

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



Tesis doctoral por compendio de publicaciones

“Nuevas técnicas para el estudio de cepas ovinas de *Fasciola hepatica* con diferente origen y grado de resistencia a fármacos antihelmínticos”

Memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria **D. David Robles Pérez** para optar al grado de Doctor por la Universidad de León

Directores

Dra. María Martínez Valladares

Dr. Francisco A. Rojo Vázquez

León, 2015

La realización de la presente Tesis Doctoral ha tenido lugar en las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad 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 al siguiente proyecto y contrato de investigación:

- a) **“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.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. Don Francisco A. Rojo Vázquez y la Dra. Doña María Martínez Valladares su tiempo y dedicación hacia mi persona y el desarrollo de esta Tesis doctoral, de la misma manera que ha sido un orgullo para mi formar parte de este grupo de trabajo.

Hacer mención especial a mi compañero de fatigas en este viaje de tantos años, D. José Manuel Martínez Pérez. Muchas son las anécdotas, situaciones, alegrías y penurias que hemos pasado juntos y por ello un trocito de esta Tesis también es suya.

También quiero agradecer su ayuda y colaboración a todas las personas de los centros en los que desarrollé mi trabajo: el departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León y el Instituto de Ganadería de Montaña, haciendo especial hincapié en las técnicas especialistas de laboratorio por su enorme ayuda, y a otras personas que siempre estuvieron pendientes de mi trabajo, asesorándome o ayudándome.

Por último, y no menos importantes, sino más, dar las gracias a mis padres, Vicen y José Luis, a mi hermano Iván y a Marta, ya que la familia hace de uno lo que es y será en un futuro y ellos han estado y estarán siempre presentes en todos los momentos de mi vida. Y para finalizar todos estos agradecimientos, quería hacer una mención especial a mi madre, y decirla que esto y todo lo que haga en mi vida, va dedicado a ella porque ha sido la persona que más ha sufrido y luchado por sacarnos adelante y sin ella yo no hubiera sido nada. Así que mamá, esto va por ti. Aquí no te olvidamos, ni lo haremos jamás.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	11
<i>Introducción general</i>	11
1. Reseña histórica	13
2. Etiología.....	15
2.1. Agente etiológico.....	15
2.2. Encuadre taxonómico	15
2.3. Morfología del parásito adulto.....	15
2.4. Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	18
2.5. Variabilidad genética	22
3. Epidemiología	29
3.1. Hospedadores intermediarios y definitivos.....	29
3.2. Prevalencia	31
3.3. Influencia de los factores ambientales en la transmisión de la infección ..	34
3.4. Importancia económica.....	36
4. Patogenia y fisiopatología	38
4.1. Patogenia	38
4.2. Lesiones	40
4.2.1. Patogenia de la fibrosis y de la colangitis hiperplásica	44
4.3. Alteraciones hemáticas	45
4.4. Aspectos clínicos	48
5. Aspectos inmunitarios	53
5.1. Respuesta inmunitaria en la fasciolosis.....	56
5.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	60
6. Diagnóstico	63

6.1. Diagnóstico clínico.....	63
6.2. Diagnóstico coprológico	65
6.3. Inmunodiagnóstico	66
6.4. Diagnóstico por técnicas moleculares.....	68
7. Control y profilaxis.....	70
7.1. Medidas sobre el hospedador intermediario	70
7.2. Medidas sobre el hospedador definitivo.....	71
7.2.1. Quimioprofilaxis	71
7.2.1.1. Resistencia antihelmíntica y su detección	75
7.2.1.2. Mecanismo de desarrollo de la resistencia antihelmíntica.....	77
7.2.1.3. Control del desarrollo de las resistencias	81
7.2.2. Inmunoprofilaxis	82
7.2.3. Nutrición.....	86
7.2.4. Acción directa sobre el manejo de los hospedadores definitivos.....	87
CAPÍTULO II.....	89
<i>Objetivos</i>	89
CAPÍTULO III	93
<i>Publicaciones</i>	93
Analysis of genetic variability of <i>Fasciola hepatica</i> populations from different geographical locations by ISSR-PCR. . Parasitology 2014, 142: 527-533. Robles-Pérez, D., García-García, P., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y Martínez-Valladares, M.	95
The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of aPCR and its application in the detection of anthelminticresistance in sheep flocks naturally infected. Veterinary Parasitology 2013, 197: 277-282. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y Martínez-Valladares, M.-....	105
Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in <i>Fasciola hepatica</i> isolated from sheep.	

Veterinary Parasitology 2014, 203: 217-221. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y Martínez-Valladares, M.-	113
Screening of anthelmintic resistance to triclabendazole in <i>Fasciola hepatica</i> isolates from sheep by means of an egg hatch assay. BMC Research Veterinary 2015, 11:226. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y Martínez-Valladares, M.-.....	121
CAPÍTULO IV.....	129
<i>Resumen de resultados</i>	129
CAPÍTULO V	137
<i>Discusión general</i>	137
CAPÍTULO VI.....	151
<i>Conclusiones</i>	151
CAPÍTULO VII.....	155
<i>Referencias bibliográficas</i>	155

CAPÍTULO I

Introducción general

1. Reseña histórica

La primera referencia registrada de la enfermedad causada por *Fasciola hepatica* tuvo lugar en el año 1379 por el francés Jean de Brye, a quien el rey Carlos V de Francia encargó escribir un tratado sobre la correcta gestión de los rebaños ovinos. Atribuyó la enfermedad al consumo por las ovejas de la hoja de una hierba conocida como “dauve” que destruía el hígado del animal. En 1523 Sir Anthony Fitzherbert hizo ya referencia al término “flokcs” (trematodos), nombre que deriva de la palabra anglosajona "floc", que significa “lenguado”. En 1547, Gabucinus, se refirió al parásito como un helminto similar a una semilla de calabaza. Los antiguos tratados españoles denominan al parásito con nombres diversos como “coscojo”, “caracolillo” o “palomita” (Rojo-Vázquez & Gómez-Bautista, 1989; Díez Baños, 2011).

Francesco Redi en 1668 recuperó fasciolas del hígado de un carnero y de la bilis de una liebre, haciendo constancia de la ubicación biliar del parásito (Rojo-Vázquez et al., 2012). En 1698, Godefridus Bidloo, observó los huevos por primera vez y describió el parásito así como partes de su anatomía, confirmando su hermafroditismo (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994a); y Pierre Pallas en 1760 extrajo en una necropsia humana fasciolas de los conductos biliares. Otros investigadores como Mehlis, Blanchard, Leuckart, Sommer y Macé ya con posterioridad, describieron la anatomía del parásito de forma más detallada.

Entre los acontecimientos históricos relacionados con el parásito, dignos de tener en cuenta, nos encontramos con los siguientes:

- 1773: observación de las cercarias por Müller y su enquistamiento por Nitzsch en 1817.

- 1818: detección de las redías en el caracol por Bojanus, denominándolas así en honor a Redi (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999), aunque ya en 1738, Schwammerdan las había identificado sin saber darles un significado.
- 1831: descripción del huevo y del miracidio por Mehlis, confirmando Creplin en 1837 la transformación del miracidio a partir del huevo.
- 1842: Steenstrup introdujo el concepto de “alternancia de generaciones” para explicar la relación entre los distintos estadios larvarios con el parásito adulto.
- 1874: Weinland descubrió la relación entre los estadios larvarios y *Galba truncatula*, haciéndole pensar que podría tratarse del hospedador intermediario (Taylor, 1937). Esta teoría fue confirmada por Leuckart y Thomas en 1882 con el descubrimiento del ciclo biológico, y por Lutz en 1892, cuando confirmó que eran las metacercarias las que daban lugar al adulto. Sinitzin completó el ciclo biológico en 1914, cuando describió las rutas migratorias intraorgánicas (Andrews, 1999).

El descubrimiento del ciclo sirvió como modelo para otras parasitosis de trematodos digeneos en los que se sospechaba que podía existir algún hospedador intermediario.

2. Etiología

2.1. Agente etiológico

Entre los parásitos pertenecientes al género *Fasciola* con mayor incidencia a nivel mundial, se encuentran *F. hepatica*, presente en zonas templadas del planeta y *Fasciola gigantica*, frecuente en zonas de climas tropicales, aunque se ha observado su coexistencia en las zonas subtropicales (Krämer & Schnieder ,1998; Mas-Coma et al., 2005). Otros géneros relacionados son *Fascioloides magna* y *Fasciola jacksoni* (Cobbold, 1869), aunque estudios recientes ubican a esta última en el género *Fascioloides* (Heneberg, 2013).

2.2. Encuadre taxonómico

F. hepatica se encuentra encuadrada taxonómicamente en el Reino *Animalia*, Filo *Platyhelminthes*, Clase *Trematoda*, Subclase *Digenea* (van Beneden, 1858), Orden *Echinostomatida*, Familia *Fasciolidae* (Railliet, 1985) y Género *Fasciola* (Linnaeus, 1758).

2.3. Morfología del parásito adulto

F. hepatica es un helminto hermafrodita que presenta un cuerpo ancho, foliáceo, aplanado dorsoventralmente con simetría bilateral, de unas dimensiones de 18 a 51 mm de longitud por 4 a 13 mm de anchura y de color marrón grisáceo (Nozais et al., 1997). Presenta dos ventosas próximas entre sí; la oral es pequeña y está situada en el extremo

de una proyección en forma de cono en el extremo anterior. La ventral está situada caudalmente y entre ambas se puede observar el poro genital.

Su tegumento está cubierto por espinas móviles dirigidas hacia atrás (Boray, 1982), cuyo número varía en función del desarrollo del parásito (Bennett, 1975a, 1975b; Fairweather et al., 1999) y que sirven de barrera en la interacción parásito-hospedador ya que influyen directamente sobre el desarrollo de la respuesta inmunitaria (Trudgett et al., 2000). Este tegumento se ve dañado por los fármacos antihelmínticos (Halferty et al., 2009), impidiendo la formación de los microtúbulos (Stitt & Fairweather, 1993) y alterando la integridad de la membrana lo que finalmente provoca la muerte del parásito (Brennan et al., 2007). Otros estudios han demostrado que el tegumento sufre cambios morfológicos directamente por la acción de fármacos como el nitroxinil (McKinstry et al., 2003), clorsulón (Meaney et al., 2003, 2004) o triclabendazol (Stitt & Fairweather, 1993).

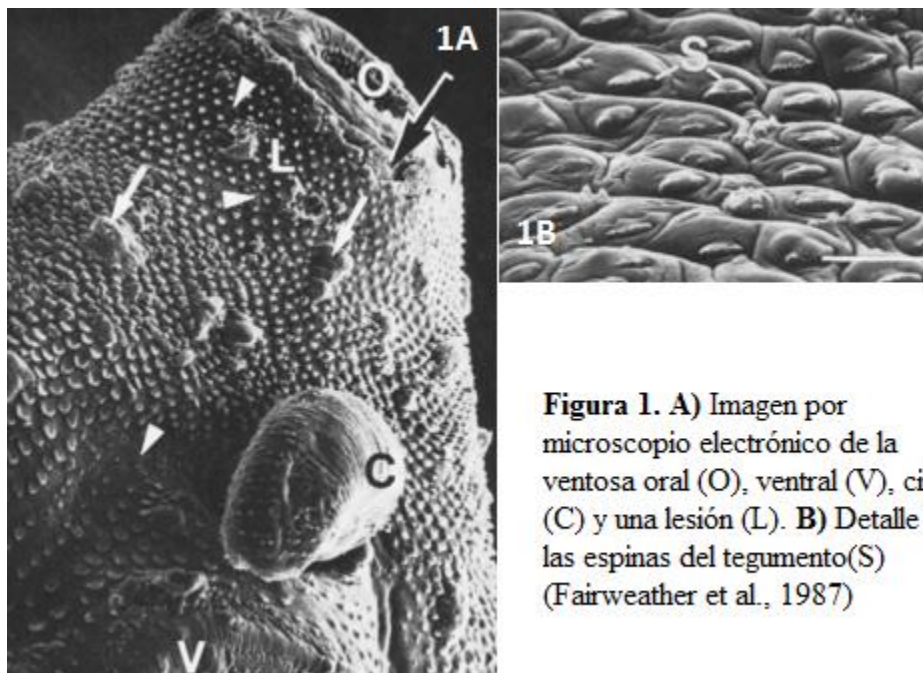


Figura 1. A) Imagen por microscopio electrónico de la ventosa oral (O), ventral (V), cirro (C) y una lesión (L). **B)** Detalle de las espinas del tegumento(S) (Fairweather et al., 1987)

La cubierta superficial del tegumento denominada glucocáliz se mantiene en las fases juveniles y durante toda la migración a través de la cavidad peritoneal y del hígado, perdiéndose cuando llega a los conductos biliares debido a una serie de cambios fisiomorfológicos. El nuevo tegumento más externo está compuesto de un sincitio anucleado cuyas células basales y apicales están unidas mediante túbulos (Threadgold, 1963; Bennett & Threadgold, 1975; Hanna, 1980a, 1980b). Los parásitos una vez que se establecen en los conductos biliares pueden permanecer allí durante años (Andriamanantena et al., 2005).

El parásito adulto presenta un aparato digestivo muy ramificado, especialmente los ciegos que son largos y con numerosos divertículos laterales. El sistema reproductor consta de dos testículos en la parte media y el útero y los ovarios están localizados anteriormente a los mismos.



Figura 2. Morfología interna de un adulto de *Fasciola hepatica*.

2.4. Ciclo biológico de *F. hepatica*

El ciclo biológico de *F. hepatica* es complejo, ya que necesita de dos hospedadores y una serie de condiciones climáticas para que pueda completarse. Los detalles del ciclo son los siguientes:

- a) Las **fasciolas adultas** presentes en los conductos biliares del hospedador definitivo, eliminan al ambiente huevos no embrionados por medio de las heces. Se estima que cada adulto elimina entre 2.000 y 5.000 huevos al día que pasan al duodeno mezclados con la bilis de la vesícula biliar (Graczyk & Fried, 1999; Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). Los huevos son operculados, ovoides, de color pardo amarillento y con un tamaño que oscila entre 130-150 μm de largo y 65-90 μm de ancho. La eliminación fecal no es constante y aunque tiene lugar durante todo el año (Manga et al., 1990), presenta un carácter estacional siendo mayor en otoño y primavera.

Los huevos han de separarse de la masa fecal para poder embrionar en el exterior en un proceso que dura de 9 a 15 días. Para ello se requieren condiciones óptimas de temperatura con unos límites que oscilan entre los 25°C y 30°C (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960; Díez-Baños, 1976; Soulsby, 1987; Malone 1986) y que estén recubiertos de una fina película de agua y un pH entre 4,2 y 9 (Vázquez-Gómez et al., 1985).

- b) Una vez que el huevo está embrionado, tiene lugar la formación de una larva en su interior denominada **miracidio** que se caracteriza por tener dos manchas oculares oscuras y por poseer movilidad gracias a la presencia de cilios. El huevo eclosiona permitiendo la salida del miracidio al medio tras un estímulo lumínico, ya que se activa la producción de una enzima proteolítica que provoca

la apertura del opérculo. En 12 días este proceso se completa si existe una temperatura media de 26°C (Rojo-Vázquez et al., 2012), aunque en condiciones de campo se precisan hasta dos meses cuando la temperatura oscila entre 10-12°C. También se ven implicados choques térmicos como efecto estimulante para la eclosión del huevo (Gold & Goldberg, 1976).

- c) Una vez liberado el miracidio, este debe encontrar un molusco como hospedador intermediario antes de 24 horas – generalmente *Galba truncatula* – antes de agotar sus reservas energéticas y guiado por un fototropismo positivo. A mayor temperatura en el medio ambiente, menor es la vida del miracidio, comprobándose que a 30°C, tan solo resiste seis horas (Smith & Grenfell, 1984), aunque hay otros factores implicados en la búsqueda del hospedador intermediario, tales como el pH, la salinidad o la composición iónica del medio. La penetración del miracidio en el molusco se produce gracias a su actividad mecánica (Dawes, 1961) y a la secreción de enzimas proteolíticas que debilitan el epitelio del caracol (Smyth & Halton, 1983); el punto de entrada suele ser próximo al pie del caracol (Roberts, 1950).
- d) Una vez dentro del molusco, el miracidio pierde sus cilios (Hope-Cawdery et al., 1978; Boch & Supperer, 1986) y constituye el primer estadio larvario de *F. hepatica* en el hospedador intermediario, el **esporocisto**, que se localiza en la región periesofágica del caracol. En condiciones de sequía o frío, los estadios intermediarios pueden disminuir su actividad metabólica sobreviviendo varios meses hasta que las condiciones sean favorables (Boray, 1969).
- e) Tras 15 días, se constituye a partir del esporocisto la primera generación de **redias**, el segundo estadio larvario intramolusco. En su interior se encuentran

células germinales, a partir de las cuales se formarán las sucesivas generaciones larvarias que pueden ser redias hijas o cercarias (Taylor, 1965; Boray, 1982).

- f) Las **cercarias** abandonan el molusco, comprendiendo todo el proceso desde la entrada del miracidio unas 8-10 semanas. Una vez en el exterior pierden su cola, se enquistan en la vegetación (Dixon, 1965; Koie et al., 1976, Jones, 2002) y pasan a denominarse **metacercarias**, constituyendo la forma infectante para los hospedadores definitivos (Andrews, 1999). Algunas metacercarias no se fijan a ningún sustrato, sino que se mantienen flotando en la superficie del agua (Mas-Coma et al., 2005), supuestamente tras caerse de la vegetación. Además, son susceptibles a las elevadas temperaturas y a la desecación, aunque se ha visto que con bajas temperaturas invernales son capaces de sobrevivir (Over & Dijkstra, 1975).
- g) La infección de los hospedadores definitivos tiene lugar durante el pastoreo, aunque también puede tener lugar a través del agua de bebida o de ensilados durante la estabulación de los animales. Una vez que se ingieren, el porcentaje de implantación es del 40%, ya que algunas pueden eliminarse directamente con las heces o sufrir una migración intraórganica (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). Se ha comprobado que las metacercarias con mayor poder infectante se forman a los 22-23°C. El desenquistamiento tiene lugar primero en el rumen gracias a la alta concentración de dióxido de carbono y temperaturas de hasta 39°C y después en el intestino delgado por contacto con la bilis en el conducto colédoco (Sukhdeo & Mettrick, 1987; Rojo-Vázquez et al., 2012). Una hora después de la ingestión, las formas juveniles atraviesan la pared intestinal (Dawes & Hughes, 1964) pasando a localizarse libres en la cavidad abdominal para migrar hacia el hígado (Andrews, 1999), aunque también se han observado

localizaciones ectópicas en ganglios, páncreas o pulmón (Smyth & Halton, 1983). Entre los cuatro y cinco días postinfección (p.i.), son capaces de atravesar la cápsula hepática y comenzar la migración a través del parénquima hepático, aumentando su tamaño por la ingesta de sangre y de células hepáticas para asentarse en los conductos biliares a los 40 días p.i., donde alcanzan la madurez sexual y empiezan a excretar huevos a los 55-56 días p.i. (Andrews, 1999; Rojo-Vázquez et al., 2012). Una fasciola adulta puede producir más de 20.000 huevos al día, aunque la media oscila entre 2.000 y 5.000.



Figura 3. Ciclo biológico completo de *Fasciola hepatica*.

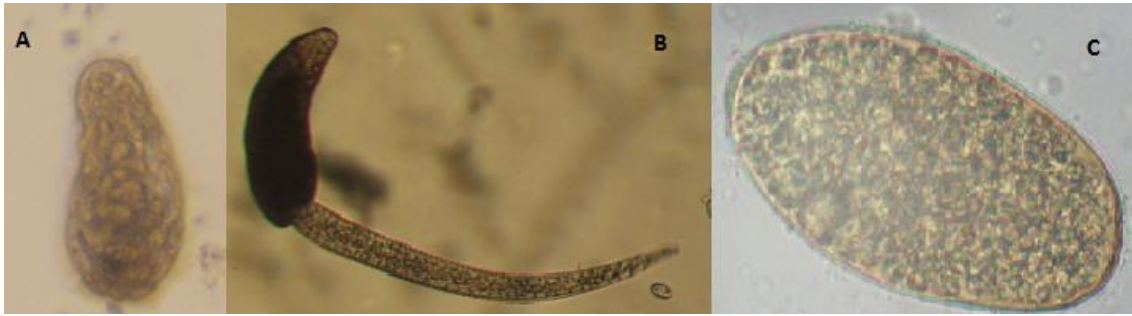


Figura 4. Diversas fases de *F.hepatica*. **A)** Miracidio. **B)** Cercaria. **C)** Huevo

2.5. Variabilidad genética

El estudio de la variabilidad genética en *F. hepatica* y de su estructura representa un punto crítico para comprender mejor el proceso de la infección, el nivel del flujo genético que existe entre distintos animales y poblaciones, el sistema reproductivo del parásito, la posibilidad de estimar la “consanguinidad” y el tamaño efectivo de las poblaciones, entre otras utilidades (Allendorf et al., 2013). Además, los datos resultantes se pueden utilizar para construir modelos que permitan predecir la capacidad infecciosa de determinados genotipos o la relación entre resistencia y la utilización de fármacos antiparasitarios (Churcher et al., 2008; Silvestre et al., 2009; Criscione et al., 2010; Vázquez-Prieto et al., 2014). Desde un punto de vista finalista, el estudio de la variabilidad genética mejora nuestros conocimientos sobre la epidemiología de la infección y ayuda a un control más eficiente de la enfermedad.

En primer lugar, se debe tener en cuenta que esta especie es hermafrodita, ya que los individuos adultos poseen ambos aparatos reproductores masculino y femenino. Sin embargo, aunque en la mayoría de los trabajos se ha encontrado variabilidad genética tanto en poblaciones como en infrapoblaciones (poblaciones dentro de un mismo hospedador definitivo) y en muchas ocasiones no aparece cuantificada la importancia

relativa de cada una, los datos sugieren que el modo de reproducción predominante es la fecundación cruzada y que existen importantes niveles de flujo génico (Hurtrez-Boussès et al., 2004). Por otro lado, ya que una única fasciola es capaz de producir huevos, la autofecundación también tiene un papel importante (Lagrange & Gutmann, 1961). Sin embargo, el alto nivel de heterocigosis encontrado en fasciolas procedentes de Japón, Corea, USA y Australia (Agatsuma et al., 1994) refleja que existen bajos niveles de autofecundación y por lo tanto predomina una fecundación cruzada. Muchos fasciólidos de Japón y Corea son triploides y presentan aspermia (Itagaki et al., 1998; Terasaki et al. 2000), al igual que otras cepas diploides, que no van a poder autofecundarse y son posiblemente ginogénicos. Por lo tanto, parece que los espermatozoides no son esenciales para la activación del óvulo ni para la fertilización. Aunque se creía que las fasciolas triploides eran típicas de Japón, Corea y China, se ha comprobado que el fenómeno no es exclusivamente asiático puesto que en la cepa británica Cullompton, aislada en 1998, existen también ejemplares triploides (Fletcher et al., 2004).

El origen más probable de los embriones triploides es la fusión del núcleo del espermatozoide con un gameto femenino no reducido o con el núcleo diploide de un huevo partenogénico (Terasaki et al., 2000). Es probable que la triploidía surja ocasionalmente y persista porque no causa esterilidad en los individuos que son ya facultativamente partenogénicos. En relación con la resistencia a los fármacos, los individuos triploides tienen un alelo extra, lo que confiere una tasa de mutación de un 50% superior por cada célula. Algunas mutaciones, como la producción de tubulina que se ha demostrado que no se une a los bencimidazoles en cepas de nematodos gastrointestinales resistentes al fármaco, tendría un efecto cuantitativamente menor en los triploides que en los diploides por la dilución de los dos alelos restantes que

confieren susceptibilidad y, una vez generados, los genotipos resistentes se mantendrían por partenogénesis.

En definitiva, la triploidía en algunas poblaciones de *F. hepatica* hace que la variabilidad genética sea elevada lo que puede facilitar la supervivencia de esas poblaciones parásitas ante condiciones desfavorables, como la exposición a los antihelmínticos. Aunque si la resistencia a los fármacos es recesiva, los triploides saldrían peor parados que los diploides ya que habría menor probabilidad de que los tres alelos fueran recesivos.

Por lo tanto, la fecundación cruzada, la autofecundación, la ginogénesis y la triploidía pueden influir en la recombinación de alelos entre individuos: es decir, en la variabilidad genética de las poblaciones y, en consecuencia en la resistencia a los fármacos ya que tiene una base genética.

Debido al ciclo de vida de *F. hepatica*, una población de esta especie en los hospedadores definitivos puede estar formada por varias infrapoblaciones o conjuntos de individuos que parasitan al mismo individuo hospedador. Las cercarias tienen movilidad limitada, así como el caracol intermediario en el que se desarrollan y, por tanto, se esperaría que cada hospedador definitivo se infectara y albergara múltiples parásitos genéticamente idénticos (Vilas et al., 2012), lo que llevaría a una fragmentación de la población, a un aumento de la consanguinidad y a la consiguiente reducción del tamaño efectivo de población (Criscione & Blouin, 2005). Como consecuencia, el proceso de deriva genética sería acusado y tendría lugar una pérdida de la variabilidad genética dentro de las poblaciones del parásito y un incremento de la divergencia interpoblacional.

Existen muchos enfoques genéticos que emplean una gran variedad de marcadores moleculares que han demostrado su utilidad para la identificación y el estudio de

variabilidad genética en los parásitos (Gasser, 1999, 2006; Prichard & Tait, 2001; Bildfell et al., 2007; Zhu et al., 2007). En el caso concreto de *F. hepatica*, se han utilizado entre otros, marcadores isoenzimáticos (Vázquez-Prieto et al., 2011; Vilas et al., 2012), ADN polimórfico amplificado al azar (random amplified polymorphic DNA, RAPDs) (Semyenova et al., 2003), microsátélites (Hurtrez-Boussès et al., 2004), polimorfismos amplificados relacionados con secuencias génicas (sequence-related amplified polymorphism, SRAPs) (Alassad et al., 2008; Li et al., 2009), PCRs basadas en polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLPs) (Walker et al., 2007) y polimorfismos de nucleótidos simples (single nucleotide polymorphism, SNPs) de varios genes nucleares y mitocondriales (para una revisión, veáse Teofanova et al., 2011). En la actualidad, otra técnica, como el empleo de los marcadores denominados intersecuencias simples repetidas (inter-simple sequence repeat, ISSR) se está utilizando para el estudio de diversas especies como *Schistosoma japonicum* (Zhao et al., 2009), *Trichinella spiralis* (Perteguer et al., 2009) y, por primera vez, en *F. hepatica* (Robles-Pérez et al., 2014), con resultados expuestos en una de las publicaciones que forman esta Tesis Doctoral. Los ISSR son marcadores que nos permiten obtener los niveles de variación entre las regiones microsatélite que se encuentran dispersas; los microsátélites son regiones del ADN que presentan secuencias repetidas en tándem que tienden a ser aleatorias y tienen una longitud de 2 a 6 nucleótidos.

Algunos investigadores como Alasaad et al. (2007) han utilizado marcadores genéticos para caracterizar unas muestras de fasciolas adultas mediante las secuencias del espaciador interno transcrito 1 y 2 (*internal transcribed spacer*, ITS-1e ITS-2) del ADN ribosomal, confirmándose que estas muestras recogidas por toda la geografía española a partir de hígados de bovinos, ovinos, caballos, cabras, gamos, ciervos y muflones

pertenecían a *F. hepatica*. Además, se comprobó que en la posición 925 y 926 del ITS-2 de las muestras españolas, existen dos nucleótidos que difieren de la secuencia recogida en el *Genbank* para fasciolas de otras localizaciones, con lo que también se podrían diferenciar individuos en función de su procedencia. Estas dos espaciadores se utilizaron también para confirmar la existencia de una especie de fasciola que denominaron “intermedia” entre *F. hepatica* y *F. gigantica* en Japón, Corea y China (Itagaki & Tsutsumi 1998; Agatsuma et al., 2000; Huang et al., 2004; Itagaki et al., 2005a, b; Lin et al., 2007).

Estudios más detallados, como el realizado por Semyenova et al. (2003) en ejemplares adultos de *F. hepatica* procedentes de ganado bovino, confirmaron una alta diversidad genética mediante el uso de marcadores RAPDS, atribuyendo más de un 87% de esta diversidad a las diferencias infrapoblacionales, un 8% a las diferencias entre infrapoblaciones de cada componente poblacional y un 5% a las diferencias entre las dos poblaciones analizadas muestreadas en regiones diferentes: Ucrania y Armenia. Estos resultados indican que cada hospedador definitivo puede ser infectado por parásitos genéticamente diferentes. Sin embargo, los RAPDs no parecen ser los marcadores más adecuados para analizar la estructura poblacional ya que no son fácilmente reproducibles (Backeljau et al., 1995; Teofanova et al., 2011).

Posteriormente, la variabilidad genética intraespecífica también se ha estudiado mediante la secuenciación del ADN mitocondrial. Semyenova et al. (2006) analizaron parte de las secuencias de los genes mitocondriales que codifican para las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno (NADH) y citocromo oxidasa (COX) en *F. hepatica*, confirmando un alto flujo genético. Por otra parte, Walker et al. (2007) demostraron que un mismo hospedador, ya sea vacuno u ovino, puede ser infectado por 10 haplotipos mitocondriales de *F. hepatica* en un solo año. Puesto que la dispersión de

los parásitos también depende de sus hospedadores, es posible que la estructura de la variación genética sea diferente en función del tipo de hospedador definitivo que parasite. Vilas et al. (2012) analizaron la variabilidad genética de *F. hepatica* que parasitaba el ganado vacuno y ovino encontrando que aunque mostraban niveles similares de variabilidad genética total, la distribución de esta variabilidad entre los hospedadores individuales parece más estructurada en los parásitos de las ovejas. En comparación con los parásitos de vacuno, en el ganado ovino los resultados de su estudio sugieren que las poblaciones mostraron menores niveles de flujo de genes, un mayor grado de transmisión agregada y una mayor probabilidad de apareamiento dentro de los clones. Es por ello que las fasciolas que infectan el ganado ovino parecen mostrar una variabilidad genética más estructurada a nivel infrapoblacional y una mayor presencia de clones. Vázquez-Prieto et al. (2011) también confirmó que existe mayor estructuración genética a nivel infrapoblacional en el ganado ovino, ya que la diferenciación genética entre las infrapoblaciones es bastante superior que en bovino, incluso realizando el estudio en ovejas pertenecientes a un mismo rebaño y las vacas a explotaciones diferentes.

Puesto que el modo en que se estructura la variabilidad genética nos informa sobre características tales como el modo de reproducción, tamaño efectivo de las poblaciones, o el nivel de flujo genético existente entre poblaciones, su conocimiento también es útil para predecir el modo en que se dispersarán mutaciones como por ejemplo aquellas que confieran resistencia a los fármacos antihelmínticos.

Se ha propuesto que las mutaciones que confieren resistencia a fármacos en helmintos son generalmente recesivas (Cornell et al., 2003), por lo que frecuentemente se perderían por deriva genética antes de que alcanzasen una frecuencia lo suficientemente elevada como para encontrarlas en un número significativo de homocigotos. Es de

esperar que la resistencia sea común en poblaciones con tamaño efectivo grande, ya que el efecto de la deriva es muy débil y cuando aparece una mutación recesiva, tiene más probabilidades de permanecer en la población, de tal manera que si en esa especie existen mecanismos que favorezcan la “consanguinidad”, aumentará la homocigosis (Cornell et al., 2003). Si el tamaño efectivo fuera pequeño, aumentaría el efecto de la deriva y la probabilidad de que la mutación se perdiera antes de que alcance la homocigosis.

También, Vara del Río et al. (2007) confirmaron que ciertas variaciones puntuales en un fragmento de 510 pb que codifica para la subunidad 28S del ADN ribosómico, podrían estar relacionadas con el fenotipo resistente a determinados fármacos antihelmínticos, permitiendo el diagnóstico de un linaje particular.

Si las mutaciones que confieren resistencia al triclabendazol en *F. hepatica* fuesen recesivas, el incremento de su frecuencia podría estar favorecido tanto en ganado bovino como en ovino por diferentes vías. Por una parte, las poblaciones que parasitan al ganado bovino podrían desarrollar resistencia con mayor probabilidad ya que albergan mayor diversidad genética y poseen un mayor tamaño efectivo. Por otro lado, la transmisión de la resistencia también podría verse favorecida en las infrapoblaciones de ovejas debido a que presentan un mayor potencial para la consanguinidad, ya que la presencia de clones es más frecuente (Vilas et al., 2012), lo cual aumenta las posibilidades de apareamiento entre individuos genéticamente idénticos, y por tanto tendrá lugar una mayor frecuencia de homocigotos en la población.

3. Epidemiología

3.1. Hospedadores intermediarios y definitivos

Los hospedadores intermediarios de *F. hepatica* son caracoles clasificados dentro del Phylum *Molusca*, Clase *Gastropoda*, Subclase *Pulmonata*, Familia *Lymnaeidae*. Presentan una concha espiral piramidal que se enrolla formando una estructura cónica (Malek, 1962). El género *Lymnaea* (*Galba*) es el que actúa más habitualmente como hospedador intermediario de *F. hepatica* (Kendall, 1965). Su principal exponente, presente en todos los países europeos y con evidencias en Sudamérica y África, es *Galba truncatula* (Graczyk & Fried, 1999), aunque en otras localizaciones se han visto implicados *Lymnaea palustris* y *Lymnaea fuscus* (Novolbilský et al., 2013). La intervención de más de una especie como hospedador intermediario depende de la capacidad de adaptación del parásito, siendo en este caso muy alta (Boray, 1981, 1982) y desarrollando un papel fundamental las condiciones del medio (Mas-Coma et al., 1999).

Pero como consecuencia del cada vez mayor movimiento de ganado pueden existir otras especies tanto de fasciolas como de caracoles. En España, el valle del Guadalquivir es la frontera entre *G. truncatula* y *F. hepatica* con *Lymnaea auricularia* y *F. gigantica*. La Península Ibérica es un área adecuada para que *G. truncatula* pueda ser hospedadora intermediaria para ambas especies de fasciolas (Dar et al., 2003). *F. gigantica* fue encontrada en ovejas en Ciudad Real por Almarza (1934) por lo que es posible que estas dos especies de helmintos puedan coexistir en una misma zona o que haya habido introducciones de *F. gigantica* desde África y Portugal al país (Cruz-Silva et al., 1971).

Las especies diana de la infección por *F. hepatica* que actúan como hospedadores definitivos son principalmente los rumiantes, domésticos y silvestres. En España, se han encontrado parasitados ovejas, cabras, vacas, caballos, asnos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres, gamos (Cordero del Campillo et al., 1994; Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999) e incluso humanos (Hopkins, 1992; Rim et al., 1994). La receptividad al parásito permite diferenciar tres grupos. Los más susceptibles son los ovinos, caprinos y lagomorfos. Otros, como los suidos, perros y gatos, reaccionan con rapidez e impiden el desarrollo del parásito. En el caso de bovinos y équidos, reaccionan con retraso ante la implantación en el hígado (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999).



Figura 5. Formas maduras de *Fasciola hepatica*.

3.2. Prevalencia

La fasciolosis es una helmintosis cosmopolita presente en todas las regiones templadas del globo. En España, se encuentra distribuida ampliamente (Cordero del Campillo et al., 1980) y es una de las zoonosis parasitarias de mayor prevalencia en los animales de consumo humano (Morales et al., 2000).

Respecto a su prevalencia en Europa, los datos que se manejan son muy variables, ya que algunos son recientes pero otros ya tienen cierta antigüedad. En Alemania se han confirmado valores del 10,7% en vacuno (Simmank, 1987) y del 1,7% en ovino (Epe et al., 2004), prevalencias similares a los del país vecino, Bélgica, con un 12,5% en vacuno (Genicot et al., 1991). En Polonia, se estiman valores de un 7,2% en vacuno y un 3,7% en ovejas (Konopka, 1993), aunque datos más recientes confirman un 34,9% (Kozak-Cieszczyk, 2006). En el sur de Europa nos encontramos con valores altos como el 29,3% de Turquía en ganado ovino y bovino (Celeb & Ultav, 1988) y otros más bajos como el 5% en vacuno (Poglayer et al., 1995) o el 12,4% en ovino (Biggeri et al., 2007) en Italia; en Grecia se han encontrado prevalencias similares en pequeños rumiantes, del 16,2% (Kantzoura et al., 2011). En el norte de Europa se describió que el 47% de las vacas de leche de Inglaterra, se encontraban infectadas (McCann et al., 2010), así como el 18,8% de las ovejas y cabras de Noruega (Domke et al., 2013).

