajo et al., 2001; Mas-Coma et al., 2009). The infection has a worldwide distribution. Moreover, in some regions *F. hepatica* is also an important human pathogen (Haroun and Hillyer, 1986) and is now considered

as an emerging and re-emerging parasitic disease in many countries as a consequence of human factors (Mas-Coma et al., 2005).

In small ruminants, fasciolosis causes a reduction of the growth, production of meat, milk or wool and provokes effects in late pregnancy and in the animal health status, as well as a high morbidity and mortality (Cordero del Campillo and Rojo-Vázquez, 1999). Also of economical relevance is the liver condemnation in infected sheep and the costs of anthelmintic drugs. The infection is present in areas with specific climatic conditions, suitable for the life cycle of the intermediate host snail. Although *Galba truncatula* has a worldwide distribution (Urquhart et al., 1996), *F. hepatica* has been also detected in high lands of tropical (Soulsby, 1986) and subtropical regions (Krämer and Schnieder, 1998; Mas-Coma et al., 2005). Most cases

* Corresponding author at: Faculty of Veterinary Medicine, University of León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain. Tel.: +34 987291338; fax: +34 987291304.

E-mail address: francisco.rojo@unileon.es (F.A. Rojo-Vázquez).

of fasciolosis in ruminants appear during the late winter and spring in many areas in Europe, North America and Northern Africa. However, this picture is changing due to different factors such as the climate change (Mas-Coma et al., 2005; Kenyon et al., 2009). In Spain, according to faecal examinations, about 30% of sheep flocks in the North-West (NW) are infected and have prevalence values higher than 50% by immunodiagnostic assays (García-Pérez and Juste-Jordán, 1987; Ferre et al., 1995).

The diagnosis of fasciolosis is confirmed by the observation of parasite eggs in the faeces of infected animals (Boray, 1985; Anderson et al., 1999), but due to the long pre-patent period in ovines, coprological methods are only sensitive from 8 weeks post-infection (wpi) onwards (Zimmerman et al., 1982; Rodríguez-Pérez and Hillyer, 1995; O'Neill et al., 2000). Due to these drawbacks, the development of more accurate diagnostic methods for the early detection of the infection is desirable.

F. hepatica antigens in faeces are indicative of a current infection (Hillyer, 1999) and last for the parasite lifespan (Mezo et al., 2004). Sandwich-ELISA is a rapid, easy and sensitive test to detect coproantigens earlier than the liver fluke eggs in faeces (Moustafa et al., 1998). The detection of *F. hepatica* antigens in faeces has some advantages, one of them being that only actively metabolizing flukes are detected. The detection of antigens rather than antibodies is considered the best procedure for evaluating the status of infection (Endah Estuningsih et al., 2004). Moreover, immunological tests were used to assess the effectiveness of chemotherapy in *F. hepatica* infections (Boulard et al., 1995; Martínez-Valladares et al., 2010b). Other methods such as immunoelectrophoresis and counter-immunoelectrophoresis, although are very specific, have limited sensitivity (Kooshan et al., 2010). On the other hand, with more specific methods, such as molecular techniques, it has been possible to confirm the infection due to other helminth parasites; i.e. *Echinococcus* spp., *Taenia* spp., *Toxocara* spp. and *Uncinaria* spp. (Bretagne et al., 1993; Dinkel et al., 1998; Mathis and Deplazes, 2006) by means of a PCR assay in faeces. With these molecular assays, the diagnosis of the infection is more accurately confirmed since only the parasite is detected.

Under this situation there is a need for new methods to diagnose the liver fluke infection. In animals, the disease has been diagnosed by ultrasonographic examination (Gonzalo-Orden et al., 2003) although its cost is a drawback. According to all these limitations, in the current study a PCR method has been developed to be compared with faecal analysis by sedimentation and coproantigen detection with a commercial kit. We report here two PCR-based techniques to detect *F. hepatica* from faecal samples in experimental and natural infections in sheep because, to our knowledge, there are no published reports of molecular diagnosis for the common liver fluke in sheep.

2. Materials and methods

2.1. Animal sampling

The experimental animals were 7 female Merino sheep aged 5 months, weighting 35–40 kg and without clinical

signs of parasitic or infectious diseases. They were purchased from areas in León (NW Spain) classified as low risk for *F. hepatica*. Before starting the assay, the absence of fasciolosis was confirmed by coprological and coproantigen (BIO K 201) tests. Sheep were experimentally infected with 200 *F. hepatica* metacercariae in gelatin capsules, administered using a dosing gun. The metacercariae were obtained from Ridgeway Research Ltd., Co. (Lydney, UK) and were susceptible to anthelmintics according to the laboratory. Faecal samples were directly collected from the rectum weekly from the day of infection to 12 wpi. The study was carried out at the animal facilities of the Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) at León (NW of Spain). All animals were handled in the same conditions in accordance with animal ethics guidelines.

The naturally infected animals were randomly selected from three flocks with a previously known history of fasciolosis. Several pools of faeces from 60 to 80 sheep were analysed with the aim to confirm the presence of *F. hepatica* in the different flocks. After that, in the first flock (F1), located in Villamandos (NW of Spain), 27 individual faecal samples were analysed. To complete the study, 18 sheep of a second flock (F2), located in Santillán de la Vega (NW of Spain), were tested and, in a third flock (F3), situated in the same locality as F2, two pools of faeces from 28 sheep each were analysed. All these animals were managed in a similar way as the rest of the flock.

2.2. Faecal analysis

The number of *F. hepatica* eggs was calculated by a standard sedimentation method using a McMaster chamber as described by Thienpont et al. (1986). The mean number of eggs per gram of faeces (epg) in animals experimentally challenged was calculated weekly by the arithmetical mean. The sensitivity of the technique is 15 epg.

2.3. Sandwich-ELISA

With the aim to measure the coproantigen in all faecal samples, 0.5 g of fresh faeces were homogenized using a mortar and pestle and added to 2 ml of PBS-Tween 20 1%. Faecal eluates were stored overnight at 4 °C and then centrifuged for 10 min at 1000 × g. The supernatants were collected and stored frozen at –20 °C until their analysis. The specifications indicated by the 96-well polyclonal Antibody-based (pAb) sandwich ELISA plates "Bio-X bovine *F. hepatica* antigenic ELISA kit" were followed. Only samples with optical density (OD) values higher than the cut-off value of 0.150 at 450 nm were considered positives. All samples were analysed in duplicate.

2.4. PCR in faeces

From the experimentally infected animals, a pool of faeces was taken weekly and DNA extraction was carried out from 2 g of each pool. Regarding natural infections, DNA extraction was carried out from 2 g of 45 individual samples (flocks F1 and F2) and from two pools with 2 g of faeces each (flock F3). Recommendations of the manufacturer "SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit" (Biotools B&M

Fig. 1. Nucleotide sequence comparison between *F. hepatica* mitochondrial DNA fragment (NC.002546.1) and the 423 bp PCR product (FhCox).

Labs.) were followed. The final product contained DNA was resuspended into 60 µl of buffer BBE and stored at -20°C until use. All samples were tested in duplicate.

2.4.1. Standard PCR

PCR reaction was based on 20 µl containing 1.5 µM buffer + MgCl_2 , 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 0.4 µl Taq polymerase, 0.5 µM specific primers (Cox1.F: 5'-GTTGGCATATTGCGGCTTAG-3' and Cox1.R: 5'-AGGGATCTGCACCTCAACTC-3') and 1 µl DNA diluted ten times. Specific PCR primers were designed based on a *F. hepatica* mitochondrial DNA (mtDNA) sequence (NC.002546.1) in order to amplify the cytochrome C oxidase 1 gene (Cox1). The thermocycler used (Biorad) was set to give 2 min at 95°C , followed by 40 cycles each of 30 s at 95°C , 30 s at 63°C and 45 s at 72°C , and finally an extension step at 72°C for 10 min.

Two negative controls of uninfected sheep and DNA from faeces of 8 sheep experimentally infected by gastro intestinal nematodes (GIN), such as *Trichostrongylus* spp. ($n=3$), *Teladorsagia circumcincta* ($n=3$) and *Haemonchus contortus* ($n=2$), were included to determine the specificity of the technique. The amplification products were analysed by electrophoresis in a 1.5% agarose TBE gel and stained with Gel Red. Then, the bands were excised, purified and sent to the Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) of the University of León to be sequenced. The PCR product identified showed almost 100% identity with the corresponding *F. hepatica* mtDNA fragment with the exception of the 8840 base-pair position (Fig. 1).

2.4.2. Nested-PCR

The first PCR started with 20 µl containing 1.5 µM buffer + MgCl_2 , 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 0.4 µl Taq polymerase, 0.5 µM general primers (Cox2.F: 5'-TNTGTTTTTKCKKATGCAYTA-3' and LrRNA.R: 5'-TCYYRGGGTCTTCCGTC-3') and 1 µl DNA. This pair of primers was previously described by Martínez-Ibeas et al. (2011). The thermocycler used (Biorad) was set to give 2 min at 95°C , followed by 40 cycles each of 30 s at 95°C , 30 s at 63°C and 90 s at 72°C , and finally an extension step at 72°C for 10 min.

The subsequent PCR was done in the same way as the standard PCR but with 1 µl of the resulting product of the previous PCR, diluted ten times, likewise with GIN and the

negative controls. The amplification products were analysed by electrophoresis in a similar way as point Section 2.4.1.

2.5. Statistical analysis

The values of faecal epg and OD data were expressed as arithmetic mean with standard deviation (SD). The data were analysed using the statistical computer package for social science (SPSS). Statistical relationship between OD and faecal egg counts from natural infections was obtained with the non-parametric Spearman's correlation coefficient. Differences below the 5% level ($P < 0.05$) were considered to be significant.

3. Results

3.1. Faecal egg count

Faecal analysis was performed weekly in the experimentally infected sheep from 6 wpi to 12 wpi. The first faecal detection of eggs started on 9 wpi. The arithmetic means ($\pm$ SD) of the egg output were 15 epg (± 24.05), 15 epg (± 32.07), 99.4 epg (± 138.8) and 183.7 epg (± 117.5) on weeks 9, 10, 11 and 12 post-infection, respectively.

The results of the naturally infected animals are shown in Table 1. More than a half of animals (24/45) from flocks F1 and F2 were positive by sedimentation: 6 out of 27 in F1 and all of the animals (18/18) in F2. Regarding F3, samples were evaluated individually (data not shown) and then two pools of this flock were analysed getting the following results: 51.95 and 24.75 epg each.

Table 1

Number of naturally infected sheep per flock (F1 and F2) according to their eggs per gram (epg) values in faeces.

epg	Number of sheep per flock	
	F1	F2
0	21	0
15	2	8
30	2	4
45	2	2
60	0	2
90	0	1
105	0	1

Fig. 2. Optical density (OD) evolution in relation to week post-infection (wpi) in the experimental assay (sandwich-ELISA).

3.2. Sandwich-ELISA

During the first 3 weeks pi, the antigen value in the experimentally infected animals was lower than 0.150, so all animals were negative (100%). The infection was firstly detected by week 4 pi, when 57.1% of animals were positive reaching a percentage of 85.7% 3 weeks later. All sheep were positive by sandwich-ELISA from 8 wpi. The OD values during the experimental infection are shown in Fig. 2.

In relation to natural infections, in individual samples from flocks F1 and F2, as well as in the two pools of faeces from flock F3, all animals had OD values higher than 0.150, so the infection was confirmed. The relationship between epg and OD values in the naturally infected animals was significant after calculating Spearman's rho coefficient ($r = 0.505$; $P = 0.000$).

3.3. PCR in faeces

The diagnosis of the experimental infection by a standard PCR was carried out between 0 and 8 wpi with the specific primers (Cox1.F/R). In this assay, a 423 bp fragment of mtDNA was amplified, including the coding region of Cox1 gene (Fig. 3). The detection of *F. hepatica* infection was positive from 3 wpi onwards in the pool of faeces. However, when a nested-PCR was used, samples were positive as soon as week 2 pi (Fig. 4). With the nested-PCR, the first pair of degenerate oligonucleotides amplified a fragment of 1035 bp, including the regions of the Cox1 gene and the large ribosomal RNA subunit in the mtDNA.

Regarding naturally infected flocks F1 and F2, the standard PCR only detected the infection in 37 out of 45 animals. However, by means of a nested-PCR, all of them were positive as well as two pools of faeces from flock F3 (Fig. 5). The specificity of the nested-PCR was shown because no PCR product was amplified in sheep by three different GIN species (data not shown). In Fig. 5, a DNA sample from the sheep experimentally infected by *T. circumcincta* was included.

4. Discussion

The use of molecular and immunological techniques is a commonplace for the study of the epidemiology and control of some parasitic infections in livestock. In helminth infections, the studies comparing these methods with the detection of eggs in faeces are scarce. The current study evaluates three methods for the diagnosis of the infection by *F. hepatica* in sheep: (i) coprological diagnose by sedimentation, (ii) a commercial sandwich-ELISA kit, and (iii) two new PCR assays. The detection of liver fluke eggs in faeces has been conventionally carried out for the diagnosis of fasciolosis in ruminants. The detection of the infection has been confirmed on 7 wpi (Paz-Silva et al., 2002), between weeks 8 and 10 pi (O'Neill et al., 2000; Martínez-Valladares et al., 2010a) or even later, between 10 and 12 wpi (Duménigo and Mezo, 1999) and 11–16 wpi (Zimmerman et al., 1982; Rodríguez-Pérez and Hillyer, 1995). However, in our study, we detected eggs in the faeces of experimentally infected animals after 9 wpi.

Coproantigen detection was carried out using pAb-Copro ELISA test (Bio-X Diagnostics), with a specificity of 100%. By indirect-ELISA *F. hepatica* infection can be detected from 1 wpi (Almazán et al., 2001; Arias et al., 2006), as early as 3 wpi (Marín, 1992) or after 5 wpi (Rodríguez-Osorio et al., 1998). On the other hand, by sandwich-ELISA, it is possible to detect coproantigens before the patency of the infection, by weeks 5–7 pi. (Espino et al., 1997; Moustafa et al., 1998). These results tally with ours, in which 57.1% sheep were positive from 4 wpi. The level of antigens gradually increased reaching high values being parallel to the excretion of eggs in the faeces, as observed by other authors (Paz-Silva et al., 2002). While by sandwich-ELISA the infection can be detected in all experimentally infected animals from 8 wpi, this was not possible in all sheep when using the sedimentation method until 12 wpi, although 1 up to 7 sheep showed a first faecal excretion of *F. hepatica* eggs on 9 wpi. Regarding natural infection, antigens in faeces were detected in all animals from flocks F1 and F2, and in the two pools from F3, which is similar to results obtained by Duménigo and Mezo (1999), and Duménigo et al. (2000).

The development of the new diagnostic technique based on the detection of DNA as PCR has resulted in important specific methods. However, these techniques require that specific sequences should be available because DNA from different organisms and cells can be present in faecal samples. In *F. hepatica* infection, it is thought that between 25% and 60% of ingested metacercariae reach the liver (Cordero del Campillo and Rojo-Vázquez, 1999). Once metacercariae excyst in the rumen or small intestine, the juvenile flukes penetrate the intestinal mucosa and can be found in the abdominal cavity by 72 h (Kendall and Parfitt, 1962), reaching the liver at 90 h pi (Sinclair, 1967). Reported data suggest that protective immunity occurs early after infection at the wall of the small intestine (Charbon et al., 1991), at the peritoneal cavity (Burden et al., 1983) and at the liver surface and parenchyma (Keegan and Trudgett, 1992) where many flukes become trapped (Ross, 1965). Surviving flukes engender a marked eosinophilic reaction (Pockros and Capozza, 2005) and degranulation of the eosinophils

Fig. 3. Standard PCR in a pool of faecal samples from the experimental assay. 1: *F. hepatica* positive control. 2–9: samples from weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 pi.

Fig. 4. Nested-PCR in a pool of faecal samples from the experimental assay. 1: *F. hepatica* positive control. 2–9: samples from weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 pi.

Fig. 5. Nested-PCR from naturally infected sheep. 1: *F. hepatica* positive control. 2–7: individual samples from flock F1. 8–13: INDIVIDUAL samples from flock F2. 14–15: pools from flock F3. 16: individual sample from an infected sheep by GIN (*T. circumcincta*).

creates pits in the tegument of the immature flukes, leading to their erosion (Burden et al., 1983). Once the tegument has been breached by eosinophils, neutrophils are seen to attach to the fluke (Davies and Goose, 1981). In contrast to the mechanism of tegumental destruction of the immature forms, host cells (eosinophils, neutrophils and macrophages) have been shown to penetrate the syncytium of the adult fluke and prise it off in natural infections (Fairweather et al., 1999). On the other hand, according to Degheidy and Shalaby (2010) the fluke apparently reacts to the immune situation by a rapid translocation of tegumental granules from the underlying tegumental cells to just below the apical plasma membrane. This might be the fluke's way of releasing damaged membrane, through some form of capping mechanism (Bennett et al., 1980). This replacement of surface membrane by the tegument might, therefore, represent the main mechanism whereby flukes avoid the host's immune response. We propose that it is this tegumental turnover and repair in the face of the host's immune response that may be responsible for the *F. hepatica* cellular material appearing in the host's faeces during the fluke's migration phase, and that this is the source of the genetic material we were able to detect using the PCR. During the patent period of the infection, not only the previously described material is present in faeces but also the DNA from eggs released by mature flukes and excreted into the faeces.

In our study, the infection was detected as early as 2 wpi by nested-PCR, or 3 wpi by a standard PCR. Therefore, the sensitivity of both PCRs is higher than the sandwich-ELISA method since the infection can be detected one or two weeks before comparing with this commercial kit. On the other hand, the specificity of PCRs was shown because no PCR product was amplified after using DNA samples from 8

sheep infected with different GIN species and 2 sheep free of any parasitic infection. The consequence of the highly sensitive and specific techniques in the diagnosis of liver fluke infection, mainly the ELISA and the PCR, has been the development of a great number of procedures to improve the diagnosis.

PCR technique has been also used to detect other helminth parasites in faeces, such as *Echinococcus granulosus* in dogs (Abbasi et al., 2003; Lahmar et al., 2006), *Echinococcus multilocularis* in foxes (Bretagne et al., 1993; Dinkel et al., 1998; Al-Sabi et al., 2007), *Taenia saginata*, *Taenia solium* and other tapeworms (Mathis and Deplazes, 2006). The later authors analysed different genes, such as the U1 small nuclear RNA (U1 snRNA) gene (Bretagne et al., 1993), the mitochondrial 12S ribosomal RNA (mt12S rRNA) gene (Al-Sabi et al., 2007), both these genes (Mathis and Deplazes, 2006), and the *Haemaphysyllus aegypticus* III (Hae III), the *Arthrobacter luteus* I (Alu I) and the *Rhodopseudomonas spheroides* I (Rsa I) genes (Abbasi et al., 2003). In the study reported here, by standard and nested-PCR, a fragment of mtDNA was amplified including the coding region of *CoxI* gene, and *CoxI* and *LrRNA* genes, respectively. Most recently, a PCR method has been also developed to check for the presence of *Fasciola gigantica* in faeces of buffaloes (Ai et al., 2010), although a different gene has been analysed, the second internal-transcribed spacers (ITS-2) within the *Fasciola* nuclear ribosomal DNA (rDNA).

Both sandwich-ELISA and nested-PCR techniques improve the early diagnosis of the infection, but the PCR described in this study advances by two weeks the early diagnosis with respect to the commercial immunological kit. Although some molecular techniques based on the detection of DNA by PCR have been used to discriminate among different species and isolates of *Fasciola* spp.

(Vara-Del Río et al., 2007; Ai et al., 2010; Alasaad et al., 2011), to our knowledge, this is the first study comparing several diagnostic methods as an aid to the diagnosis of *F. hepatica* infection in both naturally and experimentally infected sheep, specially the use of a nested-PCR technique.

5. Conclusion

The detection of DNA from *F. hepatica* significantly earlier than eggs or coproantigens in the host faeces set the PCR technique up as a valuable method to diagnose liver fluke infection in sheep. The specificity of this nested-PCR could be used as a good method for epidemiological studies. Moreover, this molecular assay could be useful for checking the efficacy of anthelmintics after treatment.

Acknowledgements

This study has been funded by the National Project RTA2010-00094-C03-02. The work of María Martínez-Valladares has been supported by a postdoctoral Jae-Doc contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and co-funded by the European Social Fund.

References

- Abbasi, I., Branzburg, A., Campos-Ponce, M., Hafez, S.K., Raoul, F., Craig, P.S., Hamburger, J., 2003. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 324–330.
- Ai, L., Dong, S.J., Zhang, W.Y., Elsheikha, H.M., Mahmood, Y.S., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Shi, Y.L., Huang, W.Y., Zhu, X.Q., 2010. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 65–72.
- Alasaad, S., Soriguer, R.C., Abu-Madi, M., El Behairy, A., Jowers, M.J., Díez Baños, P., Piriz, A., Fickel, J., Zhu, X.Q., 2011. A TaqMan real-time PCR-based assay for the identification of *Fasciola* spp. *Vet. Parasitol.* 179, 266–271.
- Almazán, C., Ávila, G., Quiroz, H., Ibarra, F., Ochoa, P., 2001. Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 97, 101–112.
- Al-Sabi, M.N.S., Kapel, C.M., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitol. Res.* 101, 731–736.
- Anderson, N., Luong, T.T., Vo, N.G., Bui, K.L., Smooker, P.M., Spithill, T.W., 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 83, 15–24.
- Arias, M., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Lomba, C., Díaz, P., Morondo, P., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A., 2006. A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Vet. Parasitol.* 137, 67–73.
- Bennett, C.E., Hughes, D.L., Harness, E., 1980. *Fasciola hepatica*: changes in tegument during killing of adult flukes surgically transferred to sensitized rats. *Parasite Immunol.* 2, 39–55.
- Boray, J.C., 1985. Flukes of domestic animals. In: Gaafar, S.M., Howard, W.E., Marsh, R.E. (Eds.), *Parasites, Pests and Predators*. Elsevier, New York, pp. 179–218.
- Boulard, C., Carreras, F., Van Gool, F., 1995. Evaluation of nitroxylin and closantel activity using ELISA and egg counts against *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected cattle. *Vet. Res.* 26, 239–245.
- Bretagne, S., Guillou, J.P., Morand, M., Houin, R., 1993. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology* 106, 193–199.
- Burden, D.J., Bland, A.P., Hammet, N.C., Hughes, D.L., 1983. *Fasciola hepatica*: migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp. Parasitol.* 56, 277–288.
- Charbon, J.L., Spahni, M., Wicki, P., Pfister, K., 1991. Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 77, 425–429.
- Cordero del Campillo, M., Rojo-Vázquez, F.A., 1999. (Coord.). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Interamericana, Madrid.
- Davies, C., Goose, J., 1981. Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunol.* 3, 81–86.
- Degheidy, N.S., Shalaby, H.A., 2010. Scanning electron microscopic observations of adult *Fasciola gigantica* after immunization with glutathione S-transferase in goats. *Res. J. Parasitol.* 5, 79–89.
- Dinkel, A., Von Nickisch-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R., Römig, T., 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1871–1876.
- Duménigo, B.E., Espino, A.M., Finlay, C.M., Mezo, M., 2000. Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 89, 153–161.
- Duménigo, B.E., Mezo, M., 1999. Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Res. Vet. Sci.* 66, 165–167.
- Endah Estuningsih, S., Widjayanti, S., Adiwinata, G., Piedrafita, D., 2004. Detection of coproantigens by sandwich ELISA in sheep experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Trop. Biomed.* 21, 51–56.
- Espino, A.M., Marcet, R., Finlay, C.M., 1997. *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Exp. Parasitol.* 85, 117–120.
- Fairweather, I., Threadgold, L.T., Hanna, R.E.B., 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 59–60.
- Ferre, I., Ortega-Mora, L.M., Rojo-Vázquez, F.A., 1995. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitol. Res.* 81, 137–142.
- García-Pérez, A.L., Juste-Jordán, R.A., 1987. Helmintos parásitos de la oveja en el País Vasco. *Rev. Iber. Parasitol. Ext.*, 105–113.
- Gonzalo-Orden, J.M., Millán, L., Álvarez, M., Sánchez-Campos, S., Jiménez, R., González-Gallego, J., Tuñón, M.J., 2003. Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol. Res.* 90, 359–364.
- Haroun, E., Hillyer, G.V., 1986. Resistance to fascioliasis: a review. *Vet. Parasitol.* 20, 63–70.
- Hillyer, G.V., 1999. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International, Oxon, UK, pp. 435–447.
- Keegan, P.S., Trudgett, A., 1992. *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunol.* 14, 657–669.
- Kendall, S.B., Parfitt, J.W., 1962. The chemotherapy of fascioliasis. *Br. Vet. J.* 118, 1–10.
- Kenyon, F., Sargison, N.D., Skuce, P.J., Jackson, E., 2009. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet. Parasitol.* 163, 293–297.
- Kooshan, M., Hashemi-Tabar, G.R., Naghibi, A., 2010. Use of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* in diagnosis of sheep by ELISA. *Am.-Eur. J. Agric. Env. Sci.* 7, 170–175.
- Krämer, F., Schnieder, T., 1998. Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1923–1929.
- Lahmar, S., Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H., Craig, P.S., 2006. Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet. Parasitol.* 144, 287–292.
- Marín, M.S., 1992. Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario. PhD Thesis. University of Oviedo, Spain.
- Martínez-Ibeas, M., Martínez-Valladares, M., González-Lanza, C., Miñambres, B., Manga-González, Y., 2011. Detection of *Dicrocoelium dendriticum* larval stages in mollusc and ant intermediate hosts by PCR, using mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS-2) sequences. *Parasitology* 138, 1916–1923.
- Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C., Castañón-Ordóñez, L., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Rojo-Vázquez, F.A., 2010a. Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 174, 166–169.
- Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A., 2010b. Efficacy of nitroxylin against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol. Res.* 107, 1205–1211.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35, 1255–1278.

- Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., 2009. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69, 41–146.
- Mathis, A., Deplazes, P., 2006. Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.* 55, S87–S90.
- Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C., Ubeira, F.M., 2004. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.* 90, 845–852.
- Moustafa, N.E., Hegab, M.H., Hassan, M.M., 1998. Role of ELISA in early detection of *Fasciola* copro-antigens in experimentally infected animals. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28, 379–387.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H., Dalton, J.P., 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22, 147–155.
- Paz-Silva, A., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Díaz, P., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morondo, P., 2002. Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 88, 568–573.
- Pockros, P.J., Capozza, T.A., 2005. Helminthic infections of the liver. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 7, 61–70.
- Ramajo, V., Oleaga, A., Casanueva, P., Hillyer, G.V., Muro, A., 2001. Vaccination of sheep against *F. hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol.* 97, 35–46.
- Rodríguez-Osorio, M., Rojas, J., Gómez-García, V., 1998. *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. *J. Parasitol.* 84, 1053–1055.
- Rodríguez-Pérez, J., Hillyer, G.V., 1995. Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 56, 57–66.
- Ross, J.B., 1965. Experimental infections of cattle with *Fasciola hepatica*: a comparison of low and high infection rates. *Nature* 208, 907.
- Sinclair, K.B., 1967. Pathogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. *Helm. Abs.* 36, 115–134.
- Soulsby, E.J.L., 1986. *Helminthes, Arthropods and Protozoa of domesticated animals*. Balliere, Tindall, London, pp. 40–52.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 1986. Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. Janseen Research Foundation, Beerse.
- Urquhart, G.M., Duncan, J., Armour, L., Dunn, J., Jennings, A.M., 1996. *Veterinary Parasitology*. Blackwell Sci, UK, pp. 103–113.
- Vara-Del Río, M.P., Villa, H., Martínez-Valladares, M., Rojo-Vázquez, F.A., 2007. Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the north-west of Spain. *Parasitol. Res.* 101, 1003–1006.
- Zimmerman, G.L., Jen, L.W., Cerro, J.E., Farnsworth, K.L., Wescott, R.G., 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 43, 2097–2100.

**EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) FROM
Ochrobactrum intermedium ON SHEEP EXPERIMENTALLY
INFECTED WITH *Fasciola hepatica***

J.M. Martínez-Pérez, D. Robles-Pérez, F. Valcárcel-Sancho, A.M. González-Guirado, I. Casanova-García, J.M. Nieto-Martínez, F.A. Rojo-Vázquez* & M. Martínez-Valladares.

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología y Enfermedades Parasitarias).
Facultad de Veterinaria de León / Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA) /
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

***Parasitology Research* 2013; 112 (8): 2913-2923.**

Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*

J. M. Martínez-Pérez · D. Robles-Pérez · F. Valcárcel-Sancho ·
 A. M. González-Guirado · I. Casanova-García de Castro ·
 J. M. Nieto-Martínez · F. A. Rojo-Vázquez · M. Martínez-Valladares

Received: 10 January 2013 / Accepted: 20 May 2013 / Published online: 6 June 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The effects of the lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* was evaluated in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Animals were divided into four groups: two treated with the LPS (T1/T2) and two controls (C1/C2). T1/C1 were slaughtered at 30 days postinfection (dpi) and T2/C2 at 85 dpi. Body weight and body condition were found higher in T1 and T2 than in controls, although differences were not significant. Treated sheep showed lower cumulative fecal egg count than controls ($p < 0.01$). Levels of red blood cells (RBC), white blood cells, hemoglobin, and hematocrit (HCT) were higher in T1 and T2. Significant differences ($p < 0.05$) in RBC and HCT were found between groups at 84 dpi. More severe macrocytic and hypochromic anemia was observed in C1 and C2 than in treated groups. Total protein and albumin values were higher in T1 and T2 ($p < 0.01$) until 29 dpi. At the end of the trial, no significant differences were observed in hepatic enzymes, although gamma-glutamyl transferase and aspartate aminotransferase values were higher in C2, and alanine aminotransferase was higher in T2. At necropsy, the mean weight of liver, fibrosis in

portal triads, and ganglion size were similar in all groups. The number and size of flukes was greater in C2 than in T2 ($p < 0.05$). The histological examinations revealed a higher degree of parenchymatous fibrosis in T2 compared to C2 ($p < 0.05$). The administration of LPS from *O. intermedium* increased the nonspecific resistance against *F. hepatica* in experimentally infected sheep.

Introduction

The common liver fluke *Fasciola hepatica* is the causative agent of fasciolosis, a zoonosis with economic implications. The infection is commonly acquired by the ingestion of herbage or water contaminated with metacercariae. Although ruminants are the main animals at risk, in some regions, *F. hepatica* is also an important human pathogen (Haroun and Hillyer 1986). The consequences of fasciolosis in small ruminants include retarded growth and decreased milk and wool production, and the disease has negative effects on general animal health, including fertility.

The integrated control strategy in ruminants is based on combining anthelmintic treatments with hygiene and grazing control (Cordero del Campillo and Rojo-Vázquez 1999), including key elements such as nutrition, genetics, and host immunity. The administration of effective chemoprophylactic is vital, although their misuse has allowed the development of anthelmintic resistance (Prichard 1994). The drug most widely used to control fasciolosis in sheep is triclabendazole, due to its high efficacy against both adult and immature flukes (Fairweather 2005; Brennan et al. 2007). However, resistance to this anthelmintic has been reported since 1995 (Overend and Bowen 1995; Dalton et al. 2003; Álvarez-Sánchez et al. 2006). As a consequence,

J. M. Martínez-Pérez · D. Robles-Pérez · F. A. Rojo-Vázquez
 Facultad de Veterinaria, Universidad de León,
 Campus de Vegazana,
 24071 Leon, Spain

F. Valcárcel-Sancho · A. M. González-Guirado ·
 I. C.-G. de Castro · J. M. Nieto-Martínez
 Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA),
 28130 Madrid, Spain

F. A. Rojo-Vázquez (✉) · M. Martínez-Valladares
 Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE),
 Finca de Marzanas, 24346 Leon, Spain
 e-mail: francisco.rojo@unileon.es

new formulations should be tested with the currently available drugs (Martínez-Valladares et al. 2010a). Vaccines and immunostimulatory products should be considered as alternatives to anthelmintic therapy (Dalton and Mulcahy 2001). These products may be becoming more acceptable in the light of increasing public concern regarding chemical residues in food and the environment (Mulcahy and Dalton 2001).

The immune system can be manipulated directly by a vaccine, or nonspecifically through immunomodulation (Masihi and Lange 1988). Multiple studies have focused on development of a suitable vaccine for fasciolosis based on enzymes including glutathione S-transferases (Sexton et al. 1990; Morrison et al. 1996), cathepsin L/B cysteine peptidases (Mulcahy and Dalton 2001; Dalton et al. 1996), leucine aminopeptidases (Piacenza et al. 1999), and on fatty acid binding proteins (Muro et al. 1997; López-Abán et al. 1999). The coadministration of these molecules with adjuvants can enhance the immunogenicity of vaccines (Coffman et al. 2010) by stimulating the protective immunity through antibodies and T cell production.

Immunomodulators (IMMs) are immunostimulating and/or immunosuppressive agents used to modify the host defense mechanisms, with the aim of controlling viral, bacterial, parasitic, and fungal disease (Masihi 2000). IMMs can be classified as microbial (whole microbes and bacterial lysates), natural, synthetic (muramyl peptides, thymic hormones, peptide analogs, Isoprinosine, and glucans), and cytokine IMMs (interferon, tumor necrosis factor, colony stimulating factors, and interleukins) (Masihi 2000). Lipopolysaccharide (LPS), a glycolipid of the cell membrane of Gram-negative bacteria, is a potent immunostimulating agent that induces cytokine production by monocytes and macrophages (Rietschel and Brade 1992). It is composed of the lipid A and a polysaccharide chain. Strategies to improve its results are focused on modifying the characteristics of the lipid A (Van der Ley 2001). The administration of LPS from *Escherichia coli* has been associated with attenuated inflammation as a consequence of downregulation of macrophage response. However, repeat doses of this glycolipid have been found to lead to tolerance in mice (Erroi et al. 1993). Veremeichenko and Zdrovenko (2008) reported that the administration of high doses of LPS from *Pseudomonas* spp. can be damaging rather than beneficial to the organism. Appropriate doses of LPS preparations can induce multiple beneficial effects, including adjuvant activity, radioprotective activity, and increased nonspecific resistance to infection and tumors (Dreisbach et al. 2000).

Studies have shown the successful action of the LPS from *E. coli* as an IMM in experimental infections by gastrointestinal nematodes (GIN) in sheep (Abel et al. 2009). Lipopolysaccharide from *E. coli* K12 was shown effective in mice infected by *E. coli* (Vuopio-Varkila et al. 1988) and by *Francisella tularensis* (Dreisbach et al. 2000). The

objective of the current study was to analyze the clinical effects of LPS from *Ochrobactrum intermedium* in sheep experimentally infected with *F. hepatica*.

Materials and methods

Animals and experimental design

The study was carried out using 36.5-month-old Merino sheep obtained from a flock without history of liver fluke infection. Sheep were weighed 1 week before the beginning of the study and divided according to body weight (BW) into four homogeneous groups of nine. Prior to beginning the trial, sheep were treated with a single oral dose of triclabendazole and levamisole (Endex[®], 10 mg/kg). No clinical signs of parasitic or infectious disease were observed, and fecal analyses (flotation, sedimentation, and larval migration) were negative in all animals.

Animals were infected on day 0 with 200 *F. hepatica* metacercariae (Ridgeway Research Ltd. Co., Lydney, UK), in a gelatin capsule administered with a dosing gun.

On days 2 and 16 postinfection (dpi), treated groups, T1 and T2, received a subcutaneous injection of 2 ml of IMM containing 6 µg/ml LPS from *O. intermedium* strain LMG3306 (Laboratorios Ovejero S.A., León, Spain) (Ovejero-Guisasola and Fresno-Escudero 2010). Control groups, C1 and C2, were injected with sterile saline solution following the same protocol as the treated groups. Groups C1 and T1 were slaughtered for examination at 30 dpi and C2 and T2 at 85 dpi, both through intravenous injection of a lethal dose (20 ml) of sodium pentobarbital (Dolethal, Vétoquinol S.A., France).

The study was carried out at the animal facilities of the Instituto de Ganadería de Montaña, León, Spain. Sheep were handled in accordance with animal ethics guidelines.

In vivo measurements

Throughout the study until its conclusion at 85 dpi, BW and body condition (BC) were measured every 2 weeks. BC was evaluated according to a system of scoring from 0 to 5 described by Russel et al. (1969). Scoring was done by a single individual to ensure consistency.

Clinical parameters such as general health status, apathy, abdominal distress, and anemia were evaluated at 0, 1, 3, and 7 dpi and, subsequently, weekly until the end of the trial.

Fecal samples were taken directly from rectum three times per week from 42 to 85 dpi. The cumulative fecal egg count (FEC) was calculated according to Vercruysse et al. (1993). The number of *F. hepatica* eggs was calculated by a standard sedimentation method using a McMaster chamber (Thienpont et al. 1986).

Hematological and biochemical parameters

Blood samples were taken by jugular venipuncture using 5 ml EDTA Venoject vacuum tubes (BD vacutainers) and 5 ml Venoject vacuum tubes without anticoagulant to obtain serum, at the time of assessing clinical parameters. The samples were processed immediately, using an automated hematology cell analyzer Medonic CA 530 (Boule Diagnostics AB, Sweden) to determine the following hematological parameters: red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), hemoglobin level (HB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC).

Serum samples were analyzed at the Laboratorio de Técnicas Instrumentales of the University of León. The levels of total protein (TP), albumin (ALB), and the hepatic enzymes gamma-glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) were determined.

Necropsy

A necropsy on all sheep was conducted according to standard procedures. The livers were weighed and scored from 0 to 5 points, depending on level of macroscopic lesions (0: absence of lesions in tissue; 5: severe proliferation of fibrous connective tissue). Immature and mature flukes present in the liver and gallbladder were recovered. In groups C1 and T1 (30 dpi), the liver tissue was cut into 25 cm³ cubes, macerated, and passed through a 300 µm sieve to recover immature flukes (Clery et al. 1996; Haçariz et al. 2009). At necropsy of groups C2 and T2 (85 dpi), the main bile ducts on the liver surface were opened, the liver was squeezed manually to release flukes, and all flukes were collected into physiological saline solution. The liver was cut into 1–2 cm slices, squeezed to release the remaining mature flukes, and macerated as described (Clery et al. 1996). Immature and mature flukes were counted and classified according to size. For C1 and T1, the categories were <2, 2.1–3.5, and 3.6–6 mm. At the second necropsy, categories were 1–5, 5–10, and >10 mm. Counts also included any identified fluke heads or tails; whichever was found in higher numbers (heads or tails) was included in the total count.

The hepatic lymph nodes (HLNs) were recovered and scored from 0 to 10 according to relative size.

For sheep in groups C2 and T2, the presence of fecal occult blood (FOB) was analyzed by a single slide stool blood test (Cenogenics Co., USA) at the conclusion of the trial.

Histopathology

Samples of liver and HLN were fixed in 10 % buffered formalin for at least 24 h at room temperature, embedded

in paraffin, cut into 4 µm sections, and stained with hematoxylin and eosin. The hepatic lesions were classified as portal fibrosis, parenchymatous necrosis, hyperplasia of bile ducts, and presence of inflammatory cells in portal and parenchymatous areas. The HLNs were studied to assess the degree of lesion in the cortex (number and size of the lymphoid follicles and infiltration of subcapsular sinus by inflammatory cells), paracortex (size, infiltration), and medulla (loss of structure and infiltration).

All lesions were visually scored as follows: 0: negative, 1: moderate, 2: severe, and 3: very severe.

Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical package SPSS for Windows. FEC was transformed to Ln (X+1) to produce approximately normally distributed data. The comparative analyses among groups were performed by analysis of variance. Differences were considered significant $p < 0.05$.

Results

In group C2, three animals were eliminated from the trial due to infection failure; therefore this group included only six sheep.

In vivo measurements

At the conclusion of the trial, treated groups showed higher BW and BC than control groups (Fig. 1). Differences did not reach levels of significance in any case.

Clinical signs (general health status, apathy, fever, abdominal distress, and anemia) showed no differences between treated and control groups (data not shown). No mortality or adverse effects of administration of the LPS or the saline solution were observed.

Eggs were first detected in feces at 49 dpi in group T2. Significant differences between treated animals and controls were shown at 66 and 69 dpi ($p < 0.01$) and at 78 and 80 dpi ($p < 0.05$), with higher values in C2. At the end of the study, the mean cumulative FEC in C2 and T2 was 1,193.8 eggs per gram (± 424.5) and 608.4 (± 251.8), respectively, ($p < 0.01$) (Fig. 2).

Hematological parameters

RBC: In both treated and control groups, RBC values decreased gradually from the beginning of the study. In treated groups, parameters were found within the normal range ($11\text{--}13 \times 10^6/\mu\text{l}$) (Schalm et al. 1981) throughout the study with the exception of 70 and 77 dpi, when values dropped to $10\text{--}11 \times 10^6/\mu\text{l}$. In the controls, values were normal until 36

Fig. 1 Body weight (BW) and body condition (BC) values from the beginning of the trial to 85 days postinfection (dpi). The arrows indicate both necropsies (30 and 85 dpi)

dpi, decreasing thereafter to $9\text{--}11 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Table 1). At 84 dpi, values were significantly higher in T2 than in C2 ($p < 0.05$).

WBC: Values were above the normal range ($2.5\text{--}7.5 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Schalm et al. 1981) in both control and treated groups during the trial (Table 1). Although WBC values were similar among groups, T2 showed higher values at the end of the study in comparison to C2, but differences were not significant.

HB: All groups were within the normal range ($11\text{--}13\text{ g/dl}$) (Schalm et al. 1981), with the exception T2 at 70 dpi and C2 at 77 and 84 dpi (Table 1). In both controls and treated groups, HB values were lower at the end of the study. There were no observed significant differences among groups throughout the trial.

HCT: This parameter remained within the normal range ($30\text{--}45\%$) (Schalm et al. 1981). All groups showed highest

values ($44\text{--}47\%$) during the first week pi (Table 1). The kinetics of the HCT was similar among groups, with T2 showing higher percentages at 84 dpi ($p < 0.05$).

MCV and MCHC: The normal range ($30\text{--}38\text{ fl}$) (Schalm et al. 1981) of MCV ($\text{HCT} \times 10/\text{RBC}$) values was exceeded in C1/C2 and T1/T2, at $34.5\text{--}39.9\text{ fl}$ and $34.5\text{--}38.5\text{ fl}$, respectively. Significantly higher values were measured in controls compared to treated groups at 3 dpi ($p < 0.01$) and at 70 dpi ($p < 0.05$). All groups showed MCHC ($\text{HB} \times 100/\text{HCT}$) values below the normal range ($31\text{--}33\text{ g/dl}$), ranging from $25.7\text{--}30.5$ and $26.0\text{--}29.2\text{ g/dl}$ in control and treated groups, respectively. Differences were not significant. All groups exhibited macrocytic and hypochromic anemia, which was more severe in the control groups, although without significance (data not shown).

Fig. 2 FEC kinetics of *Fasciola hepatica* from 42 to 85 dpi. The arrow indicates the second necropsy (85 dpi). Significant differences between groups are marked by asterisk ($p < 0.05$) and double asterisk ($p < 0.01$)

Table 1 Hematological parameters (RBC, WBC, HB, and HCT) throughout the trial

	Days pi	0	1	3	7	13	21	29	36	42	49	56	63	70	77	84
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)																
Control	Mean	12.15	12.18	11.65	11.20	12.65	11.48	11.18	10.74	10.96	12.11	10.49	10.64	10.23	10.17	9.79
	SD	0.92	0.85	0.99	0.67	1.49	0.66	0.81	0.22	2.04	1.25	0.85	1.08	0.77	0.87	0.72
Treated	Mean	12.10	12.45	11.86	11.29	12.72	11.42	11.68	11.11	12.41	11.43	11.03	11.30	10.68	10.66	11.31
	SD	1.38	0.93	0.90	1.74	1.10	0.76	0.56	1.06	1.87	0.80	0.29	0.83	0.63	1.09	1.2
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)																
Control	Mean	8.59	9.06	8.54	8.91	10.31	11.31	10.81	9.07	8.87	9.94	12.03	10.93	9.93	9.97	10.65
	SD	1.75	2.08	2.04	2.12	2.38	3.11	2.44	1.16	2.88	0.61	2.73	2.61	1.85	2.10	3.61
Treated	Mean	8.19	9.47	8.73	8.82	8.85	10.49	11.87	9.60	11.31	10.59	11.84	10.45	11.60	11.41	11.76
	SD	1.88	2.65	2.07	2.98	1.90	2.29	2.91	1.79	2.15	2.19	1.51	1.94	2.66	3.08	2.08
HB (g/dl)																
Control	Mean	12.36	12.26	11.96	11.43	12.49	11.94	11.72	11.48	11.77	12.00	11.38	11.07	11.05	10.63	10.70
	SD	0.85	0.89	0.75	0.76	0.97	0.87	0.96	0.72	2.02	1.29	1.03	1.01	0.79	0.67	0.87
Treated	Mean	11.61	12.18	11.55	11.51	12.28	11.47	11.67	11.42	12.16	11.61	11.07	11.36	10.74	11.09	11.03
	SD	1.11	0.87	0.59	0.74	0.56	0.64	0.77	1.03	0.75	0.62	0.62	0.76	0.53	0.77	1.03
HCT (%)																
Control	Mean	45.73	47.05	44.17	39.56	43.11	42.88	42.12	37.78	42.34	42.90	41.90	38.93	38.02	37.92	36.64
	SD	2.52	2.95	2.04	2.79	3.17	3.03	3.39	1.32	1.30	5.21	4.26	4.04	2.40	3.17	2.58
Treated	Mean	44.66	46.26	43.68	40.33	43.35	41.93	42.34	39.20	41.11	40.74	41.97	40.92	38.82	39.32	41.85
	SD	5.18	3.84	3.99	3.32	3.59	3.53	3.58	3.55	2.97	3.14	3.79	3.27	2.77	3.93	4.33

Biochemical parameters

TP and ALB

TP levels were within the normal range (6–7.5 g/dl) (Benjamin 1984), with the exceptions of 3, 7, 13, and 21 dpi in controls, and at 1, 7, and 70 dpi in treated groups, when values fell below the normal range. In both treated and control groups, this parameter rose above the normal range at 49 dpi. Significant differences between treated and controls were observed at 3 and 21 dpi ($p < 0.01$) and 13 and 29 dpi ($p < 0.05$), with higher values in treated groups (Fig. 3a).

ALB values were within normal limits (2.7–3.7 g/dl) (Benjamin 1984), except at 42 and 49 dpi in C1 and C2 and at 49 dpi in T1 and T2, when values exceeded the upper limit. Values below normal were found in C1/C2 at 3 and 13 dpi and in T2 at 70 dpi. Significant differences between groups were found at 3, 13, 21, and 29 dpi ($p < 0.01$), with higher values in treated groups, and at 42 and 70 dpi ($p < 0.01$) and 49 dpi ($p < 0.05$), with higher values in C2 (Fig. 3b).

Hepatic enzymes (GGT/AST/ALT)

GGT values at the end of the trial were 246.8(± 157.6) IU/l in C2 and 193.6(± 82.8) IU/l in T2, significantly higher than the reference values of 21–44 IU/l (Sykes et al. 1980; Kaneko 1980). GGT levels in control and treated groups were consistently below 100 IU/l through 36 and 42 dpi, respectively, after which they increased. Maximum enzyme activity was observed at 63 dpi, with values above the mean of 123.2 % in C2 and 101.6 % in T2. Significant differences were observed at 3, 21, and 29 dpi ($p < 0.01$) and 13 dpi ($p < 0.05$), with higher values in treated groups, and at 56 dpi ($p < 0.05$), with higher values in C2 (Fig. 3c).

AST values were 260.1 (± 137.1) and 172.7(± 38.2) IU/l in C2 and T2, respectively, at the end of the study, both significantly higher than the normal range of 27–70 IU/l (Kaneko 1980; Sykes et al. 1980). Levels increased between 49 and 56 dpi, with values above the mean of 97.8 % in C2 and 84.5 % in T2. Values subsequently decreased until the end of the trial, when they reached values similar to those measured at 42 dpi. Values in T1/T2 were significantly higher than in the corresponding controls at 3, 13, and 21 dpi ($p < 0.01$) (Fig. 3d).

Throughout the trial, mean ALT was within normal limits (7–24 IU/l) (Benjamin 1984), with slight increases in C2 and T1/T2 at 42 dpi and 21 dpi, respectively. ALT values were consistently within the normal range in all groups until the conclusion of study, when they fell below this range. Significant differences were shown at 3 and 21 dpi ($p < 0.01$), with higher values in treated groups (Fig. 3e).

Necropsy results

Mean liver weight was similar in C1 (0.8 $\pm$ 0.2 kg) and T1 (0.9 $\pm$ 0.1 kg), as well as in C2 (1.0 $\pm$ 0.2 kg) and T2 (1.0 $\pm$ 0.1 kg).

Superficial liver damage characterized by fibrous tracks was observed in both groups, with scores of 4.2 (± 1.2) in C1 and 3.8 (± 1.1) in T1. Hepatic damage scores were slightly lower in C2 (4.0 $\pm$ 0.6) than in T2, 4.1 (± 1.0).

HLN size values (0–10) were 5.9 (± 1.4) and 6.0 (± 1.7) in C1/T1 and C2/T2, respectively. Nonsignificant increases were found in C2 and T2 to 8.2 (± 1.3) and 6.5 (± 2.2), respectively.

The mean number of immature flukes recovered per sheep was 60.0 (± 37.1) and 88.7 (± 25.8) in C1 and T1, respectively. The mean number of adult flukes per animal in C2 and T2 was 128.7 (± 41.7) and 95.4 (± 26.4), respectively. Differences between control and treatment groups were significant ($p < 0.05$) at both necropsies.

Flukes were classified according to size categories depending on necropsy group (Fig. 4a). The mean number of flukes in each size category was similar, with the largest (>10 mm) recovered at the second necropsy, where significant differences were found ($p < 0.05$). A significantly higher number of flukes of the largest size-range category were collected in C2 (91.7 $\pm$ 32.1) compared with T2 (53.0 $\pm$ 21.4) (Fig. 4b).

All sheep were positive for the presence of blood in feces at 82 dpi.

Histopathology

Histological changes in liver included the presence of fibrocytes, fibroblasts, and collagen fibers; eosinophilic and leucocytic infiltration; bile duct proliferation and loss of lymphoid vessels in portal areas (Fig. 5a and b); and areas of necrosis in the liver parenchyma. Infiltration of the lining epithelium was also observed (Fig. 5b).

Livers of C1 showed higher degrees of fibrosis (1.4 $\pm$ 1.1) and bile duct hyperplasia (2.6 $\pm$ 0.5) compared 0.4 (± 0.5) and 2.5 (± 0.5), respectively, for T1. Inflammatory infiltration in portal triads was similar in among groups, with numbers of macrophages (1.1 $\pm$ 0.4) and eosinophils (2.2 $\pm$ 0.5) lower in C1 than in T1 (1.2 $\pm$ 0.4 and 2.3 $\pm$ 0.5, respectively). Significant differences between groups ($p < 0.05$) were found only for fibrosis.

A greater degree of fibrosis was observed in T2 (2.3 $\pm$ 0.6) than in C2 (2.0 $\pm$ 0.9). Macrophage numbers were higher in C2 (1.8 $\pm$ 1.0) than in T2 (1.7 $\pm$ 0.5), and eosinophils were lower in T2 (1.8 $\pm$ 1.3) than in C2 (2.0 $\pm$ 1.3). No differences reached significance levels.

Necrotic foci were present in the hepatic lobules (Fig. 6a). Levels of parenchymatous necrosis were similar

Fig. 3 Least square means for TP (a), ALB (b), GGT (c), AST (d), and ALT (e) along the trial. The arrows indicate the necropsies (30 and 85 dpi). Significant differences between groups are indicated by asterisk ($p < 0.05$) and double asterisk ($p < 0.01$)

in C1 (2.2 ± 0.6) and T1 (2.2 ± 0.7). Group T2 showed lower levels (1.8 ± 1.2) than C2 (2.3 ± 1.2). Macrophage numbers were slightly lower in C1 (1.4 ± 0.5) than in T1 (1.7 ± 0.7), in contrast to results seen in C2 (2.0 ± 1.1) compared to T2 (1.6 ± 1.0), in which the controls showed higher levels. Neutrophils were higher in treated groups at both necropsies, with values in T1 and T2 of $1.8 (\pm 1.5)$ and $1.1 (\pm 0.8)$,

respectively, compared to 1.1 ± 1.2 in C1 and 0.7 ± 0.8 in C2. Eosinophil levels were similar in C1 (2.3 ± 0.5) and T1 (2.3 ± 0.7) but were slightly higher in C2 (1.7 ± 1.5) compared to T2 (1.4 ± 1.3). No differences reached significance levels.

The most notable alteration in HLNs, observed especially in T2, was an increase in the number and size of lymphoid

Fig. 4 Mean *Fasciola hepatica* burdens at first (a) and second (b) necropsies, according to worm size. Significant differences between groups are indicated by asterisk ($p < 0.05$)

follicles in the cortex, invading and modifying the paracortex and medullar structure. Lymphoid follicles possessed a wide germinal center consisting of immature cells, with wide cytoplasm surrounded by a crescent halo of mature lymphocytes (Fig. 6b). Lymphoid follicles was slightly smaller in C2 (2.7 ± 0.5) than in T2 (2.8 ± 0.4), although the germinal center in C2 was larger (3.0 ± 0.0) than in T2 (2.8 ± 0.4). All sheep showed lymphocytic infiltration in the subcapsular sinus and an increase in the size of the paracortex (C2: 1.7 ± 0.8 ; T2: 2.6 ± 0.9) and the medulla (C2: 0.5 ± 0.8 ; T2: 0.9 ± 1.3). There were no significant differences between groups.