En España podemos confirmar diferentes prevalencias en función de la Comunidad Autónoma, el año de muestreo y el método de diagnóstico. En Galicia, Sánchez-Andrade et al. (1995) encontraron una prevalencia en ganado bovino del 88,8% mediante ELISA, aunque posteriormente Paz-Silva et al. (2003) describieron valores menores, de un 30,4% mediante coprología, un 39,1% utilizando el ELISA sándwich y un 56% con un ELISA indirecto, técnicas que han demostrado su eficiencia en los

trabajos de Almazán et al. (2001). En esta misma Comunidad y más recientemente, se han dado cifras de tan solo un 6% (Vázquez et al., 2008) y un 9% (Cienfuegos et al., 2009) en pequeños rumiantes mediante técnicas coprológicas. En Aragón, las cifras oscilaron en la década de los 90 entre un 77% en zonas de regadío frente un 28,5% en zonas de secano en el ganado ovino (Luzón-Peña et al., 1994a). Según Uriarte et al. (1985), en esta región la eliminación de huevos fue constante durante todo el año en el 14% de los ovinos. En el País Vasco, la prevalencia alcanzó un 63% en la década de los 80 en el ganado ovino (García-Pérez & Juste-Jordán, 1987). En el centro y sur peninsular, los valores encontrados fueron menores; en Castilla La Mancha y Extremadura, mediante necropsias en ovino, se determinaron unos niveles de prevalencia del 4,4% (Luzón-Peña et al., 1997) y 3,3% (Reina et al., 1987), respectivamente. En Andalucía, la prevalencia en ovino osciló entre el 2 y 50% según las zonas (Luzón-Peña et al. 1994a), con un 9,6% en Granada (Peinado-Peláez et al., 1989) y valores en caprino del 1,86% en Córdoba, Granada y Málaga (Martínez-Cruz et al., 1993).

En Castilla y León los datos que existen de prevalencia son variables; se han descrito valores del 9,5% en Salamanca (Simón-Vicente & Ramajo-Martín, 1985) aunque podían verse elevados en zonas de regadío hasta un 52% (Ramajo-Martín & Simón-Vicente, 1989). En Segovia y Burgos en el ganado ovino, y durante la década de los 90, se han descrito prevalencias del 0,46% y del 11,4%, respectivamente (Ferre et al., 1991; Hidalgo et al., 1995).

Los primeros datos que tenemos de prevalencia de fasciolosis en ganado ovino en la provincia de León fueron de casi un 100% (Del Río Lozano, 1967) para, en posteriores estudios en vacuno, confirmar una disminución de hasta el 29,5% con una media de

eliminación fecal de 51,6 huevos por gramo en heces (hgh) (González-Lanza et al., 1989). En este estudio, se comprobó que la eliminación fue máxima en el periodo comprendido entre invierno y primavera con una prevalencia máxima en enero aunque los niveles más altos de excreción de huevos fueron entre febrero y marzo. Manga-González et al. (1990), realizaron otro estudio en ovino observando una prevalencia del 14.67% y Ferre et al. (1995b) continuó con estudios también en ovino, obteniendo valores del 26,7% mediante análisis coprológicos y con una eliminación media de 10 hgh y unos datos de prevalencia del 77.6% mediante ELISA. Posteriormente, Diez-Baños et al. (2006) encontraron valores del 9,3%, también en ganado ovino. Datos más recientes de Martínez-Valladares et al. (2013) han confirmado una prevalencia en la zona noroeste de Castilla y León del 59,3% a nivel de rebaño, siendo en la provincia de León del 60,5% (con un media de eliminación de 17,5 hgh), valor significativamente más alto que los porcentajes descritos anteriormente por Ferre et al. (1995b). Martínez-Valladares et al. (2013) confirmaron que existe una correlación directa entre la humedad y la temperatura con el desarrollo del parásito en el medio, y por lo tanto, factores como el cambio climático, la presencia de resistencias antihelmínticas (Vara del Río, 2007) o el aumento de las zonas de regadío en el área de estudio, como ya demostró Esteban et al. (2002) en Perú, podrían haber favorecido este aumento de la prevalencia en los últimos años.

Respecto a la prevalencia de fasciolosis en animales silvestres, en Centroeuropa se han observado valores del 30% en ciervos, 10% en castores, 9% en liebres, 7% en jabalíes y 6% en la cabra montés (Shimalov & Shimalov, 2000). En España, valores del 0,53% por necropsia y del 1,87% tras examen fecal, fueron detectados en la cabra montés en Andalucía (Alasaad et al., 2008); en las sierras de Cazorla y de Segura se detectó

mediante necropsia que el 3% de los ciervos rojos y los gamos se encontraban infectados (Arias et al., 2012).

3.3. Influencia de los factores ambientales en la transmisión de la infección

La eliminación de huevos de *F. hepatica* alcanza su máximo nivel en el invierno porque la infección de las ovejas se produce principalmente en el otoño. Durante todo el invierno, en las regiones templadas del mundo, las condiciones climáticas no permiten el desarrollo de los huevos y de los caracoles debido a las bajas temperaturas; sin embargo, algunas metacercarias son capaces de resistir las condiciones adversas del invierno y es por ello que los animales pueden infectarse con las metacercarias originadas el otoño anterior (Rojo-Vázquez et al., 2012). Además, por debajo de los 10°C, los caracoles no emiten cercarias al medio hasta la primavera siguiente, reanudándose así el ciclo (Ollerenshaw, 1974). En las regiones secas, las altas temperaturas estivales aseguran un riesgo mínimo de infección, que hasta el comienzo de las lluvias otoñales no va a tener importancia, ya que el desarrollo de las fases intermedias del parásito en el medio se ve favorecidas por la humedad.

La incidencia de la fasciolosis se ha incrementado en los últimos años debido al cambio climático y a mayores movimientos de las cabañas ganaderas (Fairweather, 2005). En la actualidad hay estudios que certifican que la prevalencia está aumentando en el norte de Europa (Daniel & Mitchell, 2002) ya que las metacercarias son capaces de resistir los inviernos en el pasto y en consecuencia la exposición del ganado a la infección es más continua (Rojo-Vázquez et al., 2012). En Suecia, Novolbilský et al. (2014) describieron una “infección de invierno” en mayo-junio debida a los caracoles que permanecieron

hibernando y una “infección de verano” en agosto-septiembre producida por las metacercarias liberadas por los caracoles durante el verano, siendo esta la estrategia preferida por las fasciolas como también describen los estudios de Ross (1977) y Shaka & Nansen (1979). Los modelos epidemiológicos de estos países del norte de Europa, con dos ciclos anuales de infección y el riesgo máximo para los animales en el otoño, también son válidos para los países mediterráneos (Luzón-Peña et al., 1992). Ollerenshaw (1959) especuló que la "infección de invierno” sería más importante en las regiones donde el verano es demasiado corto para el desarrollo del parásito, aunque también depende de factores ambientales locales que faciliten la disponibilidad de hábitat del caracol así como del comportamiento de pastoreo de los animales.

En España, la infección de los caracoles ocurre durante todo el año, con una tasa de infección más alta al final del verano y otoño que al final del invierno. Aunque las ovejas están eliminando huevos todo el año, la emisión de cercarias es mayor en otoño (Manga et al., 1990). Sin embargo, la hibernación de las metacercarias parece ser menos importante en España y en los países mediterráneos (Luzón-Peña et al., 1994b) que en los países del norte de Europa (Shaka & Nansen, 1979).

La hibernación de *F. hepatica* ha sido objeto de diferentes estudios. En zonas del norte de Europa, algunos autores hacen hincapié en la hibernación del parásito en el medio ambiente (Urquhart et al., 1970, Bruce et al., 1973, Shaka & Nansen, 1979); según otros, la hibernación se produce en el interior del caracol (Ollerenshaw & Smith, 1969; Hope-Cawdery, 1975) que se encargará de la emisión de las cercarias, teoría confirmada por Gaasenbeek et al. (1992). Según otros autores, las metacercarias pueden sobrevivir a condiciones de congelación, mientras que los estudios por Pecheur (1967) y Hoover et al. (1984) sugieren que no sobreviven en climas fríos.

Es importante tener en cuenta que, como consecuencia de los cambios introducidos por el hombre, como los nuevos sistemas de regadío, la humedad en determinadas zonas ha aumentado (Esteban et al., 2002), a lo que si se añade el aumento de la temperatura como consecuencia del cambio climático, se han visto favorecidas las condiciones para el desarrollo de las fases intermedias de *F. hepatica*, con el consiguiente aumento de la prevalencia. En un estudio de Mas-Coma et al. (2009), se observó como la temperatura tiene un efecto directo en la producción de cercarias. Según Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez (1999), se necesita una humedad relativa de entre el 70 y el 100% para la producción de cercarias en los caracoles y además temperaturas de al menos 10°C para la eclosión de los huevos y la liberación de las cercarias.

3.4. Importancia económica

La fasciolosis tiene una gran importancia veterinaria, siendo un factor limitante en la producción ovina y bovina como consecuencia de las alteraciones metabólicas y estructurales que se producen en los animales infectados (Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999), aunque no han sido adecuadamente evaluadas (Olaechea et al., 1991; Álvarez et al., 2004). La fasciolosis causa enormes pérdidas económicas, estimadas en 200 millones de dólares americanos (Boray, 1985; Spithill & Dalton, 1998), aunque otros estudios hablan de hasta tres billones anuales a nivel mundial (Boray, 1997). En España se han estimado unas pérdidas próximas a 11,3 millones de euros en el vacuno de carne y 16,8 en el de leche (Flores Lasarte, 1981), aunque datos más actualizados hablan de cifras entre 1100 y 2000 millones de euros a nivel de la Unión Europea.

Podemos distinguir unas pérdidas directas por muertes y decomisos de hígados; y otras indirectas por la disminución de las producciones, siendo estas últimas más difíciles de calcular (Togerson & Claxton, 1998), a lo que habría que añadir el gasto en tratamientos antihelmínticos y la declaración de las canales como de calidad inferior (Chen & Mott, 1990).

Las muertes en los animales pueden producirse por infecciones agudas como consecuencia de la ingestión de una elevada cantidad de metacercarias en poco tiempo, sobre todo en los ovinos (Haroun & Hussein, 1975). Es por ello que las mayores pérdidas se producen en el ganado ovino de hasta dos años, aunque también se han registrado mortandades en ovinos adultos que pastan en zonas infectadas (Robles & Olaechea, 2001). La forma crónica cursa con reducción de la producción láctea y de lana así como del índice de conversión (Marley et al., 1996). También existe pérdida de peso, por la incapacidad de retención proteica e inapetencia (Sinclair, 1967; Crossland et al., 1977; Hope-Cawdery et al., 1977; Randell & Bradley, 1980), e interferencia en la reproducción y fertilidad (Hope-Cawdery, 1976; Dargie, 1987), lo que en su conjunto da lugar a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Wamae & Ihiga, 1991).

4. Patogenia y fisiopatología

4.1. Patogenia

Las características de los daños causados por *F. hepatica* guardan relación con la especie hospedadora, el número de metacercarias ingeridas, el estado nutricional e inmunitario y las demandas metabólicas o la posibilidad de que el animal esté gestante (Dargie, 1987). Estos daños se deben fundamentalmente a los efectos mecánicos y químicos del parásito y a las respuestas inflamatoria e inmunológica del hospedador (Rojo-Vázquez et al., 2012). La migración de las formas juveniles a través del parénquima hepático gracias a las espinas de su tegumento causa irritación, descamación, ulceración e inflamación con posibilidad de fibrosis. Las enzimas proteolíticas producidas por *F. hepatica*, tales como colagenasas (Howell, 1966) y proteasas (Dawes, 1963a) como la catepsina B (Chapman & Mitchell, 1982b) o la catepsina L (Carmona et al., 1993; Berasain et al., 1997), también van a influir en el daño del parénquima. La actividad hematófaga de las fasciolas juegan un papel fundamental ya que la ventosa oral es el punto de entrada de alimento (Sukhdeo et al., 1988); a través de ésta son incorporados los restos celulares de los hepatocitos hasta su faringe, para posteriormente digerirlos (Dawes & Hughes, 1964).

En el daño tisular también están implicados los productos de excreción del parásito que contienen proteasas que ayudan a degradar el tejido hepático, para servirle de alimento y facilitar la perforación de túneles a través de los cuales migrará por el parénquima (Kelly, 1993; Chauvin & Boulard, 1996).

La enfermedad cursa con anorexia, retraso del crecimiento, anemia acompañada de hipoalbuminemia e hiperglobulinemia y, en función de la intensidad y duración de la infección, con hipo o hiperproteinemia (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). En corderos infectados experimentalmente, se ha visto que la sintomatología aparece antes que en otros mejor alimentados, lo que demuestra que la nutrición desempeña también un papel importante a la hora de afrontar la enfermedad (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999).

La infección puede ser descrita en dos fases:

1. **Fase prehepática:** ocurre a las 72 horas de haber sido ingeridas las metacercarias, cuando las fasciolas juveniles se encuentran en la cavidad abdominal y atraviesan la pared intestinal (Kendall & Parfitt, 1962). La más completa descripción del proceso de perforación en el intestino se ha visto en ratones (Dawes & Hughes, 1964) y puede ser similar al proceso que ocurre en las ovejas. Después de integrarse en la mucosa del intestino delgado, las fasciolas juveniles disuelven la submucosa y la muscular y pasan a través de la serosa a la cavidad abdominal. La penetración no está asociada con la enfermedad clínica, ya que en este proceso se destruyen muy pocas células.
2. **Fase hepática:** a las 90 horas de la infección, los parásitos comienzan a llegar al hígado (Sinclair, 1967). Excepcionalmente, se ha descrito que las fasciolas pueden llegar también al hígado de fetos en ovejas y vacas preñadas y dar lugar a infecciones prenatales a pesar de las barreras físicas existentes (Sinclair, 1967). Los lóbulos hepáticos más afectados son el ventral y el izquierdo, ya que se encuentran más próximos al intestino delgado; además, se producirá una hipertrofia compensatoria de los lóbulos menos dañados (Sinclair, 1967). En esta

fase hay que diferenciar otras dos subfases: la *parenquimatosa* que tiene lugar durante la penetración a través de la cápsula de Glisson y la migración a través del parénquima hepático; y la *biliar*, cuando el parásito se asienta en los conductos biliares y la vesícula biliar. En la fase parenquimatosa se pueden apreciar lesiones recientes o más “antiguas” como consecuencia del transcurrir del parásito por el parénquima hepático de forma continua (Zafra, 2007), o bien un incremento de las mismas o de la respuesta inflamatoria debido al propio crecimiento del parásito (Behm & Sangster, 1999). En cuanto a la fase biliar, hay diferencias entre las especies hospedadoras; en humanos hay poca supervivencia de parásitos en la migración y la fase biliar es poco habitual (Chen & Mott, 1990). Sin embargo, en otras especies es frecuente, como se ha visto en la oveja (Rushton, 1977; Rushton & Murray, 1977), el conejo (Urquhart, 1965) o el ratón (Dawes, 1961).

Ocasionalmente se ha descrito la migración de *F. hepatica* a órganos distintos del hígado como páncreas, bazo, ganglios linfáticos o pulmón, provocando neumonía, salida de líquido pleural y pleuritis fibrosa (Boray, 1969).

4.2. Lesiones

La enfermedad puede causar lesiones que van desde irrelevantes a una importante hepatopatía. En el transcurso a través del intestino a hígado apenas se produce daño, tan solo focos hemorrágicos debido al propio trayecto del parásito (Kelly, 1993).

Durante la **fase parenquimatosa** se pueden apreciar lesiones macroscópicas, ya que se producen traumatismos y necrosis por coagulación, relacionada con los productos

tóxicos excretados por el parásito (Kelly, 1993; Chauvin & Boulard, 1996). Además, se acumulan colecciones serosas en el peritoneo y se produce engrosamiento de los conductos biliares (Cardozo & Nari, 1987). Como se mencionó anteriormente, las formas juveniles llegan al hígado a las 90 horas p.i. (Kendall & Parfitt, 1962) y permanecen en el parénquima hasta la séptima u octava semana p.i., cuando comienzan a penetrar en los conductos biliares (Dow et al., 1968). La penetración a través de la cápsula de Glisson produce pequeñas hemorragias, que puede llegar a ser graves en infecciones masivas causando la muerte del animal (Soulsby, 1987; Taylor et al., 2007). Se ha demostrado que bajo la cápsula se localizan numerosas fasciolas a los 10 días p.i. durante una primoinfección, pero tras el mismo tiempo en una reinfección, la migración se produce de forma más rápida (Chauvin et al. 1995; Meeusen et al., 1995).

Según diferentes autores, como Ross et al. (1967), Sinclair (1967), Dow et al. (1968), Boray (1969), Rushton & Murray (1977) y Kelly (1993), en función del tiempo transcurrido después de una infección se pueden apreciar lesiones diferentes:

- Entre la 1^a y 3^a semanas p.i., el parásito penetra en la cápsula y cursa con congestión del lóbulo izquierdo y trayectos de color blanquecino en la superficie diafragmática del hígado. Microscópicamente se observa degeneración de hepatocitos con infiltración de eosinófilos y macrófagos. En infecciones agudas pueden formarse microabscesos en el parénquima hepático, que están constituidos por neutrófilos rodeando o invadiendo los hepatocitos, que pueden ser normales o sufrir necrosis (Meussen et al., 1995). Las fasciolas que quedan enquistadas en el parénquima, se rodearan por macrófagos, células gigantes multinucleadas y una cápsula de tejido conjuntivo que finalmente se convertirá en un quiste caseoso (Kelly, 1993).

- Entre la 4^a y 5^a semanas p.i., el parásito se encuentra migrando por el parénquima y los trayectos toman un color amarillento y aparecen zonas hemorrágicas. En cabras, también se ha observado perihepatitis fibrinosa y posible peritonitis, afectando principalmente al lóbulo izquierdo (Pérez et al., 1999). Microscópicamente, se ven trayectos con ligera fibrosis, infiltrados de células gigantes, macrófagos y linfocitos, así como eosinófilos (Martínez-Moreno et al., 1999) y también zonas infartadas. Las fasciolas frecuentemente atraviesan los vasos sanguíneos induciendo la formación de flebitis y, en el caso de las venas hepáticas, trombosis (Rushton & Murray, 1977).
- Entre las semanas 6^a y 8^a p.i., los trayectos son más gruesos y se llenan de sangre dando una tonalidad rojiza. En la superficie visceral del lóbulo hepático izquierdo aparecen más hemorragias ya que es donde se localizan la mayoría de los parásitos. Se forman adherencias fibrinosas y hay congestión de órganos cercanos. Microscópicamente, se ve hiperplasia hepática y fibrosis en trayectos crónicos. Se pueden acumular pigmentos de hierro y existir trombosis.
- Entre la 8^a y 10^a semanas p.i., los trayectos pierden su contenido apareciendo hemorragia subcapsular. En esta fase, los parásitos comienzan a invadir los conductos biliares. Microscópicamente se ven zonas necróticas con células gigantes, tejido de granulación y linfocitos formando anillos concéntricos.
- A partir de la 10^a semana p.i., se aprecia un aumento de tamaño del hígado, conductos biliares dilatados con engrosamiento de sus paredes con detritus y parásitos adultos y vesícula y nódulos linfáticos aumentados de tamaño (Martínez-Pérez et al., 2013). Microscópicamente se aprecian los trayectos fibrosados con pérdida de tejido hepático (Mendes, 2010).

En la **fase biliar**, los parásitos penetran en los conductos biliares a partir de la 8^o-12^o semana p.i., (Rushton & Murray, 1977); éstos van a estar dilatados y engrosados haciendo prominencia sobre la cara visceral del hígado (Rushton & Murray, 1977; Reddington et al., 1986; Kelly, 1993). En las infecciones primarias crónicas, se producirá una fibrosis periportal, con engrosamiento de los conductos biliares, dando un aspecto de pseudolobulillos a la superficie hepática (Meeusen et al., 1995). En el ganado vacuno, las lesiones descamativas y ulcerativas son más frecuentes, con mayor proliferación de tejido fibroso que hace que la pared de los conductos aparezca muy engrosada y blanquecina (Kelly, 1993).

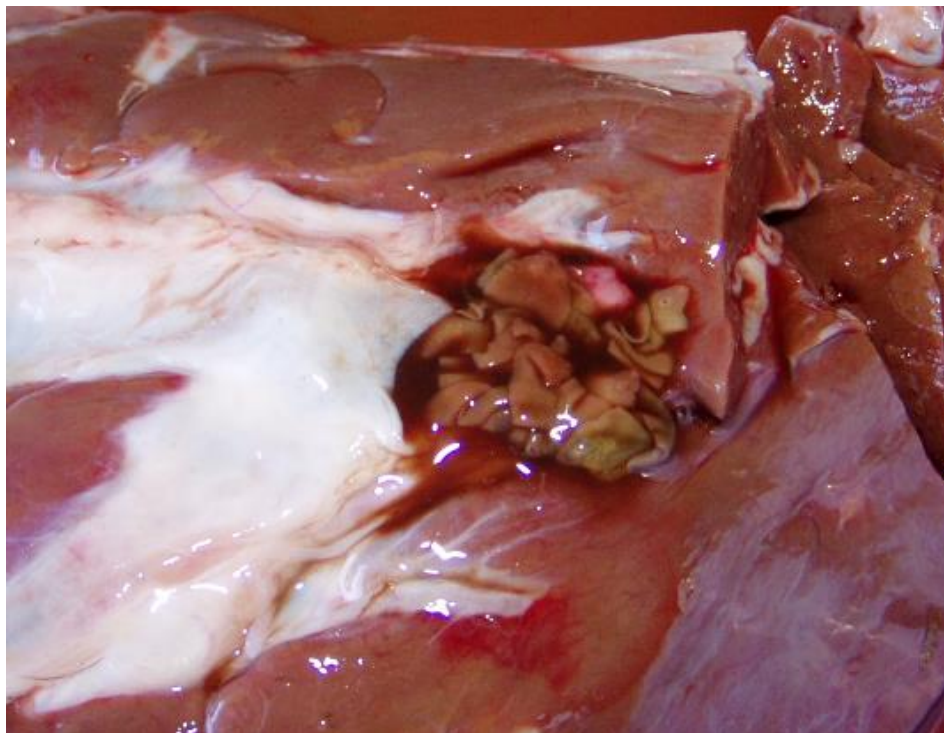


Figura 6. Hígado con presencia de *F. hepatica*.

4.2.1. Patogenia de la fibrosis y de la colangitis hiperplásica

Tras la infección, las lesiones se pueden agrupar dando lugar a los dos principales fenómenos que afectan al hígado tras la enfermedad: la *fibrosis hepática* debido a la migración del parásito (Marcos et al., 2007), y la *colangitis hiperplásica*, por su presencia en los conductos y vesícula.

En la *fibrosis* intervienen cuatro mecanismos (Murray & Rushton, 1975; Symons, 1989). Debido a la organización de los trayectos de migración se desarrollará una “*fibrosis postnecrótica*”, en la que las bandas de fibrosis conectan los espacios porta adyacentes, las venas hepáticas y la cápsula de Glisson, siendo más frecuente en el lóbulo ventral (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999). La “*fibrosis isquémica*” tiene lugar debido a los intentos de reconstrucción de las zonas de necrosis coagulativa y los microtrombos originados (Ferre-Pérez, 1994) y se desarrolla cerca de los trayectos del parásito. La “*fibrosis peribiliar*” se produce por la organización de la reacción inflamatoria producida como consecuencia de erosión de la mucosa por el movimiento del parásito. Y por último, la “*fibrosis monolobular*”, que consiste en la conexión de los espacios porta con el tejido fibrótico, observándose filamentos blanquecinos y una flebitis de la vena porta, que dará lugar a una hipertensión portal. Los trayectos migratorios en la superficie hepática son de fácil observación y van acompañados de otras manifestaciones como edema, ascitis y linfadenitis hepática (Dawes, 1963b). Además, esta fibrosis puede ayudar a delimitar el movimiento del parásito (Behm & Sangster, 1999) y actuar como barrera mecánica frente a reinfecciones.

La *colangitis* se va a producir por la irritación de las células epiteliales debido a las espinas y ventosas del parásito (Dawes, 1963a; Sinclair, 1967), conjuntamente con un engrosamiento e hiperplasia de la mucosa por la reacción inflamatoria (Urquhart, 1956;

Dow et al., 1968) acompañada de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos (Sinclair, 1970). Aunque la mucosa biliar hiperplásica es impermeable a las macromoléculas, se produce una apertura de los puentes de unión intracelular, permitiendo el paso de las proteínas plasmáticas desde la circulación general, contribuyendo a incrementar el grado de hipoalbuminemia (Dargie, 1981). En el ganado vacuno estos conductos pueden llegar a calcificarse. Se ha especulado también que la prolina sintetizada y eliminada por F. hepatica (Campbell et al., 1981) pudiera ser el mediador de la respuesta hiperplásica, estimulando la deposición de colágeno (Modavi & Isseroff, 1984; Corvo et al., 2009). Debido a la obstrucción de los conductos, se puede producir colangiectasia, ictericia (Miman et al., 2010; Yalav et al., 2012) y colestasis, lo que provocara una alteración en la digestión de grasas y formación de cálculos biliares (Katsoulos et al., 2011).

4.3. Alteraciones hemáticas

Pueden existir otras alteraciones como consecuencia de la enfermedad, que no afectan a los órganos o el metabolismo, pero que afectan a los componentes sanguíneos.

- La *anemia hemorrágica* es el principal factor que contribuye a la morbilidad y mortalidad del hospedador. Se estima que la cantidad diaria de sangre que se pierde por fasciola oscila entre 0.2 y 0.5 ml (Dawes & Hughes, 1964; Jennings, 1976). Cordero del Campillo & Rojo Vázquez (1999) indican que en la fasciolosis crónica la anemia es hipocrómica y macrocítica, como se corrobora en el estudio de Martínez-Valladares et al. (2010a). Los valores normales de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina deberían oscilar entre $11-13 \times 10^6/\mu\text{l}$,

30-45% y 11-13 g/dl, respectivamente (Schalm et al., 1981). Sin embargo, en una infección natural, Martínez-Valladares et al. (2010a), describieron valores de glóbulos rojos y hemoglobina por debajo del umbral mínimo. Martínez-Pérez et al. (2013) obtuvieron valores en animales infectados experimentalmente dentro del rango de normalidad para los tres parámetros, aunque fueron disminuyendo a medida que avanzaba la infección.

- Por lo que se refiere a las *proteínas plasmáticas*, las más importantes son la albúmina y las inmunoglobulinas (Ig). La albúmina tiene como único lugar de producción el hígado, con valores normales de 2,7 a 3,7 g/dl (Benjamin, 1984), mientras que las Igs son producidas por los leucocitos en diversos lugares del organismo (Behm & Sangster, 1999). En la fasciolosis, se produce habitualmente hipoalbuminemia e hiperglobulinemia y en concreto hay un aumento de la IgG, hasta la cuarta semana post infección, para después disminuir cuando los adultos penetran en las vías biliares (Ferre et al., 1997; Phiri et al., 2006). Durante la fase parenquimatosa de la enfermedad, el daño causado por la migración de *F. hepatica* va a provocar una disminución en la concentración plasmática de albúmina, debida en parte a un descenso en su síntesis y por otro a un aumento del volumen plasmático (Anderson et al., 1977; Dargie, 1981; Symons, 1989). Durante la fase biliar, la cantidad de albúmina que se pierde debido a las hemorragias, es mayor que la que se sintetiza en el hígado. Valores estudiados por Martínez-Valladares et al. (2010b) de albúmina y proteínas totales en animales infectados experimentalmente tuvieron la misma cinética hasta la octava semana p.i., dentro de la normalidad, pero posteriormente disminuyeron por debajo de los valores mínimos.

- También hay que hacer mención a las *enzimas hepáticas*, ya que gracias a su liberación y su presencia en sangre se puede monitorizar el progreso de la infección (Rowlands & Clampitt, 1979; Gajewska et al., 2005). El incremento de la actividad plasmática de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) indica fasciolosis aguda y subaguda y el de la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), se asocia a cronicidad y penetración de los parásitos en los conductos biliares (Galtier et al. 1986; Ferre et al. 1995a). Ambas pueden ser utilizadas también para comprobar la eliminación de los parásitos tras el tratamiento terapéutico (Ferre et al., 1994, 1995a, b; Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). La GLDH disminuye su actividad cuando las fasciolas alcanzan la madurez sexual y se localizan en los conductos biliares. Esta enzima indica una necrosis producida durante la migración de las formas jóvenes por el parénquima y es la primera que se detecta (Leclipteux et al., 1998). La actividad de la aspartato aminotransferasa (AST), la alanina amino transferasa (ALT) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) aumentan durante la migración de las formas inmaduras por el parénquima hepático, aunque son enzimas menos hepatoespecíficas (Sykes et al., 1980). Martínez- Valladares et al. (2010b) confirmaron un pico de actividad enzimática de ALT a la cuarta semana p.i. y de AST a las tercera semana p.i. con un segundo pico entre la 8-10 semana p.i. A nivel de las vías biliares, va a tener lugar un aumento de la GGT entre la octava y décima semana p.i. (Chauvin et al., 1995; Martínez-Valladares et al., 2010a), cuya presencia es indicativa de que el parásito adulto ya se encuentra en los conductos, alcanzándose los valores plasmáticos más elevados.
- Respecto a las *poblaciones leucocitarias*, con valores normales dentro de 2,5-7,5 x 10³ por µl (Schalm et al., 1981), lo más reseñable es una marcada eosinofilia

tras la infección, que se incrementa en la fase parenquimatosa y persiste en altos niveles cuando el parásito penetra en los conductos biliares (Ross et al, 1966; Schuster & Lammler, 1973; Sinclair, 1973, 1975; Poitou et al., 1992, 1993; Jemli et al., 1993; Mekroud et al., 2007). También se puede observar un aumento de linfocitos y neutrófilos y, ocasionalmente, monocitos y basófilos (Behm & Sangster, 1999). Martínez-Valladares et al. (2010a) y Martínez-Pérez et al. (2013), confirmaron estos valores superiores al rango normal tras la infección.

- También cabría esperar una interferencia en la producción y liberación de *bilis* cuando el parásito ocupa los conductos; sin embargo, sólo ocasionalmente se ha descrito bilirrubinemia en ratas en la fase parenquimatosa (González et al., 1991) y en ovejas en la fase parenquimatosa y biliar (Prache & Galtier, 1990; Ferre et al., 1995a).
- Existen otros componentes que también se ven afectados, aunque en menor medida. Tal es el caso del ácido ascórbico en plasma, que disminuye de manera constante con la infección (Gameel, 1982; Kouider & Kolb, 1994) lo que puede dar lugar a un estrés oxidativo y a una alteración del metabolismo del hierro y de los procesos de reparación de tejidos. Sin embargo, Jemli et al. (1993) no describieron cambios en los componentes minerales ni en otros tales como urea, creatinina, triglicéridos o colesterol a lo largo de la infección.

4.4. Aspectos clínicos

La fasciolosis puede presentar tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica, que aparecen en función de la disponibilidad y número de metacercarias ingeridas, de la

estacionalidad, de la respuesta inmune del hospedador y de la duración de la infección (Boray, 1969; Haroun & Hillyer, 1986; Torgerson & Claxton, 1998; Piedrafita et al., 2004).

La forma aguda se caracteriza por dolor abdominal, anemia, hepatomegalia y fiebre y es el resultado del daño tisular por la migración de formas inmaduras por la pared duodenal y por la cápsula y parénquima hepático. La crónica, producida cuando los parásitos se asientan en los conductos biliares, se caracteriza por colangitis, hiperplasia y fibrosis (Behm & Sangster, 1999; Marcos et al., 2008). La subaguda presenta una sintomatología intermedia. A continuación, comentaremos cada una de ellas.

- **Aguda:** no es común, pero si aparece es fundamentalmente en ovejas. Los animales no presentan signos clínicos y se les suele encontrar muertos, incluso con buena condición corporal. Es más frecuente en otoño y principio del invierno (Rojo-Vázquez et al., 2012). Se puede manifestar de dos formas: en la primera, existe un elevado número de parásitos migrando por el parénquima (Ross et al., 1967) y en la segunda, la cantidad de parásitos es menor aunque en los conductos biliares ya pueden observarse formas maduras (Boray, 1969).

Este cuadro clínico se desarrolla a las 2-3 semanas como consecuencia de la ingestión de un elevado número de metacercarias, que ronda el millar, en un corto periodo de tiempo, fundamentalmente en animales jóvenes que se enfrentan por primera vez al parásito, y que invadirán el parénquima hepático produciendo anemia hemorrágica normocítica y normocrómica (Reid, 1973). También cursa con dolor abdominal, anorexia, conjuntivas amarillentas e incluso muerte cuando la pérdida de sangre es abundante y/o existe fallo hepático (Dawes & Hughes, 1964; Jennings, 1976; Behm & Sangster, 1999;

Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). A la palpación se aprecia hepatomegalia y ascitis (Rojo-Vázquez et al., 2012) y solo puede ser diagnosticada *post-mortem* o bien por un examen parasitológico o hemático. Esta forma clínica es imposible de diagnosticar en las primoinfecciones por exámenes coprológicos, ya que los estadios juveniles todavía no producen huevos y el animal se encuentra en la fase de prepatencia de la infección (Alcaíno & Apt, 1989). En la analítica, se detecta eosinofilia (Poitou et al. 1993; Gökçe et al., 2011), aumento de la enzima AST (Ferre et al., 1994, 1996), hiperglobulinemia y un hematocrito entre el 7-10%. En algunas ocasiones la infección se puede complicar por la presencia conjunta de *Clostridium oedematiens (novyi)* tipo B, proliferando en las lesiones producidas por las fasciolas (Behm & Sangster, 1999, Rojo-Vázquez et al., 2012).

- **Subaguda:** se produce a las 6-10 semanas de la ingestión de dosis más bajas de metacercarias durante un periodo de tiempo más extenso y el daño viene dado por las formas migrantes inmaduras y por las maduras ya asentadas en los conductos biliares causando colangitis. Algunos animales pierden peso durante 1 o 2 semanas antes de la aparición de los signos clínicos, que se caracterizan por letargo, palidez de mucosas y dolor abdominal (aunque no todos presentan hepatomegalia). Algunos individuos ya presentan edema submandibular o “*papo*” y ascitis. En los análisis se detecta un aumento de la GLDH y la GGT, indicadores del daño en los conductos (Sykes et al., 1980; Yang et al., 1998). Si se prolonga la infección, se produce anemia macrocítica e hipocrómica por la hemorragia y por el bajo hematocrito, menor del 25%. Inicialmente cursa con hiperproteinemia por el aumento de las Igs (Nansen et al., 1975), pero debido al

descenso de la albúmina, se pasa a un estado de hipoproteinemia (Dargie, 1981; Symons, 1989).

- **Crónica:** tiene lugar principalmente a finales de invierno y comienzos de primavera y es la forma más común de la enfermedad (Rojo-Vázquez & Ferrer-Pérez, 1999). Se produce después de 4-5 meses por la ingestión continua de una cantidad baja o moderada de metacercarias, menos de cien y casi siempre durante el otoño-invierno. Esta forma clínica se complica en animales desnutridos, gestantes o en lactación, con una importante pérdida de la condición corporal y se caracteriza por la pérdida de peso, anemia hemorrágica crónica (Dargie & Mulligan, 1971) e hipoalbuminemia, palidez de mucosas, edema submandibular (“papo”) y ascitis.



Figura 7. Edema submandibular o “papo”.

La forma más frecuente de infección suele ser subclínica y además, es la más difícil de diagnosticar, causando cuantiosas pérdidas económicas. Durante la infección subclínica,

la pérdida de apetito está confirmada (Boray, 1969; Sinclair, 1972; Berry & Dargie, 1976; Hawkins & Morris, 1978; Sykes et al., 1980), con la consiguiente reducción de la ingesta diaria de alimentos (Dargie, 1987). El grado de anorexia se ha asociado con la intensidad de la infección, pero no existe una relación clara entre la carga parasitaria y la disminución del apetito (Symons, 1985; Dargie, 1987). Sin embargo, Ferre et al. (1994), observaron una gran disminución en la ingesta voluntaria de alimentos en corderos, incluso en infecciones con tan sólo 20 metacercarias. Además, comprobaron que cuanto mayor es el fallo hepático, más disminuye el apetito, confirmándose con un aumento de la concentración de los ácidos biliares en plasma y una reducción en el flujo de bilis y la secreción de ácido biliar, que eventualmente podría conducir a la disminución de la ingesta voluntaria de alimentos (Anil & Forbes, 1980).

5. Aspectos inmunitarios

La inmunidad hace referencia a los mecanismos utilizados por el organismo para protegerse contra los agentes extraños. Las respuestas inmunológicas pueden ser clasificadas como inmunidad innata o inmunidad adquirida (Fearon & Locksley, 1996).

La *inmunidad natural o innata* es una respuesta rápida, inespecífica, que actúa sobre todos los patógenos por igual y no genera memoria inmunológica. La piel, mucosas, reflejo de la tos, ácidos gástricos o la temperatura corporal pueden actuar como barreras naturales frente a diversos agentes, pero no suelen ser útiles en las infecciones por *F. hepatica*. La inmunidad innata se refiere también a la fase temprana de la respuesta inmune durante la cual el organismo emplea receptores para identificar y responder a una amplia gama de organismos (Medzhitov & Janeway, 2000). En ella intervienen diversas moléculas tales como:

- El sistema del complemento: es un conjunto de proteínas que actúan cuando se activan y tienen como finalidad defender al organismo, principalmente de microorganismos. Son capaces de lisar las células por formación de poros en sus membranas, induciendo una respuesta inflamatoria y favoreciendo la opsonización para una posterior fagocitosis por macrófagos y granulocitos (Roitt, 2006). Se puede activar por la vía clásica, iniciada por los complejos antígeno-anticuerpo, por la vía alternativa, a través de polisacáridos de la pared bacteriana, o por la vía de las lectinas, similar a la clásica sin necesidad de anticuerpos (Mastellos & Lambris, 2002).
- Las citoquinas: son producidas por linfocitos y macrófagos y se pueden clasificar en: (i) interferones (IFN), participando en las primeras etapas de la

respuesta inmune y se considera que son la primera línea de la resistencia a muchos virus. (ii) Interleucinas (IL), producidas principalmente por los linfocitos T, con funciones de diferenciación, activación y proliferación de células. Cada IL actúa específicamente sobre un grupo limitado de células que expresan el receptor apropiado para esa IL. (iii) Factor de necrosis tumoral (TNF) con varias funciones, incluyendo la inflamación y la mediación de reacciones citotóxicas.

- Los eosinófilos: se encuentran recubiertos de IgE e IgG y son ricos en gránulos de histamina que vierten al exterior produciendo fuertes respuestas inflamatorias para posteriormente los neutrófilos encargarse de la fagocitosis y destrucción de patógenos. Los basófilos y mastocitos pueden secretar IL, como la IL-4 (Wedemeyer et al, 2000) y la IL-5, que van a estimular la liberación de eosinófilos (Behm & Ovington, 2000), participando en reacciones alérgicas. Su función principal es en la defensa contra los organismos demasiado grandes para ser fagocitados (Behm & Ovington, 2000). Se ha comprobado que cuando los eosinófilos son estimulados pueden dañar la membrana de los parásitos debido a la propiedad que tienen estas células de unirse a ellos.
- Los monocitos y macrófagos: fagocitan cuerpos extraños y producen las citoquinas proinflamatorias TNF, IL-1 e IL-6. Poseen receptores para lipopolisacáridos que son el principal componente de las bacterias Gram negativas, liberando moléculas reguladoras que influyen en la respuesta innata incluyendo la IL-12 y el óxido nítrico (NO) (Mitttrucker & Kauffmann, 2000).
- Las células natural killer (NK): actúan muy pronto en la respuesta inmune, ya que son la principal fuente de IFN gamma (IFN- γ), citoquina clave en la activación de macrófagos (Schwacha et al, 1998). También producen NO

(Cifone et al., 1999), empleado en la respuesta innata como un regulador de la IL-12 (Diefenbach et al, 1999).

- Las células dendríticas (CDs): son células presentadoras de antígenos y se encuentran entre las primeras células que detectan microorganismos invasores (Pulendran et al, 2001). Utilizan diversos receptores para detectar patógenos potenciales y responder mediante la secreción de una serie de citoquinas (Banchereau et al, 2000).

La *inmunidad adquirida* es más lenta, pero más específica, genera memoria y discriminación entre antígenos propios y extraños (Roitt, 2006). Está mediada por linfocitos B y T tras exponerse a un antígeno presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno (Barton & Medzhitov, 2002; Mendes, 2010). Los linfocitos B son responsables de la inmunidad humoral y los T de la celular (Roitt, 2006).

- **Inmunidad celular:** Las dos principales grupos de linfocitos T son los linfocitos T colaboradores (Th) y los linfocitos T citotóxicos (Tc).

Los *linfocitos T colaboradores* según la estimulación antigénica que reciban (Mosmann et al., 1986; Mosmann & Coffman, 1989a; Abbas et al., 1996; Constant & Bottomly, 1997; Jankovic et al., 2001) van a dar lugar a los grupos Th1 y Th2, en función de las citoquinas que produzcan (Seder & Paul, 1994).

Los Th1 predominan en infecciones por virus y bacterias y tienen un carácter proinflamatorio (Berger, 2000) activando a los macrófagos y produciendo IgG (Spithill et al., 1997). Se caracterizan por la producción del TNF- β , IFN- γ y diversas IL (IL-2, IL-3, IL-12). Los Th2 predominan en infecciones parasitarias, presentando un componente antiinflamatorio (Berger, 2000) con la producción de citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Mulcahy et al., 1999).

Además potencian la proliferación de IgE (activada por IL-4), eosinófilos (activados por IL-5) y células cebadas (activadas por IL-3 e IL-4) (Mossman & Coffman, 1989b; Estes et al., 1995; Jankovic et al., 2001; Cervi et al., 2001).

Los *linfocitos T citotóxicos*, neutralizan células infectadas por microorganismos intracelulares, mediante un ataque directo a las células infectadas, inyectando enzimas tóxicas que provocan su destrucción. También atacan tejidos transplantados así como células cancerígenas (Roitt, 2006).

- **Inmunidad humoral:** está mediada por linfocitos B y células plasmáticas. Los linfocitos B viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a órganos linfoides secundarios como el bazo, ganglios linfáticos, tonsilas o placas de Peyer (Clark & Ledbetter, 1994). Van a combatir patógenos extracelulares así como sus toxinas, y son capaces de reconocer un amplio espectro de antígenos extraños mientras ignora antígenos propios (Kelly & Chan, 2000). Reconocen los antígenos a través de las Igs presentes en su membrana pero este estímulo no es suficiente para que se inicie la respuesta inmune humoral. Para ello es necesario que los linfocitos B, reciban ayuda de citoquinas producidas por los linfocitos T colaboradores, dando lugar a células de memoria y células plasmáticas, que liberarán anticuerpos o Igs. Los rumiantes, han mostrado poseer las siguientes Ig: IgM, IgG, IgA e IgE, homólogos a los de otras especies y definidos según su antigenicidad y movilidad electroforética (Musoke et al., 1986).

5.1. Respuesta inmunitaria en la fasciolosis

Aunque muchas especies de mamíferos pueden ser infectados por *Fasciola* spp., hay una variación en el grado de susceptibilidad a la infección, y en la capacidad de desarrollar una respuesta inmune eficaz. Por ejemplo, las ovejas a menudo mueren de

fasciolosis aguda, mientras que algunas infecciones pueden durar hasta 11 años (Pantelouris, 1965). También se han visto diferencias genéticas que pueden ocasionar distintos niveles de susceptibilidad en ovejas, como ocurre en la raza Barbados Blackbelly, que es más resistente que otras como la Nativa de Florida (Boyce et al., 1987). En contraposición, en el ganado bovino rara vez mueren individuos por fasciolosis y tienden a recuperarse entre los 9 y 26 meses p.i., hecho que puede ser debido al engrosamiento de las paredes de los conductos biliares por la calcificación tras la infección crónica (Mulcahy et al., 1999; Rojo-Vázquez & Ferre-Pérez, 1999). En ovejas con fasciolosis crónica este hecho no es visible y por lo tanto podría estar relacionado con mayores tasas de mortalidad. En los seres humanos sí que se presenta alta morbilidad, y los parásitos persisten en el hospedador durante períodos prolongados (Maizels et al., 1993), aunque las tasas de mortalidad no suelen ser elevadas.

En el ganado equino y porcino, el parásito no suele alcanzar la madurez y hay estudios que han equiparado la susceptibilidad a la infección con el control en la migración en el parénquima por la fibrosis que se produzca (Soulsby, 1987), estableciendo un orden de resistencia que comenzaría por cerdos, caballos, bovinos y ovinos.

En ratas se ha comprobado la gran resistencia para soportar infecciones de *F. hepatica*. Esto puede ser debido a un proceso de recuperación similar al que ocurre en las vacas (Hughes et al., 1976).

Hay que hacer mención también al fenómeno que tiene lugar en la infección por *F. magna*, ya que en su hospedador natural, se encuentra encapsulada en el hígado dentro de quistes fibrosos que se conectan con los conductos biliares a través de los cuales elimina los huevos (Soulsby, 1987). En cerdos y vacas estos quistes tienen una pared tan gruesa que no pueden comunicarse con los conductos biliares. Por el contrario, en la

oveja no se produce esta encapsulación, permitiendo al parásito migrar por el tejido hepático y causar graves lesiones (Mulcahy et al., 1999).

Las barreras naturales como piel, mucosas o ácidos gástricos no suelen ser útiles en las infecciones por *F. hepatica*, es más, los jugos gástricos favorecen el desenquistamiento de las metacercarias (Dalton & Brindley, 1997).

Los helmintos generalmente inducen una respuesta inmunitaria de tipo Th2 y se ha descrito que tiene mayor importancia que la de tipo Th1 en su expulsión (Sher & Coffman, 1992; Urban et al., 1992; Svetic et al., 1993). Durante la infección se producirá IgE por acción de la IL-4 y se promoverá la movilización de eosinófilos que pueden liberar compuestos tóxicos catiónicos, capaces de provocar daño en la cutícula de los parásitos. Sin embargo, algunos parásitos han evolucionado y han conseguido evitar esta respuesta Th2, usando los mecanismos de defensa del hospedador para facilitar su propia supervivencia (Pritchard et al., 1997).

La infección por *F. hepatica* induce una respuesta Th2 polarizada, relacionada con la producción de IL-4 (Viallard et al., 1999) y con una temprana respuesta Th1 con producción de IFN- γ (Tliba et al., 2002). Cuando la respuesta Th1 va disminuyendo, las citoquinas de perfil Th2 aumentan y esto supone una reducción en la carga parasitaria (O'Neill et al., 2000; Moreau & Chauvin, 2010). Martínez-Pérez et al. (2014a) llevaron a cabo un estudio donde se confirmó que los valores de IL-4 respecto a IFN- γ fueron más altos en la semana 4 y 12 p.i., corroborando que una respuesta Th 2 es la que permanece a lo largo de la infección, de acuerdo a trabajos previos de Pleasance et al. (2011) y Haçariz et al. (2009).

Durante la estimulación de las células T indiferenciadas, y en presencia de IL-4, se favorecerá el desarrollo de los linfocitos Th2 frente a los Th1 (Finkelman et al., 1988; Hsieh et al., 1992; Seder & Paul, 1994). Sin embargo, en presencia de IL-12, se activará la diferenciación de los linfocitos Th1 y se inhibirá una respuesta Th2 (Hsieh et al., 1993; Trinchieri & Scott, 1994).

La respuesta inmune también está controlada por otras poblaciones como las células Th de tipo 3 (Shevach, 2002), que regulan la respuesta inmune por varios mecanismos, tales como la producción de IL-10 y TGF- β por contacto celular (Mauri & Ehrenstein, 2008). Estas dos citoquinas van a ayudar en la reparación del tejido durante las infecciones por helmintos actuando de forma sinérgica (Lee et al., 2002). La IL-4 se sabe que estimula la producción tanto de la IL-10 (Schmidt-Weber et al., 1999) como del TGF- β (Kohyama et al., 2001), el cual estimula a su vez la formación de colágeno (Cutroneo, 2007), por lo que ambas inducen la fibrosis hepática durante la enfermedad (Flynn et al., 2010). Martínez-Pérez et al. (2014a) confirmaron niveles de expresión más altos en estas tres citoquinas (IL-4, IL-10 y TGF- β), comparándolos con los de IFN- γ , asociado a una respuesta Th1, en un grupo control de su estudio tras la infección experimental con *F. hepatica*.

En las infecciones por helmintos hay una preferencia en la respuesta inmunitaria hacia la producción de IgE (Mansour et al., 1990; Hagan, 1993; Maizels et al., 1993; Schallig et al., 1995) por lo que la liberación de IgE e IgG es el principal mecanismo para lograr la eliminación de los helmintos (Mulcahy et al., 1999).

Principalmente se describe un aumento en la producción de IgG1 (Clery et al., 1996), asociado con una respuesta inmune tipo Th2 (Estes & Brown, 2002). Tal es así que

Martínez-Pérez et al. (2014b) demostraron un incremento de los niveles de IgG1 durante la evolución de una infección experimental en ganado ovino.

Se ha visto que los animales infectados crónicamente con *F. hepatica* pueden ser tolerantes a una infección moderada (Clery et al., 1996), y se ha confirmado (Ortiz et al., 2000) en ganado vacuno que estos animales siguen siendo igual de susceptibles a la infección.

5.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Los parásitos pueden permanecer en el hospedador largos periodos de tiempo y por lo tanto se desarrollan mecanismos de evasión para frenar el ataque del sistema inmunitario del hospedador. *F. hepatica* ha desarrollado una serie de mecanismos que permiten su establecimiento en el hígado (Meeusen et al., 1995), aunque para llegar a él tienen que atravesar estructuras como el intestino en los que el sistema inmune es muy activo (Mulcahy et al., 2005).

La mayor interacción parásito-hospedador se va a dar en la superficie del parásito, por lo que el glucocálix externo que lo recubre cobra vital importancia sufriendo continuas renovaciones (Hanna, 1980b) sobre todo durante la migración intraparenquimatosa donde está más expuesto al sistema inmune. Debido a estos procesos de renovación de su cubierta, los eosinófilos no pueden establecer un contacto duradero con el parásito, ya que se desprenden con el tegumento (Duffus & Franks, 1980; Hanna, 1980b). También pueden liberarse sustancias al medio que dificultan la acción de los anticuerpos (Duffus & Franks, 1980), algunas como el ácido siálico que evita la activación del complemento por la vía alternativa (Baeza et al., 1994), y otras como la

fosfoserina que lo bloquearían por las dos vías, clásica y alternativa (Montgomery et al., 1986).

La propia migración de las fasciolas es también un mecanismo de evasión ya que es más efectivo que se desplacen a que se queden en una única localización, provocando diferentes tipos de respuesta inmunitaria (Meeusen & Brandon, 1994).

Se ha visto que los niveles de anticuerpos inducidos en ratones, ratas, ovejas y vacas, descienden una vez que el parásito penetra dentro de los conductos biliares (Hanna, 1980a; Meeusen & Brandon, 1994; Clery et al., 1996), y que los niveles de Igs en los conductos biliares en vacas infectadas, son hasta 12 veces menores que los medidos en sangre, predominando la IgA, lo que confirma la escasa actividad inmunológica a este nivel (Hughes et al., 1981).

Existen otras estrategias defensivas que evitan al sistema inmune del hospedador, como los radicales superóxido producidos por los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos o los reactivos nitrogenados de los macrófagos, sobre los que actúan enzimas del parásito tales como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión-S-transferasa (Brophy et al., 1990; Creaney et al., 1995; Mandal et al, 2012; Scarcella et al., 2013).

Hay estudios en los que se ha observado que *F. hepatica* puede deprimir la inflamación local y la respuesta inmunitaria para facilitar su paso a través del parénquima hepático (Chauvin & Boulard, 1996) o bien que puede liberar sustancias linfotóxicas (Goose, 1978) así como proteasas destructoras de inmunoglobulinas (Smith et al., 1992; Carmona et al., 1993).

Los mecanismos que intervienen en la protección inmunitaria no han sido establecidos aún, pero se cree que tienen lugar en las primeras fases de la infección a nivel del

intestino delgado (Charbon et al., 1991), cavidad peritoneal (Burden et al., 1983) y el hígado en sí (Keegan & Trudgett, 1992).

6. Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de la fasciolosis son variados y en función de la fase en la que se encuentra la infección son más útiles unos u otros.

6.1. Diagnóstico clínico

En este caso, la sintomatología explicada en cada una de las fases de la enfermedad puede ser indicativa de la presencia de la misma. Síntomas como fiebre ligera, debilidad, hepatomegalia con dolor abdominal y ascitis, podrían cursar durante la fase aguda de la enfermedad; a ellos podrían sumarse otros en la fase más crónica como disminución del apetito y de la condición corporal, anorexia, conjuntivas amarillentas, letargo, palidez de mucosas o edema submandibular (Rojo-Vázquez et al., 2012). Además, en zonas endémicas, la muerte súbita de ovejas a finales verano y en otoño, puede ser indicativa de una infección aguda que tan solo podría ser confirmada por los hallazgos en necropsia.

En las fases agudas se detectará fibrosis hepática focal, hepatomegalia, trayectos hemorrágicos, adherencias y fasciolas en distintos estados de desarrollo por el parénquima (Murray & Rushton, 1975), aunque también pueden estar presentes en el peritoneo y en otras localizaciones ectópicas como bazo, páncreas o pulmones. En la fase subaguda, la fibrosis se va extendiendo ya desde la cápsula al parénquima, con la presencia de conductos biliares haciendo prominencia en superficie y abscesos multifocales (Scott et al., 2005). Durante la fase crónica, es común la presencia de

vermes en los conductos biliares con la consiguiente obstrucción, acompañada de colangitis, fibrosis y ganglios afectados.

Es importante diferenciar la fasciolosis, principalmente la forma aguda, de otros procesos como enterotoxemias, pasteurelosis, septicemias, intoxicaciones o acidosis; y, en la crónica, con infecciones por nematodos gastrointestinales, deficiencias nutricionales, carencia de cobre o cobalto y paratuberculosis (Rojo-Vázquez et al., 2012).

En la actualidad, algunas técnicas no invasivas basadas en el diagnóstico por imagen se están empleando en clínica, como la ecografía (Pulpeiro et al., 1991; El Shabrawi et al., 1997; Richter et al., 1999) o la tomografía axial computerizada y la resonancia magnética nuclear (Han et al., 1999; Gonzalo-Orden et al., 2003). Estas dos últimas, todavía se encuentran en fase experimental. Mediante ellas se podrá comprobar en la fase aguda áreas hipoecóicas dentro del hígado y esplenomegalia. En la fase más crónica, las alteraciones afectan esencialmente al árbol biliar (Fawzy et al., 1992; Arjona et al., 1995). Otras complicaciones que se pueden producir son congestiones hepáticas, pancreatitis obstructiva y estenosis así como perforación de las vías biliares (Acuna-Soto & Braun-Roth, 1987; Veerapan et al., 1991).

Como complemento al diagnóstico clínico, pueden servir de ayuda una serie de pruebas bioquímicas.

Los niveles anormales de las enzimas hepáticas en plasma indican una hepatopatía, pero no son específicas de la fasciolosis. La medición de las actividades séricas de las enzimas AST, sorbitol deshidrogenasa (SDH), GLDH o GGT puede ser utilizada como marcador de las diferentes etapas de la infección por *F. hepatica*. La determinación

secuencial de los niveles de estas enzimas también es valiosa para evaluar la actividad antihelmíntica de los fármacos y la eficacia del tratamiento (Benchaoui & McKellar, 1993). Además se puede llevar a cabo pruebas de funcionalidad hepática para determinar el daño instaurado por la enfermedad. La prueba de la bromosulfoftaleína confirma la reducción de su aclaramiento plasmático a partir de la octava semana p.i., en el curso de la fasciolosis subclínica (Tufenkji et al., 1987). La prueba de la antipirina ha confirmado la reducción de sus niveles de aclaramiento plasmático desde la cuarta semana p.i. (Tufenkji et al., 1988); también se ha comprobado que la fasciolosis subclínica experimental conduce a una cinética alterada de la antipirina y a una inhibición de las diferentes vías metabólicas de la misma en búfalos de agua (Jiang et al., 2000).

A nivel hemático, se detecta anemia macrocítica e hipocrómica, con niveles de hematocrito por debajo del 25% a partir de la octava semana p.i. como consecuencia de la alimentación de las fasciolas que permanecen en el parénquima, y también hipoalbuminemia (Dargie, 1987) y eosinofilia (Poitou et al., 1993).

6.2. Diagnóstico coprológico

La detección de huevos de *F. hepatica* en las heces de los animales es indicativo de infección, aunque hay que tener en cuenta que en infecciones agudas o subagudas, esta prueba puede ser negativa. La coprología tiene valor en los casos ya cronificados (Burger, 1992; Rojo-Vázquez et al., 2012), porque los huevos aparecen en las heces solo después de que el parásito alcanza la madurez sexual, alrededor de la novena semana p.i. (Martínez-Valladares et al., 2010b), cuando el daño hepático ya está instaurado. Las dos técnicas empleadas son la flotación, en la que se usan soluciones de

alta densidad como el sulfato de zinc o el yodomercuriato potásico, presentando el inconveniente de que los huevos pueden deformarse por fenómenos osmóticos (Whitlock, 1950; Parfitt & Banks, 1970); y la sedimentación, que se basa en la mayor densidad de los huevos del trematodo que los detritus de las heces, lo que permite concentrarlos tras varios lavados (Dennis et al., 1954; Parfitt & Banks, 1970). Sin embargo, la baja sensibilidad de esta técnica, estimada en un 30% (Happich & Boray, 1969), puede llevar a falsos negativos.

6.3. Inmunodiagnóstico

Aunque existen diversas técnicas como la precipitación, aglutinación (Mercado et al., 1985), inmunofluorescencia (Cabán-Hernández & Espino, 2013) o fijación del complemento, la técnica de elección es el enzimoimmunoensayo o ELISA (Hillyer & Soler de Galanes, 1991). Aunque se trata de técnicas con alta sensibilidad y especificidad, son más útiles para la detección de rebaños infectados de forma natural que para el diagnóstico individual (Pfister, 1990). La fasciolosis se caracteriza por un aumento en la producción de IgG, especialmente IgG1 que se asocia con una respuesta inmune Th2 (Clery et al., 1996). Mediante el ELISA indirecto, se han detectado anticuerpos en suero sanguíneo utilizando diferentes antígenos del parásito, principalmente de excreción-secreción, desde la primera semana p.i (Almazán et al., 2001), en la tercera semana p.i. (Marín-Gómez, 1992) o después de la quinta semana p.i. (Rodríguez-Osorio et al., 1998; Reichel, 2002; Mezo et al., 2007). Martínez-Valladares et al. (2010a) confirmaron que las IgG totales alcanzan los niveles más altos a la cuarta semana p.i. para posteriormente disminuir cuando el parásito penetra en las vías biliares. Hay que tener en cuenta que en infecciones naturales, como consecuencia de que los

animales se están reinfectando continuamente, los niveles de anticuerpos van a permanecer elevados de forma continua. Sánchez-Andrade et al. (2001) tan solo vieron solo una disminución de los anticuerpos entre la sexta y octava semana tras el tratamiento.

Otra alternativa es la detección de antígenos en el suero y/o heces mediante la técnica ELISA sándwich (Abdel-Rahman et al., 1998). Los antígenos circulantes han sido detectados en infecciones experimentales a partir de las dos primeras semanas p.i. (Duménigo et al., 2000) o más tardíamente desde la cuarta semana p.i. (Almazán et al., 2001; Martínez-Pérez et al., 2012). Varios estudios demuestran que los niveles de antígenos descienden después de un tratamiento antihelmíntico eficaz, y que tras 2-4 semanas los valores pueden volver a ser negativos (Fagbemi et al., 1995; Sánchez-Andrade et al., 2001). Mediante ELISA sándwich, Mezo et al. (2004) confirmaron un 100% de sensibilidad en la detección de antígenos específicos en heces, incluso en la infección de ovejas con una sola metacercaria y detectando la infección en la fase de prepatencia, antes de que comience la excreción de huevos (Sánchez-Andrade et al., 2000). Martínez-Valladares et al. (2010a), utilizaron el ELISA sandwich para diagnosticar la infección en ovejas infectadas de forma natural. Según Paz-Silva et al. (2002) el nivel de antígenos va a aumentar gradualmente de forma paralela a la excreción de huevos en las heces. Sin embargo, durante un corto período de tiempo tras el tratamiento, los resultados del ELISA sándwich pueden ser todavía positivos, debido a que fragmentos del parásito todavía pueden estar presentes 21 días después del tratamiento (Flanagan, 2010).

En esta Tesis Doctoral, habrá una mención especial a la utilización del ELISA sándwich para determinar la eficacia de los fármacos y además los resultados serán comparados con otras técnicas, coprológicas y de biología molecular.

6.4. Diagnóstico por técnicas moleculares

La biología molecular es una herramienta muy útil para confirmar la enfermedad mediante la detección del ADN del parásito gracias a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN partiendo de una cantidad mínima del mismo. En primer lugar, hay que proceder a la extracción del ADN, bien de las diferentes fases del parásito o a partir de muestras biológicas del hospedador intermediario o definitivo.

La PCR es una técnica muy sensible y ha sido utilizada por muchos autores para la detección de algunos parásitos como *Echinococcus multilocularis* en heces de zorros, amplificando el gen que codifica para el ARN pequeño nuclear U1 (small nuclear ARN U1, snRNA U1) (Bretagne et al., 1993) y para el ARN ribosomal 12S de la mitocondria (RNA mt12S) (Dinkel et al., 1998; Al-Sabi et al., 2007). A partir de heces de perros también se detectó la presencia de *Echinococcus granulosus* tras la amplificación del gen que codifica para la enzima Hae III de *Haemophilus aegyptius* (Abbasi et al., 2003). Por otra parte, Mathis y Deplazes (2006), detectaron la presencia de *Echinococcus spp.*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, así como de otros cestodos en heces de zorro, tras la amplificación de los genes rRNA mt12S y snRNA U1.

En relación con la fasciolosis, la detección del parásito en el hospedador definitivo ha sido detectada a partir de muestras de heces por Martínez-Pérez et al. (2012). El ADN

detectado en heces procede del tegumento del parásito debido al desprendimiento de células que tienen lugar durante la migración del parásito, así como de los huevos liberados en la fase de patencia por parte del individuo adulto. Martínez-Pérez et al. (2012) diseñaron una PCR estándar y una anidada que amplificaban un fragmento de ADN mitocondrial. Mediante la PCR estándar la infección se detectó a partir de la tercera semana p.i., y con la PCR anidada a partir de la segunda semana p.i.

Ai et al. (2010) diseñaron una PCR para la identificación de *F. hepatica* y *F. gigantica* en muestras de heces de búfalo tras la amplificación de un fragmento de la subunidad ITS2 del ADNr de *Fasciola* spp.

En el caso de esta Tesis Doctoral, uno de los objetivos ha sido desarrollar una PCR empleando unos primers propios basados en una secuencia que codifica para la subunidad ITS2 de *F. hepatica*. Además, se ha utilizado esta técnica para determinar la eficacia de tratamientos antihelmínticos en condiciones de campo.

7. Control y profilaxis

Las principales medidas para la lucha contra la fasciolosis deben ir encaminadas a llevar un control sobre la población de hospedadores intermediarios, las limneas; a la eliminación del parásito del hospedador definitivo; y a evitar la aparición de resistencias a los antihelmínticos (Rojo-Vázquez et al., 2012).

7.1. Medidas sobre el hospedador intermediario

La ventaja de actuar en esta fase podría ser el ahorro económico debido a la disminución del gasto en antihelmínticos y, como consecuencia, la disminución del desarrollo de resistencias y el evitar los posibles fallos terapéuticos (Vara del Río, 2007). Las posibilidades para llevar a cabo este control se pueden agrupar en:

- a) Control químico mediante el uso de molusquicidas. Se ha visto que su utilización en condiciones ambientales adversas para el caracol, junto con el tratamiento de los hospedadores definitivos, puede hacer disminuir la población de limneas hasta en un 90% (Roberts & Suhardono, 1996). Como inconvenientes, cabe destacar la posible toxicidad de algunos productos en la fauna acuática y la aparición de resistencias en la población (Haseeb & Freid, 1977). Además, para que sea efectivo, se debe hacer de forma continuada, con el consiguiente coste económico.

Lo ideal sería hacer un tratamiento en primavera para que los caracoles mueran y otro en verano, para que los supervivientes parasitados sean eliminados antes de la emisión de las cercarias (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b).

Los productos de elección son la niclosamida, el pentaclorofenato sódico y la N-tritilmorfolina (Boray, 1982). La niclosamida es muy tóxica para los caracoles y los huevos y apenas lo es para los mamíferos (Meyer-Lassen et al., 1994). La N-tritilmorfolina solo actúa frente a las limneas adultas, no contra los huevos, y apenas provoca daño en el medio (Pfister et al., 1994). En la actualidad, otros productos procedentes de las plantas se vienen empleando frente a los estadios tempranos de *Fasciola* dentro del caracol, como el ácido cítrico, el ácido ferúlico o las umbeliferonas (Sunita & Singh, 2011).

- b) Control biológico mediante el uso de organismos como *Chaetogaster limnaei*, que se alimenta de cercarias, o *Muellerius capillaris*, que provoca un incremento de la mortalidad de caracoles infectados (Khalil, 1961; Hourdin et al., 1993). También se han utilizado depredadores como *Zonitoides nitidu*, en Francia (Ximenes et al., 1993), o poblaciones avícolas que empleen como suplemento alimenticio los caracoles (Gunaratne et al., 1993).
- c) El manejo mediante el vallado de zonas húmedas para que los hospedadores definitivos no accedan a las mismas, el drenaje de terrenos encharcados o la incorporación de bebederos, son técnicas útiles para impedir la propagación de la infección (Gómez-Bautista & Rojo-Vázquez, 1994b; Rojo-Vázquez et al, 2012).

7.2. Medidas sobre el hospedador definitivo

7.2.1. Quimioprofilaxis

Los fármacos que pueden ser empleados abarcan un amplio espectro. Sin embargo, hay que tener en cuenta si estos son efectivos contra todos los estadios de *F. hepatica* ya que

algunos actúan solo frente a las formas adultas y otros frente a ambas, adultas e inmaduras (Rojo-Vázquez et al., 2012).

Los grupos de fármacos más empleados son los siguientes:

- **Fenoles halogenados:** como el bitionol, hexaclorofeno, niclofolán o nitroxinil, entre otros. Son muy eficaces frente a las fasciolas maduras pero poco frente a las inmaduras (Fairweather & Boray, 1999a). Martínez-Valladares et al. (2010a) demostraron una eficacia del nitroxinil de entre el 81,3 y el 86% durante el primer mes después del tratamiento, probablemente debido a que la eficacia de este fármaco frente a individuos de entre 7 a 9 semanas de edad es sólo de un 50-90%. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la fosforilación oxidativa.
- **Salicilanidas:** como la brotianida, closantel, oxiclozanida, rafoxanida o niclosamida. Actúan a partir de las 6 semanas, aunque algunos como la rafoxanida se ha comprobado que tienen actividad frente a vermes de cuatro semanas (Fairweather & Boray, 1999a). Estos fármacos inhiben la fosforilación oxidativa, disminuyendo la síntesis de ATP (Prichard, 1978).
- **Bencimidazoles y probencimidazoles:** como el albendazol, mebendazol, triclabendazol o netobimin. El albendazol ha sido muy empleado en las infecciones mixtas de fasciolas y nematodos gastrointestinales, aunque apenas actúa frente a las formas inmaduras. Su acción la ejerce frente a las fasciolas maduras (McKellar & Scott, 1990); sin embargo, ha sido el fármaco más utilizado en España durante muchos años según encuestas recientes realizadas por Rojo-Vázquez y Hosking (2013). Además, debido a su alta lipofilidad, tienen efecto inhibitorio sobre los huevos (Mottier et al., 2003) y es más eficaz

que su metabolito sulfóxido porque se une con mayor intensidad a la tubulina del parásito (Lacey et al., 1987; Lubega & Prichard, 1991). El fármaco de elección es el triclabendazol, ya que actúa frente a formas maduras e inmaduras (Boray et al., 1983). Su eficacia es del 99-100% en vermes de entre 4 y 14 semanas y del 90-99% en fasciolas de entre 2-3 semanas (Fairweather & Boray, 1999a). No evita la eclosión de los huevos aunque sí actúa frente a su producción, ya que incide en el aparato reproductor a las 24 horas del tratamiento (Hanna et al., 2012). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la unión a la tubulina, despolimerizando los microtúbulos citoplasmáticos e interfiriendo en los procesos celulares donde sean necesarios. En el caso del triclabendazol, su efecto es la pérdida del tegumento comprobado *in vitro* a las 24 horas de exposición (Stitt & Fairweather, 1993) y, como el albendazol, daña los órganos reproductores, reduciendo el número de huevos (Lang et al., 1980). Otros compuestos como el fenbendazol, oxfendazol y mebendazol tienen cierta actividad ovicida pero ningún efecto frente a los adultos (Fairweather & Boray, 1999a). Una excepción es el flubendazol que tiene un marcado efecto sobre la eclosión de huevos, así como cierta actividad contra los trematodos adultos, aunque no es tan eficaz como el albendazol.

- **Sulfamidas:** su principal representante es el clorsulón. Se han observado eficacias de alrededor del 90% frente a parásitos adultos a partir de las ocho semanas. Corba et al. (1996) demostró una eficacia del 98% tras un tratamiento a partir del recuento de huevos en las heces. Su mecanismo de acción se basa en la alteración de la glucólisis, principal vía de obtención de energía de las células (Barrett, 1976; Schulman & Valentino, 1980), dando lugar a una parálisis flácida

y a una necrosis severa de las células intestinales del parásito, impidiendo así la ingestión de alimentos (Fairweather et al., 1984).

- **Fenoxialcanos:** la diamfenetida es el mayor representante del grupo. Son compuestos muy eficaces frente a formas maduras e inmaduras, incluso frente a formas de *F. hepatica* de un solo día, aunque su actividad disminuye según avanza el desarrollo parasitario (Rew & Fetterer, 1984). Su mecanismo de acción se basa en la interferencia de los procesos de osmorregulación del parásito e inhibición de síntesis proteica.

Fármacos	Fase	Prepatente*							Patente**						
	Semanas p.i.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Albendazol Netobimin Oxiclozanida Niclofolan Hexaclorofeno									50-90				91-99		
Nitroxinil Clorsulón									50-90				91-99		
Rafoxanida Closantel									50-90				91-99		
Triclabendazol									80-90				100		
Diamfenetida									80-90				90-100		

Tabla 1. Eficacia de distintos antihelmínticos a las dosis recomendadas (expresado en %) contra los diferentes estados de *F. hepatica* (Armour y Bogan, 1982; Boray, 1985; Taylor, 1987). P.i.: post infección. * Sin excreción de huevos / ** Con excreción de huevos.

Como resumen, indicar que los fármacos de elección para el tratamiento o la profilaxis de la fasciolosis suelen ser el triclabendazol, closantel, clorsulon, nitroxinil y albendazol. Todos ellos tienen una elevada eficacia frente a las formas maduras, pero moderada (clorsulon y closantel) o baja (albendazol) frente los vermes inmaduros (Zimmerman et al., 1986; Onar, 1990; Rehbein & Visser, 1999).

En relación al número de tratamientos a administrar, en áreas endémicas deberían ser de interés al menos dos tratamientos anuales: uno antes de comenzar el pastoreo para evitar su infección, y otro a finales de otoño, si no han existido casos agudos antes.

7.2.1.1. Resistencia antihelmíntica y su detección

Como consecuencia del uso continuado de fármacos, de la subdosificación y de la falta de alternancia entre los mismos, surge cada vez con más fuerza la resistencia a los antihelmínticos (RA). La RA por parte de *F. hepatica* aún no ha alcanzado los niveles observados en los nematodos gastrointestinales (Jackson & Coop, 2000); sin embargo, Overend & Bowen (1995) describieron el primer caso de resistencia al triclabendazol en Australia, y desde entonces ha habido casos en Irlanda (Lane, 1998; O'Brien, 1998), Escocia (Mitchell et al., 1998), Gales (Thomas et al., 2000), Países Bajos (Moll et al., 2000; Gaasenbeek et al., 2001; Borgsteede et al., 2005) y Argentina (Olaechea et al., 2011). En España, Álvarez-Sánchez et al. (2006) describieron por primera vez la resistencia al triclabendazol en el ganado ovino en la provincia de León. La detección temprana de la resistencia es fundamental, ya que parece que la reversión a la susceptibilidad no parece ocurrir (Ross et al., 1995).