Discussion

The objective of the current study was to evaluate the IMM effects of LPS from *O. intermedium* on sheep experimentally infected with *F. hepatica*. The LPS from *E. coli* combined with killed *Propionibacterium acnes* has been previously used as an IMM for helminth control in sheep infected with GINs (Abel et al. 2009). The immune system can be

specifically modified via the administration of vaccines with adjuvants. The adjuvants themselves have little immunogenicity but can enhance the immune response against the specific antigen, for which they are administered. IMMs exert their effect by boosting host immune responses rather than targeting pathogens directly and enhance host defenses both preventively and therapeutically (Nicholls et al. 2010).

In the present study, the most notable finding was the significant decrease in FEC in treated groups. These results are similar to the effect reported using the adjuvant Quil A (Haçariz et al. 2009) in sheep experimentally infected with *F. hepatica*. Mendes et al. (2010a) described the protective action of Quil A as indicated by FEC in goats, especially when administered in combination with Peroxiredoxin. In contrast, the administration of other adjuvants such as Freund's incomplete adjuvant (FIA) and TiterMax Gold in sheep (Haçariz et al. 2009) and FIA coadministered with Freund's complete adjuvant in goats (Buffoni et al. 2010) showed no effect on FEC levels in *F. hepatica* infection.

The increase in BW was constant throughout the study, in accordance with trials, in which Quil A, FIA, and TiterMax

Fig. 5 Liver histology: a presence of fibrocytes, fibroblasts, and collagen fibers ($\times 10$) and b eosinophilic lymphocyte infiltration ($\times 20$)

Fig. 6 **a** Hepatic parenchyma: necrotic foci with hepatocyte cellular debris and inflammatory infiltrate ($\times 20$). **b** Hepatic lymphoid follicles: germinal center of immature cells with wide cytoplasm surrounded by a crescent halo of mature lymphocytes ($\times 10$)

Gold were administered to sheep infected by *F. hepatica*. TiterMax Gold showed significantly greater BW values in comparison to the Quil A and FIA (Haçariz et al. 2009).

All hematological parameters were higher in treated groups. While WBC and HCT values remained within normal limits throughout the study, RBC counts were below the normal range at several test times, principally in the control groups. The macrocytic and hypochromic anemia observed was previously described (Martínez-Valladares et al. 2010b) in an experimental *F. hepatica* infection in sheep. At the conclusion of the trial, FOB was detected in all infected sheep. Chronic fasciolosis is also characterized by hypoproteinemia as a result of hypoalbuminemia (Cordero del Campillo and Rojo-Vázquez 1999).

Liver damage induced by *F. hepatica* can be confirmed by the determination of hepatic enzymes levels, particularly GGT (Ferre et al. 1996), which is associated with penetration of migrating flukes into the bile ducts, leading to hyperplastic cholangitis (Massoud et al. 2001; Burke 2002). Although GGT showed above normal levels in all groups, in C2, the increase was more pronounced beginning at 42 dpi. GGT remained elevated in the final half of the trial, as previously reported (Martínez-Valladares et al. 2010a; Haçariz et al. 2009; Buffoni et al. 2010; McConville et al. 2009). This suggests that bile duct damage was lower in animals treated with IMM, possibly as a consequence of smaller adult flukes. Similar results were found in AST levels, which is associated with the number of immature flukes (Severin et al. 2012) and an indicator of hepatic necrosis (Burke 2002). AST values in C2 at the end of the study coincided with a higher level of parenchymatous necrosis. The ALT enzyme, more specific for hepatic necrosis than AST, was higher in treated groups until the first necropsy, due to the inflammatory state of the liver and tissue destruction as a consequence of the parenchymal migration of immature fluke stages during the first stage of fasciolosis (Ferre et al. 1994). Groups C2 and T2 showed similar values until the end of the study.

The treatment with LPS of *O. intermedium* was associated with a significant reduction in adult fluke burden in group T2, in accord with lower cumulative FEC. The higher

number of immature flukes in T1 compared to C1 could possibly reflect counting error, due to the difficulty in recovering these forms. Mendes et al. (2010b) tested the adjuvant Quil A in goats infected with *F. hepatica* and, despite the higher fluke burden in the control group, no significant differences in reduction of fluke numbers were found between the treated and the control group. In our study, it is noteworthy that the flukes recovered from T2 were significantly smaller than those from C2, suggesting that the LPS could have impaired the development of the flukes.

The only significant difference between treatment and controls in liver histology was observed in the level of fibrosis, higher in C1 and coinciding with more extensive hepatic damage. This fibrosis may restrict the movement of the flukes because of inflammation of the bile duct epithelia and areas of the parenchyma immediately adjacent (Behm and Sangster 1999). Consequently, flukes recovered from T2 were smaller than those collected from C2. Inflammatory infiltrate consists of macrophages, eosinophils, and neutrophils and is present in recent hemorrhagic tracks (Martínez-Moreno et al. 1999). The presence of fibrocytes and fibroblasts admixed with lymphocytes and mononuclear cells inside the portal triad was the result of migration of immature flukes, as reported in previous studies of goats (Talukder et al. 2010). Macrophage and eosinophil presence in the portal triad was higher in T1 than in C1, while eosinophil levels were higher in C2, and, along with fibrosis, were the main factors in hepatic alteration occupying broad areas of parenchyma and destroying the tissue architecture. Proliferation of fibrous connective tissue associated with infiltration of lymphocytes in the portal area was lower in T1 than in C1 but was higher in T2, suggesting less hepatic damage at the beginning of the infection in treated groups, in accordance with previous reports in rats (Van Milligen et al. 1998; Kesik et al. 2007). Bile duct hyperplasia was lower in treated groups and may be due to the smaller size of the flukes in these groups, as Zafra et al. (2010) also pointed out in a study with goats. No calcification in the wall of the bile ducts was observed, as previously reported in sheep (Pullan et al. 1970) and goats (Talukder et

al. 2010). There were no significant differences in the size of lymphatic vessels. Although parenchymatous necrosis was similar in both groups, the degree of necrosis was lower in T2, probably also due to smaller flukes.

Marked hyperplasia of HLN lymphoid follicles and medullary cords suggests a strong local humoral immune response (Zafra et al. 2009; 2010) and was higher in T2 at the end of the study. On the contrary, the greatest increase in the overall size of HLNs was seen in C2.

The administration of the LPS from *O. intermedium* in sheep infected by *F. hepatica* led to a lower FEC in treated sheep, suggesting an effect on the number and the development of the flukes. Data obtained with respect to hepatic enzymes, as well as other biochemical and hematological values, indicated lower cholestasis and liver migration of immature flukes in treated groups. Group C1 exhibited significantly higher fibrosis levels and more severe necrosis compared to the treated group. While the mode of action of LPS from *O. intermedium* should be studied more extensively, this initial report suggests that an appropriate dose of this IMM can increase the nonspecific resistance to the infection and could be used as a possible adjuvant in vaccine formulations.

Acknowledgments This research has been supported by Laboratorios Ovejero, S.A., León (Spain). María Martínez-Valladares was supported by a postdoctoral Jae-Doc contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and co-funded by the European social fund.

References

- Abel LCJ, Chen S, Ricca LG, Martins MF, García M, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Shaw RJ, Longo-Maugéri IM (2009) Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunol* 31:604–612
- Álvarez-Sánchez MÁ, Mainar-Jaime RC, Pérez-García J, Rojo-Vázquez FA (2006) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec* 159:424–425
- Behm CA, Sangster NC (1999) Pathology, pathophysiology, and clinical aspects. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, p 198
- Benjamin MM (1984) Manual de parasitología clínica veterinaria. México, Limusa editorial, p 135
- Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy MCM, Meaney M, Robinson M, McFerran N, Ryan L, Lanasse C, Mottier L, Álvarez L, Solana H, Virkel G, Brophy PM (2007) Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol* 82:104–109
- Buffoni L, Zafra R, Pérez-Écija A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo E, Moreno T, Pérez J, Martínez-Moreno Á (2010) Immune response of goats immunized with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Int* 59:147–153
- Burke MD (2002) Liver function: test selection and interpretation of results. *Clin Lab Med* 22:377–390
- Clery D, Torgerson P, Mulcahy G (1996) Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 62:71–82
- Coffman RL, Sher A, Seder RA (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33:492–503
- Cordero del Campillo M, Rojo-Vázquez FA (coords) (1999) *Parasitología Veterinaria*. Madrid, Interamericana editorial
- Dalton JP, Mulcahy G (2001) Parasite vaccines – a reality? *Vet Parasitol* 98:149–167
- Dalton JP, McConigle S, Rolph TP, Andrews SJ (1996) Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* 64:5066–5074
- Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M, Doyle S, Mulcahy G, Hoyle D, Khaznadji E, Moiré N, Brennan G, Mousley A, Kreshchenko N, Maule AG, Donnelly SM (2003) *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 33:1173–1181
- Dreisbach VC, Cowley S, Elkins KL (2000) Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect Immun* 68:1988–1996
- Erroi A, Fantuzzi G, Mengozzi M, Sironi M, Orencole SF, Clark BD, Dinarello CA, Isetta A, Gnocchi P, Giovarelli M (1993) Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect Immun* 61:4356–4359
- Fairweather I (2005) Triclabendazole: new skills to unravel and old(-ish) enigma. *J Helminthol* 79:227–234
- Ferre I, Barrio JP, González-Gallego J, Rojo-Vázquez FA (1994) Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet Parasitol* 55:71–79
- Ferre I, López P, Rojo-Vázquez FA, González-Gallego J (1996) Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet Parasitol* 62:93–100
- Haçariz O, Sayers G, McCullough M, Garrett M, O'Donovan J, Mulcahy G (2009) The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 27:45–50
- Haroun E, Hillyer GV (1986) Resistance to fascioliasis: a review. *Vet Parasitol* 20:63–70
- Kaneko J (1980) Clinical biochemistry of domestic animals. Academic, New York
- Kesik M, Jedlina-Panasiuk L, Kozak-Cieszczyk M, Plucienniczak A, Wedrychowicz H (2007) Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25:3619–3628
- López-Abán J, Ramajo V, Pérez-Arellano JL, Oleaga A, Hillyer GV, Muro A (1999) A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/B1 mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol* 83:107–121
- Martínez-Moreno Á, Jiménez-Luque V, Moreno T, Redondo ESH, Martín de las Mulas J, Pérez J (1999) Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet Parasitol* 82:19–33
- Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Castañón-Ordóñez L, Famularo MR, Fernández-Pato N, Rojo-Vázquez FA (2010a) Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Parasitol* 174:166–169
- Martínez-Valladares M, Famularo MR, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA (2010b) Efficacy of nitroxylin against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol Res* 107:1205–1211
- Masihi KN (2000) Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int J Immunopharmacol* 22:1083–1091

- Masihi KN, Lange W (1988) Immunomodulators and nonspecific host defense mechanisms against microbial infections. Pergamon Press, New York, pp 1–462
- Massoud A, El Sisi S, Salama O, Massoud A (2001) Preliminary study of therapeutic efficacy of a new fasciolicidal drug derived from *Commiphora molmol* (MYRRH). *AmJTrop Med Hyg* 65:96–99
- McConville M, Brennan GP, Flanagan A, Edgar HW, Hanna RE, McCoy M, Gordon AW, Castillo R, Hernández-Campos A, Fairweather I (2009) An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 162:75–88
- Mendes RE, Pérez-Écija RA, Zafra R, Buffoni L, Martínez-Moreno Á, Dalton JP, Mulcahy G, Pérez J (2010a) Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 28:2832–2840
- Mendes RE, Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Martínez-Moreno Á, Tendler M, Pérez J (2010b) Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:698–705
- Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW (1996) Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 14:1603–1612
- Mulcahy G, Dalton JP (2001) Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res Vet Sci* 70:83–86
- Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer GV (1997) *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* 69:219–229
- Nicholls EF, Madera L, Hancock REW (2010) Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1213:46–61
- Ovejero-Guisasola JL, Fresno-Escudero M (2010) Lipopolysaccharide of *Ochrobactrum intermedium* and their use as immunostimulant of mammals. *WO* 2010/139352 A1
- Overend DJ, Bowen FL (1995) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J* 72:275–276
- Piacenza L, Acosta D, Basmdjian I, Dalton JP, Carmona C (1999) Vaccination of sheep with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis. *Infect Immun* 67:1954–1961
- Prichard R (1994) Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 64:259–268
- Pullan NB, Sewell MMH, Hammond JA (1970) Studies on the pathogenicity of massive infections of *Fasciola hepatica* L. in lambs. *Brit Vet J* 126:543–558
- Rietschel ET, Brade H (1992) Bacterial endotoxins. *Sci Am* 267:54–61
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG (1969) Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agr Sci* 72:451–454
- Schalm O, Jain J, Carroll E (1981) *Hematología Veterinaria*. Buenos Aires, Hemisferio Sur
- Severin K, Masek T, Janicki Z, Konjevic D, Slavica A, Marinculic A, Martinkovic F, Vengust G, Dzaja P (2012) Liver enzymes and blood metabolites in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Fascioloides magna*. *J Helminthol* 86:190–196
- Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF (1990) Glutathione S-transferase novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol* 145:3905–3910
- Sykes AR, Coop RL, Robinson M (1980) Chronic subclinical ovine fasciolosis: plasma glutamate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. *Res Vet Sci* 28:71–75
- Talukder S, Bhuiyan MJ, Hossain MM, Uddin MM, Paul S, Howlader MMR (2010) Pathological investigation of liver fluke infection of slaughtered Black Bengal goat in a selected area of Bangladesh. *Bang J Vet Med* 8:35–40
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ (1986) Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Beersse, Janssen Research Foundation, pp. 40–41
- Van der Ley P (2001) Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect Immun* 69:5981–5990
- Van Milligen FJ, Cornelissen JBWJ, Hendriks IM, Gaasenbeek CPH, Bokhout BA (1998) Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1, and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol* 20:285–292
- Vercruysse J, Dorny P, Hong C, Harris TJ, Hammet NC, Smith DG, Weatherley AJ (1993) Efficacy of doramectin in the prevention of gastrointestinal nematode infections in grazing cattle. *Vet Parasitol* 49:51–59
- Veremeichenko SN, Zdorovenko GM (2008) Specific structural features and immunomodulatory properties of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas* bacteria. *Appl Biochem Microbiol* 44:571–579
- Vuopio-Varkila J, Marjatta N, Pyhälä L, Mäkelä PH (1988) Lipopolysaccharide-induced nonspecific resistance to systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J Med Microbiol* 25:197–203
- Zafra R, Buffoni L, Pérez-Écija RA, Mendes RE, Martínez-Moreno Á, Martínez-Moreno FJ, Pérez J (2009) Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with a peptide of the Sm14 antigen. *Res Vet Sci* 87:226–232
- Zafra R, Pérez-Écija RA, Buffoni L, Mendes RE, Martínez-Moreno Á, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Galisteo ME, Pérez J (2010) Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *J Comp Pathol* 143:110–119

**IMMUNOLOGICAL FEATURES OF LPS FROM
Ochrobactrum intermedium ON SHEEP EXPERIMENTALLY
INFECTED WITH *Fasciola hepatica***

J.M. Martínez-Pérez, D. Robles-Pérez, F.A. Rojo-Vázquez* & M. Martínez-Valladares.

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología y Enfermedades Parasitarias).

Facultad de Veterinaria de León / Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

Research in Veterinary Science, 2014. [In Press].

ARTICLE IN PRESS

Research in Veterinary Science ■■ (2014) ■■-■■

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*

J.M. Martínez-Pérez^a, D. Robles-Pérez^a, F.A. Rojo-Vázquez^{a,b}, M. Martínez-Valladares^{b,*}^a Departamento de Sanidad Animal, Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain^b Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca de Marzanas, 24346 Grulleros (León), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2014

Accepted 25 July 2014

Keywords:

Lipopolysaccharide
Ochrobactrum intermedium
Fasciola hepatica
 Cytokines
 IgG1
 Sheep

ABSTRACT

The effects of the lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* in sheep with fasciolosis was reported previously, resulting in lower fecal egg counts and fluke burden. In the current study, we analyzed its immunological effects in two groups of sheep, treated (T) and controls (C). Fasciolosis induces a T helper (Th) type-2 response, characterized by IL-4 and IL-10 production; however, at the beginning of the infection, the IFN- γ production predominates (Th type-1 response). Although we did not find differences in IL-4 production or in the expression level of this gene in the hepatic lymph nodes, the expression level of IL-10 was higher ($P < 0.05$) in the T group at 4 wpi. The IFN- γ production was higher ($P < 0.01$) at 12 wpi as well as its level of expression at 4 wpi ($P < 0.05$) in the T group. We found a higher expression level of TGF- β at 4 wpi in the T group ($P < 0.05$), associated with the previous report of thicker fibrous tracks in a treated group. Immunoglobulin G1, related with a Th type-2 response, was higher ($P < 0.01$) in the T group at 4 and 12 wpi. In conclusion, the effects of LPS from *O. intermedium* could have resulted from a predominant Th type-2 immune response.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The prevalence of fasciolosis is currently rising possibly due to several factors: change in climatic conditions, man-made modifications of the environment and/or increment of anthelmintic resistance (Martínez-Valladares et al., 2013). Although the administration of flukicides is essential, there has been a reported increase in the prevalence of anthelmintic resistance not only by its widespread use, but also due to misuse (Martínez-Valladares et al., 2010). Therefore, new alternatives to anthelmintic therapy should be tested, such as vaccines and immunostimulatory products. The adjuvants are an integral part of most vaccines and can enhance their immunogenicity by stimulating the protective immunity through antibodies and T cell production (Coffman et al., 2010). Immunomodulators (IMMs) are immunostimulating and/or immunosuppressive compounds used to modify the host defense mechanisms against disease causative agents. An IMM which induces endogenous production of cytokines by monocytes and macrophages is the lipopolysaccharide (LPS) (Veremeichenko and Zdorovenko, 2008). Recently, the administration of LPS from *Ochrobactrum intermedium* in sheep infected by *Fasciola hepatica* led to a lower fecal egg count (FEC) and a reduction of the fluke burden, suggesting an increase in the nonspecific resistance to the infection (Martínez-Pérez et al., 2013). Under this context, the aim of this

study was to evaluate the immunological effects of LPS from *O. intermedium* on sheep experimentally infected with *F. hepatica*.

Immunological response was analyzed from a group of 36 Merino sheep experimentally infected with 200 *F. hepatica* metacercariae on day 0 of the trial. The experimental design has been previously described by Martínez-Pérez et al. (2013). Briefly, infected animals were divided into two groups, i) the treated group (T), constituted by 18 sheep treated on day 0 and 15 post infection (pi) with 2 ml of an IMM (6 μ g/ml LPS from *O. intermedium*, strain LMG3306, Laboratorios Ovejero S.A., León, Spain) and ii) the control group (C), 18 sheep treated with a placebo at the same days as the T group. Blood samples were collected from day 0 until the end of the experiment every 4 weeks. Necropsies were carried out at 4 weeks post infection (wpi), in the half of each group, and at 12 wpi, in the half left, to recover the hepatic lymph nodes (HLNs) in all sheep.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from all sheep every 4 weeks (Haçariz et al., 2009a). Cells were stimulated by duplicate with 25 μ l of Concanavalin A (ConA) and/or with *F. hepatica* excreted-secreted (ES) antigen, both at 10 μ g/ml, as well as with 25 μ l of complete medium as control. Culture supernatants were collected after incubation at 37 °C in 5% CO₂ for 72 h. IFN- γ and IL-4 were measured with commercial kits "Bovine IFN- γ Screening Set and Bovine IL-4 Screening Set" (Thermo Fisher Scientific, UK). Results were expressed as the OD ratio between samples stimulated with ConA or *F. hepatica* ES antigen and the complete medium.

The expression level of IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-10 genes was carried out in HLNs at 4 and 12 wpi. ATPase and GAPDH

* Corresponding author. Tel.: +34 987291338; fax: +34 987317161.
 E-mail address: mmavva@unileon.es (M. Martínez-Valladares).

ARTICLE IN PRESS

2

J.M. Martínez-Pérez et al./Research in Veterinary Science (2014) ■■-■■

Table 1
Primers for real-time PCR amplification.

Cytokine	Accession no.	Size (bp)	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
ATPase	X02813	96	TTCCTACTGCCCTGGAATG	CACGAAGATGAGAAGCGAGT
GAPDH	NM_001190390	125	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTGAGCTCAGGGATGACCTT
IL-4	NM_001009313	69	GGGAGGACTTGACAGGAA	ACTCGTCTGGCTTCATTAC
IL-10	NM_001009327	75	CCAGGATGGTGAAGCTGACTAG	TGGCTCTGCTCTCCGAAAC
IFN- γ	NM_001009803	60	CTGCAGATCCAGCGCAA	TGGCGACAGGTGATTCATCA
TGF- β	NM_01009400	133	GAAGTCTAGCTCGCACAGCA	CACGTCTGCTCCACTTTTA

housekeeping genes (HKG) were used as controls (Table 1). The RT-PCR and the analysis of the Ct values were carried out following the specifications of Martínez-Valladares et al. (2012).

Detection of IgG1 was carried out at 0, 4, 8 and 12 wpi. The *F. hepatica* ES antigen from adults was obtained in accordance with the specifications described by Ortiz et al. (2000). Indirect ELISA was carried out according to the protocol described by Sánchez-Andrade et al. (2000).

Data were analyzed using the statistical package SPSS for Windows and were subject to one-way analysis of variance (ANOVA) with the treatment as source of variation. A post-ANOVA analysis (Tukey's honestly significant difference test) was applied when the overall differences were determined.

The aim of the current study was to evaluate the role of LPS from *O. intermedium* on the immune response of sheep experimentally infected with *F. hepatica*. The effects of LPS from *O. intermedium* on fasciolosis in sheep were previously described by Martínez-Pérez et al. (2013). These authors reported that infected sheep treated with this IMM had lower FEC, a reduction of the fluke burden and flukes with smaller sizes at necropsy than untreated infected animals. IMM can modify the immune system by enhancing the host immune response and inducing endogenous production of cytokines against pathogens. It is known that Th type-2 humoral-mediated immune or anti-inflammatory response (Berger, 2000) is typically described in the resistance to parasitic helminth infections (Pleasant et al., 2011; Rojo-Vázquez et al., 2012). Liver fluke infection induces a strongly polarized Th type-2 response associated with an early production of pro-inflammatory cytokines, which contributes to the overall pathophysiological pattern in the host. In this sense, IL-4 is a cytokine functionally associated with a Th type-2 response (Viallard et al., 1999) which favors at the same time the IL-10 production (Schmidt-Weber et al., 1999).

In the present study, after the stimulation with ConA, the IL-4 production was significantly higher in the C group than in the T group ($P < 0.01$) at 12 wpi (Fig. 1c). However, when PBMC were stimulated with *F. hepatica* ES antigen, the IL-4 production was similar between the two groups (Fig. 1d). In a similar way, we did not find differences between groups when the expression level of the gene was analyzed in the HLN at 4 and 12 wpi (Fig. 1e and 1f). In relation to the IL-10, the level of expression of the gene was significantly higher ($P < 0.05$) in the T group at 4 wpi (Fig. 1e).

On the other hand, a Th type-1 cell-mediated or pro-inflammatory response (Berger, 2000) is associated with the presence of IFN- γ (Viallard et al., 1999). In fasciolosis, this immune response is present at the beginning of the infection until 3 wpi (Moreau et al., 1998). In this study, IFN- γ values were similar between groups after the *in vitro* stimulation of PBMC with ConA (Fig. 1a), although significant higher levels were shown in the T group after the stimulation with *F. hepatica* ES antigen at 12 wpi ($P < 0.01$) (Fig. 1b). Regarding the analysis of the expression level of the gene in the HLN, IFN- γ showed higher values in the T group at 4 wpi ($P < 0.05$) (Fig. 1e). In the present study, the higher IFN- γ production in the T group after the *in vitro* stimulation of PMBC with *F. hepatica* ES antigen could be due to the induction by LPS of higher proportions of natural-killer (NK) cells expressing IFN- γ (Kanevskiy et al., 2013). Besides,

both LPS and IFN- γ induce nitric oxide (NO), which promotes the cytotoxic and microbicidal activities of macrophages (Brunet, 2001). O'Neill et al. (2000) reported that the magnitude of the response of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines depends on the fluke burden; the low fluke burden resulted in the study by Martínez-Pérez et al. (2013) coincides with higher IFN- γ values and might be caused by a toxic effect of NO upon the parasite because of its oxidant properties and its ability to react with iron-containing compounds (Beytur et al., 2011).

Comparing the expression levels of all cytokines, the values were higher for IL-4 than for IFN- γ at 4 and 12 wpi, supporting that a Th type-2 cytokine profile persists during fasciolosis, in accordance with Pleasant et al. (2011) and Haçariz et al. (2009a).

The immune response is also controlled by other specialized populations of T regulatory cells, Th type-3 and CD4⁺/CD25⁺ cells (Shevach, 2002). These ones regulate the immune response by several mechanisms, such as the production of IL-10 and TGF- β or via cell contact (Mauri and Ehrenstein, 2008). These two cytokines play a central role in minimizing pathology and enhancing tissue repair during helminth infections acting in synergy (Lee et al., 2002). IL-4 is known to stimulate both IL-10 (Schmidt-Weber et al., 1999) and TGF- β (Kohyama et al., 2001). This fact is shown in the current study after analyzing the higher and similar expression levels of these three cytokines, especially in the T group, in comparison with the lower values in IFN- γ (Fig. 1e and 1f). It is noteworthy that TGF- β also promotes collagen production (Cutroneo, 2007), co-participating with IL-10 in the induction of fibrosis (Flynn et al., 2010). In fasciolosis, the movement of the flukes during the pre-parent period of the infection can be restricted after the inflammation of the bile duct epithelia (Behm and Sangster, 1999). This fact could have been favored by the administration of the LPS from *O. intermedium* in the study by Martínez-Pérez et al. (2013) since the treated group had smaller flukes, lower fluke burden and in liver higher hepatic damage scores characterized by fibrous tracks. The higher expression levels of IL-10 and TGF- β ($P < 0.05$) at 4 wpi (Fig. 1e) in the T group confirmed the way of action of LPS from *O. intermedium* during the pre-parent period of the infection. According to Haçariz et al. (2009a), low levels of TGF- β may cause insufficient collagen production and fibroblastic activity in the liver leading to a higher fluke burden.

Fasciolosis is also characterized by an increase in the production of IgG, especially IgG1 (Clery et al., 1996), which is associated with a Th type-2 immune response (Estes and Brown, 2002). Indeed, the IgG1 response is highly correlated with an early protective immune response in the gut mucosa against newly excysted juveniles (Van Milligen et al., 1999). Our results showed higher IgG1 levels in the T group ($P < 0.01$), principally at 8 wpi. In fact, the higher IgG1 values reported in the T group (Fig. 1g) are in agreement with an upper IgG1 titer in cattle infected by *F. hepatica* (Hoyle et al., 2003) and sheep infected by *F. gigantica* (El-Ahwany et al., 2012), both treated with cysteine proteinases (CP).

Therefore, the LPS from *O. intermedium* could induce a Th type-2 immune response and could act against the parasitic forms in a similar way as adjuvants such as Freund's incomplete adjuvant (FIA), Titer MaxGold (Haçariz et al., 2009b) or CP (El-Ahwany et al., 2012) in sheep or FIA in cattle (Mulcahy et al., 1998).

ARTICLE IN PRESS

J.M. Martínez-Pérez et al./Research in Veterinary Science (2014) ■■■■■

3

Fig. 1. Plasma levels of (a) IFN- γ and (c) IL-4 after stimulation with ConA; (b) IFN- γ and (d) IL-4 after stimulation with *F. hepatica* ES antigen; (e) Cytokine expression levels (IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-10) by RT-PCR in hepatic lymph nodes (HLNs) at 4 weeks post infection (wpi) and (f) at 12 wpi. (g) IgG1 serum antibody response along the study. Data are presented as arithmetic mean $\pm$ SD, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

ARTICLE IN PRESS

4

J.M. Martínez-Pérez et al./Research in Veterinary Science (2014) ■■-■■■

Acknowledgments

This research has been supported by Laboratorios Ovejero, S.A., León (Spain). M. Martínez-Valladares was supported by a postdoctoral Jae-Doc contract from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and co-funded by the European Social Fund.

References

- Behm, C.A., Sangster, N.C., 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, p. 198.
- Berger, A., 2000. Th1 and Th2 responses: what are they? *British Medical Journal* 321, 424.
- Beyrut, E., Akça, A., Gökçe, H.I., 2011. Pathological and immunohistochemical evaluation of the effects of interferon gamma (IFN- γ) and aminoguanidine in rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 35, 243–253.
- Brunet, L.R., 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology* 1, 1457–1467.
- Clery, D., Tongerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71–82.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492–503.
- Cutroneo, K.R., 2007. TGF- β -induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair and Regeneration* 15, S54–S60.
- El-Ahway, E., Rabia, I., Nagy, F., Zoheiry, M., Diab, T., Zada, S., 2012. Protective role of purified cysteine proteinases against *Fasciola gigantica* infection in experimental animals. *The Korean Journal of Parasitology* 50, 45–51.
- Estes, D.M., Brown, W.C., 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90, 1–10.
- Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheikha, H.M., 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Veterinary Parasitology* 169, 235–240.
- Haçariz, O., Sayers, G., Flynn, R.J., Lejeune, A., Mulcahy, G., 2009a. IL-10 and TGF- β 1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunology* 31, 613–622.
- Haçariz, O., Sayers, G., McCullough, M., Garrett, M., O'Donovan, J., Mulcahy, G., 2009b. The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 27, 45–50.
- Hoyle, D.V., Dalton, J.P., Chase-Topping, M., Taylor, D.W., 2003. Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Veterinary Parasitology* 111, 65–82.
- Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A., Kovalenko, E.I., 2013. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Frontiers in Immunology* 4, 11.
- Kotiyama, M., Sugahara, D., Hosokawa, H., Kubo, M., Hazumi, N., 2001. IL-4-mediated development of TGF- β 1-producing cells from naive CD4(+) T cells through a STAT6-independent mechanism. *European Journal of Immunology* 31, 3659–3666.
- Lee, C.G., Homer, R.J., Cohn, L., Link, H., Craft, J.E., Graham, B.S., et al., 2002. Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 35466–35474.
- Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Valcárcel-Sancho, F., Gorzález-Guirado, A.M., Casanova-García de Castro, I., Nieto-Martínez, J.M., et al., 2013. Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 112, 2913–2923.
- Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A., 2010. Efficacy of nitroxylin against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitology Research* 107, 1205–1211.
- Martínez-Valladares, M., Geldhof, P., Jonsson, N., Rojo-Vázquez, F.A., Skuce, P., 2012. *Tetadorsagia circumcincta*: molecular characterisation of the Δ rr-148 subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2, 154–161.
- Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez, C., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., et al., 2013. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites & Vectors* 6, 282.
- Mauri, C., Ehrenstein, M.R., 2008. The 'short' history of regulatory T cells. *Trends in Immunology* 29, 34–40.
- Moreau, E., Chauvin, A., Boulard, C., 1998. IFN gamma and IL-10 production by hepatic lymph node and peripheral blood lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite (Paris, France)* 5, 307–315.
- Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J., et al., 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16, 932–939.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H.G., et al., 2000. *Fasciola hepatica* infection down-regulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology* 22, 147–155.
- Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J., Williams, D.J.L., 2000. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 93, 121–134.
- Pleasant, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E., Piedrafitra, D., 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunology* 33, 495–505.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 189, 15–38.
- Sanchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morondo, P., 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* 93, 39–46.
- Schmidt-Weber, C.B., Alexander, S.I., Henault, L.E., James, L., Lichtman, A.H., 1999. IL-4 enhances IL-10 genes expression in murine Th2 cells in the absence of TCR engagement. *The Journal of Immunology* 162, 238–244.
- Shevach, E.M., 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews. Immunology* 2, 389–400.
- Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B.W.J., Bokhout, B.A., 1999. Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunology* 21, 243–251.
- Veremichenko, S.N., Zdorovenko, G.M., 2008. Specific structural features and immunomodulatory properties of the Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44, 571–579.
- Viallard, J.F., Pellegrin, J.L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., et al., 1999. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical & Experimental Immunology* 115, 189–195.

**EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH
FLAXSEED OIL OR VITAMIN E ON SHEEP
EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Fasciola hepatica***

J.M. Martínez-Pérez, D. Robles-Pérez, J. Benavides, L. Morán, S. Andrés, F.J. Giráldez,
F.A. Rojo-Vázquez & M. Martínez-Valladares*.

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología y Enfermedades Parasitarias).
Facultad de Veterinaria de León / Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

Research in Veterinary Science, 2014; 97 (1): 71-79.

Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*

J.M. Martínez-Pérez^a, D. Robles-Pérez^a, J. Benavides^b, L. Morán^b, S. Andrés^b,
F.J. Giráldez^b, F.A. Rojo-Vázquez^{a,b}, M. Martínez-Valladares^{b,*}

^a Departamento de Sanidad Animal, Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain

^b Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 Grulleros (León), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2014

Accepted 25 May 2014

Keywords:

Fasciola hepatica

Flaxseed oil

Vitamin E

Immune system

Sheep

ABSTRACT

The effects of two diets supplemented with flaxseed oil (FO) or vitamin E (VE) were studied in sheep infected with *Fasciola hepatica*. The control group (CO), not supplemented, had higher weight gain and faecal egg count ($P < 0.05$) at the end of the study. At necropsy, the number (71.2 ± 26.5) and size of flukes were lower in the FO group ($P < 0.01$), probably due to the higher levels of white blood cells and lymphocytes ($P < 0.01$). This group also had higher red blood cell and haematocrit values ($P < 0.01$). The CO group had more severe hypoproteinaemia and hypoalbuminaemia, due to having the highest fluke burden (123.0 ± 35.2), and also the highest IgG1 titre ($P < 0.01$). The diet did not affect production or gene expression levels of IFN- γ and IL-4. On the other hand, the supplementation with VE led to a reduction in adult fluke burden (97.7 ± 39.9) and lower lipid oxidation in the liver ($P < 0.001$).

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciolosis is a parasitic disease caused by the common fluke *Fasciola hepatica*. This trematode invades the liver parenchyma and bile ducts, both in herbivorous animals and humans. In small ruminants, fasciolosis reduces growth and milk production and has negative effects on health status, leading to high morbidity and mortality (Cordero del Campillo and Rojo-Vázquez, 1999).

Although control strategies are mainly based on the administration of anthelmintic drugs, the misuse of these treatments has led to the development of anthelmintic resistance. In fact, livestock producers are under considerable pressure to reduce or eliminate the use of flukicides because of the increasing public concern regarding the emergence of anthelmintic resistance and contamination in the food chain; therefore, new alternative methods to control the infection should be taken into account. For example, it has been known that nutrition affects all physiological processes in cattle, including the immune system (Carroll and Forsberg, 2007). Also, protein supplementation can increase resilience and resistance (Martínez-Valladares et al., 2005) as well as the feed intake of animals infected by helminths (Orellana et al., 1999). The quantity and nature of the diet can influence parasite survival in the host, since some plants contain condensed tannins with anthelmintic properties (Niezen et al., 1993).

On the other hand, the omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may act as immunomodulators (IMMs) since they can induce endogenous production of cytokines against viral, bacterial, parasitic, and fungal diseases (Masihi, 2000). They have been commonly used to enhance the immune response and animal welfare in laboratory models, poultry (Cortinas et al., 2005), and even in humans (Valk and Hornstra, 2000), on their own or administered with antioxidants (Grau et al., 2001).

Lesions caused by *F. hepatica* in the liver are associated with chemical alterations in cells, such as peroxidation of membrane lipid (Rehim et al., 2003). The host reacts to *F. hepatica* infection, stimulating leukocytes (Kolodziejczyk et al., 2006) and activating mechanisms associated with the generation of reactive oxygen species (ROS), including superoxide radicals, nitric oxide, and hydrogen peroxide (Abo Shousha et al., 1999). At the same time, these ROS provoke cellular damage and reduce the availability of antioxidants such as glutathione or vitamins A, C, and E (VE) (Kolodziejczyk et al., 2005, 2006; Maffei Facino et al., 1993), which may augment the generation of free radicals, with consequent lipid peroxidation. Suppression of the antioxidant system and higher ROS generation lead to oxidative stress, whose consequences include oxidative modifications of cell components, mainly lipids (Kolodziejczyk et al., 2006).

As natural antioxidant mechanisms are not enough to quench the excess ROS, the host needs a supply of additional substances such as antioxidants and/or IMMs to regulate the inflammatory response (Gabrashanska et al., 2008; Mori and Beilin, 2004). Immune cells are sensitive to oxidative stress because their membranes contain high concentrations of PUFAs that are very susceptible to

* Corresponding author. Tel.: +34 98729 1338; fax: +34 98729 1304.
E-mail address: mmarva@unileon.es (M. Martínez-Valladares).

peroxidation, producing large amounts of ROS (Poli, 2000; Spears and Weiss, 2008). Some plants such as flax contain antioxidants (Morán et al., 2012) and omega-3 PUFAs that could offset the effect of ROS, preventing lipid oxidation (Cortinas et al., 2005). On the other hand, α -tocopherol or VE is the most efficient scavenger of peroxyl radicals in phospholipid bilayers (Eid et al., 2008), protecting cells from lipoperoxidative damage induced by ROS (Gabrashanska et al., 2008).

In this context, in the current study we investigated the pathological and immunological effects of two different diets on fasciolosis in sheep. The first diet was supplemented with flaxseed oil (FO) (3%) and the second was supplemented with VE (0.06 g/kg dry matter [DM]).

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

The present study was carried out with 30 5-month-old male Merino sheep purchased from a flock without previous history of liver fluke infection and previously treated with a single oral dose of triclabendazole (10 mg/kg) and levamisole hydrochloride (7.5 mg/kg) (Endex®, Novartis, Switzerland). At the beginning of the study, no clinical signs of parasitic or infectious diseases were observed, and faecal analyses (flotation and sedimentation) were negative in all animals.

Animals were experimentally infected on day 0 with 200 *F. hepatica* metacercariae in a gelatine capsule administered individually using a dosing gun. The metacercariae were supplied by the Ridgeway Research Ltd. (Lydney, UK).

Sheep were weighed 1 week before the beginning of the study and divided according to their body weight (BW) into three homogeneous groups of 10 sheep each. The first group was supplemented with FO (3%), the second one with VE (0.06 g/kg DM), and the last group was maintained without additives as a control group (CO). Sheep were fed these diets from 6 weeks before the infection until the end of the study. All animals were slaughtered at 14 weeks post infection (wpi) through intravenous injection with a lethal dose of 20 ml per sheep of sodium pentobarbital (Dolethal®, Vétoquinol, France).

The study was carried out at the animal facilities of the Instituto de Ganadería de Montaña, located in León (Spain). All sheep were handled in accordance with animal ethics guidelines.

2.2. In vivo measurements

Throughout the study, BW and body condition (BC) were measured every 2 weeks. Weight gain (WG) was calculated after subtracting the arithmetic mean of BW values at day 6 before the beginning of the study from BW data obtained at 14 wpi. BC was evaluated by scoring between 0 and 5, as described by Russel et al. (1969), and always by the same person in order to avoid inter-assessor variation.

Faecal samples were taken directly from the rectum three times a week from 7 to 13 wpi. The number of *F. hepatica* eggs was calculated by a standard sedimentation method using a McMaster chamber (MAFF, 1986). The cumulative faecal egg count (FEC) was carried out following the specifications by Vercruysse et al. (1993).

2.3. Haematological and biochemical parameters

Blood samples were taken by jugular venipuncture using 5 ml EDTA Venoject vacuum tubes (BD vacutainers) and 5 ml Venoject vacuum tubes, without anticoagulant, to obtain serum, from all sheep every 2 weeks until the end of the study. The blood was processed immediately using the automated haematology cell analyser Medonic

CA 530 (Boule Diagnostics AB, Sweden) to determinate the following haematological parameters: red blood cells (RBC); haematocrit (HCT); white blood cells (WBC); lymphocytes (LYMPH); mean corpuscular haemoglobin (MCH); and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC).

Serum samples from 0, 4, 8, and 12 wpi were analysed at the Laboratorio de Técnicas Instrumentales of the University of León (LTI) to determine the levels of total protein (TP), albumin (ALB), and the following hepatic enzymes: gamma-glutamyl transferase (GGT) and alanine aminotransferase (ALT).

2.4. Detection of serological Ig (immunoglobulin) G1

The excretory-secretory (ES) antigen from *F. hepatica* adults was obtained following the technique described by Ortiz et al. (2000). Protein concentration was estimated by the Bradford (1976) protein assay.

Indirect ELISAs using this *F. hepatica* ES antigen were performed in 96-well polystyrene microtitre plates (Sigma, Missouri, USA). The *F. hepatica* ES antigen concentration used to coat each well was 1 µg/ml, diluted in 100 µl PBS, and plates were stored overnight at 4 °C. After discarding the content, plates were blocked with 200 µl PT-milk (2 g powdered milk + 100 ml PT) (PT: 1 l PBS pH 7.4 + 0.1% Tween-20) for 30 min at 37 °C. Then, the blocking buffer was discarded and 100 µl serum diluted 1/100 in PT-milk was added. Plates were incubated for 30 min at 37 °C. After washing the plates four times with PT, 100 µl of peroxidase-conjugated donkey anti-sheep IgG1 antibody (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), at a dilution of 1/1500 in PT-milk, was added. Following incubation for 30 min at 37 °C, the plates were washed again with PT and distilled water, and 100 µl substrate consisting of 12 ml citrate buffer with 10 mg ortho-phenylenediamine (OPD) and 10 µl 30% hydrogen peroxide was added. The plates were incubated in the dark for 5 min at room temperature until the enzymatic reaction was stopped with 100 µl per well of 3N sulphuric acid. Optical density (OD) values were read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan, USA) at 492 nm. Serum samples from all the sheep in the study were used as positive controls, while sheep free of liver flukes were used as negative controls. Both positive and negative controls were included in every plate and analysed in duplicate.

2.5. Isolation and stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and quantification of cytokines (IL-4/IFN- γ)

For culture of PBMCs, 20 ml blood were collected into lithium heparin vacutainers. Blood was mixed with 30 ml PBS and then PBMCs were isolated by centrifugation in density gradients (Lymphoprep, Axis-Shield, UK). The PBMCs recovered were washed three times in Hank's balanced salt solution (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and resuspended in complete medium consisting of RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) with 10% FCS (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). PBMCs were counted with an automated cell counter (BioRad, Madrid, Spain) and 1 ml of 10^6 cells/ml was added to each well of a 24-well plate. Cells were stimulated in duplicate with 25 µl Concanavalin A (ConA) at 10 µg/ml, and after infection, they were also stimulated with *F. hepatica* ES antigen at 10 µg/ml or with 25 µl complete medium as control. Culture supernatants were collected after incubation at 37 °C in 5% CO₂ for 72 h and then stored at -20 °C until cytokine quantification.

IFN- γ and IL-4 cytokine secretion was measured in the culture supernatant using the commercial kits Bovine IFN- γ Screening Set and Bovine IL-4 Screening Set (Thermo Fisher Scientific, UK) following the manufacturer's instructions. The results for each animal are expressed as the ratio of OD between samples stimulated with ConA or *F. hepatica* ES antigen and complete medium.

2.6. Necropsy

After slaughter at 14 wpi, a complete necropsy of all animals was performed according to standard procedures. Livers were weighed and scored from 0 to 4 points, depending on the level of macroscopic lesions (0: absence of lesions in tissue; 4: severe proliferation of fibrous connective tissue). Flukes present in livers and gallbladders were recovered. The main bile ducts on the liver surface were opened, the liver was squeezed manually to release flukes, and all flukes were collected into physiological saline solution. Livers were cut into 1–2 cm slices and squeezed manually to release the remaining mature flukes. Then, the slices were cut into 25 cm³ cubes, macerated, and passed through a 300 µm sieve to recover immature flukes (Clery et al., 1996; Haçariz et al., 2009). Recovered flukes from each sheep were counted and classified according to their size: 1–5 mm, 5–10 mm, and >10 mm. Counts also included any pieces identified as fluke heads and/or tails, although only those pieces found in higher number (heads or tails) were taken into account for the total count. At necropsy, hepatic lymph nodes (HLNs) were also recovered and weighed.

2.7. Cytokine quantification by real-time PCR

A quantitative real-time PCR using SYBR® Green detection was designed for IL-4 and IFN-γ transcript profiling, using two house-keeping genes (HKGs), adenylypyrophosphatase (ATPase) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as controls. Previously, total RNA was extracted from RNAlater-conserved HLNs according to the manufacturer's Trizol protocol (Sigma-Aldrich, USA) and then treated with 10 U amplification grade RNase-free DNase 1 (Fermentas, Spain) to remove any contaminating genomic DNA. After quantifying the RNA with a Nanodrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), 1 µg total RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, USA).

Real-time analysis was carried out using the StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Spain). PCR amplification mixtures (25 µl) contained 2 µl cDNA, 400 nM forward/reverse HKG and specific primers (Table 1), and 12.5 µl Master Mix (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Spain). The cycling conditions comprised a 10 min denaturation and polymerase activation step at 95 °C and 40 cycles of 95 °C for 15 s, 66 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Upon completion of the amplification program, a dissociation analysis (52–95 °C) was performed to determine the purity of the PCR amplicons. To estimate amplification efficiencies, a standard curve was generated for each primer pair based on known quantities of cDNA. The experiments were performed in triplicate. All assays included a standard curve, a no-template control, and each of the test cDNAs.

Raw Ct values for the real-time PCR were transformed to concentrations using the comparative Ct method and specific PCR efficiencies by the geNorm application (Van Zeven et al., 2007) which was downloaded from <http://www.medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>. Differential gene expression was considered significant when the 95% confidence interval of the mean normalised expression levels did not overlap (equivalent to $P < 0.05$).

2.8. Histopathology

Samples of the left hepatic lobe were taken for histological examination and fixed in 10% buffered formalin for at least 24 h at room temperature, embedded in paraffin wax, and cut into sections of 4 µm thickness. Paraffin sections were stained with the haematoxylin and eosin (H&E) method.

2.9. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis

Lipid peroxidation was determined by the TBARS procedure on freeze-dried liver samples according to the technique described by Bodas et al. (2012). The results are expressed as mg malondialdehyde (MDA)/g liver.

2.10. Statistical analysis

The basic descriptive statistics for each parameter (arithmetic mean and standard deviation [SD]) were calculated. The Kolmogorov–Smirnov test was carried out to determine if data were normally distributed. FEC was transformed to $\ln(X+1)$ in order to produce approximately normally distributed data. All the data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) with diet as the only source of variation, using the statistical package SPSS for Windows. When the overall differences were determined, a post-ANOVA analysis using Tukey's honestly significant difference test was applied. All statistical analyses were considered significant at the $P < 0.05$ level.

3. Results

One lamb from the group supplemented with FO was not correctly infected after oral administration of the metacercariae due to regurgitation of the gelatin capsule; therefore, this animal was eliminated from the assay and the group consisted of nine sheep.

3.1. In vivo measurements

At the end of the study, the WG was significantly greater in the CO group (17.3 ± 4.1 kg) ($P < 0.05$) than in the other two groups (FO group 12.0 ± 3.5 kg; VE group 16.4 ± 1.2 kg). In relation to BC, although there were no significant differences among groups, FO sheep (3.3 ± 0.5) had the highest values at the end of the study (VE group 3.3 ± 0.4 ; CO group 3.2 ± 0.4).

The evolution of the FEC in each group is shown in Fig. 1. Egg output was first detected in faeces at 9 wpi in sheep from the FO and CO groups, while in the VE group patency started the following week. At 13 wpi, the CO group had higher eggs per gram (epg) values than the other groups ($P < 0.05$). After analysing the cumulative FEC, the arithmetic means in the FO, VE, and CO groups were $515.8 (\pm 430.0)$ epg, $427.2 (\pm 204.6)$ epg, and $521.3 (\pm 310.4)$ epg, respectively, with no significant differences between them.

Table 1
Primers for real-time PCR amplification.

Cytokine	Accession no.	Size (bp)	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
ATPase	X02813	96	TTCTACTGCCCTGGAATG	CACGAAGATGAGAGCGGAGT
GAPDH	NM_001190390	125	ACCCAGAAAGACTGTGGATGG	TTGAGCTCAGGGATGACCTT
IL-4	NM_001009313	69	GGCAGGACTTGACAGGAA	ACTCGTCTTGGCTTCATTCAC
IFN-γ	NM_001009803	60	CTGCAGATCCAGCGCAAA	TGGCGACAGTCATTCATCA

Fig. 1. Faecal egg count (FEC) during *F. hepatica* infection from 9 to 13 weeks post-infection (wpi). Figure shows arithmetic mean $\pm$ standard deviation, * $P < 0.05$.

3.2. Haematological and biochemical parameters

RBC: Parameters in all groups were within the normal range ($11\text{--}13 \times 10^6/\mu\text{l}$) (Schalm et al., 1981) until 2 wpi; then, RBC values decreased suddenly, with a slight increase at 12 wpi (Fig. 2a). From that week until the end of the study, the FO group had significantly higher values than the others ($P < 0.01$).

HCT: This parameter was within the normal range (30–45%) (Schalm et al., 1981) at 0, 2, and 12 wpi (Fig. 2b). There was a considerable decrease from the beginning of the study, with two increases at 6 and 12 wpi. Similar to RBC data, the FO group had higher significant values than the others from 10 wpi to the end of the trial ($P < 0.01$).

WBC: In all groups, values were above the normal range ($2.5\text{--}7.5 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Schalm et al., 1981) during the whole study (Fig. 2c). During the study, the FO group showed higher values, with two considerable increases between 6 and 10 wpi ($P < 0.01$).

LYMPH: There was an increase from the beginning of the study until 8 wpi, when a continuous decrease was evident (Fig. 2d). The evolution in VE and CO groups was similar throughout the study, while the FO group showed substantial increments between 6 and 10 wpi ($P < 0.01$), with values higher than the normal range (2000–9000/ μl) (Radostits et al., 2000).

MCH and MCHC (data not shown): According to the MCH (haemoglobin/RBC) values, all groups exceeded the normal range (8–12 pg) (Merck Veterinary Manual, 2000) from 4 wpi. At the end of the study, the VE group had the highest values ($P < 0.01$).

With regard to MCHC (haemoglobin $\times 100/\text{HCT}$), the pattern throughout the study was similar to that of MCH, with values higher than the normal range (31–33 g/dl) (Schalm et al., 1981) from 4 wpi. As with MCH data, the VE group had the highest values ($P < 0.01$) at the end of the trial.

Fig. 2. Haematological parameters throughout the trial (arithmetic mean $\pm$ standard deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (a) Red blood cells [RBC] (normal range $11\text{--}13 \times 10^6/\mu\text{l}$); (b) haematocrit [HCT] (normal range 30–45%); (c) white blood cells [WBC] (normal range $2.5\text{--}7.5 \times 10^3/\mu\text{l}$); (d) lymphocytes [LYMPH] (normal range 2000–9000/ μl).

Fig. 3. Biochemical parameters along the assay (arithmetic mean $\pm$ standard deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (a) Total protein [TP] (normal range 6–7.5 g/dl); (b) albumin [ALB] (normal range 2.7–3.7 g/dl); (c) alanine aminotransferase [ALT] (normal range 7–24 IU/l); (d) gamma-glutamyl transferase [GGT] (normal range 21–44 IU/l).

TP: Levels were below the normal range (6–7.5 g/dl) (Benjamín, 1984), with the exception of 4 wpi in FO and VE groups, when values were within the normal range (Fig. 3a). During the study, the FO group showed higher values in comparison with the other two groups, especially at 4 wpi ($P < 0.01$).

ALB: Almost all data were below the normal range (2.7–3.7 g/dl) (Benjamín, 1984), except at 4 wpi in FO and VE groups when values were within the normal range (Fig. 3b). As with TP values, the FO group showed the highest ALB levels during the trial, especially at 4 wpi ($P < 0.01$).

ALT: Values were $10.5 (\pm 3.3)$ IU/l, $7.3 (\pm 2.3)$ IU/l, and $8.0 (\pm 3.2)$ IU/l in FO, VE, and CO groups, respectively, at the end of the study (Fig. 3c), all within the normal range of 7–24 IU/l (Benjamín, 1984). In the FO group, there were significant differences at 4 ($P < 0.01$) and 12 wpi ($P < 0.05$), with the highest in comparison with the other two groups.

GGT: Values at the end of the study were higher than the reference values (21–44 IU/l) (Kaneko, 1980; Sykes et al., 1980). Throughout the study, significant differences were reported, with the highest values in the FO group at 4 ($P < 0.01$) and 8 wpi ($P < 0.05$) (Fig. 3d).

3.3. IgG1 serum antibody response

Significant differences ($P < 0.01$) were shown throughout the trial among the three groups (Fig. 4). The highest values were found in the CO group during the whole study.

3.4. Plasma levels of IFN- γ and IL-4

IFN- γ : After stimulation with ConA, significant differences ($P < 0.01$) were found at the beginning of the study (week 0), with higher values in the VE group in comparison with the other groups. At the end of the experiment, at 12 wpi, the CO group showed the

Fig. 4. Immunoglobulin (Ig) G1 serum antibody response (arithmetic mean $\pm$ standard deviation, ** $P < 0.01$) during the study.