Por lo que se refiere al albendazol, la primera descripción de resistencia en España fue estudiada por Álvarez-Sánchez et al. (2001, 2006) en la provincia de León. Recientemente, en Argentina se ha aislado otra cepa de *F. hepatica* resistente al albendazol (Sanabria et al., 2013); y en España de nuevo Martínez-Valladares et al. (2014), describieron un rebaño con resistencia múltiple al albendazol y clorsulón.

La falta de respuesta al triclabendazol en los casos agudos, podría ser debida al hecho de que el fármaco necesita ser metabolizado en el hígado y como el daño hepático puede ser importante en la fasciolosis, su eficacia se ve reducida (Rojo-Vázquez et al., 2012). Este fármaco, al igual que el tiabendazol, es poco soluble y las curvas de concentración se prolongan más en el tiempo, tanto en el plasma como en el tracto gastrointestinal, con lo que tienen una mayor persistencia en el hospedador (Gottschoff et al., 1990).

Para el diagnóstico de estas resistencias, se han desarrollado algunos ensayos *in vivo* e *in vitro* (Taylor et al., 2002). Entre los primeros, se emplea la reducción del número de huevos en las heces (FECRT), siendo uno de los métodos más utilizados para estimar la eficacia antihelmíntica mediante la comparación del número de huevos antes y después del tratamiento, puesta a punto inicialmente para estrongilados gastrointestinales (Coles et al., 1992; Boersema, 1993). La desventaja que tiene es que se necesita un período de tiempo de al menos 30 días para comprobar semanalmente el número de huevos excretados en heces ya que solo es válido una vez que los parásitos se han instaurado en los conductos biliares. Sin embargo, otros autores consideran que un periodo de 14 días podría ser un intervalo suficiente para determinar la eficacia de los fármacos sobre los parásitos adultos (Álvarez-Sánchez et al., 2006). Martín et al. (1989) estimaron que la sensibilidad del test para detectar los niveles de resistencia está por debajo del 25%.

En cuanto a los ensayos *in vitro*, la técnica de elección es el ensayo de eclosión de huevos (EHA), que inicialmente se desarrolló para detectar la resistencia a los bencimidazoles en nematodos gastrointestinales. En el caso de *F. hepatica*, se han llevado a cabo algunos ensayos con los huevos del parásito recuperados a partir de las heces o directamente de la vesícula biliar. Estos ensayos se han realizado utilizando diferentes concentraciones de triclabendazol, albendazol y sus metabolitos correspondientes (Álvarez et al., 2009; Fairweather et al., 2012; Robles-Pérez et al., 2014). El EHA se basa en la capacidad de los huevos de cepas resistentes de embrionar y eclosionar en concentraciones más altas de antihelmíntico que las de una cepa susceptible (Whitlock et al., 1980). Se han confirmado diferencias en la eclosión de huevos procedentes de cepas susceptibles y resistentes al triclabendazol, por lo que esta prueba podría ser útil en cepas de campo para evaluar la sensibilidad desconocida al fármaco (Fairweather et al., 2012). Una desventaja del EHA es la falta de solubilidad de muchos de los bencimidazoles comercializados, dificultando de esta forma su empleo en estos ensayos (Lacey & Prichard, 1986). En la presente Tesis Doctoral, hemos diseñado dos EHAs; uno con albendazol y otro con triclabendazol, para detectar posibles resistencias antihelmínticas en las poblaciones en estudio.

7.2.1.2. Mecanismo de desarrollo de la resistencia antihelmíntica

De un modo general, los mecanismos por los cuales se desarrolla la resistencia se deben a modificaciones en el receptor o el efector del fármaco, o a cambios en la concentración del antihelmíntico en su sitio de acción (Sangster & Dobson, 2002; Wolstheholme et al., 2004). Existen además resistencias cruzadas en las que la resistencia conferida por un fármaco puede darse también en otro de distinta familia

antihelmíntica; y resistencias colaterales, entre fármacos de la misma familia y con similar modo de acción. Sin embargo, si el mecanismo de resistencia se debe, total o parcialmente a modificaciones en la concentración plasmática del fármaco, diferentes antihelmínticos con el mismo modo de acción no tienen por qué mostrar el mismo nivel de resistencia (Prichard & Tait, 2001).

Como hemos indicado, el grupo de fármacos más empleado en el control antiparasitario es el de los bencimidazoles y su mecanismo de acción se basa en su unión a la β -tubulina, provocando una despolimerización de los microtúbulos y, en consecuencia, una alteración de los procesos en que están involucrados (Stitt & Fairweather, 1993). Tal es el caso de la secreción de enzimas digestivas, impidiendo su correcto funcionamiento y alterando la función digestiva del parásito. Sin embargo, en relación al triclabendazol se piensa que produce una inhibición del mecanismo de actuación de los microtúbulos como modo de acción, aunque otros lo consideran un inhibidor de la síntesis proteica y del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Stitt et al., 1995).

En los nematodos gastrointestinales se ha visto que la resistencia a los bencimidazoles se produce cuando aparecen mutaciones en el gen que codifica para el isotipo 1 de la β -tubulina dando lugar a alteraciones en el receptor de alta afinidad localizado en el extremo N-terminal de dicha proteína (Prichard et al., 1980). Estas mutaciones de cambios de aminoácidos se describieron inicialmente en *H. contortus* (Geary et al., 1992; Kwa et al., 1993), donde en la posición 200 de individuos resistentes, la fenilalanina se reemplaza por tirosina. Según Dobson et al. (1996), las especies más resistentes a los benzimidazoles son *H. contortus*, *T. colubriformis* y *Teladorsagia circumcincta*.

Tras la secuenciación del gen que codifica para el isotipo 1 de la β -tubulina de *F. hepatica* (Robinson et al., 2001), no se han encontrado diferencias en la secuencia primaria de aminoácidos entre cepas resistentes y sensibles al triclabendazol (Robinson et al., 2002). En el caso de *F. hepatica*, la posición 200 está ocupada por un residuo de tirosina en ambas cepas de vermes, a diferencia de los nematodos (Robinson et al., 2002).

Martinez-Valladares & Rojo Vázquez (2014) analizaron parte de las secuencias de los genes mitocondriales NADH y COX1 en huevos de *F. hepatica* con diferentes orígenes y niveles de resistencia, concluyendo que la presencia de adultos resistentes no daba lugar a una mayor diversidad genética en el ADN mitocondrial de los huevos. Aunque en este estudio las cepas resistentes presentaban un mayor número de haplotipos, así como una mayor frecuencia de SNPs, sobre todo en la unidad COX1, las diferencias no fueron significativas con las cepas susceptibles. Otro estudio de Vara del Río et al. (2007) sobre el gen que codifica para la subunidad 28S del ADN ribosómico, confirmó que ciertas variaciones en un fragmento de 510 pb guardan relación con un fenotipo resistente, aunque estos hallazgos se deberían extrapolar a un mayor número de muestras.

El seguimiento de los cambios en los diferentes tejidos del parásito podría proporcionar información sobre la eficacia del fármaco. El tegumento es el principal punto de contacto del fármaco con los vermes y por ello es importante observar los posibles cambios en el mismo (McConville et al., 2009). Mediante estudios con el microscopio electrónico, se han descrito las posibles modificaciones que tienen lugar en el tegumento de las fasciolas sensibles y resistentes tras la incubación con el sulfóxido de triclabendazol. Estos estudios han confirmado una escasa alteración del tegumento de

las formas resistentes e incluso de sus funciones reproductoras, em comparación con las cepas susceptibles (Hanna et al., 2010).

Se ha observado que algunos parásitos tienen varias estrategias para alcanzar la resistencia, como reducir la absorción del fármaco, una expulsión activa o una modificación sobre el punto de acción o del propio fármaco (Ouellette, 2001). Por ejemplo, en *Plasmodium spp.*, existen unos transportadores que cuando presentan una mutación actúan como una “bomba” facilitando la expulsión de la cloroquina (Foote et al., 1990). También, en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mutación simultánea de tres genes que codifican para los canales de glutamato dependientes de cloro, confieren alta resistencia a la ivermectina lo que sugiere que tanto la mutación como la consecuente alteración en el transporte pueden conducir a la resistencia de este fármaco (Dent et al., 2000).

Estudios *in vitro* han demostrado que adultos de *F. hepatica* resistentes al triclabendazol presentan una mayor metabolización del fármaco (Mottier et al., 2006) que podría deberse a un mayor número de transportadores de membrana dependientes de ATP o transportadores ABC (ATP Binding Cassette) como la glucoproteína-P (Pgp) (Jones & George, 2005). La Pgp tiene como función mediar en la salida de diversos componentes del interior de la célula al exterior, tales como hormonas, toxinas y fármacos (Sangster, 1994). Ya que es utilizada como sistema de detoxificación de fármacos, si existe un mayor número de dichos transportadores, el triclabendazol se eliminaría más fácilmente sin permitir su acción a nivel celular. Una posible reversión de la resistencia al triclabendazol podría darse en presencia de un fármaco capaz de bloquear estos transportadores como puede ser la ivermectina, ya que se ha demostrado que es un sustrato para la Pgp (Didier & Loor, 1996; Pouliot et al., 1997). Esto se deduce porque

la administración conjunta de ivermectina y triclabendazol, observada tras recoger ejemplares adultos de fasciolas resistentes, provoca que la concentración de triclabendazol intracelular sea mayor posiblemente debido a un bloqueo de la Pgp por la ivermectina (Mottier et al., 2006). Todas las Pgps estudiadas en *C. elegans* y *H. contortus* parece que están expresadas en un alto nivel en células intestinales (Lincke et al., 1992,1993; Broeks et al., 1995; Smith & Prichard, 2002), en la faringe (Broeks et al., 1995; Smith & Prichard, 2002) y en células excretoras (Lincke et al., 1992)

7.2.1.3. Control del desarrollo de las resistencias

Como alternativas para evitar este problema, cabe la posibilidad de proporcionar una dosificación correcta en función del peso de cada animal o rotar los antihelmínticos de forma anual con fármacos de grupos distintos (Anderson et al., 1988; Fairweather & Boray, 1999b).

Una vez presentada la resistencia, se podrían combinar fármacos para favorecer su “sinergismo”. Con estas combinaciones, la posibilidad de utilizar dosis inferiores a las normales reduce el uso de fármacos y sus efectos secundarios, así como la presencia de residuos de medicamentos en los tejidos del hospedador y en el entorno (Meaney et al., 2006).

Algunos estudios han demostrado el valor potencial de las combinaciones farmacológicas de diversos grupos químicos frente a cepas tanto susceptibles como resistentes (Boray, 1993,1997). En el estudio realizado por Boray (1997) se consiguió una buena eficacia en cepas resistentes de seis semanas al administrar de forma simultánea triclabendazol y clorsulón en una quinta parte de sus dosis recomendadas;

también al administrar closantel combinado con triclabendazol o clorsulón frente a parásitos resistentes al closantel. Recientemente, Martínez-Valladares et al. (2014) han confirmado la eficacia de hasta un 95% al combinar albendazol y clorsulón, a dosis terapéutica, frente a formas maduras e inmaduras de cepas resistentes a ambos fármacos. Por otra parte, fármacos como el nitroxinil pueden ser una de las alternativas terapéuticas frente a cepas resistentes al triclabendazol (Martínez-Valladares et al., 2010a).

En el caso de nematodos gastrointestinales, otras combinaciones como la administración conjunta de albendazol e ivermectina en cepas resistentes de nematodos resistentes (Entrocasso et al., 2008), o mebendazol y levamisol en *Haemonchus contortus* resistente (Bennet et al., 1980), han demostrado tener efectos aditivos y sinérgicos en el ganado ovino, respectivamente.

7.2.2. Inmunoprofilaxis

Como consecuencia de la aparición de las resistencias a los fármacos antihelmínticos y debido a la persistencia de sus residuos en el medio ambiente, así como en la carne y en la leche, se viene desarrollando la inmunoprofilaxis como alternativa al control de la fasciolosis (Dalton & Mulcahy, 2001).

Las estrategias vacunales se podrían agrupar en:

- **Inmunización pasiva por transferencia de suero inmune y linfocitos sensibilizados de animales infectados a sanos:** Corba et al. (1971) demostraron

una reducción significativa del número de parásitos en vacas tras la administración de este suero.

- **Vacunas irradiadas atenuadas:** comprobándose que la radiación ionizante reduce la patogenicidad de las formas parasitarias sin afectar su potencial antigénico (Dawes, 1964). Se han obtenido niveles de protección de hasta un 70% en bovinos (Nansen, 1975; Acosta et al., 1989) y de 56% en ratas (Armour & Dargie, 1974), pero escasos en ovejas y conejos (Hughes, 1962; Creaney et al., 1995). Sin embargo, en vacas y ovejas protegidas frente a *F. gigantica* mediante la inmunización con metacercarias irradiadas se consiguieron reducciones en la carga parasitaria del 98 y 80%, respectivamente (Bitakaramire, 1973; A'Gadir et al., 1987).
- **Estimulación de la resistencia por productos de excreción/secreción:** al sensibilizar al individuo con estos productos procedentes de vermes maduros no se han obtenido buenos resultados (Lehner & Sewell, 1979; Sandeman et al., 1980), aunque en algún caso, si procedían de vermes inmaduros sí que se ha comprobado su capacidad protectora en ratas y ratones (Chapman & Mitchell, 1982a).
- **Inmunización heteróloga:** mediante el empleo de vacunas que utilizan como antígeno vivo un agente diferente del que produce la enfermedad aunque presente factores antigénicos comunes al agente original. Antígenos purificados de *Fasciola*, debido a su reactividad cruzada con anticuerpos generados frente a *Schistosoma mansoni* (Hillyer, 1987), produjeron infertilidad en el parásito y una disminución de los vermes en animales infectados (Hillyer, 1995).
- **Vacunas con antígenos definidos:** consisten en copias del polipéptido completo o incompleto de los antígenos proteicos. Las proteínas son la opción elegida ya

que son fáciles de identificar, modificar y producir en forma recombinante en grandes cantidades de forma económica. Estas interactúan en el metabolismo del parásito pudiendo ser útiles para alterar sus funciones (Hein & Harrison, 2005). Algunos antígenos purificados que se detallan a continuación han mostrado tener potencial inmunoproliférico (McManus & Dalton, 2006):

1. *Proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)* que se encuentran en el tegumento del parásito funcionando como transportadores (Muro et al., 1997). *F. hepatica* es incapaz de sintetizar sus propios ácidos grasos por lo que emplea las FABP para obtenerlos del hospedador; según Smith & Zarlenga (2006), la inmunización con estas proteínas bloquearía este mecanismo. Las FABP nativas (nFh12) y recombinantes (rFh15) de *F. hepatica* fueron empleadas induciendo niveles significativos de protección de un 55% en vacas con nFh12 (Hillyer, 1987) o un 43% en ovejas con rFh15 (López-Aban et al., 2007).
2. *Glutación S transferasa (GST)*, isoenzimas involucradas en la detoxificación de compuestos tóxicos endógenos y localizadas en el intestino y tegumento del parásito (Smith & Zarlenga, 2006). Se ha comprobado que confieren una protección del 57% en ovejas (Sexton et al., 1990) y de un 19-69% en vacas (Morrison et al., 1996).
3. *Proteínas tipo saposina (SAPs)* que participan en la interacción con lípidos de membrana y son responsables de la lisis de eritrocitos en el intestino del parásito, primer paso necesario para que las proteasas puedan proceder a la degradación de la hemoglobina en su interior (Bruhn, 2005). En un estudio llevado a cabo en conejos por Espino & Hillyer (2004), hubo una reducción de la carga parasitaria del 81%.

4. *Hemoglobina de F. hepatica*, implicada en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los vermes, los cuales están en un ambiente anaerobio. En terneros, Dalton et al. (1996) demostraron una protección de un 43% y una disminución de huevos recogidos de un 60%.
5. *Proteasas* que están implicadas en la invasión, migración y alimentación, así como en la evasión del sistema inmune. Entre ellas se han descrito las cisteín proteasas donde se incluyen las catepsinas L y B (Carmona et al., 1994; Harmsen et al., 2004; Cancela et al., 2008). En vacas vacunadas con la catepsina L1, se redujeron los vermes de un 42 a un 69% (Dalton et al., 1996) y Piacenza et al. (1999) testaron L1 y L2 en ovino, con disminuciones del 33 y 34%, respectivamente. También se han descrito las leucinas aminopeptidasas, las cuales tienen un papel fundamental en la homeostasis celular, crecimiento y desarrollo del parásito (Matsui et al., 2006); Piacenza et al. (1999), demostraron una protección de hasta un 89% en oveja y algo menor, 78%, combinada con las catepsinas L1 y L2.

Como alternativa a las vacunas, existe la posibilidad del empleo de inmunomoduladores para modificar los mecanismos de defensa del hospedador y controlar los procesos parasitarios. La combinación de estos inmunomoduladores con los antígenos citados anteriormente van a estimular aún más la inmunidad protectora a través de la producción de anticuerpos y de linfocitos Th (Coffman et al., 2010). En la actualidad, Martínez-Pérez et al. (2013, 2014a) administraron el lipopolisácarido de *Ochrobactrum intermedium* como inmunomodulador tras una infección experimental en ovejas comprobando una reducción en la eliminación fecal de huevos, con valores al final del estudio de hasta 500 huevos de diferencia entre los grupos control y los tratados;

también se observó que los animales tratados presentaron un peso y condición, al igual que mejores niveles de glóbulos rojos, blancos, hemoglobina y hematocrito.

7.2.3. Nutrición

La nutrición del hospedador es muy importante en cualquier parasitosis, ya que una malnutrición provoca que todos los daños que guardan relación con el sistema inmunitario se vean incrementados (Carroll & Forsberg, 2007). Es por ello que la influencia de la nutrición en la relación entre parásito y hospedador se considera una medida a tener en cuenta para el control de la infección (Coop & Kyriazakis, 2001).

Como consecuencia de la enfermedad, existe una elevada demanda de nutrientes, fundamentalmente proteínas, para la reparación de los tejidos y para la síntesis de los componentes del plasma (Fox, 1997). Al igual que una dieta pobre en proteínas exacerba los síntomas de la enfermedad (Boray, 1969), las dietas ricas en proteínas pueden paliar las consecuencias de la fasciolosis (van Houtert & Sykes, 1996) y mejorar los parámetros sanguíneos (Coop & Holmes, 1996).

La eficacia de la suplementación proteica y la selección genética para mejorar la resistencia de las ovejas a la infección por los nematodos gastrointestinales, han sido estudiadas por diversos autores. Kahn et al. (2003) confirmaron que las proteínas administradas antes del parto favorecían el aumento del peso del animal y la disminución de la excreción de huevos. Por otra parte Bricarello et al. (2003), observaron que la administración de suplementos proteicos en corderos de razas resistentes como la raza Santa Innes aumentó la resistencia a *Haemonchus contortus* aunque en la raza Île de France, susceptible a la infección, la dieta proteica no mejoró la resistencia a la infección. También, Martínez-Valladares et al. (2005), compararon el

efecto de una dieta baja en proteínas en dos grupos de ovejas de la raza Churra, resistentes y susceptibles a *Teladorsagia circumcincta*, confirmando la influencia de la dieta con el desarrollo de la respuesta inmune.

Diversos estudios han confirmado que la adición de zinc a la ración evita los daños del estrés oxidativo existente en las infecciones por *Fasciola* spp. (Gabrashanska et al., 2008). Martínez-Pérez et al. (2014b), administraron dos dietas suplementadas con vitamina E y aceite de linaza a ovejas infectadas por *F. hepatica*, observando una disminución de la carga parasitaria y una menor oxidación lipídica en el hígado tras la administración de vitamina E y un menor tamaño de los parásitos, con altos niveles de células blancas, tras la administración de aceite de linaza.

7.2.4. Acción directa sobre el manejo de los hospedadores definitivos

El empleo de métodos a través de la gestión ganadera ha tenido interés, sobre todo antes de que se descubriera el primer tratamiento eficaz contra la fasciolosis. La recomendación más sencilla es mantener el rebaño lejos de las áreas donde están presentes las metacercarias mediante un cercado o directamente evitar todo contacto con estas zonas en los períodos de alto riesgo de infección. Además, un programa de rotación de pastos sería muy útil para reducir los riesgos (Rojo-Vázquez et al., 2012).

Una buena estrategia sería comenzar con un programa de desparasitación de las ovejas adultas al final de primavera y principios de verano con un fármaco eficaz frente a fasciolas adultas, seguido de la desparasitación en otoño de todo el rebaño frente a formas inmaduras y otro en invierno de todo el rebaño frente a ambas formas (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999; Rojo-Vázquez et al., 2012).

CAPÍTULO II

Objetivos

El objetivo general del presente proyecto de Tesis Doctoral ha sido desarrollar, aplicar y evaluar nuevos métodos de diagnóstico y control frente a la fasciolosis ovina.

Los objetivos parciales que se han pretendido han sido los siguientes:

- 1) Estudiar la variabilidad genética de diversas poblaciones mundiales de *F. hepatica* mediante el uso de la técnica de PCR de intersecuencias simples repetidas (Inter Simple Sequence Repeat-PCR, ISSR-PCR) con la finalidad de conocer la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional.
- 2) Mejorar el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* mediante la puesta a punto de técnicas de biología molecular como la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR), basada en la amplificación del gen que codifica para el espaciador interno transcrito 2 (ITS2) del ADN ribosomal. La sensibilidad de la técnica se comparó con otras tres técnicas de diagnóstico de fasciolosis tales como la reducción fecal de huevos en heces (FECRT) y la detección del coproantígeno mediante un ELISA sándwich.
- 3) Emplear la PCR anteriormente descrita para la detección de resistencias antihelmínticas en rebaños de ovejas infectados de forma natural por *F. hepatica*.
- 4) Desarrollar una técnica *in vitro* como es el ensayo de eclosión de huevos (egg hatch assay, EHA), para la detección de resistencias antihelmínticas al albendazol y triclabendazol en diferentes cepas de *F. hepatica*.

CAPÍTULO III

Publicaciones

Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR.



D. Robles-Pérez, P. García-García, J.M. Martínez-Pérez, F.A. Rojo-Vázquez y M. Martínez-Valladares.

Departamento de Sanidad Animal (Parasitología y Enfermedades Parasitarias), Facultad de Veterinaria de León; Departamento de Biología Molecular (Área de Genética), Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de León; Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

***Parasitology* 2014, 142(4):527-533.**

Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR

D. ROBLES-PÉREZ¹, P. GARCÍA-GARCÍA², J. M. MARTÍNEZ-PÉREZ¹,
F. A. ROJO-VÁZQUEZ^{1,3} and M. MARTÍNEZ-VALLADARES^{2*}

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain

² Faculty of Biological and Environmental Sciences, University of León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain

³ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León, Spain

(Received 5 June 2014; revised 25 July 2014; accepted 21 August 2014)

SUMMARY

Inter-simple sequence repeats markers were used to determinate the genetic variability of *Fasciola hepatica* populations recovered from sheep and cattle from Spain (Sp1, Sp2, Sp3 and Sp4), UK (Eng), Ireland (Ir) and Mexico (Mex). Twenty five primers were tested but only five produced 39 reproducible bands, being 71·79% polymorphic bands. This percentage ranged from 10·26% in Sp4 to 48·72% in Sp1, and per host between 28·21 and 48·72% in sheep and between 10·26 and 38·46% in cattle. This relatively low range of genetic diversity within populations, with a mean of 34·40%, implies that a large proportion of variation resided among populations. The population differentiation ($G_{ST} = 0·547$) indicated that 54·7% of variation is due to differences between populations and 45·3% due to differences within population. The Nei's distance ranged between 0·091 and 0·230 in sheep and between 0·150 and 0·337 in cattle. The genetic relationships between populations and individuals were shown by a UPGMA dendrogram and a principal coordinate analysis; both grouped all populations separately from Sp4, a population of from the Midwest of Spain with the lowest level of diversity. Small genetic distances were observed between Eng and Ir, on the one hand, and Sp1, Sp2, Sp3, from the Northwest of Spain, together with Mex, on the other.

Key words: *Fasciola hepatica*, ISSR-PCR, genetic variability, polymorphism, population genetic structure.

INTRODUCTION

Fasciolosis is a worldwide distributed parasitic disease affecting a wide range of mammalian species, mainly ruminants, but also humans. In animals it causes significant reductions in productive parameters such as a decrease of body weight, milk production and liver condemnation at abattoirs. The causative agent, *Fasciola hepatica*, is a helminth parasite which can be found infecting animals in many countries throughout Europe, America and Oceania. In Africa and Asia *F. hepatica* overlaps with the species *Fasciola gigantica*. The prevalence of fasciolosis is increasing in certain parts of the world due to different causes such as climate change (Rojo-Vázquez *et al.* 2012) and/or man-made environmental modifications (Martínez-Valladares *et al.* 2013b).

The knowledge of the amount of the genetic variability is of crucial importance because since Darwin it is known that evolution and adaptation depends on the existence of heritable variability within a species to generate the differences between ancestral and descendant populations (Charlesworth and Charlesworth, 2009). On the other hand, the

distribution of the genetic diversity into and between populations allow us to infer the level of genetic flow, the effective population size, the mating system or the inbreeding level, among other characteristics (Allendorf *et al.* 2013). These data can be used to construct models in order to predict the infection capacity of specific genotypes (Vázquez-Prieto *et al.* 2014). Therefore, the study of genetic variability of strains infecting the farm animals is essential to improve the understanding of parasite epidemiology and the control disease.

Up to date, several methods have been carried out to characterize genetically *F. hepatica* and determine its variability. Among them, Semyanova *et al.* (2003) have described the random amplified polymorphic DNA (RAPD), which is based on the use of a single oligonucleotide with an arbitrary sequence that hybridizes with DNA; however, this technique has low specificity and reproducibility. Also Walker *et al.* (2007) used restriction fragment length polymorphisms (RFLP) to determine the genetic variability of different isolates of *F. hepatica*. There are different studies in which other techniques were described such as polymerase chain reaction (PCR) amplification of simple sequence repeat (SSR) (Hurtrez-Bousses *et al.* 2004), detection of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Alasaad *et al.* 2008; Li *et al.* 2009), use of allozyme markers (Vázquez-Prieto *et al.* 2011) or sequence analysis of

* Corresponding author: Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León, Spain.
E-mail mmarva@unileon.es



Fig. 1. Locations of different populations of *F. hepatica*. 1: Sp1. 2: Sp2. 3: Sp3. 4: Sp4. 5: Eng. 6: Ir. 7: Mex.

genomic and mitochondrial gene markers (Teofanova *et al.* 2011; Farjallah *et al.* 2013; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez 2014).

Alternatively, Zietkiewicz *et al.* (1994) developed a PCR based on the amplification of inter-microsatellites markers. Inter-simple sequence repeats (ISSRs) are a type of DNA marker which involves the use of microsatellite sequences, repetition of a di-, tri- or tetranucleotide, as primers in the PCR (Gupta *et al.* 1994; Zietkiewicz *et al.* 1994). The resulting bands are sequences of genome between two identical microsatellite primers with an opposite orientation on the DNA strand (Zietkiewicz *et al.* 1994). The ISSR technique is known to generate a large number of polymorphic bands. Moreover, this technique overcomes the technical limitations of RFLP and RAPD.

ISSR-PCR has already been used for others authors to study the genetic variability in parasites such as *Trichinella* (Fonseca-Salamanca *et al.* 2006), *Trypanosoma evansi* (Njiru *et al.* 2007) and *Schistosoma japonicum* (Zhao *et al.* 2009). However, the present study is the first report that uses this technique to study the genetic variation of different populations of *F. hepatica* from different geographical locations.

MATERIALS AND METHODS

Fasciola hepatica populations and DNA extraction

A total of 40 *F. hepatica* adults were collected from the livers of infected hosts belonging to the following geographical locations (Fig. 1): Sp1 (Torale de los Guzmanes, León; Spain), Sp2 (Torina, León;

Spain), Sp3 (La Coruña; Spain), Sp4 (Cáceres; Spain), Eng (Shrewsbury/South Gloucester strain, Ridgeway Research Ltd Company; UK), Ir (Ireland) and Mex (México). The number of adults used per location is shown in Table 1. Individual flukes were washed extensively in physiological saline, identified morphologically to genus and species according to existing keys and descriptions (Yamaguti, 1958).

Total genomic DNA was extracted from a single piece of adult using the commercial kit SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit (*Biotools*). DNA samples were resuspended in 60 μ L of buffer BBE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) and stored at -20°C until use.

ISSR-PCR amplification

For ISSR-PCR analysis, 25 primers randomly selected from the University of British Columbia primer set #9 (UBC) (Table 2) were screened using seven pools of DNA from each population. Only the five primers which produced clear and reproducible bands (UBC846, UBC848, UBC855, UBC856 and UBC881) were selected (Fig. 2). Then, the ISSR-PCR was carried out with all individual samples of each population and with the five selected primers to construct a matrix in function of the presence or absence of bands.

The reaction mixture (20 μ L) contained 0.4 μ L Taq polymerase, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP's), 1.5 μ M buffer+MgCl₂, 0.5 μ M primers and 1 μ L DNA diluted ten times of each individual of each population. The thermocycler used (Bio-Rad) was set to 2 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles each of 30 s at 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s at annealing temperature indicated in Table 2 for each primer

Table 1. Number and percentage (%) of polymorphic bands (PB), number of alleles per locus (A), effective number of alleles per locus (Ae) and Nei's genetic diversity (H) per population

Isolate	Species	Number of adults	PB (%)	A	Ae	H
Sp1	Sheep	7	19 (48.72%)	1.487±0.506	1.273±0.355	0.163±0.193
Sp2	Sheep	7	18 (46.15%)	1.462±0.505	1.315±0.403	0.177±0.213
Sp3	Cow	5	11 (28.21%)	1.282±0.456	1.217±0.371	0.120±0.199
Sp4	Cow	5	4 (10.26%)	1.102±0.307	1.040±0.128	0.028±0.087
Eng	Sheep	6	11 (28.21%)	1.282±0.456	1.196±0.357	0.109±0.189
Ir	Cow	5	15 (38.46%)	1.385±0.493	1.241±0.355	0.140±0.194
Mex	Cow	5	12 (30.77%)	1.308±0.468	1.196±0.335	0.114±0.185
Mean	-	-	12.9 (34.40%)	1.330±0.456	1.211±0.329	0.122±0.180

Table 2. Primers randomly selected from UBC (University of British Columbia) primer set #9

Primer name	Sequence 5' - 3'	T _m (°C)
UBC801	ATATATATATATATATT	20
UBC803	ATATATATATATATATC	20
UBC805	TATATATATATATATAC	20
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	40
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	40
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	46
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	49.1
UBC825	ACACACACACACACACT	49.1
UBC826	ACACACACACACACACC	53
UBC827	ACACACACACACACACG	53.7
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	50
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	40
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	40
UBC846	CACACACACACACACART	53
UBC847	CACACACACACACACARC	46
UBC848	CACACACACACACACARG	50
UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	53.7
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	50
UBC855	ACACACACACACACACYT	59.1
UBC856	ACACACACACACACACYA	50
UBC857	ACACACACACACACACYG	56.7
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	59.1
UBC871	TATTATTATTATTATTAT	30
UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	63
UBC900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	63

In bold letters, the primers selected for the study. Y=C/T. R=A/G.

and 90 s at 72 °C and finally an extension step at 72 °C for 10 min. The amplification products were analysed by electrophoresis in 1.5% agarose TBE (Tris base, boric acid and EDTA) gel, stained with GelRed and visualized by 'Image Lab' statistical software (Bio-Rad) to determinate the reproducible bands in each individual.

All amplifications were carried out in triplicate with the aim to confirm the results.

Data analysis

A matrix was constructed from amplified fragments in function of the presence (1) or absence (0) of bands. The fragments showing differences among samples

were referred to as polymorphic bands (Li *et al.* 2009). By the software POPGENE (1.32) (Yeh *et al.* 1997) several variability parameters were estimated, such as the number and percentage of polymorphic bands, the number of alleles per locus (A), the effective number of alleles per locus (Ae), the Nei's genetic diversity (H), the total genetic diversity (Ht), the intrapopulation genetic variability (Hs) and the interpopulation differentiation (Gst). For the analysis of interpopulation relationships, Nei's distances were calculated and the resulting matrix was used to construct a dendrogram by UPGMA cluster analysis. Also, a bootstrap analysis (using 1000 replicates) was carried out by Phylip software package v3.69 (Felsenstein 2005) to confirm the robustness of the results. In order to visualize the genetic relationships among all samples, the Jaccard similarity index was estimated between all pairs, and a principal coordinate analysis (PCA) was performed by means of GenAIEx 6.501 (Peakall and Smouse, 2012).

RESULTS

With the aim to determine the intra-specific variability of *F. hepatica*, five ISSR primers from UBC (UBC846, UBC848, UBC855, UBC856 and UBC881) were selected. These primers generated 13, 6, 5, 7 and 8 bands, respectively, 39 in total (average of 7.8 bands per primer), ranging from approximately 200 to 1000 bp (Fig. 2). Of these, 28 were polymorphic bands (71.79%) considering all the parasite populations. Per location, the number and percentage of polymorphic bands ranged from 10.26% in Sp4 to 48.72% in Sp1. Other parameters related with the variability within populations (A, Ae and H) are shown in Table 1.

The structure of variability among the studied adults from different populations was estimated by the parameters Ht, Hs and Gst (total, intrapopulations and interpopulations variability, respectively). The results were: Ht = 0.267, Hs = 0.121 and Gst = 0.547.

Data generated from ISSR-PCR, in function of the presence (1) or absence (0) of bands, resulted in

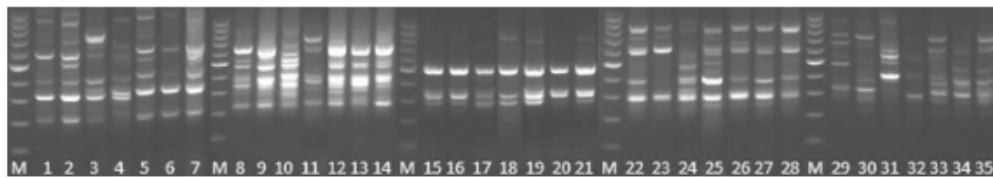


Fig. 2. ISSR-PCR with the selected primers. UBC846 (lanes: 1–7), UBC848 (lanes: 8–14), UBC855 (lanes: 15–21), UBC856 (lanes: 22–28) and UBC881 (lanes: 29–35). For each primer, seven pools of DNA from each location were used in the following order: Sp1, Sp2, Eng, Sp4, Sp3, Ir and Mex. M, marker.

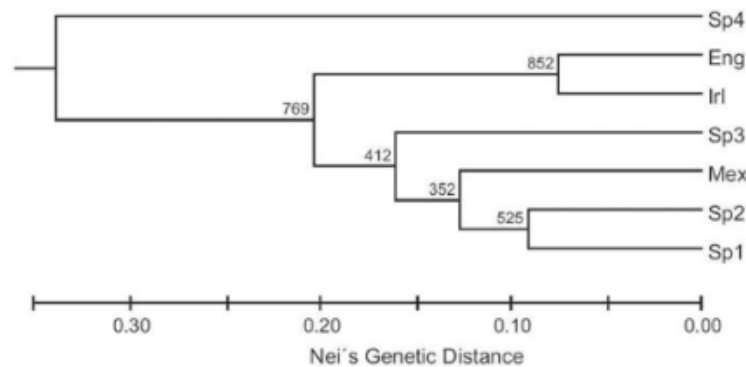


Fig. 3. Dendrogram constructed by the unweighted pair group method analysis (UPGMA), showing the genetic relation between the populations of the study. The numbers next to the nodes indicate the bootstrap values using 1000 replicates.

a matrix of Nei's genetic distances. This was used to construct the UPGMA dendrogram (Fig. 3). According to the dendrogram, the adults from the Midwest of Spain (Sp4) were clearly different from the rest of samples. Within the cluster where most of the populations were present, small genetic distances were observed between some geographically close populations, Eng and Ir, on the one hand, and Sp1, Sp2, Sp3, from the Northwest of Spain, jointly with Mex, on the other (Fig. 3). We also analysed the Nei's distance taking into account the host of each sample, and this case the values ranged from 0.091 to 0.230 in sheep and from 0.150 to 0.337 in cattle.

Additionally, the genetic relationships between all *F. hepatica* adults were determined by a PCA after calculating the Jaccard similarity index. As it is shown in Fig. 4, all adults from Sp4 were situated separately in a different group. Moreover, there is no differentiation between the adults from the populations Sp1, Sp2, Sp3 and Mex.

DISCUSSION

The ISSR-PCR has been described as an alternative for polymorphism studies (Zietkiewicz *et al.* 1994). When ISSR markers are compared to others of similar characteristics, such as RAPDs or SRAPs, some advantages are noticeable. Thus, RAPDs reproducibility is considered poor, and they need a

significant laboratory work to standardize protocols in order to obtain reliable results (Teofanova *et al.* 2012), while ISSRs are quite reproducible due to the use of longer primers allowing for higher annealing temperatures than those of RAPDs (Kojima *et al.* 1998). On the other hand, SRAPs show less polymorphism than ISSRs due to the fact that SRAPs focus on genic regions. To detect as much genetic variability as possible, SRAPs are usually analysed in denaturing acrylamide gels, and in many cases the resulting banding pattern is very complex and difficult to score (Alasaad *et al.* 2008; Li *et al.* 2009).

In this study we have used the ISSR-PCR technique for the first time in order to estimate the genetic diversity of *F. hepatica* adults from different geographical locations. The importance of population genetic structure studies lies in achieving an efficient management of the parasitic disease, specially nowadays, when the prevalence of the infection by *F. hepatica* is increasing in certain parts of the world (Rojo-Vázquez *et al.* 2012; Martínez-Valladares *et al.* 2013b) and resistant isolates to anthelmintics are appearing in different countries (Moll *et al.* 2000; Mooney *et al.* 2009; Martínez-Valladares *et al.* 2010, 2013a; Olaechea *et al.* 2011).

After carrying out the ISSR-PCR in 40 adult specimens from seven different locations, some parameters related with the genetic variability within each isolate have been calculated. In this case,

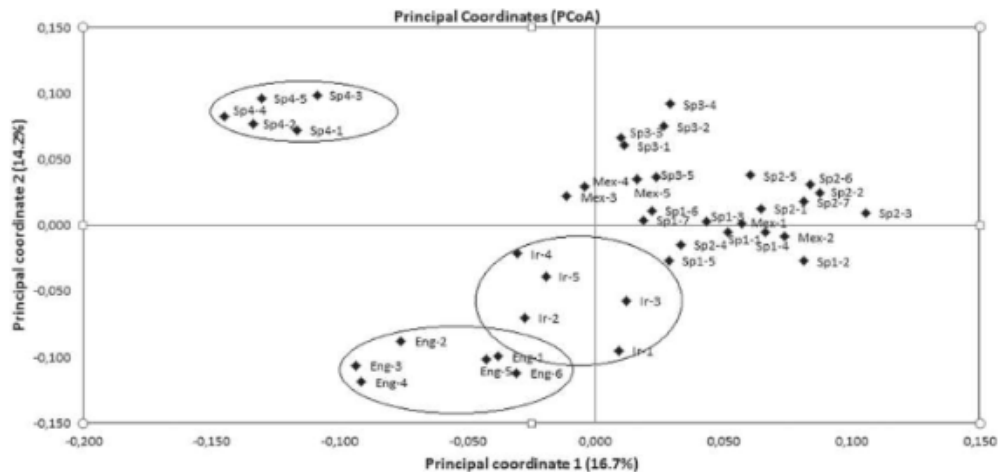


Fig. 4. PCA plot (PC1 vs PC2) based on the Jaccard similarity index among all samples.

the total number of polymorphic bands reported in the present study was high (71.79%), meaning that this technique can yield a significant number of polymorphic markers that can be useful in *Fasciola* population studies. However, when individual populations are considered, the level of polymorphic bands is quite lower, ranging between 10.26% in Sp4 and 48.72% in Sp1. This relatively low range of genetic diversity within populations, with a mean of 34.40%, implies that a large proportion of variation resided among populations. Similar results were published by Zhao *et al.* (2009) when the ISSR-PCR was used to study the genetic variability of three populations of *S. japonicum* and found a total of 74.77% of polymorphic bands, ranging from 19.63 to 64.49%. However, when these authors compared two different species, *S. japonicum* and *S. mansoni*, the total percentage of polymorphic bands was significantly higher, 98.13%. On the other hand, the value of A, or the number of alleles per locus, was also the highest in Sp1 and the lowest in Sp4. The value of Ae considers not only the real number of alleles in the populations (A), but also whether they present an even distribution. When A and Ae present the same values, the population has reached the maximum genetic variability (heterozygosity) taking into account its allelic diversity. In this study, all populations showed values of Ae lower than A, which indicates that the populations have not reached the maximum variability possible because one of the alleles was more frequent than the other in the polymorphic loci. According to all these parameters, Sp4 presents the lowest level of diversity. No individuals with repeated multilocus genotypes were found in any population, thus there was no need to consider the presence of clones and the effects they have on the genetic variability parameters.

In our study, the population differentiation or G_{st} was 0.547, indicating that 54.7% of the genetic variation is due to differences between populations vs to 45.3%, due to differences between individuals in each population. This result points out a high level of genetic structuration, which is also reflected in the values of Nei's genetic distances, ranging from 0.091 to 0.337. The population Sp4 is the main contributor to the high value of population differentiation because of its unique characteristics; when the analysis was carried out excluding this population, the G_{st} value lowers to 0.308.

In any case, this result contrasts with that obtained by Vázquez-Prieto *et al.* (2011), which studying three Spanish populations from cattle using allozyme markers, reported a level of population differentiation of 0.006, and a range of Nei's genetic distances between 0.003 and 0.010. A low level of population differentiation (0.078) was also found by Morozova *et al.* (2002) using RAPDs markers. These important differences between studies could be due to the fact that the samples of the study carried out by Vázquez-Prieto *et al.* (2011) were collected within a specific region of the Northwest of Spain (Galicia), and all the samples of Morozova *et al.* (2002) were isolated from the same Ukrainian cattle population.

On the other hand, Vilas *et al.* (2012) also studied *F. hepatica* populations from cattle and sheep in this same region of Spain (Galicia), than Vázquez-Prieto *et al.* (2011), although in this case sampling a higher number of populations and using allozyme and microsatellite markers at the same time. The range of variation of Nei's genetic distance calculated between populations was 0.023–0.094 in cattle and 0.033–0.156 in sheep and the F_{st} (equivalent to G_{st}) values were 0.087 and 0.170 for cattle and sheep, respectively. These authors suggested that parasites

of sheep appear to show significantly more structured variation at the intrapopulation level. However, the range of Nei's distance found in our study for sheep (0.091–0.230) was lower than for cattle (0.150–0.337), between 0.091 and 0.230, showing less structured variation. In addition, in their study the expected heterozygosity (H) was 0.411 and 0.360 on average in cattle and sheep, respectively, while in our study, it ranged between 0.109 and 0.177 (excluding Sp4). The higher level of genetic diversity in the study of Vilas *et al.* (2012) can be mainly attributed to the fact that the analysed markers cannot be considered as a random sample of loci: firstly, the chosen isozymatic loci were those previously known as polymorphic in their populations, and secondly, they used microsatellite markers which usually are highly polymorphic detecting many alleles per locus; whereas the ISSR-PCR detected two alleles based on the presence or absence of band, and all the loci were scored, whether or not polymorphic.

Using SRAP markers, Alasaad *et al.* (2008) studied the *F. hepatica* genetic variability by analysing Spanish samples from several different hosts and geographical localities and described a low level of genetic variation in *F. hepatica*. This observation may be because the SRAP markers target sequences belonged to coding regions of the genome and these regions have lower mutation rates due to their functional constraints (Crow, 2000). The authors also related this observation to the cycle of *Fasciola* spp., which would act against speciation processes, decreasing at the same time their genetic variability and allowing the infection for new host species (Varela-Del Río *et al.* 2007). Supporting this hypothesis, Alasaad *et al.* (2008) could not find any association between *F. hepatica* genetic characteristics and their hosts and/or region.

In the present study, both UPGMA (Fig. 3) and PCA analysis (Fig. 4) grouped populations into similar clusters, which showed a fair accordance. Both methods showed a clear genetic differentiation of Sp4, and a clustering of the samples related to their geographical origin. Thus, the three samples from the North West of Spain (Sp1, Sp2 and Sp3), and those from Ireland (Ir) and Great Britain (Eng) cluster in the same groups. The genetic relationships between samples from Sp1, Sp2 and Sp3 are less clear, as can be inferred from the low bootstrap values of the groups shown in Fig. 3 (a method to establish the robustness of the clusters), and from PCA analysis (Fig. 4) that showed intermixed some of the samples from this populations. Similarly to Alasaad *et al.* (2008), but in contrast with Vilas *et al.* (2012), no association between *F. hepatica* genetic characteristics and their hosts have been found in this study.

From the grouping analysis, the position of two populations, Sp4 and Mex, deserves further comments. There are several reasons that could explain

the fact that the samples from Sp4 are genetically different from the rest of the Spanish populations. Regarding the strain Sp4 located in Cáceres (in the Midwest of Spain), it is possible that the strain had entered into Spain from the North of Africa during the period of Moorish rule with infected cattle. We are aware of the native Spanish population of cows that have African origin (Beja-Pereira *et al.* 2006), as it is confirmed by mitochondrial studies. On the other hand, the genetic differentiation of Sp4 can be associated with a reproductive isolation of the strain due to the low density of the parasites in that area, restricting the possibilities of exchanging genetic material with other strains.

On the other hand, the results of the PCA show that there is no differentiation between the adults from Sp1, Sp2, Sp3 and Mex, in agreement with the low bootstrap values calculated in the UPGMA analysis between the Spanish and Mexican populations. This similarity between samples from different locations can be explained by a common origin, since cattle and sheep were repeatedly introduced in America during the colonization leading to a rapid spreading of the parasite from Spain to Mexico by means of infected animals.

Concluding remarks

In the present study, we have used for the first time the ISSR-PCR to study the genetic diversity of *F. hepatica* populations from different countries – Spain, UK, Ireland and Mexico. This technique provided us with a high number of polymorphic markers and showed that the genetic diversity is structured, being the intrapopulation variability at the same level that the interpopulation differentiation. All populations grouped separately from one population from de Midwest of Spain. Within the cluster where most of the adults are present, small genetic distances were observed between some geographically close populations, UK and Ireland, on the one hand, and the rest populations from Spain and Mexico, on the other.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Manga-González (Instituto de Ganadería de Montaña de León, Spain) her collaboration for collecting the samples, and especially Dr Quiroz-Romero (National Autonomous University of Mexico, Mexico), Dr McCarthy (University College Dublin, Ireland), Dr Paz-Silva (University of Santiago de Compostela, Spain) and Dr Valcárcel (CISA, Spain) for providing the *F. hepatica* adults.

FINANCIAL SUPPORT

This study has been funded by the national project INIA-MEC, 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

- Alasaad, S., Li, Q. Y., Lin, R. Q., Martín-Atance, P., Granados, J. E., Díez-Baños, P., Pérez, J. M. and Zhu, X. Q. (2008). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitology Research* 103, 181–186.
- Allendorf, F. W., Luikart, G. and Aitken, S. N. (2013). *Conservation and the Genetics of Populations*, 2nd Edn. Wiley-Blackwell, UK.
- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Laluzza, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Sampietro, L., Casoli, A., Goyache, F., Royo, L. J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Ouragh, L., Magid, A., Atash, A., Boscato, P., Triantophyllidis, C., Ploumi, K., Sineo, L., Mallegni, F., Taberlet, P., Erhardt, G., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Luikart, G. and Bertorelle, G. (2006). The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, S113–S118.
- Charlesworth, B. and Charlesworth, D. (2009). Darwin and genetics. *Genetics* 183, 757–766.
- Crow, J. F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Reviews Genetics* 1, 40–47.
- Farjallah, S., Slimane, B. B., Piras, C. M., Amor, N., Garippa, G. and Merella, P. (2013). Molecular characterization of *Fasciola hepatica* from Sardinia based on sequence analysis of genomic and mitochondrial gene markers. *Experimental Parasitology* 135, 471–478.
- Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fonseca-Salamanca, F., Nogal-Ruiz, J. J., Benito, C., Camachot, M. V. and Martínez-Fernández, A. R. (2006). Molecular characterization of *Trichinella* genotypes by intersimple sequence repeat polymerase chain reaction (ISSR-PCR). *Journal of Parasitology* 92, 606–610.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J. and Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 998–1006.
- Hurtrez-Bousses, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guegan, J. F., Meunier, C., Bargues, M. D., Mas-Coma, S. and Renaud, F. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Molecular Ecology Notes* 4, 689–690.
- Kojima, T., Nagaoka, T., Noda, K. and Ogihara, Y. (1998). Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 37–45.
- Li, Q. Y., Dong, S. J., Zhang, W. Y., Lin, R. Q., Wang, C. R., Qian, D. X., Lun, Z. R., Song, H. Q. and Zhu, X. Q. (2009). Sequence-related amplified polymorphism, an effective molecular approach for studying genetic variation in *Fasciola* spp. of human and animal health significance. *Electrophoresis* 30, 403–409.
- Martínez-Valladares, M. and Rojo-Vázquez, F. A. (2014). Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitology Research* 113, 2733–2741.
- Martínez-Valladares, M., Famularo, M. R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C. and 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., Cordero-Pérez, C. and Rojo-Vázquez, F. A. (2013a). Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Experimental Parasitology* 6, 59–62.
- 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. and Rojo-Vázquez, F. A. (2013b). 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 and Vectors* 27, 282–290.
- Moll, L., Gaasenbeek, C. P., Vellema, P. and Borgsteede, F. H. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 91, 153–158.
- Morozova, E. V., Ryskov, A. P. and Semyenova, S. K. (2002). RAPD variation in two trematode species (*Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*) from a single cattle population. *Genetika* 38, 1155–1162.
- Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J. P., Mulcahy, G. and de Waal, T. (2009). The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in west of Ireland. *Veterinary Parasitology* 164, 201–205.
- Njiru, Z. K., Constantine, C. C., Gitonga, P. K., Thompson, R. C. and Reid, S. A. (2007). Genetic variability of *Trypanosoma evansi* isolates detected by inter-simple sequence repeat anchored-PCR and microsatellites. *Veterinary Parasitology* 147, 51–60.
- Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F. and Cabrera, R. (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology* 178, 364–366.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.
- Rojo-Vázquez, F. A., Meana, A., Valcárcel, F. and Martínez-Valladares, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 30, 15–38.
- Semyenova, S. K., Morozova, E. V., Chrisanfova, G. G., Asatrian, A. M., Movsessian, S. O. and Ryskov, A. P. (2003). RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica* 48, 1230–1231.
- Teofanova, D., Kantzoura, V., Walker, S., Radoslavov, G., Hristov, P., Theodoropoulos, G., Bankov, I. and Trudgett, A. (2011). Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 109–115.
- Teofanova, D., Hristov, P., Yoveva, A. and Radoslavov, G. (2012). Issues associated with genetic diversity studies of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea, Fasciolidae). In *Genetic Diversity in Microorganisms* (ed. Csikán, M.) ISBN: 978-952-51-0064-5, InTech, doi: 10.57772/34038. Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-microorganisms/issues-associated-with-genetic-diversity-studies-of-the-live-fluke-fasciola-hepatica-platyhelminthes>.
- Vara-Del Río, M. P., Villa, H., Martínez-Valladares, M. and Rojo-Vázquez, F. A. (2007). Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitology Research* 101, 1003–1006.
- Vázquez-Prieto, S., Vilas, S., Mezo, M., González-Warleta, M., Ubeira, F. M. and Paniagua, E. (2011). Allozyme markers suitable for population genetic analysis of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 176, 84–88.
- Vázquez-Prieto, S., González-Díaz, H., Paniagua, E., Vilas, R. and Ubeira, F. M. (2014). A QSPR-like model for multilocus genotype networks of *Fasciola hepatica* in Northwest Spain. *Journal of Theoretical Biology* 344, 16–24.
- Vilas, R., Vázquez-Prieto, S. and Paniagua, E. (2012). Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 45–52.
- Walker, S. M., Prodšhl, P. A., Fletcher, H. L., Hanna, R. E. B., Kantzoura, V., Hoey, E. M. and Trudgett, A. (2007). Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infestations from cattle and sheep. *Parasitology Research* 101, 117–125.
- Yamaguti, S. (1958). *Systema Helminthum, the Digestive Trematodes of Vertebrates*, Vol. I. Interscience Publishers, New York, USA.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T., Ye, Z. H. and Mao, J. X. (1997). *POPGENE, the User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Zhao, G. H., Li, J., Zou, F. C., Mo, X. H., Yuan, Z. G., Lin, R. Q., Weng, Y. B. and Zhu, X. Q. (2009). ISSR, an effective molecular approach for studying genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different provinces in mainland China. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 903–907.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.

**The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by
means of aPCR and its application in the
detection of anthelminticresistance in sheep
flocks naturally infected.**



D. Robles-Pérez, J.M. Martínez-Pérez, F.A. Rojo-Vázquez y 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* 2013, 197 (1-2): 277-282.**



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



D. Robles-Pérez^a, J.M. Martínez-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 2013

Received in revised form 1 May 2013

Accepted 3 May 2013

Keywords:

Fasciola hepatica

Anthelmintic resistance

PCR

FECRT

CRT

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a PCR for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in feces of sheep based on the ribosomal internal transcribed spacer. Detection of infection was possible from the second week post-infection in experimentally infected sheep by amplification of a 292 bp fragment. This PCR was employed for the detection of anthelmintic resistance (AR) in naturally infected sheep flocks, and results were compared with techniques such as the fecal egg count reduction test (FECRT) and the copro-antigen reduction test (CRT). The FECRT was carried out in two flocks, Santillan de la Vega (SV) and Corullón (CR), with sheep treated with albendazole (ABZ), clorsulon (CL), or triclabendazole (TCBZ). Feces were collected from individuals on days 0, 7, 15, and 30 post-treatment (pt). The FECRT showed adult *F. hepatica* to be resistant to ABZ and CL in both flocks. All parasite stages in the SV flock were susceptible to TCBZ, while in the CR flock, adult flukes showed resistance and immature forms were susceptible to the treatment. To compare FECRT and the PCR results, we calculated the percent of positive sheep on day 1 pt. In both flocks, the percent positive sheep was consistently higher by PCR than by sedimentation, confirming that the PCR is a more sensitive method of diagnosing infection and therefore to detect the resistance in infected animals. The CRT was carried out in the SV flock using a sandwich ELISA kit. The percent of sheep found positive by PCR was higher than with ELISA. Comparison of FECRT, CRT, and PCR for the detection of AR showed PCR to be the most sensitive.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciolosis is a cosmopolitan helminthosis that is an important limiting factor in sheep and bovine production (Spithill and Dalton, 1998). The most significant economic losses are due to chronic disease with consequences such as weight loss, decrease in the conversion index, and reduction in milk production as well as liver condemnation.

Detection of *Fasciola hepatica* eggs in feces of sheep with suspected infection is only useful to identify chronic infections, since eggs appear in the feces only after the fluke reaches sexual maturity, at around 9 weeks of infection (Martínez-Valladares et al., 2010a), when liver damage has already occurred. The conventional method of identifying eggs is sedimentation, however, the sensitivity of this technique is estimated to be only 30% (Happich and Boray, 1969), leading to false negatives.

Another diagnostic method is the detection of specific antigens in feces by sandwich ELISA. Mezo et al. (2004) reported sensitivity of this test to be 100% in sheep and cattle, even when sheep were infected with only a single

* Corresponding author. Tel.: +34 987291338; fax: +34 987291304.
E-mail address: francisco.rojo@unileon.es (F.A. Rojo-Vázquez).

fluke. Moreover, through the detection of copro-antigen, diagnosis of the infection can be made earlier (Moustafa et al., 1998): about 1 week post-infection (pi) (Almazán et al., 2001) compared to 4–5 weeks pi with sedimentation (Rodríguez-Osorio et al., 1998; Flanagan et al., 2011; Martínez-Pérez et al., 2012). Molecular methods are highly sensitive for the diagnosis of diseases. Several authors have confirmed infection by parasites such as *Echinococcus* spp., *Toxocara* spp., and *F. hepatica* using PCR assay of feces (Bretagne et al., 1993; Dinkel et al., 1998; Martínez-Pérez et al., 2012).

In recent years, there has been a reported increase in the prevalence of anthelmintic resistance (AR) in *F. hepatica* due to the misuse of drugs for fluke control. Several cases have been described in Scotland (Mitchell et al., 1998), Wales (Thomas et al., 2000), Netherlands (Moll et al., 2000), Ireland (Mooney et al., 2009), Spain (Álvarez-Sánchez et al., 2006; Martínez-Valladares et al., 2010b), and Argentina (Olaechea et al., 2011). Anthelmintic resistance limits the use of many drugs for controlling infection.

In vivo and *in vitro* tests to reveal AR have been developed. The fecal egg count reduction test (FECRT) is an *in vivo* assessment based on reduction in the number of eggs in feces following anthelmintic treatment (Coles et al., 1992). The egg hatch test (EHT) was developed to detect, *in vitro*, AR to benzimidazoles (BZs) used against trichostrongylids, and recently Robles-Pérez et al. (unpublished data) have carried out EHT for the detection of AR to triclabendazole (TCBZ) and albendazole (ABZ) in *F. hepatica* isolates. Currently the detection of *F. hepatica* antigens in feces is being applied in infected sheep to detect AR to ABZ and TCBZ (Flanagan et al., 2011; Novobilský et al., 2012).

The primary goal of our study was to develop a PCR based on the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) for the detection of *F. hepatica* in sheep and to use this technique to detect AR in naturally infected sheep flocks. We compared the results to those of FECRT and the copro-antigen reduction test (CRT).

2. Materials and methods

2.1. Fecal DNA samples from experimentally infected sheep

DNA from pooled fecal samples of sheep experimentally infected with *F. hepatica* were used. The samples were collected from the initiation of infection until 8 weeks pi. Fecal DNA samples from two uninfected sheep and five sheep experimentally infected with gastrointestinal nematodes (GIN), three with *Teladorsagia circumcincta* and two with *Haemonchus contortus*, were also used in the analysis. All samples were those used by Martínez-Pérez et al. (2012).

2.2. Naturally infected sheep

Naturally infected sheep were randomly selected from two flocks with a history of fasciolosis. The flocks were located in Santillán de la Vega (SV) Province, Palencia, and Corullón (CR) Province of León, both located in the Autonomous Community of Castilla y León, Northwest Spain.

The predominant breeds of sheep were Assaf in SV and Churra in CR, reared for production of milk and meat, respectively. At both farms, flocks were grazed on irrigated pastures from 6 to 8 h per day. Both flocks contained grazing animals at the time of the study, and the most recent anthelmintic treatment had been carried out at least two months prior to the beginning of the study.

Infection by *F. hepatica* was confirmed in both flocks by analyzing four pools of fecal samples from 20 sheep selected at random via a coprological test. Feces were processed by sedimentation (MAFF, 1986) using a McMaster chamber (Thienpont et al., 1986). The farms were selected for the current study because sheep showed mean eggs per gram (epg) in feces greater than 45.

2.3. FECRT

To carry out the FECRT, sixty sheep were individually sampled to select those positive for *F. hepatica*. The selected sheep were separated into three groups to be treated with ABZ (Sinvermin[®]; 7.5 mg/kg), clorsulon (CL) (Ivomec-F[®]; 2 mg/kg), or TCBZ (Fasinex[®]; 10 mg/kg). Feces were collected on days 0, 7, 15, and 30 post-treatment (pt). The number of sheep per treatment group ranged from 7 to 9 sheep.

Individual feces samples were processed by sedimentation. The level of resistance present in each group and farm was determined with the following formula:

$$\% = \left[\frac{\text{mean epg day 0} - \text{mean epg day pt}}{\text{mean pg day 0}} \right] \times 100$$

According to the WAAVP guidelines for Trichostrongylidae (Coles et al., 1992), resistance can be confirmed when the percent fecal egg count reduction after treatment is lower than 90%. When the percent ranged from 90 to 95%, the flock was considered borderline between susceptibility and resistance, and, when higher than 95%, susceptible.

All values of epg in feces are expressed as the arithmetic mean with standard deviation.

2.4. DNA extraction and PCR

DNA extraction was carried out on 0.5 g of feces from each naturally infected sheep on days 0, 7, 15, and 30 pt.

The extraction of DNA from feces followed specifications of the commercial kit SpeedTools Tissue DNA Extraction Kit (Biotools). DNA samples were resuspended in 60 µL of buffer BBE and stored at –20 °C until use. To improve the quality of the DNA, samples were subjected to ethanol precipitation and finally resuspended in 40 µL of buffer.

PCR reaction was based on a 25 µL volume containing 12.5 µL of Taq DNA Polymerase Master Mix (2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs and 0.05 units/µL Ampliqon Taq polymerase), 0.5 µM specific primers (ITS2F: 5'-GTGCCAGATCTATGGCGTTT-3' and ITS2R: 5'-ACCGAGGTCAGGAAGACAGA-3') and 4 µL of DNA diluted ten times. Primers were based on the sequence GQ231547.1 of *F. hepatica* encoding the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2). The thermocycler used (Biorad) was set to 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles

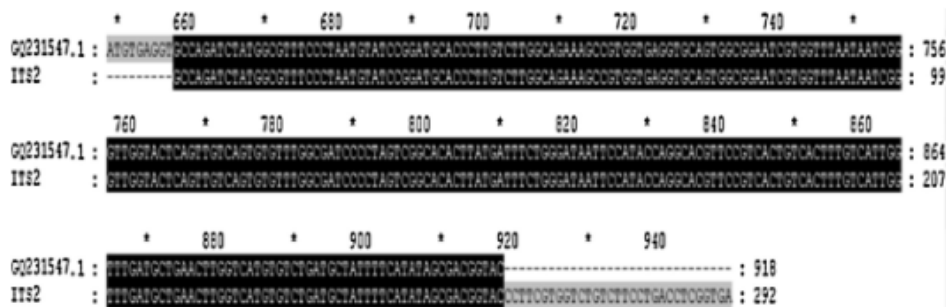


Fig. 1. Nucleotide sequence comparison between ribosomal internal transcribed spacer 2 (GQ231547.1) of *F. hepatica* and the 292 bp PCR product (ITS2).

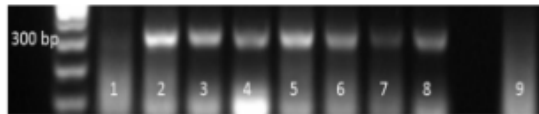


Fig. 2. PCR in a pool of fecal samples from experimentally infected assay. 1–8: samples from weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 post infection (pi); 9: negative.

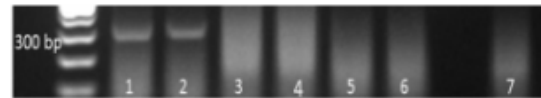


Fig. 3. PCR in a pool of fecal samples from experimentally infected sheep. 1–2: *F. hepatica* positive control; 3–4: individual samples from uninfected sheep; 5–6: individual sample from an infected sheep by *H. contortus* and *T. circumcincta*, respectively; 7: negative.

of 30 s at 95 °C, 30 s at 63 °C, and 45 s at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 10 min. A negative control was included. The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose TBE gel and stained with Gel Red. Then, the bands were excised, purified, and sent to the Laboratorio de Técnicas Instrumentales at the University of León to be sequenced.

2.5. Sandwich ELISA

The copro-antigen was measured in the naturally infected sheep from the SV flock on days 0, 7, 15, and 30 pt.

To measure the copro-antigen in fecal samples, 1 g of fresh feces from each sheep was added to 2 mL of PBS-Tween 20. Fecal eluates were stored 48 h at 4 °C and centrifuged for 10 min at 1000 × g. The supernatants were collected and stored at –20 °C until analysis. The specifications indicated by the Bio-X Bovine *F. hepatica* Antigenic ELISA Kit (BIO K 201) 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 analyzed in duplicate. The OD values are expressed as arithmetic mean and standard deviation.

3. Results

The diagnosis of an experimental infection by *F. hepatica* was carried out in weeks 1–8 pi by a PCR technique using specific primers for the amplification of a 292 bp fragment of the ribosomal ITS2 sequence. The PCR product identified showed 100% identity with the ITS2 of *F. hepatica* (GQ231547.1) (Fig. 1). The detection of *F. hepatica* infection was possible from the second week pi (Fig. 2).

To confirm the specificity of the technique, a PCR with fecal samples from uninfected sheep and from those experimentally infected with GINs, *T. circumcincta* and *H.*

contortus, was also carried out (Fig. 3). The absence of amplification product in these PCRs confirmed the specificity of the technique.

After developing a PCR to diagnose the infection, we used the technique to detect AR in naturally infected sheep. The PCR was carried out on fecal DNA samples of sheep on days 0, 7, 15, and 30 after the treatment with ABZ, CL, and TCBZ. The PCR products before and after anthelmintic treatment are shown in Figs. 4 and 5 for SV and CR flocks, respectively. We confirmed a reduction in the number of positive animals in both flocks throughout the study for all drugs, with all samples being negative on day 30 pt TCBZ.

The number of sheep positive by PCR, relative to the number of sheep analyzed, is shown in Table 1 as along with the percent positive for each day pt.

Results obtained by PCR for the diagnosis of AR were compared to those of other *in vivo* and *in vitro* techniques, FECRT and CRT. For FECRT, the percent reduction of eggs is shown in Table 2.

To confirm the results of PCR and FECRT, a sandwich ELISA was carried out in the SV flock to compare all techniques. The number of positive sheep each sampling day is shown in Table 1 and the mean OD value in Table 3. The day of treatment administration, the mean OD value was greater than 0.150 in all sheep and groups, confirming that all animals were infected. On days 7, 15, and 30 pt, the mean OD values were lower than 0.150 only after treatment with TCBZ.

When comparing the three diagnostic methods individually (Table 1), we observed that the most sensitive technique was PCR followed by ELISA and sedimentation.

4. Discussion

The development of sensitive, rapid, and precise techniques for routine diagnosis of infections in flocks is critical.

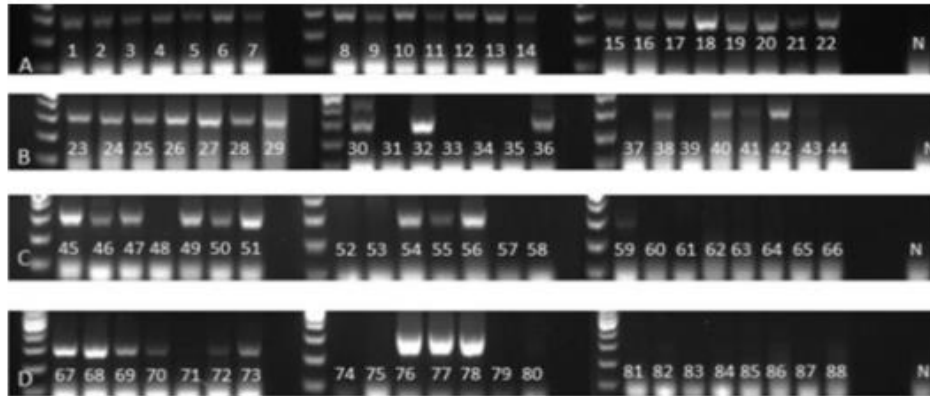


Fig. 4. PCR with fecal samples from SV. (A) (day 0) 1–7: treated with ABZ; 8–14: treated with CL; 15–22: treated with TCBZ. (B) (day 7) 23–29: treated with ABZ; 30–36: treated with CL; 37–44: treated with TCBZ. (C) (day 15) 45–51: treated with ABZ; 52–58: treated with CL; 59–66: treated with TCBZ. (D) (day 30) 67–73: treated with ABZ; 74–80: treated with CL; 81–88: treated with TCBZ; N: negative.

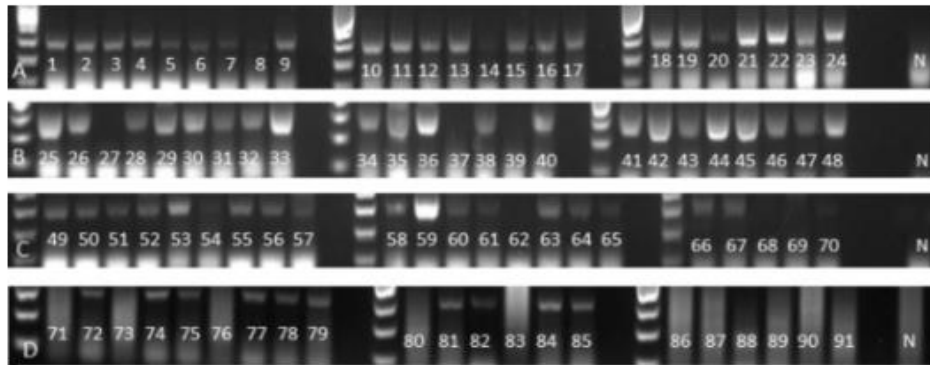


Fig. 5. PCR with fecal samples of CR. (A) (day 0) 1–9: treated with ABZ; 10–17: treated with CL; 18–24: treated with TCBZ. (B) (day 7) 25–33: treated with ABZ; 34–40: treated with CL; 41–48: treated with TCBZ. (C) (day 15) 49–57: treated with ABZ; 58–65: treated with CL; 66–70: treated with TCBZ. (D) (day 30) 71–79: treated with ABZ; 80–85: treated with CL; 86–91: treated with TCBZ; N: negative.

Table 1

Total number of animals infected by *F. hepatica* according to the total number of analyzed animals and its corresponding percent relative to day post treatment, technique employed, drug administered, and flock; SED: sedimentation.

Flock	Drug	Technique	Day post treatment				% positive animals		
			0	7	15	30	7	15	30
SV	ABZ	SED	7/7	4/7	6/7	3/7	57.1	85.7	42.9
		PCR	7/7	7/7	6/7	6/7	100	85.7	85.7
		ELISA	7/7	7/7	6/7	5/7	100	85.7	71.4
	CL	SED	7/7	3/7	2/7	2/7	42.9	28.6	28.6
		PCR	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9	42.9	42.9
		ELISA	7/7	3/7	3/7	3/7	42.9	42.9	42.9
	TCBZ	SED	8/8	1/8	0/8	0/8	12.5	0	0
		PCR	8/8	5/8	1/8	0/8	62.5	12.5	0
		ELISA	8/8	0/8	0/8	0/8	0	0	0
CR	ABZ	SED	9/9	4/9	5/9	2/9	44.4	55.6	22.2
		PCR	9/9	8/9	9/9	6/9	88.9	100	66.7
	CL	SED	8/8	2/7	4/8	1/6	28.6	50	16.7
		PCR	8/8	5/7	7/8	4/6	71.4	87.5	66.7
	TCBZ	SED	8/8	2/8	0/5	0/6	25	0	0
		PCR	7/7	8/8	2/5	0/6	100	40	0

Table 2
Number of *F. hepatica* eggs per gram in feces (\pm standard deviation) and fecal egg count reduction test (FECRT) relative to days post treatment, drug administered and flock.

Flock	Drug	Day post treatment				FECRT (%)		
		0	7	15	30	7	15	30
SV	ABZ	34.3 \pm 29.6	17.1 \pm 22.0	23.6 \pm 14.6	10.7 \pm 14.3	50.1	31.2	68.8
	CL	34.3 \pm 16.7	8.6 \pm 11.8	3.4 \pm 7.3	3.4 \pm 7.3	74.9	90.1	90.1
	TCBZ	84.4 \pm 58.3	3.8 \pm 10.7	0	0	95.5	100	100
CR	ABZ	30.0 \pm 21.2	10.0 \pm 13.0	10.0 \pm 10.6	5 \pm 10.6	66.6	66.6	83.3
	CL	35.6 \pm 40.9	4.3 \pm 7.3	7.5 \pm 8.0	2.5 \pm 6.1	88.8	77.7	94.4
	TCBZ	32.1 \pm 25.1	4 \pm 6.9	0	0	86.6	100	100

The first aim of this study was to develop a PCR technique for the diagnosis of fasciolosis in sheep and, further, to use this technique to detect the presence of AR in naturally infected flocks. The development of new diagnostic methods for the detection of AR, avoiding the sacrifice of animals, is important and necessary for animal welfare considerations.

We developed a PCR to detect the presence of *F. hepatica*, amplifying a 292 bp fragment of the ITS2 in sheep. The infection was detected at week 2 pi. We confirmed the specificity of the technique with DNA fecal samples from uninfected sheep and those infected with GIN. Results were in accordance with those of Martínez-Pérez et al. (2012) who detected the infection in feces from week 2 pi using Nested-PCR to amplify a 423 bp fragment of the cytochrome C oxidase 1 gene (Cox1). However, the PCR described in the present study is a less time consuming method than Nested-PCR. With coprological techniques, studies in experimentally infected sheep have reported detection later: at week 7 pi (Paz-Silva et al., 2002), between weeks 8 and 10 pi (O'Neill et al., 2000; Martínez-Valladares et al., 2010a), and after 10 weeks pi (Duménigo and Mezo, 1999).