Fig. 5. Plasma levels of (a) interferon-gamma (IFN- γ) and (c) interleukin-4 (IL-4) after stimulation with Concanavalin A (ConA); (b) IFN- γ and (d) IL-4 after stimulation with *E. hepatica* excretory–secretory (ES) antigen. Figures show arithmetic mean $\pm$ standard deviation, ** $P < 0.01$.

highest levels (Fig. 5a). With regard to the stimulation of PBMCs with *E. hepatica* ES antigen, significant differences ($P < 0.01$) were also observed at the beginning of the experiment (week 0), with the highest values in the VE group (Fig. 5b).

IL-4: After stimulation with ConA, significant differences ($P < 0.01$) were shown at week 0, with lower values in FO and CO groups in comparison with the VE group. However, the CO group had the highest levels at 12 wpi (Fig. 5c). After stimulation of PBMCs with *E. hepatica* ES antigen, significant differences ($P < 0.01$) were found between the groups at week 0, with the highest values in the VE group (Fig. 5d).

3.5. Necropsy

At necropsy (14 wpi), significant differences were found between the mean liver weight of each group ($P < 0.01$): between the mean weight in the FO group (799.3 ± 75.0 g) and the mean in the VE group (946.9 ± 68.1 g) ($P < 0.01$) or the mean in the CO group (921.4 ± 133.8 g) ($P < 0.05$).

Significant differences were also shown in relation to superficial macroscopic liver damage ($P < 0.05$). The lesions characterised by fibrous tracks in the FO group were more intense/severe (3.1 ± 0.9) than those in the CO group (2.4 ± 0.5) ($P < 0.05$). The lesions in the VE group had intermediate values (2.7 ± 0.5).

There was no significant difference in the mean weight of HLNs between the groups, although the VE group had a higher value (29.4 ± 9.2 g) than CO (27.3 ± 12.9 g) and FO (25.2 ± 7.9 g) groups.

The arithmetic mean of flukes recovered per sheep was significantly different between the groups ($P < 0.05$). In the CO group, the mean was significantly higher (123.0 ± 35.2 ; range: 65–190) than in the FO group (71.2 ± 26.5 ; range: 21–115) ($P < 0.01$). The mean in the VE group was $97.7 (\pm 39.9)$; range: 18–170).

Flukes were classified according to their size (Fig. 6). Significant differences were shown in the mean number of flukes with a size of 1–5 mm and the heads/tails recovered ($P < 0.01$), as well as in the mean number of flukes with a size >10 mm ($P < 0.05$).

3.6. Cytokine expression levels (IFN- γ and IL-4) by real-time PCR

IFN- γ : Values were similar among groups, with no significant differences between them (Fig. 7a).

IL-4: Although there were higher values in the CO group, no significant differences were reported among groups (Fig. 7b).

3.7. Histopathology

Different types of lesion were macroscopically observed according to the involvement of hepatic parenchyma, capsule, and ducts, and the gross characteristics of the macroscopic changes. These lesions varied from acute necrotic lesions and subacute lesions with fibrous perihepatitis to chronic lesions with calcified tracts and cholangiectasis. Besides, focal lesions with fibrous scars were found in some livers. There were no significant differences among the groups.

On the other hand, histopathological study of samples of the left lobe mainly showed severe hepatitis with a mixed inflammatory

Fig. 6. Fluke burden at necropsy according to size (arithmetic mean $\pm$ standard deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Fig. 7. Cytokine expression levels by real-time PCR of (a) IFN- γ and (b) IL-4.

component (LYMPHS, macrophages, eosinophils, and neutrophils). While FO and VE groups mainly showed purulent or mixed damage, livers from the CO group generally had non-purulent characteristics, although there were no significant differences among the groups.

Histological lesions could be classified as mild, moderate, or severe in relation to the extension inflammatory infiltrate. Besides, these changes found in the liver were also classified into different patterns, depending on the characteristics of the inflammatory reaction and proliferation of connective tissue: periportal, when the infiltration of cells appeared mainly around the periportal areas; diffused-periportal, when this infiltrate extended beyond the periportal areas; diffused, when all the hepatic parenchyma, regardless of its location, showed a diffuse infiltrate of inflammatory cells; and evidence of tracts, when focal areas of necrotic debris limited by inflammatory cells were randomly distributed within the parenchyma. There were no clear differences between the three groups in the severity or lesional patterns found, although it was subjectively noticed that infiltration of polymorphonuclear leukocytes was more frequent in the liver in FO and VE groups compared with the CO group.

3.8. TBARS

TBARS showed significantly lower levels of lipid oxidation ($P < 0.001$) in livers of sheep belonging to the VE group ($0.9 \pm 0.1 \mu\text{g MDA/g}$) in contrast to livers of CO (2.4 ± 0.3) and FO ($2.3 \pm 0.4 \mu\text{g MDA/g}$) groups.

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the pathological and immunological effects of two different diets on sheep experimentally infected by *F. hepatica*. The first diet was supplemented with FO (3%) and the second with the antioxidant VE. The omega-3 PUFAs in FO act as IMM by boosting the immune response, enhancing host defences, and targeting pathogens directly (Mori and Beilin, 2004). On the other hand, VE is an antioxidant that reduces the oxidative stress in tissues and prevents lipid oxidation (Eid et al., 2008). It is known that supplementation with VE and/or omega-3 PUFAs can reduce the negative consequences provoked by the generation of ROS in tissues during host defence (Cortinas et al., 2005; Mori and Beilin, 2004).

The results from the current study show the effects of omega-3 PUFAs and VE supplementation on fasciolosis. The most impor-

tant finding is the significant reduction of the adult fluke burden in both supplemented groups and especially in the FO group ($P < 0.01$). These results are similar to those obtained after treating sheep infected by *F. hepatica* with an IMM, the LPS from *Ochrobactrum intermedium* (Martínez-Pérez et al., 2013). In this study, a relevant reduction in fluke burden was also shown. The effects of a supplemented diet on reducing the worm burden after infection by other helminthes, gastrointestinal nematodes (GINs), were also evaluated in small ruminants during the administration of forages such as *Schinopsis balansae* (Athanasiadou et al., 2001) or *Lespedeza cuneata* (Min et al., 2005). Valderrábano et al. (2010) suggested that in *Artemisia absinthium* or *Onobrychis viciifolia* forages, besides the presence of condensed tannins in their content, there are other specific compounds with different anthelmintic activities that affect the establishment and development of incoming larvae or have an indirect effect on the immune response. In the current study, it is noteworthy that the flukes recovered from FO and VE groups were significantly smaller ($P < 0.05$) than those from the CO group, suggesting that both supplements could have interfered with the development of the flukes.

The first excretion of eggs in faeces was at 9–10 wpi, in accordance with other studies that suggested that patency started at 8 wpi (Rojo-Vázquez et al., 2012; Valero et al., 2009). Significant differences were shown in the FEC at the end of the study in the supplemented groups ($P < 0.05$). In sheep infected by GIN, some studies have shown a reduction in the FEC after supplementation of the diet with forages such as *S. balansae* or *Lotus pedunculatus* (Athanasiadou et al., 2001, 2005) and *Trifolium pratense/repens* (Marley et al., 2005). However, supplementation with New Zealand native flaxseed (*Phormium tenax*) or VE in cattle and sheep infected with GIN, respectively, as well as supplementation with *Beta vulgaris* leaves and *T. pratense* in cattle with fasciolosis, did not have any effect on FEC (Litherland et al., 2008; MacGillivray et al., 2011; Orellana et al., 1999).

RBC and HCT counts were below the normal range at several time points, supporting previous analysis of fasciolosis in sheep (Martínez-Valladares et al., 2010b). At the end of the trial, the FO group showed significantly higher RBC and HCT values ($P < 0.01$) than the other groups, probably due to the lower fluke burden in this group. Also in the FO group, between 6 and 10 wpi, significant increases were found in the WBC and LYMPH values ($P < 0.01$), which could have influenced fluke development.

In the current study, the CO group showed significantly higher WG values at the end of the study compared with the other two groups ($P < 0.05$). This observation could be the result of the higher

fluke burden which led to oedemas and ascites, due to the presence of more severe hypoproteinaemia and hypoalbuminaemia in this group (Fig. 3a and b). Fluid accumulation in interstitial space can influence the WG, but not the BC, which was similar in all groups. The lowest values of ALB and TP reported in the CO group are in accordance with the study of Martínez-Valladares et al. (2010b), who also experimentally infected sheep with *F. hepatica*. ALB synthesis in the liver decreases in conditions of hepatic infection and injury; therefore, hypoalbuminaemia is associated with inflammation and oxidative stress situations (Danielski et al., 2003; Sahin and Kucuk, 2001). The decrease in ALB levels throughout the study was less marked in the FO and VE groups, probably because they had a lower fluke burden, but this result may also be influenced by the effect of supplementation on ROS. In line with this, antioxidant levels were significantly higher in the VE group than in the other groups ($P < 0.001$), which could have helped to maintain liver integrity. The TBARS results are in accordance with other studies in poultry supplied with PUFAs and VE (Cortinas et al., 2005; Grau et al., 2001); these authors reported a reduction of TBARS values as a consequence of dietary intake of VE.

In order to evaluate the liver damage induced by the trematode, levels of hepatic enzymes were determined. ALT is associated with hepatic tissue destruction, as a consequence of the parenchymal migration of flukes during the first stage of fasciolosis (Ferre et al., 1994). In the current study, the higher ALT values in the FO group at 4 wpi could be related to the supplementation favouring the migration of immature flukes. This consequence was also reported after the administration of an IMM, the LPS of *O. intermedium*, in sheep with fasciolosis (Martínez-Pérez et al., 2013). On the other hand, GGT is associated with the presence of flukes in the bile ducts, which leads to proliferative cholangitis (Ferre et al., 1996). In this study, GGT values were above normal levels in all groups, especially in the FO group and in the second half of the trial, confirming the presence of adult flukes in the bile ducts (Haçariz et al., 2009; Martínez-Pérez et al., 2013; Martínez-Valladares et al., 2010a). Although the highest GGT values at 8 wpi were shown by the FO group, the increment between 8 and 12 wpi was higher in the CO group (95.97%) than in the FO group (47.0%), probably because of the higher number of adult flukes in the CO group at the end of the study.

The production of a predominant IgG1 or IgG2 antibody isotype is commonly used to determine whether a T-helper (Th) type 2 or type 1 immune response is induced, respectively (Estes and Brown, 2002). Infection by *F. hepatica* is characterised by an increase in the production of IgG, especially IgG1 (Bossaert et al., 2000; Clery et al., 1996). In the present study, the supplementation with FO and VE reduced production of this antibody in sheep with fasciolosis. Similar results were reported by Hidioglou et al. (1995) in calves after the administration of VE. However, Reffett et al. (1988) and Hogan et al. (1993) found that VE injection had no effect on IgG1 values in sheep and cows, respectively.

Although liver fluke infection induces a strongly polarised Th type 2 response, associated with production of pro-inflammatory cytokines (IL-4), fasciolosis is also associated with an early Th type 1 response (IFN- γ) (Tliba et al., 2002). When the Th type 1 response is downregulated, at around 2–4 wpi, Th type 2 cytokines are upregulated (Flynn et al., 2007; Rojo-Vázquez et al., 2012), leading to protective immunity and, accordingly, a reduction in fluke burden (Moreau and Chauvin, 2010). According to O'Neill et al. (2000), the magnitude of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses depends on the fluke burden. After *in vitro* stimulation of PBMCs, we showed that the VE supplementation favoured a higher IFN- γ and IL-4 production at the beginning of the study ($P < 0.01$), before carried out the infection. However, during the infection, none of both diets had a significant effect on cytokine production or the expression levels of their genes. Although not significantly, the higher

expression level of IL-4 in the CO group was related to a Th type 2 response, as the highest IgG1 levels at the end of the trial were found in this group. Comparing the expression levels of these cytokines, the values were higher for IL-4 than for IFN- γ at the end of the study, supporting the idea that a Th type 2 cytokine profile persists during fasciolosis, in accordance with Haçariz et al. (2009) and Pleasance et al. (2011).

In conclusion, the administration of FO in sheep experimentally infected by *F. hepatica* led to a reduction in adult fluke burden, smaller flukes recovered at necropsy, and lower FEC at the end of the trial. These results could be due to the increase in WBC and LYMPH production in this group in the middle of the infection. On the other hand, supplementation with VE also led to a reduction in adult fluke burden and lower lipid oxidation in the liver.

Acknowledgements

Financial support received from 'Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León' (Project CSI185B11-2) is gratefully acknowledged. J. Benavides and M. Martínez-Valladares have a JAE-Doc contract and L. Morán was supported by a JAE-Predoc grant from the CSIC under the programme 'Junta para la Ampliación de Estudios' (CSIC-European Social Fund).

References

- Abo Shousha, S., Khalil, S.S., Rashwan, E.A., 1999. Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29, 149–156.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99, 205–219.
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127, 233–243.
- Benjamin, M.M., 1984. *Manual de parasitología clínica veterinaria*. Limusa Editorial, México, p. 135.
- Bodas, R., Prieto, N., Jordán, M.J., López-Campos, Ó., Giráldez, F.J., Morán, L., et al., 2012. The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal* 6, 863–870.
- Bossaert, K., Fami, F., Leclipteus, T., Protz, M., Lonnen, J., Losson, B., 2000. Humoral immune response in calves to single dose trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87, 103–123.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Carroll, J.A., Forsberg, N.E., 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 23, 105–149.
- Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 62, 71–82.
- Cordero del Campillo, M., Rojo-Vázquez, F.A., coords., 1999. *Parasitología Veterinaria*. Interamericana Editorial, Madrid, 968 pp.
- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., Baucells, M.D., 2005. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Science* 84, 48–55.
- Danielski, M., Ikizler, T.A., McMonagle, E., Kane, J.C., Pupim, L., Morrow, J., et al., 2003. Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *American Journal of Kidney Diseases* 42, 286–294.
- Eid, Y., Ebeid, T., Moawad, M., El-Habbak, M., 2008. Reduction of dexamethasone-induced oxidative stress and lipid peroxidation in laying hens by dietary vitamin E supplementation. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 20, 28–40.
- Estes, D.M., Brown, W.C., 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90, 1–10.
- Ferre, I., Barrio, J.P., González-Gallego, J., Rojo-Vázquez, F.A., 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 55, 71–79.
- Ferre, I., López, P., Rojo-Vázquez, F.A., González-Gallego, J., 1996. Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Veterinary Parasitology* 62, 93–100.
- Flynn, R.J., Mannion, C., Golden, O., Haçariz, O., Mulcahy, G., 2007. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 75, 1373–1381.
- Gabrashanska, M., Teodorova, S.E., Anisimova, M., 2008. Oxidative-antioxidant status of *Fasciola hepatica*-infected rats supplemented with zinc. A mathematical model for zinc bioaccumulation and host growth. *Parasitology Research* 104, 69–78.

- Grau, A., Guardiola, F., Grimpa, S., Barroeta, A.C., Codony, R., 2001. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Science* 80, 1630–1642.
- Haçariz, Ö., Sayers, G., McCullough, M., Garrett, M., O'Donovan, J., Mulcahy, G., 2009. The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 27, 45–50.
- Hidroglou, M., Batra, T.R., Ivan, M., 1995. Effects of supplemental vitamins E and C on the immune responses of calves. *Journal of Dairy Science* 78, 1578–1583.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., 1993. Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. *Journal of Dairy Science* 76, 401–407.
- Kaneko, J., 1980. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, New York, p. 97.
- Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E., Skrzydlewska, E., 2005. Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 96, 367–372.
- Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E., Skrzydlewska, E., 2006. *Fasciola hepatica*: effects on the antioxidative properties and lipid peroxidation of rat serum. *Experimental Parasitology* 113, 43–48.
- Litherland, A., Deighton, D., Leathwick, D., 2008. An evaluation of anthelmintic properties, assessed using faecal nematode egg counts, of New Zealand native flax (*Phormium tenax*). *New Zealand Veterinary Journal* 56, 339–342.
- MacGillivray, C.E., Zajac, A.M., Rego, K.A., Petersson, K.H., 2011. Effect of vitamin E supplementation on naturally acquired parasitic infection in lambs. *Veterinary Parasitology* 175, 300–305.
- Maffei Facino, R., Carini, G., Ceserani, R., Ceserani, I., Cavaletti, E., et al., 1993. Efficacy of glutathione for treatment of fascioliasis, an investigation in the experimentally infested rat. *Arzneimittel-Forschung – Drug Research* 43, 455–460.
- Marley, C.L., Fraser, M.D., Fychan, R., Theobald, V.J., Jones, R., 2005. Effect of forage legumes and anthelmintic treatment on the performance, nutritional status and nematode parasites of grazing lambs. *Veterinary Parasitology* 131, 267–282.
- Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Valcárcel-Sancho, F., González-Guirado, A.M., Casanova-García de Castro, I., Nieto-Martínez, J.M., et al., 2013. Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochromonas intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 112, 2913–2923.
- Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, M.P., Cruz-Rojas, M.A., Rojo-Vázquez, F.A., 2005. Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunology* 27, 219–225.
- Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C., Castañón-Ordóñez, L., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Rojo-Vázquez, F.A., 2010a. Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology* 174, 166–169.
- Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A., 2010b. Efficacy of nitroxylin against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitology Research* 107, 1205–1211.
- Masihi, K.N., 2000. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *International Journal of Immunopharmacology* 22, 1083–1091.
- MAFF, 1986. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques* (Ministry of Agriculture Fisheries and Food). Technical bulletin N. 18. HMSO, London.
- Merck Veterinary Manual, 2000. *Merck Veterinary Manual*. Océano Editorial, Barcelona. 2558 pp.
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahlu, T., 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Veterinary Parasitology* 130, 105–113.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Benavides, J., Prieto, N., Pérez, V., et al., 2012. Antioxidants included in the diet of fattening lambs: effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Animal Feed Science and Technology* 173, 177–185.
- Moreau, E., Chauvin, A., 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 428593.
- Mori, T.A., Beilin, L.J., 2004. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Current Atherosclerosis Reports* 6, 461–467.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Waghorn, G.C., Charleston, W.A.G., 1993. Internal parasites and lamb production – a role for plants containing condensed tannins? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 53, 235–238.
- O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H.G., et al., 2000. *Fasciola hepatica* infections down-regulate Th1 responses in mice. *Parasite Immunology* 22, 147–155.
- Orellana, P., Recabarren, S., Lobos, A., Islas, A., Briones, M., Rubilar, L., 1999. Effects of winter supplementation and antiparasite treatment on the productive performance of milk herd in the central-south region of Chile. *Preventive Veterinary Medicine* 38, 207–215.
- Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J., Williams, D.J.L., 2000. The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 93, 121–134.
- Pleasant, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E., Piedrafita, D., 2011. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunology* 33, 495–505.
- Poli, G., 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* 21, 49–98.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Veterinary Medicine*. W.B. Saunders, London.
- Reffett, J.K., Spears, J.W., Brown, T.T., 1988. Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza 3 virus. *Journal of Animal Science* 66, 1520–1528.
- Rehim, W.M., Sharaf, I.A., Hishmat, M., el Toukhy, M.A., Rawash, N.A., Fouad, H.N., 2003. Antioxidant capacity in *Fasciola hepatica* patients before and after treatment with triclabendazole alone or in combination with ascorbic acid (vitamin C) and tocopherol (vitamin E). *Arzneimittel-Forschung* 53, 214–220.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 189, 15–38.
- Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science* 72, 451–454.
- Sahin, K., Kucuk, O., 2001. A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters. *Acta Veterinaria Hungarica* 49, 421–430.
- Schalm, O., Jain, J., Carroll, E., 1981. *Hematología Veterinaria*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Spears, J.W., Weiss, W.P., 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal* 176, 70–76.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., Robinson, M., 1980. Chronic subclinical ovine fasciolosis: plasma glutamate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. *Research in Veterinary Science* 28, 71–75.
- Tiba, O., Moire, N., Le Vern, Y., Boulard, C., Chauvin, A., Sibille, P., 2002. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Research* 33, 261–270.
- Valderrábano, J., Calvete, C., Uriarte, J., 2010. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Veterinary Parasitology* 172, 89–94.
- Valero, M.A., Ubeira, F.M., Khoubbane, M., Artigas, P., Muñio, L., Mezo, M., et al., 2009. MM3-ELISA evaluation of coproantigen and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Veterinary Parasitology* 159, 77–81.
- Valk, E.E., Hornstra, G., 2000. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 70, 31–42.
- Van Zeveren, A.M., Visser, A., Hoorens, P.R., Verduyn, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2007. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Ostertagia ostertagi* by the coefficient of variation and geNorm approach. *Molecular and Biochemical Parasitology* 153, 224–227.
- Verduyn, J., Dorny, P., Hong, C., Harris, T.J., Hammet, N.C., Smith, D.G., et al., 1993. Efficacy of doramectin in the prevention of gastrointestinal nematode infections in grazing cattle. *Veterinary Parasitology* 49, 51–59.

CAPÍTULO IV

Discusión general

- *“¿Qué oficio tenéis?*

- Éste que véis”

(Refranero Nacional)

Los dos primeros objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la fasciolosis por *F. hepatica* y la comparación de estos procedimientos con la coprología por sedimentación y el ELISA-sándwich, a partir de heces de ovinos infectados natural y experimentalmente. Los resultados obtenidos han sido publicados en el trabajo titulado: **“Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep”**.

En primer lugar, se desarrollaron y pusieron a punto dos tipos de PCR, una estándar y otra anidada, mediante la detección de material genético del parásito presente en heces de ovejas. Para ello, se amplificó un fragmento mitocondrial de 423 pb que incluyó parte de los genes Cox I y Lr RNA. Posteriormente, se comparó la sensibilidad de tres técnicas de diagnóstico -coprología, ELISA-sándwich y PCR-, a partir de las mismas muestras fecales. Para asegurar la especificidad de las técnicas moleculares, se utilizaron heces de ovinos infectados experimentalmente con nematodos gastrointestinales (*Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp.), helmintos cuya prevalencia en animales en pastoreo es muy elevada.

Para la consecución de los objetivos se llevó a cabo una infección experimental en la que la excreción fecal de huevos se detectó a partir de la 9ª semana post-infección mediante coprología por sedimentación, coincidiendo con resultados previos que detectaban huevos a partir de la 7ª semana post-infección (Paz-Silva *et al.*, 2002) o entre las semanas 8ª y 10ª post-infección (O'Neill *et al.*, 2000; Martínez-Valladares *et al.*, 2010a). Por otro lado, con las técnicas de PCR estándar y ELISA-sándwich se confirmó la infección a partir de las semanas 3ª y 4ª post-infección, respectivamente. De manera similar ocurrió con la detección del antígeno fecal mediante el ELISA-

sándwich, hallado entre las semanas 5^a y 7^a post-infección en los experimentos de Espino *et al.* (1997) y Moustafa *et al.* (1998). Sin embargo, al diagnosticar la infección mediante una PCR anidada, se pudo demostrar la presencia del parásito en la 2^a semana post-infección, es decir, una semana antes que con la PCR estándar y el ELISA-sándwich.

En cuanto al diagnóstico de la infección natural, mientras las técnicas de PCR anidada y ELISA-sándwich presentaron una sensibilidad del 100% de las muestras fecales, la PCR estándar mostró valores del 82,22%, y la coprología por sedimentación del 53,33%.

Por lo tanto, este trabajo describe por primera vez la utilización de técnicas de PCR para la detección de fasciolosis a partir de muestras de heces, aunque previamente se había utilizado también para detectar *F. gigantica* en heces de búfalos (Ai *et al.*, 2010).

En un estudio posterior realizado por nuestro grupo de investigación, en el cual también ha participado el presente doctorando, se mejoró la técnica de PCR estándar mediante la amplificación de la subunidad ITS 2, consiguiendo diagnosticar la infección a partir de la 2^a semana post-infección. Posteriormente, esta técnica fue aplicada para la detección de resistencia antihelmíntica en ganado ovino infectado de forma natural (Robles-Pérez *et al.*, 2013).

En relación al control de las helmintosis, ya se ha mencionado que la presencia y la persistencia de residuos químicos en los alimentos y en el medio ambiente, unido a la presencia cada vez mayor de cepas resistentes a los fármacos antihelmínticos, nos invita a buscar más nuevas opciones. Para ello se barajan diferentes alternativas, aunque los estudios más relevantes se enmarcan dentro del campo de la modulación

de la respuesta inmunitaria del hospedador definitivo, con el fin último de controlar la infección mediante el desarrollo de una vacuna eficaz. Esta modulación puede ser mediante la administración de vacunas y/o inmunomoduladores. Entre los ejemplos de antígenos vacunales encontramos las enzimas glutatión-S-transferasas (Sexton *et al.*, 1990; Morrison *et al.*, 1996), las proteasas extracelulares catepsina L/B y cisteína-peptidasa (Dalton *et al.*, 1996; Mulcahy & Dalton, 2001), las leucina amino-peptidasas (Piacenza *et al.*, 1999) y las proteínas semejantes a las transportadoras de ácidos grasos de cadena larga (Muro *et al.*, 1997; López-Abán *et al.*, 1999, 2007, 2008, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2004a, 2004b), entre otras. Por otro lado, aunque los inmunomoduladores no presentan un alto grado de inmunogenicidad por sí solos, pueden modificar los mecanismos de defensa del hospedador y potenciar la respuesta inmunitaria frente a antígenos específicos (Nicholls *et al.*, 2010).

Hacia esta dirección se enfocaron el segundo y tercer artículos de la presente Tesis Doctoral, titulados **“Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*”** e **“Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*”**, respectivamente. Mientras el primero de ellos valoró las consecuencias patogénicas de la administración de un inmunomodulador, el LPS de *O. intermedium*, frente a la fasciolosis ovina, el segundo estudio recogió el efecto inmunitario en el organismo del hospedador definitivo tras su aplicación.

La administración del LPS de *O. intermedium* en ovejas infectadas experimentalmente, consiguió reducir significativamente ($P < 0,01$) la excreción fecal acumulada de huevos al final del experimento, con valores de 1.193,8 ($\pm 424,5$) hgh y 608,4 ($\pm 251,8$) hgh en los grupos testigo y tratado, respectivamente. Este efecto es

similar a la de otros adyuvantes como el Quil A (Haçariz *et al.*, 2009b) y el Quil A combinado con peroxirredoxina (Mendes *et al.*, 2010a), utilizados en ovino y caprino, respectivamente. Igualmente ocurrió con los parámetros zootécnicos valorados, peso y condición corporal, superiores –aunque no significativamente- en el grupo de animales tratados con el LPS al final del estudio, de la misma manera que se demostró en los estudios donde se estudiaron los efectos del Quil A, el FIA y el TMG en ovino (Haçariz *et al.*, 2009b), y el FIA-FCA en cabras (Buffoni *et al.*, 2010). La disminución en la excreción fecal de huevos de *F. hepatica* se confirmó con un menor recuento ($P<0,05$) de fasciolas adultas durante la necropsia, en la 12ª semana post-infección, con valores de 128,7 ($\pm 41,7$) y 95,4 ($\pm 26,4$) fasciolas en los grupos testigo y tratado, respectivamente. Asimismo, las fasciolas recuperadas fueron significativamente más pequeñas ($P<0,05$) en el grupo tratado, lo que hace suponer que el LPS pudo impedir el desarrollo de las mismas durante la prepatencia de la infección.