The benzimidazole compound TCBZ is the only drug effective against both adult and immature flukes (Boray et al., 1983). Treatment with ABZ and CL is only effective against adult stages (McKellar and Scott, 1990; Geurden et al., 2012) having limited efficacy against immature flukes (Fairweather and Boray, 1999). With FECRT, in both the SV and CR flocks, adult flukes showed resistance to ABZ and CL on day 7 pt. Eggs detected on days 15 and 30 pt had likely been produced by resistant adults and immature flukes that had reached the mature stage. With respect to TCBZ, in the SV flock the reduction of eggs was higher than 95% on the sampling days, indicating that all parasite stages were susceptible to the drug. However, in the CR flock resistance to TCBZ was shown in adult flukes on day 7 pt. Since the egg in feces in both flocks at the beginning of the assay was only approximately 30 epg for most of the groups, we confirmed the infection by other techniques.

To compare the FECRT and the PCR results, we calculated the percent of positive animals each sampling day. In both flocks, the percent of positive sheep was consistently higher by PCR than by sedimentation, confirming that PCR is a more sensitive method of diagnosis and, therefore, of detecting resistance in infected animals. Dinkel et al.

Table 3
Mean optical density (\pm standard deviation) relative to days post treatment and drug administered in the SV flock.

Drug	Day post treatment			
	0	7	15	30
ABZ	1.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.6	0.9 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5
CL	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.4
TCBZ	0.9 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01

(1998), in a study of foxes infected with *Echinococcus multilocularis*, also discarded coprological techniques and opted for coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. The results obtained in our study indicate that FECRT is not able to accurately detect the level of AR due to low sensitivity of the coprological techniques.

Use of the commercial kit Bio X Diagnostics makes detection of *F. hepatica* coproantigen in feces possible 4–5 and 2 weeks earlier than using egg detection in experimental *F. hepatica* and *Fasciola gigantica* sheep infections, respectively (Valero et al., 2009). This method has also been employed by other authors (Flanagan et al., 2011; Gordon et al., 2012) to detect the presence of AR in infected animals. Flanagan et al. (2011) defined the absence of coproantigens in collected fecal samples at 14 day pt as successful treatment. In the current study, comparing the percent positive animals with PCR and sandwich ELISA, in flock SV, after treatment with ABZ, the percent of positive animals was the same, although slightly higher on day 30 pt by PCR. After the administration of CL, all percentages were the same (42.9%) by both techniques. With TCBZ, the percent of positive sheep was higher by PCR on days 7 and 15 pt (62.5 and 12.5%, respectively). Therefore, we confirmed that the PCR technique was more sensitive than sandwich ELISA, and therefore the presence of AR could be detected more accurately. Lahmar et al. (2007) also carried out a comparison between sandwich ELISA and PCR in feces to diagnose the infection of *Echinococcus granulosus* in dogs. They observed ELISA to detect prepatent infections with a high sensitivity (82.8%), but a detection rate of only 25.9% during an equivalent time period with PCR.

On the other hand, Flanagan et al. (2011) compared CRT and FECRT to determine TCBZ efficacy in 4 isolates of *F. hepatica*. Methods produced similar results: 3 isolates were susceptible and 1 showed resistance to TCBZ.

In the present study, in the SV flock, on days 7 and 30 pt with ABZ, differences were evident: 3 animals were positive by sandwich ELISA but not by sedimentation. However, 7 pt with TCBZ, one animal was positive by sedimentation but negative by ELISA. It may be that fluke eggs can also be detected in feces as false positives, due to their presence in the gall bladder some days after successful treatment (Flanagan et al., 2011). This phenomenon was also observed by Novobilský et al. (2012) who reported that the number of positive animals was higher by sedimentation than when using the kit Bio-X K201 *Fasciola copro-antigen*.

5. Conclusion

The early detection of fasciolosis is possible by week 2 pi using PCR that amplifies a fragment of the ITS2 subunit. This technique was used to diagnose the AR in two naturally infected sheep flocks. When comparing FECRT, PCR, and CRT, the most sensitive technique to detect resistant flocks was shown to be PCR. Our study is the first to compare three diagnostic techniques to determine the presence of AR.

Acknowledgements

This study has been funded by the national projects INIA-MEC, 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

- 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.
- Álvarez-Sánchez, M.A., 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.
- Boray, J., Crowfoot, P., Strong, M., Allison, J., Schellebaum, M., von Orelli, M., Sarasin, G., 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113, 315–317.
- 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.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Diehl, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Dinkel, A., Von Nickisch-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R., Romig, T., 1998. Detection of in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1871–1876.
- 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.
- Fairweather, I., Boray, J.C., 1999. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Vet. J.* 158, 81–112.
- Flanagan, A., Edgar, H.W.J., Gordon, A., Hanna, R.E.B., Brenan, G.P., Fairweather, I., 2011. Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 176, 170–176.
- Geurden, T., Bartram, D., Van Brussel, L., Bo, L., Scott-Baird, E., Rugg, D., 2012. Evaluation of the comparative efficacy of a moxidectin plus triclabendazole pour-on solution against adult and immature liver fluke, *Fasciola hepatica*, in cattle. *Vet. Parasitol.* 189, 227–232.
- Gordon, D.K., Zadoks, R.N., Stevenson, H., Sargison, N.D., Skuce, P.J., 2012. On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 187, 436–444.
- Happich, F.A., Boray, J.C., 1969. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Aust. Vet. J.* 45, 326–328.
- Lahmar, S., Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H., Craig, P.S., 2007. Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet. Parasitol.* 144, 287–292.
- MAFF, 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques (Ministry of Agriculture Fisheries and Food). Technical bulletin N. 18, HMSO, London.
- 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.
- 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.
- McKellar, Q., Scott, E., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents—a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13, 223–247.
- 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 (M3). *J. Parasitol.* 90, 845–852.
- Mitchell, G.B.B., Maris, L., Bonniwell, M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143, 399.
- 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.
- Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J.P., Mulcahy, G., de Waal, T., 2009. The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in west of Ireland. *Vet. Parasitol.* 164, 201–205.
- 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.
- Novobilský, A., Aeverpil, H.B., Höglund, J., 2012. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 190, 272–276.
- Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R., 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet. Parasitol.* 178, 364–366.
- 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. *Parasitol. 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.
- Rodríguez-Osorio, M., Rojas, J., Gómez-García, V., 1998. *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. *J. Parasitol.* 84, 1053–1055.
- Spithill, T.W., Dalton, J.P., 1998. Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol. Today.* 14, 224–228.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 1986. Diagnosis Helminthiasis by Coprological Examination. Janssen Research Foundation, Beerse.
- Thomas, I., Coles, G.C., Duffus, K., 2000. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in Southwest Wales. *Vet. Rec.* 146, 200.
- 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 release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet. Parasitol.* 159, 77–81.

**Development of an egg hatch assay for the
detection of anthelmintic resistance to
albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from
sheep.**



D. Robles-Pérez, J.M. Martínez-Pérez, F.A. Rojo-Vázquez y 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* 2014, 203 (1-2): 217-221.**



Short Communication

Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep



D. Robles-Pérez^a, J.M. Martínez-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 7 June 2012

Received in revised form 30 October 2013

Accepted 18 November 2013

Keywords:

Fasciola hepatica

Anthelmintic resistance

Egg hatch assay

Albendazole

ABSTRACT

The aim of this study was to develop an egg hatch assay (EHA) to detect the resistance of *Fasciola hepatica* to albendazole (ABZ). With this purpose, two different *F. hepatica* isolates were tested: (i) susceptible (Shrewsbury/South Gloucester strain) to ABZ (SA); (ii) resistant to ABZ (RA). A commercial formulation of ABZ (Sinvermin[®]) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used at concentrations of 0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, and 2 µg/ml. In the SA isolates, eggs from feces exposed to ABZ at the three highest concentrations showed significantly lower hatching percentages than the control well ($P < 0.01$); also for the two highest concentrations, the percentage of development was significantly lower than the control ($P < 0.01$). However, in the RA isolate, no differences among treatments and control were found in the percentage of hatched or developed eggs. On the other hand, the EHA was conducted over a 15 day period following treatment with ABZ for sheep infected by the RA isolate. On day 7 post-treatment (pt), no differences among treatments and controls were observed. On day 15 pt, the development and hatching rates exposed to the highest ABZ concentration were lower than at lower concentrations, suggesting susceptibility. The ovicidal effect of ABZ and the potential use of EHA to differentiate between ABZ susceptible and resistant isolates are confirmed in the current study. However, the use of this technique should be confirmed with a higher number of isolates.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fasciolosis is an important infection of sheep and cattle with increasing prevalence in recent years (Kenyon et al., 2009; van Dijk et al., 2010; Martínez-Valladares et al., 2013).

Among all flukicides, one of the most important chemical groups is the benzimidazoles (BZs). Of all compounds,

albendazole (ABZ) is recommended for the control of fasciolosis, and, although its activity is restricted to flukes older than 12 weeks (McKellar and Scott, 1990), it was one of the most used drug in Spain for many years according a recent survey (Rojo-Vázquez and Hosking, 2013), removing up to 94–95% of adult flukes in sheep (Coles and Stafford, 2001).

Recent reports have indicated an increase in the prevalence of anthelmintic resistance (AR) to *F. hepatica* due to drug overuse; however, the mechanisms involved in its development are not yet well understood. AR to *F. hepatica* has not reached the levels seen in gastrointestinal nematodes (GIN) (Jackson and Coop, 2000). Overend and Bowen (1995) described the first case of resistance to triclabendazole (TCBZ) in Australia, and, since then, there have been

* 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).

reports in Ireland (Lane, 1998; O'Brien, 1998), Scotland (Mitchell et al., 1998), Wales (Thomas et al., 2000), and the Netherlands (Moll et al., 2000; Gaasenbeek et al., 2001). In Spain, Álvarez-Sánchez et al. (2006) described for the first time the resistance to ABZ and TCBZ in sheep in the province of León.

In vivo and *in vitro* tests have been developed to identify AR. Among the *in vivo* tests, the fecal egg count reduction test (FECRT) is based on reduction of the number of eggs in feces following anthelmintic treatment (Coles et al., 1992). In relation to *in vitro* tests, the egg hatch assay (EHA) has been developed to detect BZ resistance in trichostrongyles and is based on the ovicidal properties of some BZs; eggs of resistant isolates embryonate and hatch at higher concentrations than do those of a susceptible isolate (Whitlock et al., 1980). Although the EHA was originally designed to detect AR in GIN, preliminary studies were carried out in *F. hepatica* by Álvarez et al. (2009) and Fairweather et al. (2012), who compared the hatching rate of eggs taken from the gall bladder and using various concentrations of TCBZ, ABZ, and their sulfoxide metabolites.

In this context, the aim of this study was to develop an EHA to determine the resistance of *Fasciola hepatica* isolates to ABZ. EHAs were designed using eggs from feces to test a formulation of ABZ with susceptible and resistant *F. hepatica* isolates.

2. Materials and methods

2.1. *Fasciola hepatica* isolates

Two *Fasciola hepatica* isolates differing in resistance and susceptibility to ABZ were used. The susceptible isolate (SA) was the Shrewsbury/South Gloucester strain (Ridge-way Research Ltd Company, UK). On the other hand, a field isolate from Santillán de la Vega, (Palencia, Spain), resistant to ABZ (RA), was also tested. With the aim to determine the resistance in the isolate RA the FECRT was carried out by Robles-Pérez et al. (2013). In this study, after the administration of ABZ, the reduction of eggs in feces was 50.1% on day 7 post treatment (pt) and 31.2% on day 15 pt.

2.2. EHA

The formulation used in this study was the commercial of ABZ (Sinvermin[®]) diluted in DMSO to guarantee its complete solubilization.

With the aim to assess the resistance to ABZ, a stock solution (400 µg/ml) of a commercial formulation of ABZ (Sinvermin[®]) (28.5 mg/ml) diluted with DMSO was used to guarantee the complete solubilization of the drug. Dilutions of 0.04, 0.4, 4, and 40 µg/ml were prepared to obtain a final concentration in the wells of 0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, and 2 µg/ml after adding 10 µl of each solution to a total volume of 2 ml. In all EHAs, control wells with 10 µl of DMSO, without drug, were included.

The concentration of ABZ in the stock solution was confirmed as a function of the respective peak area carried out by HPLC chromatography following the protocol previously described by Ragno et al. (2006).

Eggs from feces of infected sheep by both isolates were obtained by a fecal sedimentation method (MAFF, 1986).

For the EHA, a 24 well cell culture plate was used and all anthelmintic concentrations were tested in duplicate. Into each well, 1890 µl of water, 100 µl of water with 30–50 eggs, and 10 µl of each dilution were placed. A control well containing 10 µl of DMSO was also used. Plates were incubated for 14 days at 25 °C in darkness. They were then placed under light for 2 h to stimulate hatching of the miracidia. The number of eggs hatched, embryonated, and unembryonated were counted.

All EHA assays were repeated five times for each isolate.

With the aim to detect AR to ABZ using the EHA after an *in vivo* treatment, eggs from feces of six sheep infected by the isolate RA were recovered. The EHAs were carried out on days 0, 7, and 15 after administration of a single oral dose of ABZ (7.5 mg/kg, Sinvermin[®]).

2.3. Data and statistical analysis

The percentage of hatched and developed eggs was calculated for each isolate, using the following formula:

Percentage of development

$$= \left(\frac{\text{number of developed eggs}}{\text{total number of eggs}} \right) \times 100$$

Percentage of hatching

$$= \left(\frac{\text{number of hatched eggs}}{\text{total number of eggs}} \right) \times 100$$

The number of developed eggs is the sum of hatched (operculum opened without miracidium) and embryonated eggs (miracidium inside the egg). The number of eggs is the sum of hatched, embryonated, and unembryonated eggs (egg in morula stage, without miracidium).

To compare two EHAs differing in hatch rates, a ratio of the results of each concentration to the control was calculated, using the following formula:

$$\text{Ratio} = \left(\frac{\% \text{ hatching of each concentration}}{\% \text{ hatching of control}} \right) \times 100$$

The data were analyzed using the statistical computer package for social sciences SPSS. A one-way ANOVA was used to assess differences. To confirm significant differences between concentrations and the control group, the Dunnett test was carried out. Differences of less than 5% were considered significant ($P < 0.05$).

3. Results

The results of the percentage of hatched and developed eggs in the SA and RA isolates are shown in Fig. 1. For the SA isolate, the hatching rate increased at lower drug concentrations, from 8 to 29%, and 33% in the control. The percentage of developed eggs ranged from 21 to 70% for the respective concentrations and was 72% for the control. The hatching rate of the control was significantly higher than that of the three highest concentrations ($P < 0.01$), and the percentage of developed eggs was significantly

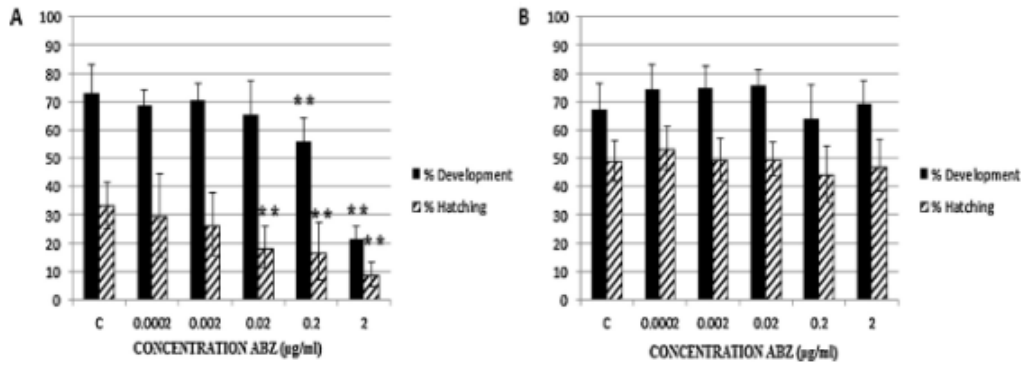


Fig. 1. Percentage of hatched and developed eggs of the susceptible (SA) (A) and resistant (RA) (B) isolates. Significant differences between concentrations and control are indicated by ** ($P < 0.01$).

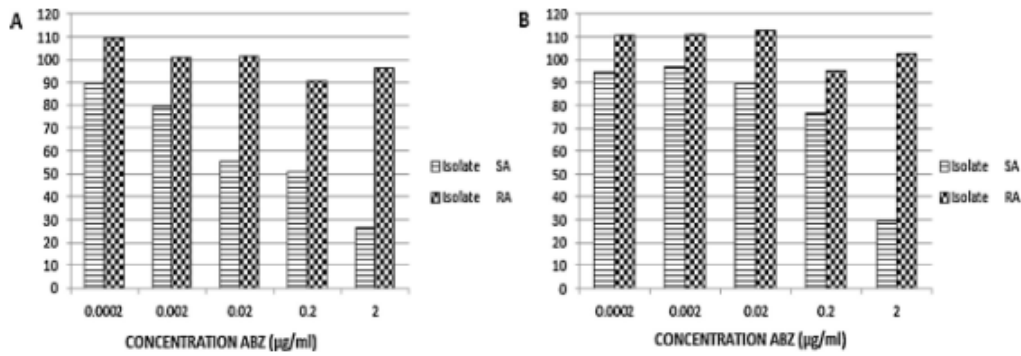


Fig. 2. Ratio of hatching (A) and development (B) eggs for each concentration to its corresponding control for the susceptible (SA) and resistant (RA) isolates to albendazole.

higher in the control than in the two highest concentrations ($P < 0.01$). For the RA isolate, hatching ranged from 44 to 53%, with a value of 49% for the control, and percentage of developed eggs from 69 to 75%, with a value of 67% for the control. The differences were not significant among the concentrations or between them and control.

Since the hatching rates and percentage of developed eggs varied between isolates, we calculated the ratio of the

results of each concentration to its control value (Fig. 2), confirming higher hatching and egg development in the resistant isolate.

We also compared the percentage of hatching and developed eggs from feces of the sheep infected with the RA isolate on days 0, 7, and 15 pt with ABZ (Fig. 3). The results on day 0 are shown in Fig. 1B. On days 7 and 15 pt, the EHA was carried out only once due to the low quantity

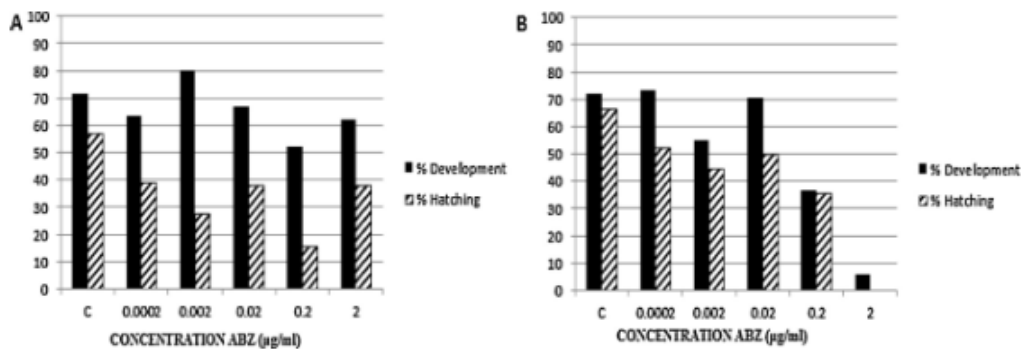


Fig. 3. Percentage of hatched and developed eggs of the resistant isolate (RA) after the *in vivo* treatment of infected sheep on days 7 (A) and 15 (B) post treatment.

of eggs recovered from feces. On day 7 pt, the hatching rates ranged from 16 to 39%, with 57% for the control. The developed egg rate ranged from 52 to 80%, with 71% for the control. On day 15 pt, the hatching and developed egg rates ranged from 36–52% to 36–73%, respectively, with the values for the highest concentration at 0 and 5%. The rates of hatching and developed eggs in the control were 66% and 72%, respectively.

4. Discussion

The EHA has been described as an *in vitro* technique useful for the detection of AR to benzimidazoles (BZs) in GIN of domestic animals (Coles et al., 2006). In the current study we carried out EHA with eggs of *F. hepatica*, with the objective of determining liver fluke resistance to ABZ.

Boersema (1983) described two mechanisms of action of BZs against nematode eggs: the interruption of the embryonation and the failure of hatching, both actions taking place at the initial phases of development (Le Jambre, 1976; Weston et al., 1984). The ovicidal activity of BZs such as ABZ in nematodes is related, not only to the affinity of the drug to β -tubulin, but also to its ability to penetrate the egg shell and accumulate inside. It has been suggested that inhibition of egg hatching depends on the hydrophobic nature of the drug, and the highest activity is correlated with high solubility in lipids (Lacey, 1988). The lipophilicity of ABZ may facilitate penetration into the eggs (Mottier et al., 2003).

In the isolate susceptible to ABZ, SA, the hatching and development rates in eggs from feces decreased significantly when the concentration of drug was increased, showing the effect of ABZ. On the contrary, with the resistant isolate, RA, hatching and development rates were similar regardless of the concentration. The ovicidal effect of ABZ was also previously reported by Álvarez et al. (2009) in eggs from bile of a susceptible isolate. In this study, the authors tested ABZ and its sulfoxide metabolite (ABZ.SO) at concentrations of 0.05–5.0 nmol/ml, equivalent to 0.0135–1.35 μ g/ml, resulting in very low hatching rates (3.7–13.2%). We used concentrations between 0.0002 and 2 μ g/ml to obtain a wider range of results; the percentages of hatching ranged between 8 and 29% in SA, which were not very different from the study of Álvarez et al. (2009). Other study carried out by Canevari et al. (2013), determined the AR in isolates of South America also with concentrations between 0.05 and 5 nmol/ml of ABZ and ABZ.SO. These authors observed a very low ovicidal activity (<13.4%) in a resistant isolate although in the isolates suspected to be susceptible to ABZ, the ovicidal activity was higher than 70.3% at the lowest concentration tested. In our study the percentage of hatched eggs in the resistant isolate ranged between 44 and 53%.

On the other hand, we attempted to determine the level of AR by conducting EHA over a 15 day period following treatment with ABZ of sheep infected by the RA isolate. The time of egg presence in the gallbladder until they appear in feces is not known, and is variable and sporadic; therefore fecal samples were collected on days 0, 7, and 15 pt. The activity of ABZ is restricted to flukes older than 12 weeks

(McKellar and Scott, 1990). Before administration of the drug, the rates of hatching and development were similar in all concentrations tested, suggesting the resistant status of the isolate (Fig. 1B). The eggs obtained on day 7 pt should have been produced by resistant adult flukes and the eggs recovered on day 15 pt to both resistant adult flukes and previously immature flukes that had reached the mature stage. These immature flukes may not have developed resistance, since they would have been exposed to the drug a shorter time than adults. Therefore, on day 7 pt, there were no differences among treatment concentrations, and the isolate showed resistance (Fig. 3A). On day 15 pt, the rates of hatching and development with the highest concentration were lower than other concentrations, suggesting a susceptible profile (Fig. 3B). On day 15 pt, two generations of *F. hepatica* were involved, with possible differing resistance status. Therefore, the result of the EHA on day 15 pt shows a lower degree of resistance.

In conclusion, an EHA to detect AR to ABZ in *F. hepatica* isolates was developed using a commercial formulation diluted in DMSO and eggs recovered from feces of infected sheep. The ovicidal effect of the drug was clearly shown and the concentrations tested in this study permitted to differentiate between susceptible and resistant isolates. The EHAs described in the present study should be conducted with more isolates differing in degree of resistance to ABZ.

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

- Álvarez-Sánchez, M.A., 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.
- Álvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I., Lanusse, C., 2009. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Vet. Parasitol.* 164, 211–216.
- Boersema, J.H., 1983. Possibilities and limitations in the detection of anthelmintic resistance. In: Borgsteede, F.H.M., Henriksen, S.A., Over, H.J. (Eds.), *Facts and Reflections. IV. Resistance of Parasites to Anthelmintics*. Central Veterinary Institute, Lelystad, pp. 207–218.
- Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C., Álvarez, L., 2013. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *J. Helminthol.* 19, 1–7.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Diei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Coles, G.C., Stafford, K.A., 2001. Activity of oxyclozanide, nitroxyml, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet. Rec.* 148, 723–724.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.

- Fairweather, I., McShane, D.D., Shaw, L., Ellison, S.E., O'Hagan, N.T., York, E.A., Trudgett, A., Brennan, G.P., 2012. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: proof of concept. *Vet. Parasitol.* 183, 249–259.
- Gaasenbeek, C.P., Moll, L., Cornelissen, J.B., Vellema, P., Borgsteede, F.H., 2001. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 95, 37–43.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, 95–107.
- Kenyon, F., Sargison, N.D., Skuce, P.J., Jackson, F., 2009. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet. Parasitol.* 163, 293–297.
- Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18, 885–936.
- Lane, G., 1998. Anthelmintic resistance. *Vet. Rec.* 143, 232.
- Le Jambre, L.F., 1976. Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 2, 385–391.
- MAFF, 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Technical Bulletin No. 18. HMSO, London.
- 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. Increase in prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* infections in sheep in the Northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications? *Parasit. Vectors* 6, 282–290.
- McKellar, Q., Scott, E., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents—a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13, 223–247.
- Mitchell, G.E.B., Maris, L., Bonniwell, M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143, 399.
- 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.
- Mottier, L., Álvarez, L., Pis, A., Lanusse, C., 2003. Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol–water partition coefficients. *Exp. Parasitol.* 103, 1–7.
- O'Brien, D.J., 1998. Fasciolosis: a threat to livestock. *Irish Vet. J.* 51, 539–541.
- Overend, D.J., Bowen, F.L., 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.* 72, 275–276.
- Ragno, G., Risoli, A., Ioele, G., De Luca, M., 2006. Photo- and thermal-stability studies on benzimidazole anthelmintics by HPLC and GC–MS. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 54 (6), 802–806.
- Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M., 2013. The diagnosis of fasciolosis in faeces 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.
- Rojo-Vázquez, F.A., Hosking, B.C., 2013. A telephone survey of internal parasite control practices on sheep farms in Spain. *Vet. Parasitol.* 18, 166–172.
- Thomas, I., Coles, G.C., Duffus, K., 2000. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in Southwest Wales. *Vet. Rec.* 146, 200.
- van Dijk, J., Sargison, N.D., Kenyon, F., Skuce, P.J., 2010. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperature regions. *Animal* 4, 377–392.
- Weston, K.M., O'Brien, R.W.O., Pritchard, R.K., 1984. Respiratory metabolism and thiabendazole susceptibility in developing eggs of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 14, 159–164.
- Whitlock, H.V., Kelly, J.D., Porter, C.J., Griffin, D.L., Martin, I.C.A., 1980. In vitro screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet. Parasitol.* 7, 215–232.

**Screening of anthelmintic resistance to
triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolates from
sheep by means of an egg hatch assay.**



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

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

***BMC Research Veterinary* 2015, 11:226**

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Screening anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep by means of an egg hatch assay

David Robles-Pérez¹, José Manuel Martínez-Pérez¹, Francisco Antonio Rojo-Vázquez^{1,2}
and María Martínez-Valladares^{2*}

Abstract

Background: In the present study, the detection of anthelmintic resistance to triclabendazole (TCBZ) in sheep infected by *Fasciola hepatica* was studied using an egg hatch assay (EHA). *F. hepatica* eggs were recovered from bile and faeces of infected animals by isolates with different grade of anthelmintic resistance to TCBZ: i) a resistant isolate (RT); ii) a susceptible isolate (ST); iii) naturally infected sheep by a susceptible field strain (FST). In the EHA the percentage of hatched eggs were calculated according to the following concentrations of TCBZ diluted in dimethyl-sulfoxide (DMSO): 0.05, 0.2, 1, 5, and 25 µg/ml.

Results: In relation to the EHAs carried out with the eggs from bile of sheep infected by ST, differences were found in the percentage of hatched eggs between the control well, only with DMSO, and the two highest concentrations of TCBZ (5 and 25 µg/ml) ($p < 0.05$). However, when we tested the drug with the eggs from the bile of sheep infected by RT, the percentage of hatched eggs was similar among all concentrations. Since the range of hatching varied between isolates, we calculated the ratio of the results of each concentration to its control value confirming the higher hatching in RT than in ST.

We developed an EHA with eggs recovered from faeces in order to avoid the slaughter of sheep. The results of the EHAs with the isolate ST showed differences in the percentage of hatching between the highest concentration (25 µg/ml) and the control well ($p < 0.05$); however, these differences were not confirmed under field conditions with the strain FST.

Conclusions: The ovicidal effect of TCBZ in *F. hepatica* eggs from bile was shown using a commercial formulation diluted in DMSO with a minimum concentration of 5 µg/ml. However, in eggs recovered from faeces the results are not conclusive. The cleaning of eggs recovered from faeces is an important issue that should be reviewed and standardized before comparing results between susceptible and resistant isolates in this kind of EHA.

Keywords: *Fasciola hepatica*, Anthelmintic resistance, Egg hatch assay, Triclabendazole

Background

Fasciola spp. infects mammals worldwide, mainly ruminants, but also humans can become infected. In ruminants, and especially in sheep, the infection reduces feed conversion, growth, and meat and milk production. Moreover, it is one of the major causes of liver condemnations at abattoirs and interferes with fertility and fecundity [1].

The infection is usually caused, in temperate areas of the world, by the common liver fluke *F. hepatica*. Its prevalence is rising nowadays due to different factors such as climate change, man-made environmental modifications or the presence of anthelmintic resistance (AR) [1, 2]. AR is the result of repeated administration of the same anthelmintic; moreover, its development has been favoured by ineffective treatment due to the underdosing. AR is the result of repeated treatments of the same anthelmintic although its development is also favoured by the administration of underdosing or overdosing [3].

* Correspondence: mmaria@eez.csic.es

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca de Marzanas, 24346 Grulleros, León, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Robles-Pérez et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Currently, the most commonly used drug to control fasciolosis belongs to benzimidazole (BZ) family and is the triclabendazole (TCBZ). TCBZ has been the drug of choice for treating liver fluke infections in livestock for over 20 years [4] since it is the only anthelmintic effective against both *F. hepatica* stages, immature and mature flukes [5]. However, there are several reports describing resistant strains of *F. hepatica* to TCBZ all around the world, in Australia [6], Argentina [7] and also in different European countries [8–11]. Therefore, early detection of resistance is essential, since reversion to susceptibility does not seem to occur [12].

Some *in vivo* and *in vitro* tests have been developed to detect the AR in ruminants. Among the *in vivo* tests, the faecal egg count reduction test (FECRT) is based on the reduction of the number of eggs in faeces after the anthelmintic treatment [13]. Regarding *in vitro* tests, an egg hatch assay (EHA) has been described to detect BZ resistance in Trichostrongylidae [14, 15]. The EHA is based on the ovicidal properties of some BZs, and on the capacity of eggs from resistant isolates to embryonate and hatch at higher concentrations than those ones from a susceptible isolate [16]. Although the EHA was originally designed to detect AR in gastrointestinal nematodes (GIN), some studies have been carried out with *F. hepatica* eggs from gall bladder and/or faeces using TCBZ, albendazole (ABZ) and their sulphoxide metabolites [17–19].

The aim of this study has been to characterize the susceptibility and resistance of *F. hepatica* isolates to TCBZ by means of an EHA using eggs from gall bladder and faeces.

Methods

Isolates of *F. hepatica*

Eight experimentally infected sheep with two *F. hepatica* isolates having different levels of resistance or susceptibility to TCBZ were used. The susceptible isolate to TCBZ (ST) was the Shrewsbury/South Gloucester isolate (Ridgeway Research Ltd Company, UK); the TCBZ-susceptibility of this isolate was confirmed in a clinical trial by Martínez-Valladares et al. [11]. The resistant isolate to TCBZ (RT) was characterized by Álvarez-Sánchez et al. [10] in a flock located in the Spanish province of León; the egg reduction in this flock after the treatment of sheep with TCBZ was 81.8 % on 16 day after treatment and 75.7 % on 30 day after treatment. The molecular characterization of RT was recently described by Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez [20].

On the other hand, naturally infected sheep with a TCBZ-susceptible field strain (FST) situated in Palencia, Spain, was also tested. The susceptibility of this strain was previously shown by Robles-Pérez et al. [21].

Egg hatch assays

A commercial formulation of TCBZ (Fasinex®) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to carry out the EHAs. The concentration of TCBZ in this commercial formulation was 50 mg/ml. Dilutions of 10, 40, 200, 1000 and 5000 µg/ml were prepared to obtain a final concentration in the wells of 0.05, 0.2, 1, 5, and 25 µg/ml after adding 10 µl of each dilution to a total volume of 2 ml. In all EHAs, control wells with 10 µl of DMSO were included.

Eggs from faeces were obtained by sedimentation [22] from animals infected by ST and from a pool of faeces of sheep naturally infected by FST. Four sheep, two infected with ST and two with RT, were killed by injection of sodium pentobarbital (Dolethal®) into the jugular vein in order to recover eggs from the bile. *F. hepatica* eggs were directly recovered from the gall bladder and washed several times with tap water by sedimentation. The slaughter of animals complies with national regulations (R.D. 53/2013) and with all animal welfare standards, taking account all necessary moral and ethical issues in the use of experimental animals.

For the EHA, a 24 well cell culture plate was used and all anthelmintic concentrations were tested in duplicate. Into each well, 1890 µl of water, 100 µl of water with 30–50 eggs, and 10 µl of each dilution were placed. Two control wells containing 10 µl of DMSO, without TCBZ, were also included. Plates were incubated for 14 days at 25 °C in darkness. They were then placed under light for 2 h to stimulate hatching of the miracidia. The number of eggs hatched, embryonated, and unembryonated were counted. All EHA assays were repeated five times for each isolate.

Data and statistical analysis

The percentage of hatched eggs was calculated for each isolate, using the following formula:

$$\text{Percentage of hatching} = \left(\frac{\text{number of hatched eggs}}{\text{total number of eggs}} \right) \times 100$$

The number of eggs is the sum of hatched, embryonated, and unembryonated eggs (egg in morula stage, without miracidium). The results reported in this study are the mean of five repetitions of each EHA.

With the aim to compare two EHAs with different hatch ranges, a ratio of the results of each concentration to the control was calculated, using the following formula:

$$\text{Ratio} = \left(\frac{\% \text{ hatching of each concentration}}{\% \text{ hatching of control}} \right) \times 100$$

The data were analyzed using the statistical computer package for social sciences SPSS. A one-way ANOVA was used to assess differences. The Dunnett test was carried out to confirm significant differences between concentrations

and the control group. Differences of less than 5 % were considered significant ($P < 0.05$).

Results

EHA with eggs from bile

In the EHAs carried out with the eggs from bile, we compared two isolates, one susceptible (ST) and another resistant (RT) to TCBZ (Fig. 1).

The percentages of hatching in ST isolate are shown in Fig. 1a. The results show that the lower the concentration of the drug is, the higher the percentage of hatched eggs, ranging from 43 to 53 %, with a value of 63 % in the control well. The differences between the two highest concentrations (5 and 25 $\mu\text{g/ml}$) and the control were significant ($p < 0.05$). On the other hand, the percentage of hatched eggs in RT ranged from 19 to 21 %, being 22 % in the control well (Fig. 1b). In this isolate, no significant differences were shown between concentrations.

After calculating the ratio of the results of each concentration to its control value, in both isolates (Fig. 2), we confirmed the higher hatching in RT than in ST.

EHA with eggs from faeces

Figure 3 shows the results of percentage of hatched eggs in the susceptible isolates. The hatching percentage ranged from 17 to 23 %, with a control value of 26 % for ST. Significant differences were observed between the highest concentration (25 $\mu\text{g/ml}$) and the control well ($p < 0.05$) (Fig. 3a).

Using a field strain, FST, also susceptible to TCBZ (Fig. 3b), the percentages of hatching were similar between concentrations, ranging from 19 to 29 %, being

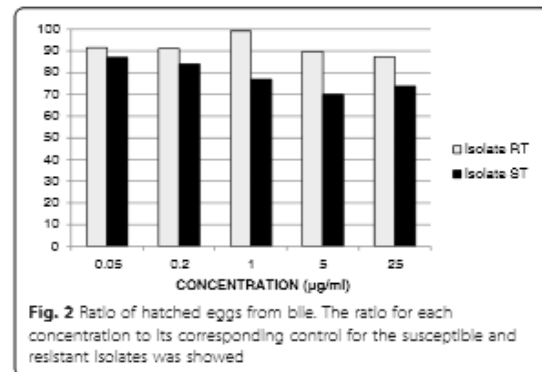


Fig. 2 Ratio of hatched eggs from bile. The ratio for each concentration to its corresponding control for the susceptible and resistant isolates was showed

33 % in the control well; no significant differences were shown between concentrations.