Por otro lado, se observó una anemia macrocítica e hipocrómica más marcada en los testigos, en concordancia con otros experimentos previos que contrastaban la eficacia de antihelmínticos (Martínez-Valladares *et al.*, 2010b).

Por su parte, hubo niveles plasmáticos de proteínas totales y de albúmina significativamente superiores ($P<0,05$) en el grupo tratado con el LPS, principalmente hasta la 4ª semana post-infección. Las enzimas hepáticas GGT -relacionada con la colangitis hiperplásica (Massoud *et al.*, 2001; Burke, 2002)- y la aspartato-aminotransferasa (AST) -asociada con la necrosis parenquimatosa (Burke, 2002; Severin *et al.*, 2012)-, mostraron valores superiores –aunque no significativos- en los testigos desde la 7ª semana post-infección hasta el final del estudio. La enzima

alanina-aminotransferasa (ALT) -asociada a la migración de las fasciolas inmaduras (Ferre *et al.*, 1994)-, pese no presentar valores claramente diferenciables entre los grupos, fue algo superior en el grupo tratado con el LPS. Estas diferencias en los niveles de actividad enzimática son una clara consecuencia del menor número de fasciolas en el grupo tratado que en el testigo.

Conviene reflejar la marcada hiperplasia de los folículos linfoides y los cordones medulares de los ganglios hepáticos linfáticos, indicadora de una fuerte respuesta inmunitaria de tipo humoral (Zafra *et al.*, 2009, 2010), cuyo valor fue superior, sin llegar al nivel de significación, en el grupo tratado con el LPS.

La respuesta inmunitaria frente a la infección por *F. hepatica* conlleva la inducción de un perfil Th2 así como la producción temprana de IFN- γ como citoquina asociada a la respuesta Th1, hecho confirmado en nuestro estudio tras la medición del nivel de expresión en ganglios linfáticos a la 4ª y 12ª semanas post-infección. La IL-4, relacionada con la Th2, estimula la producción de IL-10 (Schmidt-Weber *et al.*, 1999) y de TGF- β (Kohyama *et al.*, 2001), citoquinas implicadas en minimizar los daños patológicos y en incrementar la reparación tisular durante la infección (Lee *et al.*, 2002). El TGF- β promueve la formación de colágeno (Cutroneo, 2007) y participa junto con la IL-10 en la inducción de fibrosis (Flynn *et al.*, 2010).

Según Veremeichenko & Zdorovenko (2008), el LPS es capaz de inducir la producción endógena de citoquinas por parte de los monocitos y macrófagos. Estas tres citoquinas (IL-4, IL-10 y TGF- β) presentaron unos niveles significativamente ($P < 0,05$) elevados de expresión en el grupo tratado con el LPS a la 4ª semana post-infección, en concordancia con otro estudio anterior sobre fasciolosis ovina (Haçariz *et al.*, 2009a).

También se valoró la producción de IgG1, asociada con un perfil de respuesta de tipo Th2 (Estes & Brown, 2002) y relacionada con una cierta inmunidad protectora frente a formas juveniles (Van Milligen *et al.*, 1999). Los valores superiores de IgG1 ($P < 0,01$) a partir de la 4ª semana post-infección, concuerdan con los resultados de otros estudios sobre fasciolosis bovina por *F. hepatica* (Hoyle *et al.*, 2003) y fasciolosis ovina por *F. gigantica* (El-Ahwany *et al.*, 2012), tratados en ambos casos con cisteína-peptidasas.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que el LPS de *O. intermedium* aumenta la resistencia inespecífica frente a *F. hepatica* y puede ser un candidato idóneo como posible adyuvante en nuevas formulaciones vacunales.

Por último, como segunda estrategia alternativa para el control de la fasciolosis mediante la modulación de la respuesta inmunitaria, se estudió el efecto de la administración de una dieta rica en aceite de linaza o en vitamina E en ganado ovino infectado experimentalmente con *F. hepatica*. La nutrición afecta a todos los procesos fisiológicos, incluyendo el sistema inmunitario (Carroll & Forsberg, 2007). Según Van Houtert & Sykes (1996), una dieta rica en proteínas puede reducir las consecuencias fisiopatológicas de las helmintosis, especialmente en animales jóvenes y primoinfectados (Fox, 1997). Los resultados de este último objetivo se han publicado en el trabajo titulado **“Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*”**. Para ello, se administraron dos dietas suplementadas con aceite de linaza y con vitamina E, un mes antes de tener lugar la infección experimental con *F. hepatica*, frente a un grupo equivalente de testigos.

El lino contiene ácidos grasos omega-3 que actúan como inmunomoduladores induciendo la producción de citoquinas (Masihi, 2000) y mejorando la respuesta inmunitaria (Mori & Beilin, 2004), y además tiene propiedades antioxidantes (Morán *et al.*, 2012) que previenen la peroxidación lipídica compensando el efecto de las especies reactivas de oxígeno (Cortinas *et al.*, 2005). Se cree que los ácidos omega-3 suprimen la respuesta Th1 e inducen una cierta polarización hacia la de tipo Th2 (Zhang *et al.*, 2005b; Monk *et al.*, 2012). Por otro lado, la vitamina E (α -tocoferol) es el mayor protector de membranas fosfolipídicas, reduce el estrés oxidativo tisular y protege a las células de los daños inducidos igualmente por las citadas especies reactivas de oxígeno (Eid *et al.*, 2008; Gabrashanska *et al.*, 2008).

Las dos dietas actuaron reduciendo significativamente ($P<0,05$) la excreción fecal de huevos del parásito el último día del experimento, en la semana 13^a post-infección. Las diferencias más importantes se encontraron entre el grupo testigo y el grupo suplementado con el aceite de linaza ($P<0,01$). Estos resultados concuerdan con otros estudios de infecciones por nematodos gastrointestinales en ovinos donde se suplementó con diferentes leguminosas (Athanasiadou *et al.*, 2001, 2005; Marley *et al.*, 2005). Sin embargo, en otros estudios donde se utilizó el lino nativo de Nueva Zelanda y la vitamina E para el control de las nematodosis bovinas y ovinas, y en fasciolosis bovina (Orellana *et al.*, 1999; Litherland *et al.*, 2008; MacGlaflin *et al.*, 2011) no se demostró tal efecto.

También se observó un efecto significativo ($P<0,05$) en la reducción del número y del tamaño de las fasciolas recuperadas a la 14^a semana post-infección, de manera similar a otras infecciones por nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes suplementados con quebracho, ajeno o esparceta (Athanasiadou *et al.*, 2001;

Valderrábano *et al.*, 2010), entre otras. De hecho, mientras en el grupo testigo se recuperaron 123 ($\pm 35,2$) fasciolas, en los suplementados con vitamina E y aceite de linaza se obtuvieron 97,7 ($\pm 39,9$) y 71,2 ($\pm 26,5$) fasciolas, respectivamente.

El grado de hipoproteinemia e hipoalbuminemia en los testigos fue mayor ($P < 0,01$), en especial durante la 4ª semana post-infección. Los valores de la enzima ALT fueron superiores en los animales a los que se administró aceite de linaza a lo largo del estudio, y en concreto durante la 4ª ($P < 0,01$) y 12ª ($P < 0,05$) semanas post-infección, como consecuencia de una menor carga parasitaria. En cuanto a la enzima GGT, presentó un incremento en el grupo testigo durante la última etapa del ensayo, confirmando la carga parasitaria superior en este último.

En el estudio histopatológico, la infiltración de polimorfonucleares y la fibrosis fueron superiores –aunque no significativas– en los grupos suplementados, especialmente el del aceite de linaza, constatando el efecto sobre la reducción del tamaño y de la cantidad de fasciolas en el hígado al provocar una restricción de su movimiento por el parénquima, de la misma manera que ocurrió tras la administración del LPS de *O. intermedium*.

En este trabajo se comprobó que la suplementación con aceite de linaza y vitamina E redujo los índices de IgG1 a lo largo de todo el estudio ($P < 0,01$), de manera similar a otros ensayos en terneros a los que se había administrado la vitamina E (Hidiroglou *et al.*, 1995), y en contraposición a experimentos donde se había inyectado dicha vitamina en ovinos (Reffett *et al.*, 1988) y en bovinos (Hogan *et al.*, 1993). Por otra parte, la IL-4 mostró valores más elevados al final del estudio en los testigos, mediante PCR cuantitativa, al igual que la IgG1, confirmando el perfil Th2 en la fasciolosis. En cambio, en los dos grupos suplementados no hubo una mayor

expresión citoquinas de tipo Th1 o Th2 al final del estudio, aunque, al inicio del mismo y antes de llevarse a cabo la infección experimental, se observó una mayor producción de IFN- γ e IL-4 ($P < 0,01$) en el grupo de la vitamina E.

Finalmente, los resultados de los TBARS indicaron una acción significativamente ($P < 0,001$) beneficiosa en el mantenimiento de la integridad tisular hepática tras la suplementación con la vitamina E, al igual que en experimentos en otras especies animales (Grau *et al.*, 2001; Cortinas *et al.*, 2005).

En conclusión, la suplementación con ambas dietas conllevó la reducción de la excreción fecal de huevos de *F. hepatica* al final del ensayo experimental, así como una menor carga y tamaño de los parásitos recuperados en la necropsia, especialmente en el grupo del aceite de linaza. Asimismo, la vitamina E supuso una peroxidación lipídica inferior en el hígado. Por tanto y tras considerar los resultados obtenidos en este último trabajo, una dieta rica en ácidos grasos omega-3 y en vitamina E podría ayudar a controlar la infección por *F. hepatica* en ovinos.

CAPÍTULO V

Conclusiones

*“Con arte, paciencia y buen modo,
se consigue todo”*

(Refranero Nacional)

Las conclusiones a las que hemos llegado en cada uno de los trabajos publicados han sido las siguientes:

I. "Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep".

- a) La infección experimental y natural por *F. hepatica* puede detectarse en muestras fecales de ovinos a partir de la 2ª y 3ª semanas post-infección mediante la técnica de PCR -anidada y estándar, respectivamente-. Asimismo, con el ELISA-sándwich se puede comprobar la infección a partir de la 4ª semana post-infección. Ambos métodos diagnósticos presentaron una sensibilidad, especificidad y repetibilidad elevadas.

II. "Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*".

- a) La administración parenteral del LPS de *O. intermedium* supuso una reducción de la infección por *F. hepatica*, traducida en la disminución en las cifras de huevos de *F. hepatica* excretados con las heces, y en un menor número y tamaño de las fasciolas adultas. Este hecho pudo deberse posiblemente a la fibrosis hepática, que limita la emigración de las fasciolas a través del parénquima hepático y su llegada a los canalículos biliares.
- b) Los valores relativos a los parámetros zootécnicos, hemáticos y bioquímicos indicaron una mejor respuesta frente a la infección en el grupo tratado que en

el testigo, estableciéndose una anemia leve y una funcionalidad hepática superior al finalizar el experimento.

- c) El LPS de *O. intermedium* logra incrementar la resistencia inespecífica del hospedador definitivo frente a la infección por *F. hepatica*.

III. “Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*”.

- a) La administración del LPS de *O. intermedium* indujo un perfil predominante de respuesta inmunitaria Th2, caracterizado por una elevada expresión de IL-4, IL-10 y TGF- β , al igual que de la IgG1 a lo largo del estudio. Se corrobora la actuación sinérgica de las dos últimas citoquinas en la inducción de la fibrosis -que pudo limitar la emigración y el crecimiento de las fasciolas-, así como el aumento de la resistencia inespecífica del hospedador tras administrar el LPS.

IV. “Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*”.

- a) La administración de dos dietas basadas en la suplementación con aceite de linaza y vitamina E redujo la excreción fecal de huevos de *F. hepatica*, la carga parasitaria y el tamaño de las fasciolas recuperadas en la necropsia, especialmente en el primer grupo; aquí, los valores superiores de la serie blanca y la fibrosis pudieron contribuir a limitar el tamaño y la migración de las fasciolas por el parénquima hepático.

- b) Los índices hemáticos y bioquímicos analizados se vieron menos afectados por la infección (menor gravedad de la anemia y funcionalidad hepática superior) en los grupos suplementados con aceite de linaza y vitamina E.
- c) El perfil de respuesta inmunitaria Th2, caracterizado por la elevada expresión de IL-4 y de IgG1 al final del experimento, se observó especialmente en el grupo testigo. Aunque las suplementaciones con aceite de linaza y con vitamina E no mostraron efectos sobre la producción o expresión génica de las citoquinas IL-4 e IFN- γ , sí contribuyeron a la reducción significativa de IgG1, aminorando los efectos de la respuesta inmunitaria característica de tipo Th2.
- d) El índice de peroxidación lipídica mostró valores significativamente inferiores tras la suplementación con vitamina E, confirmando su efecto antioxidante.

CAPÍTULO VI

Referencias bibliográficas

*“Aprende de maestros,
y vendrás a ser diestro”*

(Refranero Nacional)

1. **Abad Gavín, M.** (1984). *Introducción a la Historia de la Veterinaria* (Lección inaugural del curso académico 1984-1985). Servicio de Publicaciones, Universidad de León, 51 pp.
2. **Abad Gavín, M.** (1999). *El Caballo en la Historia de España*. Servicio de Publicaciones, Universidad de León, 195 pp.
3. **Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
4. **Abbasi, I., Branzburg, A., Campos-Ponce, M., Hafez, S.K., Raoul, F., Craig, P.S. & Hamburger, J.** (2003). Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 324-330.
5. **Abel, L.C.J., Chen, S., Ricca, L.G., Martins, M.F., García, M., Ananías, R.Z., Mussalem, J.S., Squaiella, C.C., Shaw, R.J. & Longo-Maugéri, I.M.** (2009). Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunol.* 31: 604-612.
6. **Abo Shousha, S., Khalil, S.S. & Rashwan, E.A.** (1999). Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 29: 149-156.
7. **Aguirre Prado, L.** (1963). *La Mesta*. Temas Españoles, Madrid, 31 pp.
8. **Ai, L., Dong, S.J., Zhang, W.Y., Elsheikha, H.M., Mahmmoud, Y.S., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Shi, Y.L., Huang, W.Y. & Zhu, X.Q.** (2010). Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *An. Trop. Med. Parasitol.* 104: 65-72.

9. Alassad, S., Huang, C.Q., Li, Q.Y., Granados, J.E., García.Romero, C., Pérez, J.M. & Zhu, X.Q. (2007). Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA. *Parasitol. Res.* 101: 1245-1250.
10. Alassad, S., Granados, J.E., Cano-Manuel, F.J., Meana, A., Zhu, X.Q. & Pérez, J.M. (2008). Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in southern Spain. *Parasitol. Res.* 102: 751-755.
11. Alasaad, S., Soriguer, R.C., Abu-Madi, M., El Behairy, A., Jowers, M.J., Díez Baños, P., Píriz, A., Fickel, J. & Zhu, X.Q. (2011). A TaqMan real-time PCR-based assay for the identification of *Fasciola* spp. *Vet. Parasitol.* 179: 266-271.
12. Almazán, C., Ávila, G., Quiroz, H., Ibarra, F. & Ochoa, P. (2001). Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 97: 101-112.
13. Al-Sabi, M.N.S., Kapel, C.M., Deplazes, P. & Mathis, A. (2007). Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitol. Res.* 101: 731-736.
14. Álvarez de Morales, A. (2003). *El pensamiento político y jurídico de Campomanes*. Instituto Nacional de la Administración Pública, Madrid.
15. Álvarez-Sánchez, M.Á., Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J., Monteagudo-Rodríguez, M., Martín-Gómez, S. & Rojo-Vázquez, F.A. (2001). *Some problems related to the use of albendazole in sheep flocks for the control of mixed natural infection by gastrointestinal and liver fluke parasites*. 18th Int. Conf. WAAVP, Stresa, pp. 26-30.
16. Álvarez-Sánchez, M.Á., Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J. & Rojo-Vázquez, F.A. (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.* 159: 424-425.

17. **Anderson, N., Luong, T.T., Vo, N.G., Bui, K.L., Smooker, P.M. & Spithill, T.W.** (1999). The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 83: 15-24.
18. **Anderson, N., Martin, P.J. & Jarrett, R.G.** (1988). Mixtures of anthelmintics: A strategy against resistance. *Aust. Vet. J.* 65: 62-64.
19. **Andrews, S.J.** (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Dalton J.P. (Coord.): *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, 526 pp.
20. **Andriamanantena, D., Rey, P., Pret, J.L. & Klotz, F.** (2005). Distomatoses. *EMC-Mal. Infect.* 4: 105-118.
21. **Anes, G.** (1982). *La economía española al final del Antiguo Régimen*. Alianza/Banco de España, Madrid.
22. **Arias, M., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Lomba, C., Díaz, P., Morondo, P., Díez-Baños, P. & Paz-Silva, A.** (2006). A 2,9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Vet. Parasitol.* 137: 67-73.
23. **Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S. & Serhan, C.N.** (2005). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7671-7676.
24. **Armour, J.** (1991). Liver fluke. En: Martin, W.B. & Aitken, I.D. (Eds.): *Diseases of sheep*. Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp. 115-121.
25. **Arroyo, R., Mora, J., Molina, S., Troper, L. & Amador, A.** (1981). Fascioliasis hepática humana en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 2: 35-57.

26. Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. & Coop, R.L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99: 205-219.
27. Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F. & Coop, R.L. (2005). Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus columbriformis* in grazing sheep. *Vet. Parasitol.* 127: 233-243.
28. Baeza, E., Poitou, I., Villejoubert, C. & Boulard, C. (1994). Complement depletion in rats infected with *F. hepatica*: *In vivo* and *in vitro* studies. *Vet. Parasitol.* 51: 219-230.
29. Behm, C.A. & Sangster, N.C. (1999). Pathology, pathophysiology and clinical aspects. En: Dalton J.P. (Ed.): *Fasciolosis*. CAB Intern., Wallingford, pp. 185-224.
30. Benjamín, M.M. (1984). *Manual de Parasitología Clínica Veterinaria*. Ed. Limusa, Méjico, 421 pp.
31. Bennett, C.E. (1975a). Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. *J. Parasitol.* 61: 886-891.
32. Bennett, C.E. (1975b). Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturatrion in the mouse. *J. Parasitol.* 61: 892-898.
33. Bennett, C.E., Hughes, D.L. & Harness, E. (1980). *Fasciola hepatica*: Changes in tegument during killing of adult flukes surgically transferred to sensitized rats. *Parasite Immunol.* 2: 39-55.
34. Bennett, C.E. & Threadgold, L.T. (1975). *Fasciola hepatica*: Development of the tegument during migration in the mouse. *Exp. Parasitol.* 38: 38-55.
35. Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *B.M.J.* 321: 424.

36. **Beytut, E., Akça, A. & Gökçe, H.I.** (2011). Pathological and immunohistochemical evaluation of the effects of interferon gamma (IFN- γ) and aminoguanidine in rats experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 35: 243-253.
37. **Biggeri, A., Catelan, D., Dreassi, E., Rinaldi, L., Musella, V., Veneziano, V. & Cringoli, G.** (2007). Multivariate spatially-structured variability of ovine helminth infections. *Geospat. Health* 2: 97-104.
38. **Bodas, R., Prieto, N., Jordán, M.J., López-Campos, Ó., Giráldez, F.J., Morán, L. & Andrés, S.** (2012). The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal* 6: 863-870.
39. **Boray, J.C.** (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.* 7: 95-210.
40. **Boray, J.C.** (1982). Fascioliasis. En: Hillyer, G.V. & Hopla, C.E. (Eds.): *CBC Handbook Series in Zoonoses* (vol. III). CBC Press, Florida.
41. **Boray, J.C.** (1985). Flukes of domestic animals. En: Gaafar, S.M., Howard, W.E. & Marsh, R. (Eds.): *Parasites, Pests and Predators*. Elsevier, Nueva York, pp. 179-218.
42. **Boray, J.C.** (1986). Trematode infections of domestic animals. En: Boray, J.C., Martin, P.J. & Roush, R.T. (Eds.): *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Plenum Press, Nueva York, pp. 401-425.
43. **Boray, J.C., Crowfoot, P., Strong, M., Allison, J., Schellenbaum, M., von Orelli, M. & Sarasin, G.** (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113: 315-317.
44. **Boulard, C., Bouvry, M. & Argente, G.** (1985). Comparison of the detection of foci of fascioliasis by the ELISA test on lactoserum and serum and by coproscopy. *Ann. Rech. Vet.* 16: 363-368.

45. **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
46. **Brady, M.T., O'Neill, S.M., Dalton, J.P. & Mills, K.H.** (1999). *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 67: 5372-5378.
47. **Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L., Álvarez, L., Solana, H., Virkel, G. & Brophy, P.M.** (2007). Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82: 104-109.
48. **Bretagne, S., Guillou, J.P., Morand, M. & Houin, R.** (1993). Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology* 106: 193-199.
49. **Brown, J.K., Donaldson, D.S., Wright, S.H. & Miller, H.R.** (2003). Mucosal mast cells and nematode infection: Strain-specific differences in mast cell precursor frequency revisited. *J. Helminthol.* 77: 155-161.
50. **Brunet, L.R.** (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1457-1467.
51. **Buffoni, L., Zafra, R., Pérez-Écija, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez-Galisteo, E., Moreno, T., Pérez, J. & Martínez-Moreno, A.** (2010). Immune response of goats immunised with glutathione S-transferase and experimentally challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Int.* 59: 147-153.
52. **Burden, D.J., Bland, A.P., Hammet, N.C. & Hughes, D.L.** (1983). *Fasciola hepatica*: Migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp. Parasitol.* 56: 277-288.
53. **Burke, M.D.** (2002). Liver function: test selection and interpretation of results. *Clin. Lab. Med.* 22: 377-390.

54. Carmona, C., Dowd, A., Smith, A. & Dalton, J.P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* *in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62: 9-17.
55. Carroll, J.A. & Forsberg, N.E. (2007). Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. N. Am. – Food A.* 23: 105-149.
56. Carroll, C.W. & Wilson, L.H. (Eds.) (2012). *The Medieval Shepherd: Jean de Brye's "Le Bon Berger" (1379)*. ACMRS Publications, Arizona, 234 pp.
57. Charbon, J.L., Spahni, M., Wicki, P. & Pfister, K. (1991). Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 77: 425-429.
58. Chauvin, A. & Boulard, C. (1996). Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3: 209-215.
59. Cienfuegos, S., Díaz, P., Vázquez, L., Dacal, V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Panadero, R., Viña, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P. & López, C. (2009). Prevalencia e intensidad de parasitación en granjas de pequeños rumiantes en Galicia. *AIDA I*: 143-145.
60. Ciria Poza, J. (2008). El futuro de la ganadería en Castilla y León. En: Gómez Limón, J.A. (Coord.): *El futuro de la agricultura en Castilla y León*. Ed. MIC, León, 256 pp.
61. Clery, D., Torgerson, P. & Mulcahy, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 62: 71-82.
62. Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492-503.
63. Cole, F.J. (1944). *A history of comparative anatomy, from Aristotle to the eighteenth century*. Ed. Macmillan, Londres, 524 pp.

64. **Coop, R.L. & Holmes, P.H.** (1996). Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26: 951-962.
65. **Cordero del Campillo, M.** (1966). Las bases biológicas de la lucha contra *Fasciola hepatica*. *Avigan* 165: 8-19.
66. **Cordero del Campillo, M. et al.** (1980). *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Madrid, 152 pp.
67. **Cordero del Campillo, M.** (1983). *La Universidad de León. De la Escuela de Veterinaria a la Universidad*. Ed. Everest, León, 528 pp.
68. **Cordero del Campillo, M.** (1996). *Desarrollo histórico de la Medicina Preventiva*. Ed. Crin, Barcelona, 62 pp.
69. **Cordero del Campillo, M. & Rojo-Vázquez, F.A.** (1999). (Coord.). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Interamericana, Madrid, 968 pp.
70. **Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F. & Baucells, M.D.** (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Sci.* 84: 48-55.
71. **Cosme, A., Ojeda, E., Cilla, G., Torrado, J., Alzate, L., Beristain, X., Orive, V. & Arenas, J.I.** (2001). Fasciolosis hepatobiliar. Estudio de una serie de 37 pacientes. *Gastroenterol. Hepatol.* 24: 375-380.
72. **Cox, F.E.** (2002). History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 595-612.
73. **Cruz e Silva, J.A., Mendonça, M.M. & Alfonso Roque, M.M.** (1971). Étude comparative de la fasciolose des boins en Portugal Metropolitain et à l'île de Santiago (Cap Vert). Conditions favorables à sa dissemination et possibilité de l'erradication. *Comptes-Rendues. I Multicol. Europ. Parasitol.*, Rennes.
74. **Cutroneo, K.R.** (2007). TGF- β -induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair Regen.* 15: S54-S60.

75. Dalton, J.P. (Coord.) (1999). *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, 526 pp.
76. Dalton, J.P., McConigle, S., Rolph, T.P. & Andrews, S.J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect. Immun.* 64: 5066-5074.
77. Dalton, J.P. & Mulcahy, G. (2001). Parasite vaccines – a reality? *Vet. Parasitol.* 98: 149-167.
78. Dalton, J.P., Neill, S.O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A.G. & Donnelly, S.M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33: 1173-1181.
79. Danielski, M., Ikizler, T.A., McMonagle, E., Kane, J.C., Pupim, L., Morrow, J. & Himmelfarb, J. (2003). Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 42: 286-294.
80. Dargie, J.D. (1987). Trematode infections in sheep and cattle: Effects on productivity and metabolism. En: Leading, W.H.D. & Guerrero, J. (Eds): *Proceedings of the MSD AGVET Symposium*, Montreal, pp. 35-43.
81. Dargie, J.D., Holmes, P.H., McLean, J.M. & Mulligan, W. (1968). Pathophysiology of fascioliasis in the rabbit. Studies on albumin turnover. *J. Comp. Pathol.* 78: 101-105.
82. Davies, C. & Goose, J. (1981). Killing of newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* in sensitized rats. *Parasite Immunol.* 3: 81-86.
83. Dawes, B. & Hughes, D.L. (1964). Fascioliasis: The invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Adv. Parasitol.* 2: 97-168.

84. **De Lourdes Sampaio, M., Martínez Fernández, A.R. & Mattos dos Santos, M.A.** (1968). Susceptibility of some fresh water snails species of Portugal and Spain to *Fasciola hepatica*. *An. Fac. Vet. León* 14: 239-255.
85. **Del Río Lozano, J.** (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*. 13: 211-253.
86. **Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas** (2004). Ed. Masson, Barcelona, 1.319 pp.
87. **Díez Baños, P.** (2011). *Fasciola y fasciolosis, un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la Parasitología con otras Ciencias* (Discurso de ingreso como Académico de Número, Acad. de Farmacia de Galicia). Centro de Impresión NINO, Santiago de Compostela, 214 pp.
88. **Díez y Díez, M.** (1981). Influencia de la temperatura de incubación de los huevos de *Fasciola hepatica* sobre la capacidad de infestación de la primera fase larvaria en el molusco hospedador intermediario *Lymnaea palustris*. *Hygia Pecoris* 3: 39-59.
89. **Dinkel, A., Von Nickisch-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R. & Roming, T.** (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1871-1876.
90. **Domínguez Sánchez, S.** (2002). Datos sobre la trashumancia en León en los siglos XII y XIII. *Astórica* 21: 61-62.
91. **Domínguez Sánchez, S. & Martínez Pérez, J.M.** (2006). Los caballos hispanos en el s. XIII y su presencia en las cruzadas. *Actas del XXXVII Congreso Internacional de la Asoc. Mundial y XII Cong. Nacional de Historia de la Veterinaria*. Ed. MIC, León.
92. **Domke, A.V., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S. & Stuen, S.** (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Vet. Parasitol.* 194: 40-48.

93. **Donaldson, J., van Houtert, M.F.J. & Sykes, A.R.** (1997). The effect of protein supply on the periparturient parasite status of the mature ewe. *Proc. N. Z. Soc. An. Prod.* 57: 186-189.
94. **Dow, C., Ross, J.G. & Tood, J.R.** (1968). The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58: 120-135.
95. **Dreisbach, V.C., Cowley, S. & Elkins, K.L.** (2000). Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect. Immun.* 68: 1988-1996.
96. **Duffus, W.P.H. & Franks, D.** (1980). In vitro effect to immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. Exp. Immunol.* 41: 430-440.
97. **Duménigo, B.E., Espino, A.M. & Finlay, C.M.** (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. *Res. Vet. Sci.* 60: 278-279.
98. **Duménigo, B.E., Espino, A.M., Finlay, C.M. & Mezo, M.** (1999). Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 86: 23-31.
99. **Duménigo, B.E. & Mezo, M.** (1999). Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Res. Vet. Sci.* 66: 165-167.
100. **Durbin, C.G.** (1952). Longevity of the liver fluke, *Fasciola* sp. in sheep. En: Otto, G.F. (Ed.): *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, Washington.
101. **Duthaler, U.P.** (2012). Artemisinins for the treatment of fascioliasis: Progress in preclinical and diagnostic research. PhD Thesis, Facultad de Ciencias de la Universidad de Basilea, 120 pp.

102. Duthaler, U.P., Smith, T.A. & Keiser, J. (2010). *In vivo* and *in vitro* sensitivity of *Fasciola hepatica* to triclabendazole combined with artesunate, artemether, or OZ78. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4596-4604.
103. Eid, Y., Ebeid, T., Moawad, M. & El-Habbak, M. (2008). Reduction of dexamethasone-induced oxidative stress and lipid peroxidation in laying hens by dietary vitamin E supplementation. *Emir. J. Food Agric.* 20 : 28-40.
104. El-Ahwany, E., Rabia, I., Nagy, F., Zoheiry, M., Diab, T. & Zada, S. (2012). Protective role of purified cysteine proteinases against *Fasciola gigantica* infection in experimental animals. *Korean J. Parasitol.* 50: 45-51.
105. Erroi, A., Fantuzzi, G., Mengozzi, M., Sironi, M., Orencole, S.F., Clark, B.D., Dinarello, C.A., Isetta, A., Gnocchi, P. & Giovarelli, M. (1993). Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect. Immun.* 61: 4356-4359.
106. Escudero Díez, A. (1970). Histopatología y relaciones *Fasciola hepatica*/*Lymnaea truncatula* y *L. palustris* en la infestación experimental. *An. Fac. Vet. León* 16: 261-347.
107. Espino, A.M., Marcet, R. & Finlay, C.M. (1997). *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Exp. Parasitol.* 85: 117-120.
108. Estes, D.M. & Brown, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90: 1-10.
109. Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A. & Brown, W.C. (1995). Expression and biological activities of bovine interleukin 4: Effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. *Cell Immunol.* 163: 268-279.

110. Estuningsih, S.E., Widjayanti, S., Adiwinata, G. & Piedrafita, D. (2004). Detection of coproantigens by sandwich ELISA in sheep experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Trop. Biomed.* 21: 51-56.
111. Eycleshymer, A.C. & Schoemaker, D.M. (1917). *Anatomical names especially the Basle Nomina Anatomica ("BNA")*. William Wood & Co., Nueva York, 776 pp.
112. Fairweather, I. (2005). Triclabendazole: new skills to unravel and old(ish) enigma. *J. Helminthol.* 79: 227-234.
113. Fairweather, I. (2009). Triclabendazole progress report, 2005-2009, an advancement of learning? *J. Helminthol.* 83: 139-150.
114. Fairweather, I. & Boray, J.C. (1999). Mechanisms of fasciolicide action and drug resistance in *Fasciola hepatica*. En: Dalton, J.P. (Ed.): *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, pág. 225-276.
115. Fairweather, I., Threadgold, L.T. & Hanna, R.E.B. (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. En: Dalton, J.P. (Ed.): *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, pp. 47- 111.
116. Favennec, L., Jave Ortiz, J., Gargala, G., López Chegne, N., Ayoub, A. & Rossignol, J.F. (2003). Double-blind, randomized, placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of fascioliasis in adults and children from northern Peru. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17: 265-270.
117. Fawcett, A.R. (1990). A study of a restricted programme of strategic dosing against *Fasciola hepatica* with triclabendazole. *Vet. Rec.* 127: 492-493.
118. Fernández Clemente, E. (1986). Sobre la crisis de la ganadería española en la segunda mitad del siglo XVIII. *Brocar: Cuad. Inv. Hist.* 12: 89-101.
119. Ferre, I., Barrio, J.P., González-Gallego, J. & Rojo-Vázquez, F.A. (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet. Parasitol.* 55: 71-79.

120. Ferre, I., Calvo, E. & Rojo-Vázquez, F.A. (1991). Contribución a la confección de un mapa parasitológico del ganado ovino de la provincia de Segovia. *Med. Vet.* 8: 556-559.
121. Ferre, I., López, P., Rojo-Vázquez, F.A. & González-Gallego, J. (1996). Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* 62: 93-100.
122. Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1993). Epidemiología de las trematodosis hepáticas ovinas en la provincia de León. *Acta Parasitol. Port.* 1: 189.
123. Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1995). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitol. Res.* 81: 137-142.
124. Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1997). Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 68: 261-267.
125. Ferre, I. & Rojo-Vázquez, F.A. (1994). Patología y Clínica (Fasciolosis). *Ovis* 34: 35-43.
126. Ferre-Pérez, I. (1994). *Estudios sobre fasciolosis ovina* (Tesis Doctoral). Servicio de Publicaciones, Universidad de León, 61 pp.
127. Flynn, R.J., Mannion, C., Golden, O., Haçariz, O. & Mulcahy, G. (2007). Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 75: 1373-1381.
128. Flynn, R.J., Mulcahy, G. & Elsheikha, H.M. (2010). Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Vet. Parasitol.* 169: 235-240.
129. Foster, W.D. (1965). *A History of Parasitology*. E. & S. Living., Edimburgo, 201 pp.

130. **Fournier, M.** (1990). The Book of Nature: Jan Swammerdam's microscopical investigations. *Tractix* 2: 1-24.
131. **Fox, M.T.** (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments. *Vet. Parasitol.* 72. 285-297.
132. **Froyd, G.** (1969). Fascioliasis. *Outlook Agric.* 6: 76-81.
133. **Gaasenbeek, C.P.H., Moll, L., Cornelissen, J.B.W.J., Vellema, P. & Borsteede, F.H.M.** (2001). An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 95: 37-43.
134. **Gabrashanska, M., Teodorova, S.E. & Anisimova, M.** (2008). Oxidative-antioxidant status of *Fasciola hepatica*-infected rats supplemented with zinc. A mathematical model for zinc bioaccumulation and host growth. *Parasitol. Res.* 104, 69-78.
135. **García Martín, P.** (1988). *La Ganadería Mesteña en la España Borbónica (1700-1836)*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
136. **García-Pérez, A.L. & Juste-Jordán, R.A.** (1987). Helmintos parásitos de la oveja en el País Vasco. *Rev. Iber. Parasitol.*, volumen extraordinario: 105-113.
137. **García Sanz, Á.** (1978). La agonía de la Mesta y el hundimiento de las exportaciones laneras: Un capítulo de la crisis económica del Antiguo Régimen en España. *Agricultura y Sociedad* 6: 283-356.
138. **García Sanz, Á.** (1994). La ganadería española entre 1750 y 1865: Los efectos de la reforma agraria liberal. *Agricultura y Sociedad* 72: 81-119.
139. **Gerbet, M.C.** (2003). *La ganadería medieval en la Península Ibérica*. Ed. Crítica, Barcelona, 272 pp.
140. **Glauert, A.M., Lammas, D.A. & Duffus, W.P.** (1985). Ultrastructural observations on the interaction *in vitro* between bovine eosinophils and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 91: 459-470.

141. Gómez-Bautista, M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1994a). Etiología y Biología (Fasciolosis). *Ovis* 34: 11-19.
142. Gómez-Bautista, M. & Rojo-Vázquez, F.A. (1994b). Tratamiento, Profilaxis y Control (Fasciolosis). *Ovis* 34: 53-59.
143. Gonzalo-Orden, J.M., Millán, L., Álvarez, M., Sánchez-Campos, S., Jiménez, R., González-Gallego, J. & Tuñón, M.J. (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol. Res.* 90: 359-364.
144. Goose, J. (1978). Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* 275: 216-217.
145. Grau, A., Guardiola, F., Grimpa, S., Barroeta, A.C. & Codony, R. (2001). Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: Influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Sci.* 80: 1630-1642.
146. Grove, D.I. (1990). *A History of Human Helminthology*. CAB International, Wallingford, 856 pp.
147. Gual, M. (1971). *Alfonso X de Castilla y León, el Sabio* (vol. I). Ed. Rialp, Madrid.
148. Gurish, M.F., Bryce, P.J., Tao, H., Kisselgof, A.B., Thornton, E.M., Miller, H.R., Friend, D.S. & Oettgen, H.C. (2004). IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol.* 172: 1139-1145.
149. Haçariz, O., Sayers, G., Flynn, R.J., Lejeune, A. & Mulcahy, G. (2009a). IL-10 and TGF- β 1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol.* 31: 613-622.

150. Haçariz, O., Sayers, G., McCullough, M., Garrett, M., O'Donovan, J. & Mulcahy, G. (2009b). The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* 27: 45-50.
151. Hagan, P. (1993). IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol.* 15: 1-4.
152. Halferty, L., Brennan, G.P., Trudgett, L., Hoey, L. & Fairweather, I. (2009). Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 159: 126-138.
153. Halliwell, B. (1988). Albumin, an important extracellular antioxidant. *Biochem. Pharmacol.* 37: 569-571.
154. Hanna, R.E.B. (1980a). *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Exp. Parasitol.* 50: 155-170.
155. Hanna, R.E.B. (1980b). *Fasciola hepatica*: Glycocalix replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.* 50: 103-114.
156. Haridy, F.M., El Garhy, M.F. & Morsi, T.A. (2003). Efficacy of Mirazid (*Commiphora molmol*) against fascioliasis in Egyptian sheep. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33: 917-924.
157. Hassan, A., Ibrahim, A., Mbodji, K., Coëffier, M., Ziegler, F., Bounoure, F., Chardigny, J.M., Skiba, M., Savoye, G., Dëchelotte, P. & Marion-Letellier, R. (2010). An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J. Nutr.* 140: 1714-1721.
158. Haroun, E. & Hillyer, G.V. (1986). Resistance to fascioliasis: a review. *Vet. Parasitol.* 20: 63-70.

159. **Hernández, F.** (1996). La Mesta y el desarrollo del sector ganadero. *Mundo Ganadero* 75: 76-77.
160. **Hidalgo, M.R., Díez-Baños, N., Calvo, E. & Rojo-Vázquez, F.A.** (1995). Estudio parasitológico en el ganado ovino de la provincia de Burgos. *Med. Vet.* 6: 397-405.
161. **Hidiroglou, M., Batra, T.R. & Ivan, M.** (1995). Effects of supplemental vitamins E and C on the immune responses of calves. *J. Dairy Sci.* 78: 1578-1583.
162. **Hillyer, G.V.** (1999). Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. En: Dalton, J.P. (Ed.): *Fasciolosis*. CAB International, Wallingford, 526 pp.
163. **Hogan, J.S., Weiss, W.P., Smith, K.L., Todhunter, D.A. & Schoenberger, P.S.** (1993). Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. *J. Dairy Sci.* 76: 401-407.
164. **Hoyle, D.V., Dalton, J.P., Chase-Topping, M. & Taylor, D.W.** (2003). Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: The effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Vet. Parasitol.* 111: 65-82.
165. **Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A. & Murphy, K.M.** (1992). Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6065-6069.
166. **Ibarra, F., Vera, Y., Hernández, A. & Castillo, R.** (1997). Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet. Méx.* 28: 297-301.
167. **ICZN** (International Committee on Zoological Nomenclature) (1925). *Trematode, Cestode and Acanthocephala names placed in the official list of generic names (Opinion 84)*. Smithsonian Miscellaneous Collections, Washington.
168. **INE** (Instituto Nacional de Estadística) (2009). *Censo agrario de España*. Madrid.

169. Jackson, F. & Coop, R.L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: 95-107.
170. Jankovic, D., Liu, Z. & Gause, W.C. (2001a). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: Asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22: 450-457.
171. Jankovic, D., Sher, A. & Yap, G. (2001b). Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: Decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 403-409.
172. Jarnicki, A.G. & Fallon, P.G. (2003). T helper type-2 cytokine responses: Potential therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 449-455.
173. Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.
174. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer, N. (1992). *Pathology of domestic animals*. Academic Press, San Diego, 780 pp.
175. Kahn, L.H., Kaplan, B. & Steele, J.H. (2007). Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as 'one medicine'). *Vet. Ital.* 43: 5-19.
176. Kaneko, J. (1980). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, Nueva York, 932 pp.
177. Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I. (2013). Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Front. Immunol.* 4: 11.
178. Kantzoura, V., Kouam, M.K., Demiris, N., Feidas, H. & Theodoropoulos, G. (2011). Risk factors and geospatial modelling for the presence of *Fasciola hepatica* infection in sheep and goat farms in the Greek temperate Mediterranean environment. *Parasitology* 138: 926-938.

179. Keegan, P.S. & Trudgett, A. (1992). *Fasciola hepatica* in the rat: Immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunol.* 14: 657-669.
180. Keiser, J. & Utzinger, J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1507-1514.
181. Keiser, J. & Utzinger, J. (2007). Food-borne trematodiasis, current chemotherapy and advances with artemisinin and synthetic trioxolanes. *Trends Parasitol.* 23: 555-562.
182. Keiser, J., Gruyer, M.S., Perrottet, N., Zanolari, B., Mercier, T. & Decosterd, L. (2009). Pharmacokinetic parameters of artesunate and dihydroartemisinin in rats infected with *Fasciola hepatica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63: 543-549.
183. Keiser, J., Shu-Hua, X., Tanner, M. & Utzinger, J. (2006). Artesunate and artemether are effective fasciolicides in the rat model and *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 1139-1145.
184. Kendall, S.B. & Parfitt, J.W. (1962). The chemotherapy of fascioliasis. *Brit. Vet. J.* 118: 1-10.
185. Kenyon, F., Sargison, N.D., Skuce, P.J. & Jackson, E. (2009). Sheep helminth parasitic disease in South Eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet. Parasitol.* 163: 293-297.
186. Kesik, M., Jedlina-Panasiuk, L., Kozak-Cieszczyk, M., Plucienniczak, A. & Wedrychowicz, H. (2007). Enteral vaccination of rats against *Fasciola hepatica* using recombinant cysteine proteinase (cathepsin L1). *Vaccine* 25: 3619-3628.
187. Kim, W., Khan, N.A., McMurray, D.N., Prior, I.A., Wang, N. & Chapkin, R.S. (2010). Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog. Lipid Res.* 49: 250-261.

188. Klein, J. (1979). *La Mesta: Estudio de la Historia Económica Española, 1273-1836*. Alianza Editorial, Madrid, 457 pp.
189. Kohyama, M., Sugahara, D., Hosokawa, H., Kubo, M. & Hozumi, N. (2001). IL-4-mediated development of TGF-beta1-producing cells from naïve CD4(+) T cells through a STAT6-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 31: 3659-3666.
190. Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E. & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 96: 367-372.
191. Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E. & Skrzydlewska, E. (2006). *Fasciola hepatica*: Effects on the antioxidative properties and lipid peroxidation of rat serum. *Exp. Parasitol.* 113: 43-48.
192. Kooshan, M., Hashemi-Tabar, G.R. & Naghibi, A. (2010). Use of Somatic and Excretory-Secretory antigens of *Fasciola hepatica* in diagnosis of sheep by ELISA. *Am-Eur. J. Agric. Env. Sci.* 7: 170-175.
193. Kozak-Cieszczyk, M. (2006). The occurrence of *Fasciola hepatica* in chosen regions of Poland based on molecular and serological methods. *Wiad. Parazytol.* 52: 137-139.
194. Krämer, F. & Schnieder, T. (1998). Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1923-1929.
195. Lafuente, J. & Vela, Y. (2011). *La Veterinaria a través de los tiempos*. Ed. Servet, Zaragoza, 344 pp.
196. Lahmar, S., Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H. & Craig, P.S. (2006). Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet. Parasitol.* 144: 287-292.
197. Lane, G. (1998). Anthelmintic Resistance. *Vet. Rec.* 143: 232.

198. **Lapage, G.** (1981). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Continental, México, 790 pp.
199. **Lee, C.G., Homer, R.J., Cohn, L., Link, H., Craft, J.E., Graham, B.S., Johnson, T.R. & Elias, J.A.** (2002). Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 277: 35466-35474.
200. **Litherland, A., Deighton, D. & Leathwick, D.** (2008). An evaluation of anthelmintic, properties assessed using faecal nematode egg counts, of New Zealand native flax (*Phormium tenax*). *N. Z. Vet. J.* 56: 339-342.
201. **Liu, D.** (2012). Molecular detection of human parasitic pathogens. CRC Press, Boca Raton, 895 pp.
202. **López-Abán, J., Casanueva, P., Nogal, J., Arias, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández, A.R. & Muro, A.** (2007). Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet. Parasitol.* 145: 287-296.
203. **López-Abán, J., Esteban, A., Vicente, B., Rojas-Caraballo, J., del Olmo, E., Martínez-Fernández, A.R., Hillyer, G.V. & Muro, A.** (2012). Adaptive immune stimulation is required to obtain high protection with fatty acid binding protein vaccine candidate against *Fasciola hepatica* in Balb/C mice. *J. Parasitol.* 98: 527-535.
204. **López-Abán, J., Nogal-Ruiz, J.J., Vicente, B., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández, A.R., Feliciano, A.S., Muro, A.** (2008). The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 153: 176-181.

205. López-Abán, J., Ramajo, V., Pérez-Arellano, J.L., Oleaga, A., Hillyer, G.V. & Muro, A. (1999). A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/B1 mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* 83: 107-121.
206. Losson, B. (1988). Chimio prophylaxie et chimiothérapie de la distomatose: Médicaments classiques et molécules nouvelles. *Ann. Méd. Vét.* 132: 93-106.
207. Luzón-Peña, M. (1991). *Epizootiología de la fasciolosis en la zona centro de España: Cronobiología de las fases de vida libre y en el hospedador intermediario en las condiciones climáticas de Madrid* (Tesis Doctoral). Servicio de Reprografía, Universidad Complutense de Madrid, 221 pp.
208. Luzón-Peña, M., Cerrada, C., Meana, A. & Gómez-Bautista, M. (1997). Prevalencia de fasciolosis en ovino en áreas de alta producción de España. *Albéitar* 11: 16.
209. Luzón-Peña, M., Manga-González, Y. & Ramajo, V. (1994a). Epidemiología (Fasciolosis). *Ovis* 34: 21-32.
210. Luzón-Peña, M., Rojo-Vázquez, F.A. & Gómez-Bautista, M. (1995). Seasonal availability of *Fasciola hepatica* metacercariae in a temperate Mediterranean area (Madrid, Spain). *Zentralbl. Veterinarmed. B* 42: 577-585.
211. Luzón-Peña, M., Rojo-Vázquez, F.A. & Gómez-Bautista, M. (1994b). The overwintering of eggs, intramolluscal stages and metacercariae of *Fasciola hepatica* under the temperatures of a Mediterranean area (Madrid, Spain). *Vet. Parasitol.* 55: 143-148.
212. MacGlaflin, C.E., Zajac, A.M., Rego, K.A. & Petersson, K.H. (2011). Effect of vitamin E supplementation on naturally acquired parasitic infection in lambs. *Vet. Parasitol.* 175: 300-305.

- 213. MAFF** (1986). *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Technical bull. N. 18, HMSO, Londres, 160 pp.
- 214. Maffei Facino, R., Carini, M., Aldini, G., Ceserani, R., Ceserani, I., Cavaletti, E. & Vederio, L.** (1993). Efficacy of glutathione for treatment of fascioliasis, an investigation in the experimentally infested rat. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 43, 455-460.
- 215. MAGRAMA** (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2012). *Censo de la ganadería española y encuestas ganaderas. Boletín mensual de Estadística* (ss. XX-XXI). Secretaría General Técnica, Madrid.
- 216. MAGRAMA** (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (2014). *Datos sobre pluviosidad, temperature, insolación y humedad en la provincia de León* (versión electrónica). Secretaría General Técnica, Madrid.
- 217. Mallada, L.** (1882). Causas de la pobreza de nuestro suelo. *Boletín de la Sociedad Geográfica de Madrid* XII, Madrid, pp. 89-109.
- 218. Malone, J.B., Williams, T.E., Muller, R.A., Gearchan, J.P. & Loyacano, A.F.** (1987). Fascioliasis in cattle in Louisiana: Development of a system to a predict disease risk by climate using the Thornthwaite water budget. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1167-1170.
- 219. Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Pozo-Carnero, M.P. & Hidalgo-Argüello, R.** (1990). Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitol. Pol.* 35: 149-157.
- 220. Marcos, A., Nova, E. & Montero, A.** (2003). Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (Suppl. 1): S66-S69.
- 221. Marcos Sánchez, A.** (2012). Inmunonutrición: Una materia transversal y emergente. *Ann. R. Acad. CC. Vet.* 20: 97-147.

222. **Marín Barriguete, F.** (1989). Reformismo y ganadería: El Honrado Concejo de la Mesta en el reinado de Carlos III. *Actas del Congreso Internacional sobre Carlos III y la Ilustración: El Rey y la monarquía*. Ministerio de Cultura, Madrid.
223. **Marín Gómez, M.S.** (1992). *Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario* (Tesis Doctoral). Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo.
224. **Marley, C.L., Fraser, M.D., Fychan, R., Theobald, V.J. & Jones, R.** (2005). Effect of forage legumes and anthelmintic treatment on the performance, nutritional status and nematode parasites of grazing lambs. *Vet. Parasitol.* 131: 267-282.
225. **Martínez-Cruz, S., Rodríguez, R., Becerra, C. & Martínez-Moreno, A.** (1993). Seroprevalencia de la fasciolosis caprina en Andalucía. *Acta Parasitol. Port.* 1: 209.
226. **Martínez-Fernández, A.R., Nogal-Ruiz, J.J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Hillyer, G.V. & Muro, A.** (2004a). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet. Parasitol.* 126: 287-298.
227. **Martínez-Fernández, A.R., Nogal-Ruiz, J.J. & Muro, A.** (2004b). Ensayos de protección (vacunas), frente a *Fasciola hepatica*. *Ann. R. Acad. CC. Vet.* 12: 167-183.
228. **Martínez-Ibeas, A., Martínez-Valladares, M., González, C., Miñambres, B. & Manga-González, Y.** (2011). Detection of *Dicrocoelium dendriticum* larval stages in mollusc and ant intermediate hosts by PCR, using mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS-2) sequences. *Parasitology* 138: 1916-1923.
229. **Martínez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Moreno, T., Redondo, E.S.H., Martín de las Mulas, J. & Pérez, J.** (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet. Parasitol.* 82: 19-33.

230. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Benavides, J., Morán, L., Andrés, S., Giráldez, F.J., Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. (2014). Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* doi: 10.1016/j.rvsc.2014.05.009.
231. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. (2012). Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 190: 80-86.
232. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Valcárcel-Sancho, F., González-Guirado, A.M., Casanova-García de Castro, I., Nieto-Martínez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. (2013). Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 112: 2913-2923.
233. Martínez Rodríguez, J.M., Gutiérrez Álvarez, S.J. & Puente Feliz, G. (2009). *Un siglo de la Cámara de Comercio e Industria de León*. Ediprest Arte 2000, León, 674 pp.
234. Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C., Castañón-Ordóñez, L., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N. & Rojo-Vázquez, F.A. (2010a). Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 174: 166-169.
235. Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C. & Rojo-Vázquez, F.A. (2014). Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Exp. Parasitol.* 136: 59-62.
236. Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A. (2010b). Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol. Res.* 107: 1205-1211.

237. **Martínez-Valladares, M., Geldhof, P., Jonsson, N., Rojo-Vázquez, F.A. & Skuce, P.** (2012). *Teladorsagia circumcincta*: Molecular characterisation of the avr-14B subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* 2: 154-161.
238. **Martínez-Valladares, M., Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Cordero-Pérez, C., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., González-Lanza, C., Castañón-Ordóñez, L. & Rojo-Vázquez, F.A.** (2013). Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit. Vectors* 6: 282.
239. **Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, M.P., Cruz-Rojo, M.Á. & Rojo-Vázquez, F.A.** (2005). Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 27: 219-225.
240. **Mas-Coma, S., Bargues, M.D. & Valero, M.A.** (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35: 1255-1278.
241. **Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D.** (2009). *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69: 41-146.
242. **Masihi, K.N.** (2000). Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int. J. Immunopharmacol.* 22: 1083-1091.
243. **Masihi, K.N. & Lange, W.** (1988). *Immunomodulators and nonspecific host defence mechanisms against microbial infections*. Pergamon Press, Oxford, 462 pp.
244. **Massoud, A., El Sisi, S., Salama, O. & Massoud, A.** (2001). Preliminary study of therapeutic efficacy of a new fasciolicidal drug derived from *Commiphora molmol* (Myrrh). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 96-99.