Discussion

The study of AR to BZs in ruminants infected by helminth parasites is an important issue to avoid its development and spread. Several authors have used the *in vitro* technique EHA in order to characterize strains of GIN and *F. hepatica* in sheep flocks [3, 14, 17–19, 23]. In the present study, the EHA has been adapted and modified to detect the AR to TCBZ in sheep infected by *F. hepatica*.

TCBZ metabolism includes ruminal and hepatic biotransformations in metabolites as TCBZ-sulphoxide, TCBZ-sulphone, hydroxy-TCBZ, hydroxy-TCBZSO and hydroxy-TCBZSO₂ [24]. The TCBZ and its sulphoxide and sulphone metabolites contribute to anthelmintic activity and variations in the regional specificity in the levels of disruption to the tegument of the fluke are presents [25]. The drug and

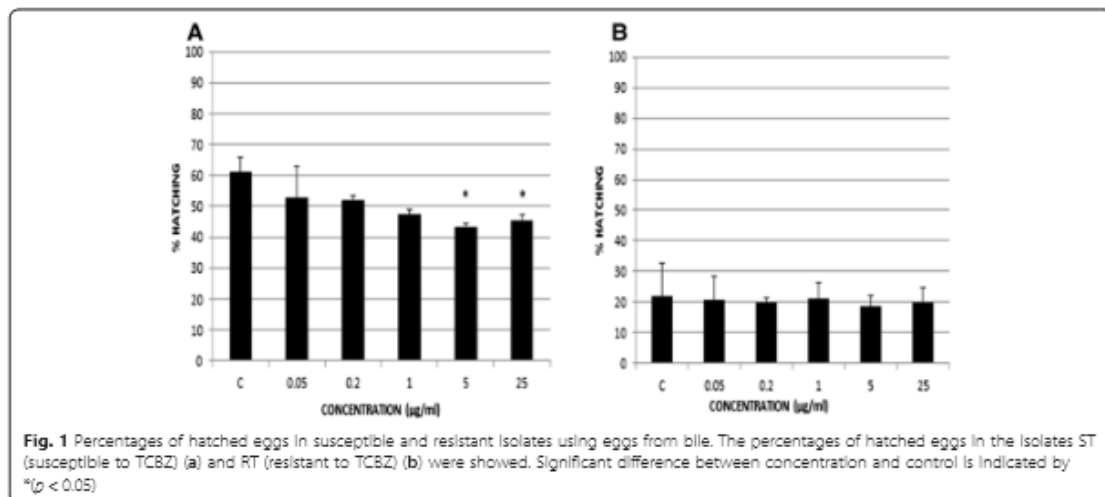
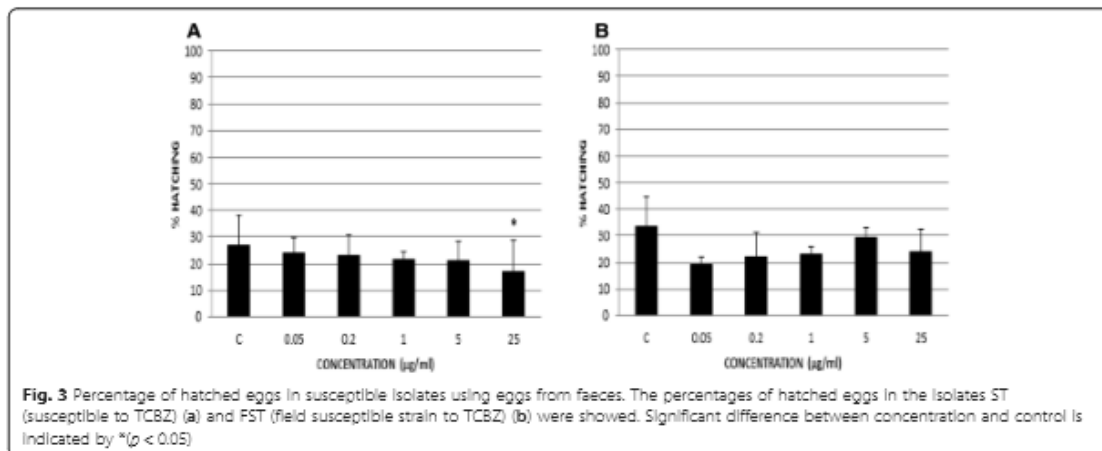


Fig. 1 Percentages of hatched eggs in susceptible and resistant isolates using eggs from bile. The percentages of hatched eggs in the isolates ST (susceptible to TCBZ) (a) and RT (resistant to TCBZ) (b) were showed. Significant difference between concentration and control is indicated by * ($p < 0.05$)



metabolites bind to β -tubulin which prevents the process of polymerization to form microtubules in the fluke [26]. Accordingly, the integrity of the surface membrane of the parasite is altered leading to damage to the integument and causing the death of the fluke [4].

Firstly, we carried out an EHA using a commercial formulation, Fasinx[®], and eggs from bile. Both, TCBZ and its sulfoxide metabolite were used by Álvarez et al. [17] in a preliminary study testing two formulations of TCBZ in eggs from bile, one diluted with methanol and another one with DMSO. These authors showed a range of hatching of 45–80 % using concentrations of TCBZ between 5 and 20 nmol/ml, equivalent to 1.8–7.2 µg/ml; however, they did not find any ovicidal effect of TCBZ in eggs from susceptible and resistant strains to this drug. Due to this fact, in the current study we extended the range of concentrations to test the efficacy of TCBZ in eggs from bile, between 0.05 and 25 µg/ml. After comparing the percentages of hatching between the susceptible (ST) and resistant (RT) isolates, we found only significant differences between the control and the two highest concentrations (5 and 25 µg/ml) in ST ($p < 0.05$), suggesting an ovicidal effect of the drug in this case. However, when the EHA was carried out with eggs from RT, no differences were found among concentrations (Fig. 1b). Recently, Fairweather et al. [18] tested a 60 µg/ml concentration of the sulfoxide metabolite of TCBZ in the same RT isolate that we used in the current study. This author found a very low level of hatching in RT (<2 %) and therefore they classified the isolate as susceptible. In the present study we showed a percentage of hatching of 20.5 % after testing the highest concentration (25 µg/ml); moreover, no significant differences were described between any concentration and the control using the same RT isolate. The reason of these different results in relation to resistance of RT could

be due to the different formulations of TCBZ. Unlike our EHAs, Fairweather et al. [18] used a higher concentration and the sulfoxide metabolite of the drug, not the pure TCBZ.

With the aim to compare the results described between the susceptible and resistant isolates, we calculated a ratio for each isolate and concentration, since the hatching ranges of both isolates were different, probably due to the variability of the technique or the quality of eggs recovered (Fig. 2). The ratios show that the hatching was higher in RT, confirming its higher level of resistance.

On the other hand, with the purpose to avoid the slaughter of sheep to detect the AR using *in vitro* techniques, we developed an EHA with eggs of *F. hepatica* collected from faeces. With the aim to determine the repeatability of this technique using eggs from faeces, we only tested susceptible isolates, ST and FST. In this case, we observed that the hatching ranges were similar between each other (Fig. 3a and b), however, we only showed significant differences between the highest concentration (25 µg/ml) and the control well in ST. This finding was not confirmed in FST. It is important to note that the percentages of hatching in ST were lower than those obtained in the EHA using eggs from bile. The reason of the low hatching rates could be the presence of rest of faeces or impurities. Indeed, according to Rowcliffe and Ollerenshaw, [27] one of the critical factors for hatching is that the eggs must have become freed from the faeces. Robles-Pérez et al. [19] carried out EHAs to detect the resistance to ABZ using *F. hepatica* eggs recovered from faeces. In that case the percentages of hatching in the control wells were 33, 57 and 71 % for a susceptible strain and 49 % for a resistant strain. Therefore, there is a great variability in the hatching rates. It seems that the methodology to

recover eggs from faeces is an important issue in the EHA, therefore, this step needs more review and standardization before comparing results between susceptible and resistant isolates.

Conclusions

The ovicidal effect of TCBZ in *F. hepatica* eggs from bile was shown using a commercial formulation diluted in DMSO with a minimum concentration of 5 µg/ml. We compared the hatching rates of two isolates, one susceptible and another resistant to TCBZ, and we only found significant differences between the two highest concentrations (5 and 25 µg/ml) and the control well in the susceptible isolate. However, in eggs recovered from faeces the results are not conclusive. Significant differences were shown in the percentages of hatching between the highest concentration (25 µg/ml) and the control in a susceptible isolate, but these results were not confirmed under field conditions with another susceptible strain.

Abbreviations

TCBZ: Triclabendazole; EHA: Egg hatch assay; RT: Resistant isolate; FST: Susceptible field strain; ST: Susceptible isolate; DMSO: Dimethylsulfoxide; AR: Anthelmintic resistance; FECRT: Faecal egg count reduction test; GIN: Gastrointestinal nematodes; ABZ: Albendazole.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DRP wrote the initial manuscript and performed the experiments. JMMP contributed to the realization of the experiments and the slaughter of animals. FARV and MMV coordinated the experiments and made the revisions required for submission of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

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.

Author details

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain. ²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca de Marzanas, 24346 Grulleros, León, Spain.

Received: 23 February 2015 Accepted: 18 August 2015

Published online: 28 August 2015

References

1. Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M. Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol.* 2012;30:15–38.
2. Martínez-Valladares M, Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Cordero-Pérez C, Famularo MR, Fernández-Pato N, et al. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* infections in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit Vectors.* 2013;6:282–90.
3. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Roma, Italia: Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO; 2003.
4. Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey EM, McCoy M, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol.* 2007;82:104–9.
5. Boray J, Crowfoot P, Strong M, Allison J, Schellenbaum M, von Orelli M, et al. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet Rec.* 1983;113:315–7.
6. Oyerend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J.* 1995;72:275–6.
7. Claechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol.* 2011;178:364–6.
8. Mitchell GBB, Maris L, Bonniwell MA. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet Rec.* 1998;143:399.
9. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede FH. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2000;91:153–8.
10. Álvarez-Sánchez MA, Malnar-Jaime RC, Pérez-García J, Rojo-Vázquez FA. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec.* 2006;159:424–5.
11. Martínez-Valladares M, Famularo MR, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez FA. Efficacy of nitroxyimil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol Res.* 2010;107:1205–11.
12. Roos MH, Kwa MSG, Grant WN. New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Today.* 1995;11:148–50.
13. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Dlel TR, Taylor MA, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 1992;44:35–44.
14. Martínez-Valladares M, Famularo MR, Fernández-Pato N, Cordero-Pérez C, Castañón-Ordóñez L, Rojo-Vázquez FA. Characterization of a multidrug resistant *Teladorsagia circumcincta* isolate from Spain. *Parasitol Res.* 2012;102:683–7.
15. Martínez-Valladares M, Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Cordero-Pérez C, Famularo MR, Fernández-Pato N, et al. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by *in vivo* and *in vitro* techniques. *Vet Parasitol.* 2013;191:177–81.
16. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. *In vitro* screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet Parasitol.* 1980;7:215–32.
17. Álvarez L, Moreno G, Moreno L, Ceballos L, Shaw L, Fairweather I, et al. Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Vet Parasitol.* 2009;164:211–6.
18. Fairweather I, McShane DD, Shaw L, Ellison SE, O'Hagan NT, York EA, et al. Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Vet Parasitol.* 2012;183:249–59.
19. Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez F, Martínez-Valladares M. Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet Parasitol.* 2014;203:217–21.
20. Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA. Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitol Res.* 2014;113:2733–41.
21. Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M. The diagnosis of fasciolosis in faeces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. *Vet Parasitol.* 2013;197:277–82.
22. MAFV (Ministry of Agriculture Fisheries and Food). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Technical bulletin N. 18, HMSO, London, 1986.
23. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 2006;136:167–85.
24. Virkel G, Ufschitz A, Sallowitz J, Pils A, Lanusse C. Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 2006;29:213–23.
25. Halferty L, Brennan GP, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather I. The relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 2009;159:126–38.
26. Stitt AW, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol Res.* 1993;79:329–36.
27. Rowcliffe SA, Ollerenshaw CB. Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1960;54:172–81.

CAPÍTULO IV

Resumen de resultados

En esta sección se han resumido los resultados globales para cada uno de los trabajos publicados.

I. “Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR”.

- Se seleccionaron cinco primers de la base de la Universidad de British Columbia (UBC846, UBC848, UBC855, UBC856 y UBC881) para llevar a cabo una ISSR-PCR. Estos primers generaron 13, 6, 5, 7 y 8 bandas, respectivamente, siendo el total de 39 (7.8 bandas por primer), con un tamaño que va aproximadamente desde 200 a 1.000 pares de bases. De ellas, 28 fueron polimórficas (71,79%), considerando todas las poblaciones de parásitos en su conjunto. Si tenemos en cuenta las poblaciones de forma individual, el porcentaje de bandas polimórficas osciló entre 10,26% en la cepa Sp4 y 48,72% en la Sp1.

- Respecto a los valores del número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos por locus (A_e), si estos fueran idénticos, se consideraría que se ha alcanzado la máxima variabilidad. Sin embargo, A_e fue menor que A , ya que uno de los alelos fue más frecuente que el otro, en los loci polimórficos.

- La estructura de la variabilidad entre los adultos estudiados de diferentes poblaciones se estimó mediante varios parámetros, teniendo relevancia la diferenciación interpoblacional (G_{st}) con un valor de 0.547. Esto indica que un 54,7% de la variación es debida a diferencias entre las poblaciones frente al 45,3% restante, que sería debido a diferencias dentro de las poblaciones.

- Mediante las distancias de Nei obtenidas, se construyó un dendrograma UPGMA, para determinar las relaciones interpoblacionales. De acuerdo con el dendrograma, los

parásitos de la región central de España (Sp4) fueron claramente diferentes del resto de las muestras. Dentro del conjunto en el que la mayoría de las poblaciones estaban agrupadas, se observaron pequeñas distancias genéticas entre algunas poblaciones geográficamente cercanas, como la de Eng e Ir, por una parte, y Sp1, Sp2, Sp3, del noroeste español, junto con la de Mex, por otro. También se calculó la distancia de Nei teniendo en cuenta el tipo de hospedador, y este caso los valores oscilaron entre 0,091-0,230 en ovejas y 0,150-0,337 en vacas. Esto indica que las poblaciones de ovejas estaban más próximas entre sí que las de vacuno.

- Además, las relaciones genéticas entre todos los adultos de *F. hepatica* se determinaron mediante un análisis de coordenadas principales (PCA) después de calcular el índice de similitud de Jaccard. De nuevo, todos los individuos de la cepa Sp4 estuvieron ubicados por separado en un grupo diferente del resto. Por otra parte, no hubo diferenciación entre los adultos de las poblaciones Sp1, Sp2, Sp3 y Mex.

II. “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”

- Tras la realización de una PCR usando primers específicos que amplifican un fragmento de 292 pb de la secuencia del espaciador transcrito interno (ITS2) del ADN ribosomal, para el diagnóstico de una infección experimental por *F.hepatica* a partir de muestras fecales, se confirmó la detección de la infección a partir de la segunda semana pi, mostrando el producto de PCR amplificado un 100% de similitud con el ITS2 de *F. hepatica* (GQ231547.1) del GenBank.

- La especificidad de esta técnica se confirmó mediante otra PCR usando muestras fecales de ovejas no infectadas e infectadas experimentalmente con los nematodos gastrointestinales, *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus*. La ausencia de producto de amplificación en esta PCR confirmó su especificidad.

- Una vez puesta a punto la técnica, se empleó esta PCR para la detección de resistencias antihelmínticas en ovejas infectadas de forma natural de dos explotaciones. La PCR se llevó a cabo a partir de muestras de ADN procedentes de heces de ovejas recogidas los días 0, 7, 15, y 30 después del tratamiento con ABZ, CL y TCBZ., confirmándose una reducción del número de animales positivos en ambos rebaños durante todo el estudio para todos los fármacos, siendo todos los individuos negativos el día 30 pt tras la administración del TCBZ.

- Los resultados obtenidos por PCR se compararon el test de reducción de huevos en heces (FECRT). Por esta técnica, se confirmó para ambos rebaños la resistencia al ABZ y CL de las formas maduras el día 7 pt, con porcentajes del 50,1 y 74,9% respectivamente en la explotación de Palencia, y del 66,6 y 88,8% en la de León. Respecto al TCBZ, en la explotación de Palencia se confirmó la susceptibilidad tanto de las formas maduras como de las inmaduras, y en la de León, la resistencia de las formas maduras el día 7 pt con un porcentaje del 86,8%.

- Para confirmar los resultados de PCR y FECRT, se realizó también un ELISA sándwich en el rebaño de Palencia. El día de la administración de los fármacos, el valor de la densidad óptica (DO) media medida a 450 nm fue superior a 0.150 en todas las ovejas en todos los grupos, lo que confirma que todos los animales estaban infectados. En los días 7, 15 y 30 pt, los valores medios de la DO fueron inferiores a 0.150 sólo después del tratamiento con TCBZ.

- Para comparar las tres técnicas, se calculó el porcentaje de animales positivos de cada explotación con cada tratamiento en todos los días del estudio, observándose que la PCR fue la técnica más sensible ya que detectó un mayor número de positivos.

III. “Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazol in *Fasciola hepatica* isolated from sheep”

- Tras la realización del EHA con dos cepas, una susceptible (SA) y otra resistente (RA) al ABZ, se observó que en la cepa SA, los porcentajes de eclosión disminuyeron al aumentar la concentración del fármaco, oscilando estos valores entre un 8 y un 29%, presentando el control una eclosión del 33%. El porcentaje de huevos desarrollados osciló entre 21 y 70%, siendo del 72% para el control. Además se confirmaron diferencias significativas entre el control y las tres concentraciones más altas en el caso de la eclosión y con las dos más altas para el desarrollo. Para la cepa RA, los porcentajes apenas variaron independientemente de la concentración empleada. Los de eclosión oscilaron entre un 44 a un 53%, con un valor de 49% para el control, y los de desarrollado entre un 69 y un 75%, siendo el control de un 67%. En esta cepa no se observaron diferencias significativas para ninguna concentración.

- Dado que los porcentajes de eclosión y desarrollo variaron tanto entre cepas, se calculó un ratio de cada concentración respecto a su control, confirmando en todos los casos, una mayor eclosión y desarrollo en la cepa RA.

- También se comparó el porcentaje de eclosión y desarrollo en huevos de ovejas infectadas con la cepa RA en los días 0, 7 y 15 pt. En el día 7 pt, los porcentajes de eclosión variaron del 16 al 39%, con un 57% para el control y los de desarrollo entre un 52 a un 80%, con un 71% para el control. En el día 15 pt, estos porcentajes fueron de un

36 a un 52% para la eclosión y de un 36 a un 73% para el desarrollo, siendo los porcentajes para la concentración más alta de un 0 y un 5%, respectivamente.

IV. “Screening of anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolates from sheep by means of an egg hatch assay”

- En primer lugar se llevó a cabo un EHA con huevos procedentes de bilis para comparar dos cepas, ambas procedentes de ovejas infectadas de forma experimental, una susceptible (ST) y otra resistente (RT) al TCBZ. Los porcentajes de eclosión en la cepa ST disminuyeron a medida que aumentamos la concentración del fármaco, oscilando entre un 43% y un 53%, siendo el control de un 63%. También se observaron diferencias significativas entre el control y las dos concentraciones más altas. Por otra parte, el porcentaje de huevos eclosionados en la cepa RT varió de un 19 a un 21%, siendo un 22% en el pocillo control. En esta cepa, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones.

- Se calculó un ratio entre los porcentajes de cada concentración respecto a su control, para determinar cuál de las dos cepas presentaba mayor eclosión, confirmándose que fue la cepa RT.

- Para los ensayos llevados a cabo con huevos procedentes de heces, se compararon dos cepas susceptibles. La cepa ST presentó unos porcentajes del 17 al 23%, observándose diferencias significativas entre el control y la concentración más alta. Para confirmar estos resultados, se realizó otro EHA con una cepa susceptible de campo, la FST, presentando unos porcentajes similares, del 19 al 29%, pero en este caso no se vieron diferencias significativas.

CAPÍTULO V

Discusión general

El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral fue el estudio de la variabilidad genética de diversas poblaciones mundiales de *F. hepatica* mediante el uso de la técnica de PCR de intersecuencias simples repetidas (“Inter Simple Sequence Repeat-PCR”, ISSR-PCR), técnica empleada por primera vez en este parásito. Los resultados obtenidos han sido publicados en el trabajo titulado: **“Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR”**.

La variabilidad genética se estudió entre un total de 40 ejemplares adultos procedentes de diversas localizaciones geográficas como España (León, La Coruña, Cáceres), Reino Unido, Irlanda y México, recogidos a partir de ganado ovino y bovino. La ISSR-PCR se llevó a cabo con primers específicos para determinados microsátélites y que por lo tanto amplifican regiones intermicrosátélites; estos fueron seleccionados a partir de una base de secuencias microsátélites de la Universidad de British Columbia (UBC). Tras la amplificación, las bandas resultantes son secuencias de genoma situadas entre dos primers de microsátélites idénticos, con una orientación opuesta en la cadena de ADN (Zietkiewicz et al., 1994). Mediante el programa informático POPGENE(1.32), se obtuvieron una serie de parámetros para estudiar las posibles variaciones poblacionales como son el número de alelos por locus (A), el número efectivo de alelos por locus (Ae), la diversidad genética total (Ht), la variabilidad intrapoblacional (Hs) y la diferenciación interpoblacional (Gst).

El porcentaje de bandas polimórficas obtenidas utilizando cinco parejas de primers seleccionados fue elevado (71,79%), lo que indica que esta técnica puede producir un importante número de marcadores polimórficos que pueden ser útiles en estudios poblacionales de *F. hepatica*. Sin embargo, cuando se consideraron las poblaciones

individuales, el nivel de bandas polimórficas fue bastante inferior, oscilando entre un 10,26% y un 48,72%. Este bajo rango de diversidad genética dentro de las poblaciones, con una media de 34,40%, indica que una gran proporción de la variación residió en diferencias entre las poblaciones. Resultados similares fueron recopilados por Zhao et al. (2009), los cuales utilizaron la técnica ISSR-PCR para el estudio de poblaciones de *Schistosoma japonicum*, obteniendo un 82,24% de bandas polimórficas entre poblaciones de China y Japón.

En nuestro estudio, todos los valores de A_e fueron inferiores a los de A , lo cual indica que las poblaciones estudiadas no habían alcanzado la máxima variabilidad posible porque uno de los alelos fue más frecuente que otro en los loci polimórficos.

La diferenciación interpoblacional (G_{st}) fue de 0.547, lo que demuestra que un 54,7% de la variación genética se debe a diferencias entre poblaciones frente al 45,3% debido a diferencias entre los individuos de cada población. Este resultado indica un alto nivel de estructuración genética, que también se refleja en los valores de las distancias genéticas de Nei, que van desde 0,091 hasta 0,337. El aislado de Cáceres fue la principal contribuyente al alto valor de diferenciación de la población, ya que cuando se llevó a cabo el análisis con exclusión de esta población, el valor G_{st} se redujo a 0.308. Estos resultados contrastan con los de Vázquez-Prieto et al. (2011), quienes estudiaron tres poblaciones de vacuno españolas utilizando aloenzimas como marcadores y describieron un nivel de diferenciación poblacional de 0.006 y unas distancias de Nei entre 0.003 y 0.010. Esto podría ser debido a que estas poblaciones procedían de la misma región geográfica, dando lugar a una baja diferenciación interpoblacional. Morozova et al. (2002) obtuvieron valores de diferenciación poblacional de 0.078,

utilizando marcadores RAPDs pero las muestras también procedían de una misma región ucraniana.

En otro estudio de Vilas et al. (2012), las distancias de Nei y el valor G_{st} fueron de 0.023-0.094 y 0.087 para vacuno y de 0.033-0.156 y 0.170 para ovino, respectivamente, sugiriendo que en ovejas existía una mayor variación estructural a nivel infrapoblacional. Sin embargo, estas distancias en nuestro estudio fueron menores en ovejas (0.091-0.230) que en las muestras procedentes de ganado bovino (0.150-0.337), lo que indica que las poblaciones de ovino presentaban una estructuración menor. El motivo de no emplear el G_{st} para compararlas, ha sido debido a que no se conocía si los parásitos procedían de uno o varios individuos.

Haciendo referencia al valor de diversidad genética (H) en el estudio de Vilas et al. (2012), éste fue de 0.411 y 0.360 en vacuno y ovino, respectivamente, mientras que en el nuestro, osciló entre 0,109 y 0.177, excluyendo el aislado procedente de Cáceres. Esto se puede atribuir al hecho de que los marcadores analizados en el estudio de estos autores (loci isoenzimáticos y microsatélites) no se pueden considerar como una muestra aleatoria de loci: en primer lugar, los loci isoenzimáticos elegidos son conocidos como polimórficos en sus poblaciones, y en segundo lugar, los microsatélites empleados son altamente polimórficos, detectando muchos alelos por locus. Sin embargo, la ISSR-PCR detecta dos alelos en función de la presencia o ausencia de banda, y se tienen en cuenta todos los loci, ya sean o no polimórficos.

Debido al número limitado de aislados que hemos estudiado en la presente Tesis Doctoral, sería muy interesante continuar los estudios con un número mayor de poblaciones, con diferente localización geográfica para poder conocer con más detalle algunos aspectos de la genética de *F. hepatica*. La ISSR-PCR nos ha proporcionado un

gran número de marcadores polimórficos y mostró que la diversidad genética en las cepas estudiadas de *F. hepatica* está estructurada, encontrándose la variabilidad intrapoblacional al mismo nivel que la diferenciación interpoblacional. Por lo tanto, esta técnica podría ayudar para diferenciar genéticamente variaciones entre cepas de *F. hepatica*, por ejemplo susceptibles o resistentes a determinados fármacos antihelmínticos.

El control de la fasciolosis se basa en una serie de actuaciones donde el primer aspecto clave a tener en cuenta es el diagnóstico temprano y certero de la enfermedad. Para ello actualmente contamos con métodos *in vivo* e *in vitro* con diferente especificidad y sensibilidad. Entre éstos, el más convencional aunque también el más utilizado, es la identificación de huevos en heces mediante sedimentación, aunque solamente presenta una sensibilidad del 30% (Happich y Boray, 1969). Entre los métodos inmunológicos se encuentra el ELISA sándwich para la identificación de antígenos en heces y/osuero (Moustafa et al., 1998) y el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos en suero (Almazán et al., 2001). Actualmente nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una PCR que permite la detección del ADN del parásito a partir de muestras de heces (Martínez-Pérez et al., 2012). El estudio comparado de todos estos métodos, y su aplicación bajo condiciones de campo, ha sido el objetivo del trabajo titulado: **“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”**, que constituye uno de los recopilados en esta Tesis Doctoral.

A diferencia de la PCR descrita por Martínez-Pérez et al. (2012) que amplifica regiones del ADN mitocondrial de *F. hepatica*, en el presente trabajo se puso a punto una PCR que permitiera la detección de *F. hepatica* en heces a partir de unos primers que

amplifican el gen que codifica para el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) del ADN ribosomal. El diagnóstico coprológico mediante técnicas moleculares se ha abordado en diversas ocasiones y en diferentes modelos parásito/hospedador. Por ejemplo, Dinkel et al. (1998), confirmaron una elevada sensibilidad del coprodiagnóstico por PCR en zorros infectados con *Echinococcus multilocularis*. En el actual trabajo la especificidad de la técnica se confirmó analizando heces de animales infectados por *F. hepatica*, animales no infectados y observándose que no existían reacciones cruzadas con heces de ovejas infectadas por nematodos gastrointestinales, helmintos también presentes en ovejas en pastoreo. Para determinar la sensibilidad de la técnica se infectaron experimentalmente ovejas con 200 metacercarias de *F. hepatica* pudiéndose detectar la infección desde la segunda semana p.i. en adelante. Estos resultados concuerdan con los de Martínez-Pérez et al. (2012), quienes también diagnosticaron la infección en la segunda semana p.i. pero mediante una PCR anidada en heces y amplificando una región del ADN mitocondrial; sin embargo, esta PCR requiere un mayor tiempo de realización que la descrita en la presente Tesis Doctoral. Una vez puesta a punto la técnica, la PCR se utilizó para la detección de resistencias a fasciolicidas en dos rebaños de ganado ovino infectados de forma natural y procedentes de las provincias de León y Palencia. Para ello, se llevó a cabo de forma simultánea el ensayo de reducción de huevos en heces (FECRT), la reducción del nivel de coproantígeno en las heces y la reducción de animales positivos mediante PCR en heces tras la administración de tres antihelmínticos; albendazol, clorsulón y triclabendazol. En todos los animales se confirmó la infección el día cero del estudio, día en que se trataron, mediante un recuento fecal de huevos, por coproantígeno y tras realizar la PCR en heces. Posteriormente, se analizó la eficacia de los tres tratamientos mediante la utilización de estas tres técnicas los días 7, 15 y 30 post tratamiento (p.t.).

De los tres fármacos, sólo el triclabendazol es eficaz frente a las formas maduras e inmaduras del parásito (Boray et al., 1983), mientras que el albendazol y clorsulón sólo eliminan las formas maduras (McKellar y Scott, 1990; Geurden et al., 2012) aunque tienen una cierta eficacia frente a las inmaduras (Fairweather y Boray, 1999a). En nuestro estudio, en ambos rebaños se confirmó la resistencia al albendazol y clorsulón en las formas maduras en el día 7 p.t. con porcentajes de reducción del 50,1% y 74,9%, para ambos fármacos respectivamente en el rebaño de Palencia y del 66,6% y 88,8% en el de León. Los huevos presentes los días 15 y 30 p.t. procedían de las fasciolas adultas resistentes y de las inmaduras que habían alcanzado la fase de madurez en ese momento. Respecto al triclabendazol, en la explotación de Palencia se confirmó la susceptibilidad tanto de las formas maduras como inmaduras y en la de León, la resistencia de las formas maduras en el día 7 p.t. con un porcentaje de reducción del 86,6%. Para comparar los resultados del FECRT con la reducción de animales positivos mediante el diagnóstico por PCR en heces, se calculó el número de animales positivos cada día de muestreo mediante la detección de huevos en heces y por PCR. De esta forma se comprobó que el número de animales que seguían infectados tras el tratamiento fue mayor por PCR, por lo que se considera una técnica más sensible para el diagnóstico de la infección. Tal es así, que en el rebaño de Palencia el % de animales positivos tras la administración del albendazol el día 30 p.t. fue del 42,9% tras observar la presencia de huevos en heces, y del 85,7% por PCR.

Con objeto de confirmar los resultados del FECRT y de la reducción de animales positivos mediante el diagnóstico por PCR en heces, se llevó a cabo un ELISA sándwich en la explotación de Palencia para la detección del coproantígeno en heces cada uno de los días del estudio. De esta forma se llevó a cabo el test de reducción de coproantígeno (CRT). Según Valero et al. (2009), la detección del coproantígeno es

posible incluso entre 4 y 5 semanas antes que la detección de huevos en el caso de *F. hepatica* y dos semanas antes en *F.gigantica*. Flanagan et al. (2011) estiman que un tratamiento es eficaz cuando no se detecta el coproantígeno el día 14 p.t., es decir, a las dos semanas p.t. En nuestro estudio se compararon los porcentajes de animales positivos mediante la PCR y el CRT, observándose el mismo porcentaje de animales positivos en cada día del muestreo al administrar clorsulón (42,9%). Respecto al albendazol, los porcentajes también fueron los mismos (100% en el día 7 p.t. y 85,7% en el día 15 p.t.), excepto en el día 30 p.t., donde por PCR fue del 85,7% y por ELISA sándwich del 71,4%. Tras la administración de triclabendazol, los porcentajes de animales positivos los días 7 y 15 p.t. fueron superiores mediante PCR (62,5% y 12,5%, respectivamente) que utilizando el ELISA sándwich (12,5% y 0%), habiendo un 0% el día 30 p.t. utilizando ambas técnicas. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, Lahmar et al. (2007) obtuvieron una sensibilidad del 82,8% por ELISA sándwich respecto a un 25,9% mediante una PCR en heces para la detección de *E. granulosus* en perros. En ese trabajo detectaron el ADN del parásito a los 21 días p.i., antes de la excreción fecal de huevos y para ello, amplificaron el gen que codifica para la enzima Hae III de *Haemophilus aegyptius*.

Flanagan et al. (2011), también compararon los niveles de resistencia en ovinos infectados experimentalmente mediante el FECRT y CRT en cuatro cepas diferentes de *F. hepatica* y obtuvieron resultados similares con ambas técnicas. En nuestro estudio, observamos que en el día 7 p.t. en el grupo del triclabendazol hubo un animal positivo mediante coprología (sedimentación) pero no por ELISA. Este resultado podría tratarse de un falso positivo debido a la presencia de huevos en la vesícula biliar varios días después de la administración de un tratamiento eficaz (Flanagan et al., 2011), hecho también observado por Novolbilský et al. (2012), quienes detectaron un número mayor

de animales positivos por sedimentación que utilizando un kit comercial para detectar el coproantígeno en heces.

Con la finalidad de detectar de forma más sencilla y temprana la presencia de la resistencia antihelmíntica en cepas de *F. hepatica*, otro de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue el desarrollo de métodos *in vitro* y en concreto de un ensayo de eclosión de huevo (*egg hatch assay*, EHA), técnica empleada inicialmente para la detección de resistencias a los bencimidazoles en cepas de nematodos gastrointestinales (Coles et al., 2006). El EHA se basa en la capacidad de los huevos de cepas resistentes de embrionar y eclosionar en concentraciones más altas de antihelmíntico que las de una cepa susceptible (Whitlock et al., 1980). Algunos autores como Álvarez et al. (2009) y Fairweather et al. (2012) han realizado estudios preliminares con cepas susceptibles y resistentes de *F. hepatica* utilizando para ello huevos procedentes de la vesícula biliar de animales infectados. En la presente Tesis Doctoral, incluimos los resultados de un EHA llevado a cabo con huevos de diferentes cepas de *F. hepatica* para evaluar su resistencia al albendazol, en el trabajo publicado con el título: **“Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazol in *Fasciola hepatica* isolated from sheep”**.

En este estudio, se emplearon dos cepas de *F. hepatica*: una susceptible procedente del Reino Unido, y otra de campo (infección natural) resistente al albendazol, procedente de ovinos de la provincia de Palencia (España). Para llevar a cabo los EHAs se aislaron huevos procedentes de las heces y se utilizaron concentraciones de fármaco en un rango de 0.0002 a 2 µg/ml, siendo en este trabajo la primera vez que se utilizan huevos procedentes de heces para el desarrollo de la técnica. En la cepa susceptible, los porcentajes de eclosión y de desarrollo de los huevos disminuían a medida que se

aumentaba la concentración de fármaco, oscilando entre un 8-29% para la eclosión y un 21-70% para el desarrollo embrionario, confirmando de esta forma el efecto del albendazol. Sin embargo, en la cepa resistente al fármaco, los valores del porcentaje de eclosión de huevos oscilaron entre un 44-53% y los de desarrollo entre un 69-75%, porcentajes similares para cada cepa independientemente de la concentración empleada. Álvarez et al. (2009), confirmaron el efecto ovicida del albendazol en huevos procedentes de bilis en una cepa susceptible de *F.hepatica*, obteniendo porcentajes de eclosión muy bajos y próximos a los nuestros (3,7-13,2%), aunque en ese caso las concentraciones probadas fueron entre 0.0135 y 1.35 µg/ml. Canevari et al. (2013), obtuvieron porcentajes de eclosión entre un 13 y 28% en cepas susceptibles, utilizando una concentración de 0.0135 µg/ml y con huevos procedentes de bilis; sin embargo, al utilizar huevos procedentes de cepas con sospecha de resistencia, el porcentaje se incrementó hasta un 75-90% utilizando la misma concentración de fármaco.