245. Mathis, A. & Deplazes, P. (2006). Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.* 55: S87-S90.
246. Mauri, C. & Ehrenstein, M.R. (2008). The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 29: 34-40.
247. McCann, C.M., Baylis, M. & Williams, D.J. (2010). Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *Vet. Rec.* 166: 612-617.
248. McConville, M., Brennan, G.P., Flanagan, A., Edgar, H.W., Hanna, R.E., McCoy, M., Gordon, A.W., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Fairweather, I. (2009). An evaluation of the efficacy of compound alpha and triclabendazole against two isolates of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 162: 75-88.
249. Meaney, M., Allister, J., McKinsty, B., McLaughlin, K., Brennan, G.P., Forbes, A.B. & Fairweather, I. (2006). *Fasciola hepatica*: Morphological effects of a combination of triclabendazole and clorsulon against mature flukes. *Parasitol. Res.* 99: 609-621.
250. Meeusen, E.N. & Brandon, M.R. (1994). The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune response during infection. *Eur. J. Immunol.* 24: 469-474.
251. Meeusen, E.N., Lee, C.S., Rickard, M.D. & Brandon, M.R. (1995). Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17: 37-45.
252. Meeusen, E.N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.P. & Jungersen, G. (2007). Current status of Veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 489-510.
253. Mendes, R.E. (2010). *Estudio inmunopatológico de la respuesta inducida por el antígeno recombinante Sm14 en la fasciolosis caprina* (Tesis Doctoral). Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, 286 pp.

254. Mendes, R.E., Pérez-Écija, R.A., Zafra, R., Buffoni, L., Martínez-Moreno, Á., Dalton, J.P., Mulcahy, G. & Pérez, J. (2010a). Evaluation of hepatic changes and local and systemic immune responses in goats immunized with recombinant Peroxiredoxin (Prx) and challenged with *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 28: 2832-2840.
255. Mendes, R.E., Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Martínez-Moreno, Á., Tendler, M. & Pérez, J. (2010b). Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 698-705.
256. Merck Veterinary Manual (2000). Editorial Océano, Barcelona, 2.558 pp.
257. Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C. & Ubeira, F.M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *J. Parasitol.* 90: 845-852.
258. Mezo, M., González-Warleta, M. & Ubeira, F.M. (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 93: 65-72.
259. Min, B., Hart, S., Miller, D., Tomita, G., Loetz, E. & Sahl, T. (2005). The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Vet. Parasitol.* 130: 105-113.
260. Mitchell, G.B., Maris, L. & Bonniwell, M.A. (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143: 399.
261. Moliner, M. (1981). *Diccionario de uso del español*. Ed. Gredos, Madrid, 3.031 pp.
262. Moll, L., Gaasenbeek, C.P., Vellema, P. & Borgsteede, F.H. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 91: 153-158.

263. Molloy, J.B., Anderson, G.R., Fletcher, T.I., Landmann, J. & Knight, B.C. (2005). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Vet. Parasitol.* 130: 207-212.
264. Monk, J.M., Hou, T.Y., Turk, H.F., Weeks, B., Wu, C., McMurray, D.N. & Chapkin, R.S. (2012). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease obesity-associated Th17 cell-mediated inflammation during colitis. *PLoS One* 7: e49739.
265. Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Benavides, J., Prieto, N., Pérez, V. & Giráldez, F.J. (2012). Antioxidants included in the diet of fattening lambs: effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173: 177-185.
266. Moreau, E. & Chauvin, A. (2010). Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 428593.
267. Moreau, E., Chauvin, A. & Boulard, C. (1998). IFN gamma and IL-10 production by hepatic lymph node and peripheral blood lymphocytes in *Fasciola hepatica* infected sheep. *Parasite* 5: 307-315.
268. Mori, T.A. & Beilin, L.J. (2004). Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6: 461-467.
269. Morrison, C.A., Colin, T., Sexton, J.L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T. & Spithill, T.W. (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 14: 1603-1612.
270. Mossmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989a). Heterogeneity of cytokine secretion pattern and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46: 111-147.

271. **Mossmann, T.R. & Coffman, R.L.** (1989b). Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173.
272. **Moustafa, N.E., Hegab, M.H. & Hassan, M.M.** (1998). Role of ELISA in early detection of *Fasciola* copro-antigens in experimentally infected animals. *J. Eg. Soc. Parasitol.* 28: 379-387.
273. **Mulcahy, G.** (2008). Physiopathology of fasciolosis: from parasitic aggression to medical consequences. En: **Dorchies, P.** (Ed.): *Bovine Fasciolosis: A parasitic infection of the past, present and future... Epidemiology and treatment issues*. Virbac S.A., Francia, pp. 34-43.
274. **Mulcahy, G. & Dalton, J.P.** (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 70: 83-86.
275. **Mulcahy, G., O'Connor, F., Clery, D., Hogan, S.F., Dowd, A.J., Andrews, S.J. & Dalton, J.P.** (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.* 67: 27-33.
276. **Mulcahy, G., O'Connor, F., McGonigle, S., Dowd, A., Clery, D.G., Andrews, S.J. & Dalton, J.P.** (1998). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 16: 932-939.
277. **Mulcahy, G., O'Neill, S., Fanning, J., McCarthy, E. & Sekiya, M.** (2005). Tissue migration by parasitic helminths -an immunoelusive strategy? *Trends Parasitol.* 21: 273-277.
278. **Muro, A., Ramajo, V., López, J., Simón, F. & Hillyer, G.V.** (1997). *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol.* 69: 219-229.

279. **Murray, M.** (1973). Fascioliasis: Pathology. En: Urquhart, G.M. & Armour, J. (Eds.): *Helminth diseases of cattle, sheep and horses in Europe: Proceedings of Workshop Held at Veterinary School of University of Glasgow*. R. MacLehose & Co. Ltd., Glasgow, pp. 92-96.
280. **Murray, M. & Rushton, B.** (1975). The pathology of fascioliasis, with particular reference to hepatic fibrosis. En: Taylor, A.E.R. & Muller, R. (Eds.): *Pathogenic processes in parasitic infections*. Blackwell Sci. Ltd., Oxford, pp. 27-41.
281. **Nicholls, E., Madera, L. & Hancock, R.** (2010). Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1213: 46-61.
282. **Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Waghorn, G.C. & Charleston, W.A.G.** (1993). Internal parasites and lamb production -a role for plants containing condensed tannins? *Proc. N. Z. Soc. An. Prod.* 53: 235-238.
283. **O'Brien, D.J.** (1998). Fasciolosis: A threat to livestock. *Irish Vet. J.* 51: 539-541.
284. **Onar, E.** (1990). Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 35: 139-145.
285. **O'Neill, J.F., Johnston, R.C., Halferty, L., Brennan, G.P., Keiser, J. & Fairweather, I.** (2009). Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: Morphological changes in the tegument and gut following *in vivo* treatment with artemether in the rat model. *J. Helminthol.* 83: 151-163.
286. **O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H. & Dalton, J.P.** (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22: 147-155.
287. **O'Neill, S.M., Mills, K.H.G. & Dalton, J.P.** (2001). *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon- γ production *in vivo*. *Parasite Immunol.* 23: 541-547.

288. Oprescu, I., Darabuș, G., Morariu, S., Mederle, N., Ilie, M.S., Imre, M., Imre, K. & Onita, P. (2010). Immunological diagnosis of fasciolosis by ELISA method in sheep and cattle from Arad County. *Lucrari Stiintifice Med. Vet.* 43: 21-29.
289. Orellana, P., Recabarren, S., Lobos, A., Islas, A., Briones, M. & Rubilar, L. (1999). Effects of winter supplementation and antiparasite treatment on the productive performance of milk herd in the central-south region of Chile. *Prev. Vet. Med.* 38: 207-215.
290. Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J. & Williams, D.J.L. (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 93: 121-134.
291. Ovejero-Guisasola, J.I. & Fresno-Escudero, M. (2010). Lipopolysaccharide of *Ochrobactrum intermedium* and their use as immunostimulant of mammals. WO 2010/139352 A1.
292. Over, H.J. & Dijkstra, J. (1975). Infection rhythm in fascioliasis. En: Over, H.J. & Armour, J. (Eds.): *Facts & reflections, II*. Lelystad Workshop Fascioliasis, pp. 9-17.
293. Overend, D.J. & Bowen, F.L. (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.* 72: 275-276.
294. Pavoncelli, R. & Tampieri, M.P. (1978). The occurrence of hepatic trematodes in sheep from Emilia-Romagna. *Parassitologia* 20: 217-220.
295. Paz-Silva, A., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Díaz, P., Panadero, R., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 88: 568-573.

296. Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol. Res.* 91: 328-331.
297. Pedreira, J., Feijoo, A., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Díaz, P., López, C., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2003). Valoración de las parasitosis digestivas en ganado ovino de Galicia. *XI Cong. Int. Fe. Me. S. P. Rum., Italia.*
298. Pérez, J., Martín de las Mulas, J., Carrasco, L., Gutiérrez, P.N., Martínez-Cruz, M.S. y Martínez-Moreno, Á. (1999). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 120: 199-210.
299. Pérez, J., Ortega, J., Bravo, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Moreno, T. & Martínez-Moreno, A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica* with and without triclabendazole treatment. *Vet. Res.* 36: 1-12.
300. Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sández, C. & Martínez-Moreno, Á. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.* 127: 30-36.
301. Pfister, K. (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. *Rev. Sci. Technol.* 9: 511-518.
302. Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P. & Carmona, C. (1999). Vaccination of sheep with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis. *Infect. Immun.* 67: 1954-1961.

303. Piedrafita, D., Estuningsih, S.E., Pleasance, J., Prowse, R., Raadsma, H.W., Meeusen, E.N. & Spithill, T.W. (2007). Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity *in vitro* against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* 75: 1954-1963.
304. Piedrafita, D., Raadsma, H., Prowse, R. & Spithill, T.W. (2004). Immunology of the host parasite relationship in fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Can. J. Zool.* 82: 233-250.
305. Piñeiro Fraga, P. (2013). *Estudio de los posibles reservorios de la fasciolosis en Galicia* (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, 131 pp.
306. Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E. & Piedrafita, D. (2011). Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol.* 33: 495-505.
307. Pockros, P.J. & Capozza, T.A. (2005). Helminthic infections of the liver. *Curr. Inf. Dis. Rep.* 7: 61-70.
308. Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: Role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 21: 49-98.
309. Prichard, R. (1994). Anthelmintic Resistance. *Vet. Parasitol.* 64: 259-268.
310. Pritchard, D.I., Hewitt, C. & Moqbel, R. (1997). The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* 115: 33-44.
311. Pullan, N.B., Sewell, M.M.H. & Hammond, J.A. (1970). Studies on the pathogenicity of massive infections of *Fasciola hepatica* L. in lambs. *Brit. Vet. J.* 126: 543-558.
312. Quintana López, T. (1993). *Derecho Veterinario: Epizootias y Sanidad Animal* (Serie de Monografías Jurídicas). Ed. Marcial Pons, Madrid, 192 pp.

313. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). *Veterinary Medicine*. W.B. Saunders, Londres, 2.065 pp.
314. RAE (Real Academia Española de la Lengua) (2001). *Diccionario de la Lengua Española*. Ed. Espasa Calpe, Madrid.
315. Ramajo, V., Oleaga, A., Casanueva, P., Hillyer, G.V. & Muro, A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol.* 97: 35-46.
316. Ramajo-Martín, V., López-Abán, J., Serrano, A.E., Oleaga-Pérez, A. & Muro, A. (1996). A long term study on the prevalence of gastrointestinal, hepatic and pulmonary parasitism in adult sheep from Salamanca province, Western Spain. *Res. Rev. Parasitol.* 56: 173-177.
317. Ramajo-Martín, V. & Simón-Vicente, F. (1989). Datos epizootiológicos sobre la fasciolosis ovina en praderas de regadío (Salamanca). *VI Cong. Nac. y I Cong. Ibér. Parasitol.*, Cáceres, pág. 213.
318. Reddy, P.G., Morrill, J.L., Minocha, M.B., Dayton, A.D. & Frey, R.A. (1986). Effect of supplemental vitamin E on the immune system of calves. *J. Dairy Sci.* 69: 164-171.
319. Reffett, J.K., Spears, J.W. & Brown, T.T. (1988). Effect of dietary selenium and vitamin E on the primary and secondary immune response in lambs challenged with parainfluenza₃ virus. *J. Animal Sci.* 66: 1520-1528.
320. Rehbein, S. & Visser, M. (1999). Efficacy of an injectable ivermectin/clorsulon combination against *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Rec.* 145: 468.
321. Rehim, W.M., Sharaf, I.A., Hishmat, M., el-Toukhy, M.A., Rawash, N.A. & Fouad, H.N. (2003). Antioxidant capacity in *Fasciola hepatica* patients before and after treatment with triclabendazole alone or in combination with ascorbic acid (vitamin C) and tocofersolan (vitamin E). *Arzneimittelforschung* 53: 214-220.

322. Reichel, M.P. (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet. Parasitol.* 107: 65-72.
323. Reid, J.F.S. (1973). Fascioliasis: Clinical aspects and diagnosis. En: Urquhart, G.M. & Armour, J. (Eds.): *Helminth diseases of cattle, sheep and horses in Europe: Proceedings of Workshop Held at Veterinary School of University of Glasgow*. R. MacLehose & Co. Ltd., Glasgow, pp. 81-86.
324. Reid, J.F., Armour, J., Urquhart, G.M. & Jennings, F.W. (1970). Studies on ovine fascioliasis. Observations on the sequential development of the naturally-acquired disease. *Vet. Rec.* 86: 242-249.
325. Reina, D., Navarrete, I., Hernández-Rodríguez, S. & Habela, M. (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. II. Helmintos. *Rev. Ibér. Parasitol.* (suplem.): 85-90.
326. Reinhard, E.G. (1957). Landmarks of parasitology. I. The discovery of the life cycle of the liver fluke. *Exp. Parasitol.* 6: 208-232.
327. Reiter, P. (2001). Climate change and mosquito-borne disease. *Environ. Health Perspectiv.* 109: 141-161.
328. Richter, J., Freise, S., Mull, R. & Millán, J. (1999). Fascioliasis: Sonographic abnormalities of the biliary tract and evolution after treatment with triclabendazole. *Trop. Med. Int. Health* 4: 774-781.
329. Rietschel, E.T. & Brade, H. (1992). Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 267: 54-61.
330. Roberson, E.L. (1984). Fármacos contra cestodos y trematodos. En: Booth, N.H. & McDonald, L.E. (Eds.): *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, pág. 84.

331. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. & Martínez-Valladares, M. (2013). The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. *Vet. Parasitol.* 197: 277-282.
332. Rodríguez Rodríguez, B. (1955). *Estudio de la ganadería leonesa*. Imprenta de la Diputación de León, 150 pp.
333. Rodríguez Ferri, E.F. (2012). *Enfermedades emergentes y reemergentes* (Diplomado en Sanidad). Apuntes del Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León y de la Escuela Nacional de Sanidad, Valladolid-Madrid, pp. 1-42.
334. Rodríguez-Osorio, M., Rojas, J. & Gómez-García, V. (1998). *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. *J. Parasitol.* 84: 1053-1055.
335. Roitt, I. (2006). *Essential Immunology*. Wiley-Blackwell, Oxford, 496 pp.
336. Rojo-Vázquez, F.A. (2008). Epidemiology and control in Spain. En: Dorchies, P. (Ed.): *Bovine Fasciolosis. A parasitic infection of the past, present and future... Epidemiology and treatment issues*. Virbac S.A., Carros cedex, pp. 96-103.
337. Rojo-Vázquez, F.A. & Ferre-Pérez, I. (1999). Fasciolosis. En: Cordero del Campillo, M. & Rojo-Vázquez, F.A. (Eds.): *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 260-272.
338. Rojo-Vázquez, F.A. & Gómez-Bautista, M. (1989). Historia y Etiología (Trematodosis hepáticas: Fasciolosis). *Bovis* 31: 13-16.
339. Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F. & Martínez-Valladares, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 189: 15-38.
340. Ross, J.G. (1965). Experimental infections of cattle with *Fasciola hepatica*: A comparison of low and high infection rates. *Nature* 208: 907.
341. Ross, J.G.; Dow, C. & Todd, J.R. (1967). A study of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Rec.* 80: 543-546.

342. Rowlands, D.T. & Clampitt, R.B. (1979). Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 5: 155-175.
343. Ruiz-Maya, L. (1978). Sobre la metodología del Índice de Gini. *Cuadernos de Economía* 16: 327-346.
344. Rushton, B. & Murray, M. (1977). Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *J. Comp. Pathol.* 87: 459-470.
345. Russel, A.J.F., Doney, J.M. & Gunn, R.G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agr. Sci.* 72: 451-454.
346. Sabatino, R. (1954). El origen de la oveja merina. *Estudios de Historia Moderna IV*, Barcelona, pp. 122-132.
347. Sahin, K. & Kucuk, O. (2001). A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters. *Acta Vet. Hung.* 49: 421-430.
348. Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 93: 39-46.
349. Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2001). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 87: 609-614.
350. Santiago, N. & Hillyer, G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74: 810-818.
351. Sanz Egaña, C. (1927). Don Dalmacio García Izcara (1859-1927). *Revista de Higiene y Sanidad Pecuarias XVII*, 12: 897-916.
352. Schalm, O., Jain, J. & Carroll, E. (1981). *Hematología Veterinaria*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

353. Schmidt-Weber, C.B., Alexander, S.I., Henault, L.E., James, L. & Lichtman, A.H. (1999). IL-4 enhances IL-10 genes expression in murine Th2 cells in the absence of TCR engagement. *J. Immunol.* 162: 238-244.
354. Seder, R.A. & Paul, W.E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 635-673.
355. Segrelles Serrano, J.A. (1993). *La ganadería avícola y porcina en España. Del aprovechamiento tradicional al industrializado*. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Alicante, 782 pp.
356. Severin, K., Mašek, T., Janicki, Z., Konjević, D., Slavica, A., Marinculić, A., Martinković, F., Vengušt, G. & Džaja, P. (2012). Liver enzymes and blood metabolites in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Fascioloides magna*. *J. Helminthol.* 86: 190-196.
357. Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T.W. & Mitchell, G.F. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 145: 3905-3910.
358. Shevach, E.M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: More questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400.
359. Shirai, W., Sato, T., Shibuya, H., Naito, K. & Tsukise, A. (2006). Anatomicopathological study of vascular and biliary systems using cast samples of *Fasciola*-infected bovine livers. *J. Vet. Med. A: Phys. Path. Clin. Med.* 53: 239-245.
360. Sinclair, K.B. (1967). Pathogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. *Helm. Abs.* 36: 115-134.
361. Smyth, J.D. & Halton, D.W. (1983). *The physiology of trematodes*. Cambridge University Press, Cambridge, 446 pp.

362. **Soliman, O.E., El-Arman, M., Abdul-Samie, E.R., El-Nemr, H.I. & Massoud, A.** (2004). Evaluation of myrrh (Mirazid) therapy in fascioliasis and intestinal schistosomiasis in children: Immunological and parasitological study. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 34: 941-966.
363. **Soulsby, E.J.L.** (1987). *Helmintos, artrópodos y protozoos de animales domésticos*. Ed. Interamericana, México, 809 pp.
364. **Spears, J.W. & Weiss, W.P.** (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176: 70-76.
365. **Spithill, T.W., Piedrafita, D. & Smooker, P.M.** (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int. J. Parasitol.* 27: 1221-1235.
366. **Sunita, K. & Singh, D.K.** (2011). Fascioliasis control: *In vivo* and *in vitro* phytotherapy of vector snail to kill *Fasciola* larva. *J. Parasitol. Res.* 2011: 240807.
367. **Symons, L.E.A.** (1989). *Pathophysiology of endoparasitic infection compared with ectoparasitic infestation and microbial infection*. Academic Press, Sidney, 331 pp.
368. **Sykes, A.R., Coop, R.L. & Robinson, M.** (1980). Chronic subclinical ovine fasciolosis: plasma glutamate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. *Res. Vet. Sci.* 28: 71-75.
369. **Talukder, S., Bhuiyan, M.J., Hossain, M.M., Uddin, M., Paul, S. & Howlader, M.M.R.** (2010). Pathological investigation of liver fluke infection of slaughtered Black Bengal Goat in a selected area of Bangladesh. *Bang. J. Vet. Med.* 8: 35-40.
370. **Tawill, S., Le Goff, L., Ali, F., Blaxter, M. & Allen, J.E.** (2004). Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect. Immun.* 72: 398-407.
371. **Taylor, E.L.** (1937). The revelation of the life-history of the liver fluke as an illustration of the process of scientific discovery. *Vet. Rec.* 49: 53-58.

372. TDC (Technical Development Committee of the British Veterinary Association) (1974). Hepatic vascular pathology in ovine fascioliasis. *Vet. Rec.* 95: 572-573.
373. Thienpont, D., Rochette, F. & Vanparijs, O.F.J. (1986). *Diagnosing helminthiasis by coprological examination*. Janssen Res. F., Beerse, 187 pp.
374. Thomas, A.P. (1883). The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). *Q. J. Microsc. Sci.* 23: 99-133.
375. Threadgold, L.T. & Brennan, G. (1978). *Fasciola hepatica*: Basal infolds and associated vacuoles of the tegument. *Exp. Parasitol.* 45: 300-316.
376. Trudgett, A., McNair, A.T., Hoey, E.M., Keegan, P.S., Dalton, J.P., Rima, B.K., Miller, A. & Ramasamy, P. (2000). The major tegumental antigen of *Fasciola hepatica* contains repeated elements. *Parasitology* 121: 185-191.
377. Tufenkji, A.E., Alvinerie, M., Houin, G. & Galtier, P. (1987). Pharmacokinetics of sulphobromophthalein, lidocaine and indocyanine green in the course of subclinical fascioliasis in sheep. *Res. Vet. Sci.* 43: 327-330.
378. Tufenkji, A.E., Alvinerie, M., Pineau, T., Boulard, C. & Galtier, P. (1988). Incidence of a subclinical fascioliasis on antipyrine clearance and metabolite excretion in sheep. *Xenobiotica* 18: 357-364.
379. Uriarte, J., Cabaret, J. & Tanco, J.A. (1985). The distribution and abundance of parasitic infections in sheep grazing on irrigated or non-irrigated pastures in north-eastern Spain. *Ann. Res. Vét.* 16: 321-325.
380. Urquhart, G.M., Duncan, J., Armour, L., Dunn, J. & Jennings, A.M. (2003). *Veterinary Parasitology*. Wiley-Blackwell, Oxford, 400 pp.
381. Valderrábano, J., Calvete, C. & Uriarte, J. (2010). Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Vet. Parasitol.* 172: 89-94.

382. Valero, M.A., Ubeira, F.M., Khoubbane, M., Artigas, P., Muiño, L., Mezo, M., Pérez-Crespo, I., Periago, M.V., Mas-Coma, S. (2009). MM3-ELISA evaluation of coproantigen and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet. Parasitol.* 159: 77-81.
383. Valk, E.E. & Hornstra, G. (2000). Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70: 31-42.
384. Van der Ley, P. (2001). Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis lpxL* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect. Immun.* 69: 5981-5990.
385. Van Houtert, F.J. & Sykes, A.R. (1996). Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int. J. Parasitol.* 1151-1168.
386. Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B.W.J. & Bokhout, B.A. (1999). Protection against *Fasciola hepatica* in the intestine is highly correlated with eosinophil and immunoglobulin G1 responses against newly excysted juveniles. *Parasite Immunol.* 21: 243-251.
387. Van Milligen, F.J., Cornelissen, J.B.W.J., Hendriks, I.M., Gaasenbeek, C.P.H. & Bokhout, B.A. (1998). Protection to *Fasciola hepatica* in the gut mucosa of immune rats is associated with infiltrates of eosinophils, IgG1 and IgG2a antibodies around the parasites. *Parasite Immunol.* 20: 285-292.
388. Van Tiggele, L.J. & Over, H.J. (1976). Serological diagnosis of fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 1: 239-248.

389. Van Zeveren, A.M., Visser, A., Hoorens, P.R., Vercruysse, J., Claerebout, E. & Geldhof, P. (2007). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Ostertagia ostertagi* by the coefficient of variation and geNorm approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153: 224-227.
390. Vara-Del Río, M.P., Villa, H., Martínez-Valladares, M. & Rojo-Vázquez, F.A. (2007). Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitol. Res.* 101: 1003-1006.
391. Vázquez, L., Dacal, V., Cienfuegos, S., Díaz, P., Lago, N., Panadero, R., Fernández, G., Morrondo, P. & López, C. (2008). Occurrence of trematode eggs from Galicia (NW Spain). *XVI Int. Cong. Med. Fed. Health & Prod. Rum.*, Croacia.
392. Vercruysse, J., Dorny, P., Hong, C., Harris, T.J., Hammet, N.C., Smith, D.G. & Weatherley, A.J. (1993). Efficacy of doramectin in the prevention of gastrointestinal nematode infections in grazing cattle. *Vet. Parasitol.* 49: 51-59.
393. Veremeichenko, S.N. & Zdorovenko, G.M. (2008). Specific structural features and immunomodulatory properties of the Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44: 571-579.
394. Vuopio-Varkila, J., Marjatta, N., Pyhälä, L. & Mäkelä, P.H. (1988). Lipopolysaccharide-induced non-specific resistance to systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J. Med. Microbiol.* 25: 197-203.
395. Wamae, L.W. & Ihiga, M.K. (1991). Fasciolosis as a limiting factor in livestock productivity. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 39: 257-269.
396. Wetzel, R. (1947). Zur planmäßigen Bekämpfung des Leberegels. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 54: 114-117.
397. Williams, D. (2008). Immune reaction: An on-going struggle. En: Dorchies, P. (Ed.): *Bovine Fasciolosis. A parasitic infection of the past, present and future... Epidemiology and treatment issues*. Virbac S.A., Carros cedex, pp. 44-47.

398. Wolf-Spengler, M.L. & Isseroff, H. (1983). Fascioliasis: Bile duct collagen induced by proline from the worm. *J. Parasitol.* 69: 290-294.
399. Woolhouse, M.E. (2008). Emerging diseases go global. *Nature* 451: 898-899.
400. Zafra, R. (2007). *Estudio histopatológico e inmunohistoquímico del hígado y ganglios linfáticos hepáticos en cabras inmunizadas frente a Fasciola hepatica* (Tesis Doctoral). Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, 224 pp.
401. Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Écija, R.A., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J. & Pérez, J. (2009). Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res. Vet. Sci.* 87: 226-232.
402. Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez-Galisteo, M.E. & Pérez, J. (2010). Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native Glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 143: 110-119.
403. Zhang, W.Y., Moreau, E., Hope, J.C., Howard, C.J., Huang, W.Y. & Chauvin, A. (2005a). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp. Parasitol.* 111: 154-159.
404. Zhang, P., Smith, R., Chapkin, R.S. & McMurray, D.N. (2005b). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate murine Th1/Th2 balance toward the Th2 pole by suppression of Th1 development. *J. Nutr.* 135: 1745-1751.
405. Zimmerman, G.L., Jen, L.W., Cerro, J.E., Farnsworth, K.L. & Wescott, R.G. (1982). Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2097-2100.
406. Zimmerman, G.L., Wallace, D.H., Schons, D.J. & Hoberg, E.P. (1986). Efficacy of clorsulon against mature, naturally acquired *Fasciola hepatica* infections in cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1665-1667.

*Esta Tesis Doctoral vio la luz el día 31 de julio de 2014,
festividad de San Ignacio de Loyola.*