Por otra parte, la detección de la resistencia al albendazol también se realizó mediante un EHA con huevos recogidos en heces los días 7 y 15 p.t. tras la administración de este fármaco en un rebaño con sospecha previa de resistencia. Hay que tener en cuenta que el albendazol solamente es eficaz frente a fasciolas adultas, de más de 12 semanas (McKellar & Scott, 1990), por lo que los huevos recuperados el día 7 p.t. procedían de las formas maduras resistentes al tratamiento, y los del día 15 p.t. de nuevo de éstas pero también de formas inmaduras que habían alcanzado la madurez en ese momento. En el caso de los huevos procedentes de las formas inmaduras, éstas se considerarían fasciolas con un menor grado de resistencia, pues no habían sido expuestas al tratamiento antihelmíntico. Tal es así que el día 7 p.t. no se encontraron diferencias entre las concentraciones de fármaco probadas en el porcentaje de eclosión ni de desarrollo de los huevos, que variaron entre un 16-39% y un 52-80%, respectivamente. Los resultados

de los porcentajes de eclosión y desarrollo encontrados en el día 15 p.t. con la concentración máxima (2 µg/ml), fueron del 0 y 5% respectivamente, significativamente menores que para el resto de concentraciones (0,0002 a 0,2 µg/ml). Es por ello que el día 15 p.t. se considera que tiene un perfil con una mayor susceptibilidad que el descrito para el día 7 p.t., ya que en ese momento coinciden dos generaciones de *F. hepatica* con diferentes grados de resistencia.

Continuando con el mismo objetivo del anterior trabajo, nos planteamos el desarrollo de otra técnica *in vitro* pero en este caso para la detección temprana de la RA al triclabendazol en cepas de *F. hepatica* y utilizando de nuevo el EHA. Los resultados están recogidos en la publicación, cuyo título es: **“Screening of anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolates from sheep by means of an egg hatch assay”**.

Para ello, se emplearon tres cepas de *F. hepatica* con diferente grado de resistencia a triclabendazol. Una procedente de Reino Unido (ST) y cuya susceptibilidad fue confirmada en un ensayo anterior por Martínez-Valladares et al. (2010a), otra resistente (RT) procedente de León (España) y caracterizada por Álvarez-Sánchez et al. (2006) y finalmente, una cepa de campo susceptible (FST) procedente de un rebaño de ovejas infectadas de forma natural de la provincia de Palencia (España), cuya susceptibilidad fue confirmada con anterioridad por Robles-Pérez et al. (2013).

El primer objetivo del estudio fue determinar la capacidad ovicida de una formulación comercial de triclabendazol mediante un EHA utilizando para ello huevos procedentes de vesícula biliar de las cepas ST y RT. Anteriormente al presente trabajo, Álvarez et al. (2009) habían probado una formulación de triclabendazol en huevos recogidos de la vesícula biliar de una cepa susceptible y encontraron porcentajes de eclosión que

oscilaron entre el 45-80%, con concentraciones de fármaco entre 2 y 7 $\mu\text{g/ml}$. Ya que estos autores no confirmaron ningún efecto ovicida, en nuestro estudio establecimos un rango de concentraciones mayor, entre 0,05 y 25 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de ST, los porcentajes disminuyeron a medida que se aumentaba la concentración de fármaco, oscilando los mismos entre 43-53%. Se confirmaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de eclosión entre el control (63%) y las dos concentraciones más altas, 5 $\mu\text{g/ml}$ (43%) y 25 $\mu\text{g/ml}$ (45%), sugiriendo por tanto el efecto ovicida del triclabendazol sobre la cepa susceptible. En el caso de RT, los porcentajes de eclosión fueron similares, sin apenas variación, entre un 19-21% y no se observaron diferencias significativas con el control (22%). Recientemente Fairweather et al. (2012) utilizaron huevos de esta misma cepa RT en un EHA y obtuvieron porcentajes de eclosión muy bajos, menores al 2%, por lo que la clasificaron como susceptible. La razón de los diferentes resultados entre estudios podría ser que estos autores emplearon otro fármaco diferente al nuestro, el metabolito sulfóxido de triclabendazol y además a una concentración mayor a la nuestra, 60 $\mu\text{g/ml}$. Debido a que en nuestro estudio los porcentajes de eclosión entre las cepas ST y RT fueron tan distintos, se calculó para cada cepa un ratio de cada concentración con respecto a su control, confirmándose un mayor nivel de eclosión en la cepa resistente que en la susceptible.

Por otra parte, con la finalidad de evitar el sacrificio de animales para llevar a cabo el EHA, se evaluaron los porcentajes de eclosión en cepas susceptibles a partir de huevos recuperados de las heces de animales infectados. Para ello se utilizaron las cepas susceptibles ST y FST, ésta última procedente de animales infectados de forma natural. En la cepa ST, los valores oscilaron entre un 17-23% y se observaron diferencias significativas entre el control (26%) y la concentración más alta empleada de 25 $\mu\text{g/ml}$ (17%) ($p < 0,05$). Para confirmar estos resultados, se realizó el EHA utilizando huevos

procedentes de la cepa de campo FST, obteniéndose porcentajes de eclosión similares a los de ST, entre el 19 y 29%, aunque en este caso no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones y el control (33%). Al comparar los resultados de la cepa ST tras realizar el ensayo con huevos procedentes de bilis y heces, el número de los mismos que eclosionaron en los pocillos control fue menor al aislarlos de las heces (26%) que de la bilis (63%). La causa de estas diferencias es probablemente debido a la presencia de detritus o impurezas en los huevos recogidos de las heces, de tal forma que interfieren en la disponibilidad del fármaco para que tenga lugar su mecanismo de acción en los huevos. En el trabajo anterior de la presente Tesis Doctoral, Robles-Pérez et al. (2014), para detectar la resistencia al albendazol a partir de huevos de *F. hepatica* recuperados de las heces, los porcentajes de eclosión en los pocillos control fueron del 33% utilizando huevos de la cepa susceptible, y del 49% al 71% en el caso de la cepa resistente. Debido a esta gran variabilidad en los porcentajes de eclosión utilizando huevos de heces, será necesario desarrollar un método para estandarizar la manera de recuperar los huevos, antes de poder comparar resultados entre las cepas sensibles y resistentes.

CAPÍTULO VI

Conclusiones

I. “Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR”.

Según nuestro conocimiento, tras utilizar por primera vez la técnica de la ISSR-PCR para conocer la diversidad genética en poblaciones de *F. hepatica* de España, Reino Unido, Irlanda y México, hemos podido concluir que:

- a) La diversidad genética está estructurada de tal forma que la variabilidad intrapoblacional se encuentra al mismo nivel que la diferenciación interpoblacional.
- b) Todas las poblaciones están agrupadas excepto una española procedente de Cáceres. En el resto, se han observado pequeñas distancias génicas entre poblaciones del Reino Unido e Irlanda, por un lado, y las restantes poblaciones españolas y la de México, por otro.

II. “The diagnosis of fasciolosis in faeces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected”.

- a) En condiciones experimentales, es posible detectar la fasciolosis a partir de la segunda semana post infección mediante PCR amplificando un fragmento de la subunidad ITS2. De la misma manera, hemos podido detectar resistencia o susceptibilidad a determinados antihelmínticos en animales infectados de forma natural.
- b) En infecciones naturales, el porcentaje de animales positivos que se detecta mediante PCR es superior que el ensayo de reducción de huevos en heces.

- c) Para detectar resistencia a los antihelmínticos, la PCR es más sensible que el ensayo de reducción de coproantígeno en animales infectados de forma natural, ya que detecta un mayor porcentaje de animales positivos.

III. “Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazol in *Fasciola hepatica* isolated from sheep”.

- a) El ensayo de eclosión de huevos a concentraciones entre 0,2 ng/ml y 2 µg/ml ha resultado ser una técnica adecuada para identificar cepas de *Fasciola hepatica* resistentes y susceptibles al albendazol, aunque es necesario realizar estudios con un número mayor de cepas para confirmar estos resultados.

IV. “Screening anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep by means of an egg hatch assay”.

- a) A partir de una concentración de 5 µg/ml de triclabendazol, hemos confirmado la acción ovicida de este antihelmíntico en huevos obtenidos de la vesícula biliar y se ha comprobado que la eclosión es mayor en cepas resistentes que en las susceptibles.
- b) En los huevos de cepas susceptibles de *Fasciola hepatica* aislados por primera vez de las heces para un ensayo de eclosión de huevos, la técnica no permite concluir que haya diferencias.

CAPÍTULO VII

Referencias bibliográficas

1. **Abbas, A.K., Murphy, K.M. y Sher, A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
2. **Abassi, I., Branzburg, A., Campos-Ponce, M., Abdel Hafez, S.K., Raoul, F., Craig, P.S. y 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.
3. **Abdel-Rahman, S.M., O'Reilly, K.L. y Malone, J.B.** (1998). Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59: 533-537.
4. **Acosta, D., Cristina, J., Uriarte, G., Lanzzeri, S. y Gama, S.** (1989). Estudio preliminar sobre la resistencia conferida a bovinos por metacercarias irradiadas de *Fasciola hepatica* en Uruguay. *Veterinaria* 25: 12-20.
5. **Acuna-Soto, R. y Braun-Roth, G.** (1987). Bleeding ulcer in the common bile duct due to *Fasciola hepatica*. *Am. J. Gastroenterol.* 82: 560-562.
6. **A'Gadir, H., Haroun, E.M. y Gameel, A.A.** (1987). The protective effect of irradiated metacercarias of *Fasciola gigantica* against homologous challenge in sheep. *J. Helminthol.* 61: 137-142.
7. **Agatsuma, T., Arakawa, Y., Iwagami, M., Honzako, Y., Cahyaningsih, U., Kang, S.Y. y Hong, S.J.** (2000). Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitol. Int.* 49: 231-238.
8. **Agatsuma, T., Terasaki, K., Yang, L. y Blair, D.** (1994). Genetic variation in the triploids of Japanese *Fasciola* species, and relationships with other species in the genus. *J. Helminthol.* 68: 181-186.

9. **Ai, L., Dong, S.J., Zhang, W.Y., Elsheikha, H.M., Mahmmod, Y.S., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Shi, Y.L., Huang, W.Y. 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.
10. **Alasaad, S., Granados, J.E., Cano-Manuel, F.J., Meana, A., Zhu, X.Q. y Pérez, J.M.** (2008). Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in southern Spain. *Parasitol. Res.* 102: 751-755
11. **Alasaad, S., Huang, C.Q., Li, Q.Y., Granados, J.E., García-Romero, C., Pérez, J.M. y 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.
12. **Alasaad, S., Li, Q.Y., Lin, R.Q., Martín-Atance, P., Granados, J.E., Díez-Baños, P., Pérez, J.M. y Zhu, X.Q.** (2008). Genetic variability among *Fasciola hepatica* samples from different host species and geographical localities in Spain revealed by the novel SRAP marker. *Parasitol. Res.* 103: 181-186.
13. **Alcaíno, H. y Apt, W.** (1989). Algunos antecedentes sobre la fasciolosis animal y humana. *Mon. Med. Vet.* 11: 14-29.
14. **Allendorf, F.W., Luikart, G. y Aitken, S.N.** (2013). Conservation and the Genetics of Populations. Chichester, UK, Wiley-Blackwell.
15. **Almarza, N.** (1934). Los distomas de la oveja. *Ganadería*, 2 p.7.
16. **Almazán, C., Avila, G., Quiroz, H., Ibarra, F., y Ochoa, P.** (2001). Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and faeces of experimentally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 97: 101-112.

17. **Al-Sabi, M.N., Kapel, C.M., Deplazes, P. y Mathis, A.** (2007). Comparative copro-diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes. *Parasitol. Res.* 101: 731-736.
18. **Álvarez, L., Moreno, G., Moreno, L., Ceballos, L., Shaw, L., Fairweather, I. y Lanusse, C.** (2009). Comparative assessment of albendazole and triclabendazole ovicidal activity on *Fasciola hepatica* eggs. *Vet. Parasitol.* 164: 211-216.
19. **Álvarez, L., Mottier, M.L. y Lanusse, C.E.** (2004). Comparative assessment of the access of albendazole, fenbendazole and triclabendazole to *Fasciola hepatica*: effect of bile in the incubation medium. *Parasitology* 128: 73-81.
20. **Álvarez-Sánchez, M.A.; Mainar-Jaime, R.C.; Pérez-García, J.; Monteagudo-Rodríguez, M.; Martín-Gómez, S. y Rojo-Vázquez, F.A.** (2001). Some problems related to the use of albendazol in sheep flocks for the control of mixed natural infection by gastrointestinal and liver fluke parasites. *18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (Stresa, Italia)
21. **Álvarez-Sánchez, M.A., Mainar-Jaime, R.C., Pérez-García, J. y Rojo-Vázquez, F.A.** (2006). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet. Rec.* 159: 424-425.
22. **Anderson, N., Martin, P.J. y Jarrett, R.G.** (1988). Mmixtures of anthelmintics: A strategy against resistance. *Aust. Vet. J.* 65: 62-64.
23. **Anderson, P.H., Berret, S., Brush, P.J., Herbert, C.N., Parfitt, J.W. y Patterson D.S.** (1977). Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet. Rec.* 100, 43-45.

- 24. Andrews, S.J.** (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.), CABI, Wallingford, 526 pp.
- 25. Andriamanantena, D., Rey, P., Pret, J.L. y Klotz, F** (2005). Distomatoses. *EMC Maladies Infectieuses* 4:105-118.
- 26. Anil, M.H. y Forbes, J.M.** (1980). Feeding in sheep during intraportal infusions of short-chain fatty acids and the effect of liver denervation. *J. Physiol.* 298: 407-414.
- 27. Arias, M.S., Martínez-Carrasco, C., León-Vizcaíno, L., Paz-Silva, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P. y Alonso, F.** (2012). Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. *J. Parasitol.* 98:754-759.
- 28. Arjona, R., Riancho, J.A., Aguado, J.M., Salesa, R. y González-Macías, J.** (1995). Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of the disease. *Medicine (Baltimore)* 74: 13-23.
- 29. Armour, J. y Bogan, J.** (1982). Anthelmintics for ruminants. *Br. Vet. J.* 138: 371-382.
- 30. Armour, J. y Dargie, J.D.** (1974). Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. Successful transfer of immunity by lymphoid cells and by serum. *Exp. Parasitol.* 35: 381-388.
- 31. Backeljau, T., Bruyn, L., Wolf, H., Jordanes, K., Dongen, S., Verhagen, R. y Winnepenninckz, B.** (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11: 119–130.
- 32. Baeza, E., Poitou, I., Villejoubert, C. y Boulard, C.** (1994). Complement depletion in rats infected with *Fasciola hepatica*: in vivo and in vitro studies. *Vet. Parasitol.* 51: 219-230.

- 33. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. y Palucka, K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- 34. Barrett, J.** (1976). Intermediate metabolism in *Ascaris* eggs. En: van den Bossche (ed.), *Biochemistry of Parasites and host-parasite relationships*, pp. 117-123.
- 35. Barton, G.M. y Medzhitov, R.** (2002). Toll-like receptors and their ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270: 81-92.
- 36. Behm, C.A. y Ovington, K.S.** (2000). The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today* 16: 202-209.
- 37. Behm, C.A. y Sangster, N.C.** (1999). *Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects*. In: Fasciolosis, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, pp. 185-224.
- 38. Benchaoui, H.A. y McKellar, Q.A.** (1993). Effect of early treatment with rafoxanide on antipyrine clearance in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica* 23: 439-448.
- 39. Benjamin, M.M.** (1984). Manual de Parasitología clínica veterinaria. Ed. Limusa, México, 421 pp.
- 40. Bennet, E.M., Behm, C., Bryant, C. y Chevis, R.A.F.** (1980). Synergistic action of mebendazole and levamisol in the treatment of a benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 7: 207-214.
- 41. Bennett, C.E.** (1975a). Surface features, sensory structures and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* L. *J. Parasitol.* 61: 886-891.
- 42. Bennett, C.E.** (1975b). Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* L. during growth and maturation in the mouse. *J. Parasitol.* 61: 892-898.

- 43. Bennett, C.E, y Threadgold, L.T.** (1975). *Fasciola hepatica*: development of the tegument during migration in the mouse. *Exp. Parasitol.* 38: 38-55.
- 44. Berasain, P., Goni, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J.P., Frangione, B. y Carmona, C.** (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology* 83: 1-5.
- 45. Berger, A.** (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *B.M.J.* 321:424.
- 46. Berry, C.I. y Dargie, J.D.** (1976). The role of host nutrition in the pathogenesis of ovine fascioliasis. *Vet.Parasitol.* 2: 317-332.
- 47. Biggeri, A., Catelan, D., Dreassi, E., Rinaldi, L., Musella, V., Veneziano, V. y Cringoli, G.** (2007). Multivariate spatially-structured variability of ovine helminth infections. *Geospat. Health* 2:97-104.
- 48. Bildfell, R.J., Whipps, C.M., Gillin, C.M. y Kent, M.L.** (2007). DNA-based identification of a hepatic trematode in an elk calf. *J. Wildl. Dis.* 43: 762-769.
- 49. Bitakaramire, P.K.** (1973). Preliminary studies on the immunization of cattle against fascioliasis using gamma-irradiated metacercariae of *Fasciola gigantica*. En: *Isotopes and Radiation in Parasitology III*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 23-32.
- 50. Boch, J. y Supperer, R.** (1986). *Parasitología veterinaria*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 110-120.
- 51. Boersema, J.H.** (1983). Possibilities and limitations in the detection of anthelmintic resistance. En: Borgsteede, H.M., Henriksen, S.A. y Over, H.J. (Eds), *Facts and Reflections. IV. Resistance of Parasites to Anthelmintics*. (Central Veterinary Institute, Lelystad), pp. 207-218.

- 52. Boray, J.C.** (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 7, 95-210.
- 53. Boray, J.C.** (1981). Fascioliasis and other trematode infections. Recent advances in research of *Fasciola* and other trematodes of animals. *Review of Advances in Parasitology* (W. Slusarsky edit.), Varsovia: 317-339.
- 54. Boray, J.C.** (1982). Fascioliasis. En: *CBC Handbook Series in Zoonoses*, Vol III (J.G Hillyer & C.E. Hopla edit.), CBC Press, Florida: pp. 77-88.
- 55. Boray, J.C.** (1985). Flukes of domestic animals. En: Gaafar, S.M., Howard, W.E. and Marsh, R.E. (Eds). *Parasites, Pest and Predators*. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, pp. 179-218.
- 56. Boray, J.C.** (1993). Synergistic activity of anthelmintics for the control of susceptible and resistant strains of *Fasciola hepatica* for the prevention or management of anthelmintic resistance. International Conference WAAVP pp. 182. Cambridge.
- 57. Boray, J.C.** (1997). Chemotherapy of infections with Fasciolidae. En: *Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis*, ed. J.C. Boray, pp. 83-97. New Jersey: MSD AGVET.
- 58. Boray, J., Crowfoot, P., Strong, M., Allison, J., Schellenbaum, M., von Orelli, M., y Sarasin, G.** (1983). Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113: 315-317.
- 59. Borgsteede, F.H., Moll, L., Vellema, P. y Gaasenbeek, C.P.** (2005). Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Vet. Rec.* 156: 350-351.
- 60. Boyce, W.M., Coutney, C.H. y Loggins, P.E.** (1987). Resistance to experimental infection with *Fasciola hepatica* in exotic and domestic breeds of sheep. *Int. J. Parasitol.* 17: 1233-1237.

- 61. 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. y Brophy, P.M. (2007).** Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82: 104-109.
- 62. Bretagne, S., Guillou, J.P., Morand, M. y Houin, R. (1993).** Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. *Parasitology* 106: 193-199.
- 63. Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Houdijk, J.G.M., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L. y Gennari, S.M. (2003).** Influence of dietary protein supply on resistance to infection with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines Lambs. *Vet. Parasitol.* 134:99-109.
- 64. Broeks, A., Janssen, H.W., Calafat, J. y Plasterk, R.H. (1995).** A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO J.* 14: 1858-1866.
- 65. Brophy, P.M., Crowley, P., Barrett, J. (1990).** Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione S-transferases. *Mol. Bioch. Parasitol.* 39: 155-161.
- 66. Bruce, R.G., Armour, J., Corba, J. (1973).** A further study of epidemiology of ovine fascioliasis in Scotland and its control using molluscicide. *Vet. Rec.* 92: 51-52.
- 67. Bruhn, H. (2005).** A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem. J.* 389, 249-257.
- 68. Burden, D.J., Bland, P., Hammet, N.C. y Hughes, D.L. (1983).** *Fasciola hepatica*: migration of newly excysted juveniles in resistant rats. *Exp. Parasitol.* 56: 277-288.

- 69. Bürger, H.J.** (1992). Helminthen. En: Körting, W (ed.), *Veterinär-medizinische Parasitologie*. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, p. 174.
- 70. Cabán-Hernández, K. y Espino, A.M.** (2013). Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica*. *Acta Trop.* 128: 591-597.
- 71. Campbell, A.J., Sheers, M., Moore, R.J., Edwards, S.R. y Montaque, P.E.** (1981). Proline biosynthesis by *Fasciola hepatica* at different developmental stage *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 91-101.
- 72. Cancela, M., Acosta, D., Rinaldi, G., Silva, E., Durán, R., Roche, L., Zaha, A., Carmona, C. y Tort, J.F.** (2008). A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie.* 90: 1461-1475.
- 73. Canevari, J., Ceballos, L., Sanabria, R., Romero, J., Olaechea, F., Ortiz, P., Cabrera, M., Gayo, V., Fairweather, I., Lanusse, C. y Alvarez, L.** (2013). Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *J. Helminthol.* 19: 1-7.
- 74. Cardozo, E.H. y Nari, A.H.** (1987). *Fasciola hepatica* en ovinos. En: Enfermedades parasitarias. Ed. Hemisferio Sur, Uruguay, pp. 71-111.
- 75. Carmona, C., Dowd, A.J., Smith, A.M. y Dalton, J.P.** (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* *in vitro* prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and biochemical Parasitology* 62: 9-17.
- 76. Carmona, C., McGonigle, S., Dowd, A.J., Smith, A.M., Coughlan, S., McGowran, E. y Dalton, J.P.** (1994). A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 109: 113-118.

- 77. Carroll, J.A. y Forsberg, N.E.** (2007). Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 23: 105-149.
- 78. Celeb, A. y Ultav, R.** (1988). Losses from livers condemnations from fasciolosis over a year at Carsamba district Abatton. *Veter. Hckimlu Deringi Dergisi* 58: 79-81.
- 79. Cervi, L., Cejas, H. y Masih D.T.** (2001). Cytokines envolved in the immunosupressor period in experimental fasciolosis in rats. *Int. J. Parasitol.* 31: 1467-1473.
- 80. Chapman, C.B. y Mitchell, G.F.** (1982a). *Fasciola hepatica*: comparative studies on fascioliasis in rats and mice. *Int. J. Parasitol.* 12: 81-91.
- 81. Chapman, C.B. y Mitchell, G.F.** (1982b). Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 11: 165-178.
- 82. Charbon, J.L., Spahni, M., Wicki, P., y Pfister, K.** (1991). Cellular reactions in the small intestine of rats after infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 77: 425-429.
- 83. Chauvin, A. y Boulard, C.** (1996). Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite* 3, 209-215.
- 84. Chauvin, A., Bouvet, G., y Boulard C.** (1995). Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int. J. Parasitol.* 25: 1227-1241.
- 85. Chen, M.G. y Mott, K.E.** (1990). Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop. Dis. Bull.* 87: 1-38.

- 86. Churcher, T.S., Schwab, A.E., Prichard, R.K. y Basáñez, M.G.** (2008). An analysis of genetic diversity and inbreeding in *Wuchereria bancrofti*: implications for the spread and detection of drug resistance. *Plos Neg. Trop. Dis.* 2, e211.
- 87. Cienfuegos, S., Díaz, P., Vázquez, L., Dacal V., Lago, N., Pato, J., Fernández, G., Panadero, R., Viña, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P. y López, C.** (2009). Prevalencia e intensidad de parasitación en granjas de pequeños rumiantes en Galicia. *AIDA I*: 143-145.
- 88. Cifone, M.G., D'Alò, S., Parroni, R., Millimaggi, D., Biordi, L., Martinotti, S. y Santoni, A.** (1999). Interleukin-2-activated rat natural killer cells express inducible nitric oxide synthase that contributes to cytotoxic function and interferon-gamma production. *Blood.* 93: 3876-3884.
- 89. Clark, E.A. y Ledbetter, J.A.** (1994). How B ad T cells talk to each other. *Nature* 367: 425-428.
- 90. Clery, D., Torgerson, P. y Mulcahy, G.** (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 62: 71-82.
- 91. Coffman, R.L., Sher, A. y Seder, R.A.** (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492-503.
- 92. Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Dlei, T.R., Taylor, M.A. y Waller, P.J.** (1992). World Association for the Advancement of Veterinay Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44: 35-44.
- 93. Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A. y Vercruyse, J.** (2006). The

- detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136: 167-185.
- 94. Constant, S.L. y Bottomly, K.** (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 297-322.
- 95. Coop, R.L. y Holmes, P.H.** (1996). Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26: 951-962.
- 96. Coop, R.L. y Kyriazakis, I.** (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.* 17: 325-330.
- 97. Corba, J., Armour, J., Roberts, R.J. y Urquhart, G.M.** (1971). Transfer to immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. *Res. Vet. Sci.* 12: 292-295.
- 98. Corba, J., Varady, M., Praslicka, J., Tomasovica, O.** (1996). Efficacy of IVOMEC-F against naturally acquired gastrointestinal worms, lungworms (*Dictyocaulus filaria*) and liver flukes (*Fasciola hepatica*) in sheep. *Helminthol.* 33: 133-135.
- 99. Cordero del Campillo, M. et al.** (1980). Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Madrid, 152 pp.
- 100. Cordero del Campillo, M., Castañón, L. y Reguera, A.** (1994). Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. 2ª ed. Secretariado de Publicaciones. Universidad de León. 650 pp.
- 101. Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A.** (1999). (Coord.). Parasitología Veterinaria. Ed. Interamericana, Madrid, 968 pp.

- 102. Cornell, S.J., Isham, V.S., Smith, G., Grenfell, B.T.** (2003). Spatial parasite transmission, drug resistance, and the spread of rare genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7401-7405.
- 103. Corvo, I., Cancela, M., Cappetta, M., Pi-Denis, N., Tort, J.F. y Roche, L.** (2009). The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167: 41-47.
- 104. Creaney, J., Spithill, T.W., Thompson, C.M., Wilson, L.R., Sandeman, R.M. y Parsons J.C.** (1995). Attempted immunisation of sheep against *Fasciola hepatica* using gamma-irradiated metacercariae. *Int. J. Parasitol.* 25: 853-866.
- 105. Criscione, C.D., Anderson, J.D., Sudimack, D., Subedi, J., Upadhayay, R.P., Jha, B., Williams, K.D., Williams-Blangero, S. y Anderson, T.J.** (2010). Landscape genetics reveals focal transmission of a human macroparasite. *Plos Neg. Trop. Dis.* 4, e665.
- 106. Criscione, C.D. y Blouin, M.S.** (2005). Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends Parasitol.* 21:212-217.
- 107. Crossland, N.O., Jonstone, A., Beaumont, G. y Bennet, M.S.** (1977). The effect of control of chronic fascioliasis on the productivity of lowland sheep. *Br. Vet. J.* 133: 518-525.
- 108. Cruz-Silva, J.A., Mendonça, M.M. y Alfonso-Roque, M.M.** (1971). Étude comparative de la fasciolose des boins en Portugal Metropolitain et á l'île de Santiago (Cap Vert). Conditions favorables à sa dissemination et possibilité de l'erradication. *Comptes-Rendues, I Muticol. Europ. Parasitol.*, Rennes, pp. 44.

- 109. Cutroneo, K.R.** (2007). TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair Regen.* 15: 54-60.
- 110. Dalton, J.P. y Brindley, P.J.** (1997). Proteases of trematodes. En: Fried, B. y Craczyk, T.K. (Eds.). *Advances in trematode biology*. CRC Press, Baton Raton y NuevaYork, pp 265-308.
- 111. Dalton, J.P., McGonigle, S., Rolph, T.P. y 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.
- 112. Dalton, J.P. y Mulcahy, G.** (2001). Parasite vaccines – a reality? *Vet. Parasitol.* 98: 149-167.
- 113. Daniel, R. y Mitchell, S.** (2002). Fasciolosis en cattle and sheep. *Vet. Rec.* 151: 219.
- 114. Dar, Y., Rondelaud, D. y Dreyfuss, G.** (2003). Cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola gigantica* of distinct geographical origins. *Parasitol. Res.* 89: 185-187.
- 115. Dargie, J.D.** (1981). Blood protein turnover in parasitized ruminants. In: *Isotopes and Radiation in parasitology IV*. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp.155-170.
- 116. Dargie, J.D.** (1987). The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *Int. J.Parasitol.* 17: 453-463.
- 117. Dargie, J.D. y Mulligan, W.** (1971). The onset and development of anaemia and hypoalbuminaemia in rabbits infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.* 81:187-202.

- 118. Dawes B.** (1961). On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of an experimental host, the mouse: a histological picture. *Journal of Helminthology* R.T. Leiper supplement, 41-52.
- 119. Dawes, B.** (1963a). Some observations of *F. hepatica* during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitology* 53: 135-143.
- 120. Dawes, B.** (1963b). Hyperplasia of the bile duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 53: 123-133.
- 121. Dawes, B.** (1964). A preliminary study of the prospect of inducing immunity in fascioliasis by means of infections with x-irradiated metacercarial cysts and subsequent challenge with normal cysts of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 54: 369-389.
- 122. Dawes, B. y Hughes, D.L.** (1964). Fascioliasis: the invasive stages of *Fasciola hepatica* in mammalian hosts. *Adv. Parasitol.* 2: 97-168.
- 123. Del Río Lozano, J.** (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León* 13:211-253.
- 124. Dennis, W.R., Stone, W.M. y Swanson, L.E.** (1954). A new laboratory and field diagnostic test for fluke over in feces. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 124: 47-50.
- 125. Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K. y Avery, L.** (2000). The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2674-2679.
- 126. Didier, A. y Loor, F.** (1996). The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7: 745-751.

- 127. Diefenbach, A., Schindler, H., Rollinghoff, M., Yokoyama, W.M., Bogdan, C.** (1999) Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science* 284: 951-955.
- 128. Díez-Baños, M.A.** (1976). Influencia de la temperatura en el desarrollo de los huevos de *Fasciola hepatica*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo.
- 129. 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.
- 130. Díez-Baños, N., Martínez-Delgado, A. e Hidalgo-Argüello, M.R.** (2006). Estudio parasitológico del ganado ovino en la provincia de León (España) mediante análisis coprológico. *XIV Con. Int. Fed. Mediterránea de San. Y Prod. de rumiantes. Lugo- Santiago de Compostela*.
- 131. Dinkel, A., von Nicksich-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R. y 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.
- 132. Dixon K.E.** (1965). The structure and histochemistry of the cyst wall of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology* 55: 215-226.
- 133. Dobson, R.J., LeJambre, L. y Gill, J.H.** (1996). Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int. J. Parasitol.* 26: 993-1000.

- 134. Domke, A.V., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S. y Stuen, S.** (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Vet. Parasitol.* 194:40-48.
- 135. Dow, C., Ross, J.G. Y Tood, J.R.** (1968). The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 58: 120-135.
- 136. Duffus, W.P.H. y Franks, D.** (1980). In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. Exp.Immunol.* 41: 430-440.
- 137. Duménigo, B.E., Espino, A.M., Finlay, C.M. y 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
- 138. El-Shabrawi, M., el-Karaksy, H., Okasha, S. y el-Hennawy, A.** (1997). Human fascioliasis: clinical features and diagnostic difficulties in Egyptian children. *J. Trop. Pediatr.* 43: 162-166.
- 139. Entrocasso, C., Alvarez, L., Manazza, J., Lifschitz, A., Borda, B., Virkel, G., Mottier, L. y Lanusse, C.** (2008). Clinical efficacy assessment of the albendazole ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Vet. Parasitol.* 155: 249-256.
- 140. Epe, C., Coati, N. y Schnieder, T.** (2004) Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 111:243-247.
- 141. Espino, A.M. e Hillyer, G.V.** (2004). A novel *Fasciola hepatica* saponinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J. Parasitol.* 90: 876-879.

- 142. Esteban, J.G., González, C., Bargues, M.D., Angles, R., Sánchez, C., Náquira, C. y Mas-Coma, S.** (2002). High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Trop. Med. Int Health* 7: 339-348.
- 143. Estes, D.M. y Brown, W.C.** (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90: 1-10.
- 144. Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A. y 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.
- 145. Fagbemi, B.O., Obarisiagbon, I.O. y Mbuh, J.V.** (1995). Detection of circulating antigen in sera of *Fasciola gigantica*-infected cattle with antibodies reactive with a *Fasciola*-specific 88-kDa antigen. *Vet. Parasitol.* 58: 235-246.
- 146. Fairweather, I.** (2005). Triclabendazole, new skills to unreveal an old(ish) enigma. *J. Helminthol.* 79: 227-234.
- 147. Fairweather, I., Anderson, H.R. y Baldwin, T.M.** (1987). *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment *in vitro* with the deacetylated (amine) metabolite of diamphenethide. *Parasitol. Res.* 73: 99-106.
- 148. Fairweather, I. y Boray, J.C.** (1999a). Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. *Vet. J.* 158: 81-112.
- 149. Fairweather, I. y Boray, J.C.** (1999b). Mechanisms of fasciolicide action and Drug Resistance in *Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis. Dalton J.P. (Ed.), pp. 225-276.
- 150. Fairweather, I., Holmes, S.D. y Threadgold, L.T.** (1984). *Fasciola hepatica*: motility response to fasciolicides *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 57: 209-224.

- 151. Fairweather, I., McShane, D.D., Shaw, L., Ellison, S.E., O'Hagan, N.T., York, E.A., Trudgett, A. y Brennan, G.P.** (2012). Development of an egg hatch assay for the diagnosis of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Proof of concept. *Vet. Parasitol.* 183: 249-259.
- 152. Fairweather, I., Threadgold, L.T. y Hanna, R.E.B.** (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. En: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.), CABI, Wallingford, pp.47-111.
- 153. Fawzy, R.K., Salem, A.E. y Osman, M.M.** (1992). Ultrasonographic findings in the gall bladder in human fascioliasis. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 22: 827-831.
- 154. Fearon, D.T. y Locksley R.M.** (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-54.
- 155. Ferre, I., Barrio, J.P., González-Gallego, J. y Rojo-Vázquez, F.A.** (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet. Parasitol.* 55: 71-79.
- 156. Ferre, I., Calvo, E. y 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.
- 157. Ferre, I., López, P., Gonzalo-Orden, M., Julian, M.D., Rojo-Vázquez, F.A. y González-Gallego, J.** (1995a). The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitol. Res.* 81: 127-131.
- 158. Ferre, I., López, P., Rojo-Vázquez, F.A. y González-Gallego, J.** (1996). Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* 62:93-100.

- 159. Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. y Rojo-Vázquez. F.A.** (1995b). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in northwestern Spain. *Parasitol. Res.* 81: 137-142.
- 160. Ferre, I., Ortega-Mora, L.M. y 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.
- 161. Ferre-Pérez, I.** (1994). *Estudios sobre fasciolosis ovina.* (Tesis Doctoral). Servicio de Publicaciones, Universidad de León, 61 pp.
- 162. Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A.S., Sample, J.V. y Paul, W.E.** (1988). IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.* 141: 2335-2341.
- 163. Flanagan, A.M.** (2010). *Development of diagnostic tests for the detection of resistance to triclabendazole in Fasciola hepatica.* (Tesis Doctoral). University of Belfast.
- 164. Flanagan, A., Edgar, H.W.J., Gordon, A., Hanna, R.E.B., Brenan, G.P. y Fairweather, I.** (2011). Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 176: 170-176.
- 165. Fletcher, H.L., Hoey, E.M., Orr, N., Trudgett, A., Fairweather, I. y Robinson, M.W.** (2004). The occurrence and significance of triploidy in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 128: 69-72.
- 166. Flores Lasarte, M.** (1981). Enfermedades parasitarias: Incidencia económica. *Boletín de Información Agraria "El Campo"* 83: 37.

- 167. Flynn, R.J., Mulcahy, G. y Elsheikha, H.M.** (2010). Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet. Parasitol.* 169: 235-240.
- 168. Foote, S.J., Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M., Forsyth, K., Kemp, DJ. Y Cowman, A.F.** (1990). Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345: 255–258.
- 169. Fox, M.T.** (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet. Parasitol.* 72: 285-297.
- 170. Gaasenbeek, C.P., Moll, L., Cornelissen, J.B., Vellema, P. y Borgsteede, F.H.** (2001). An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* 95: 37-43.
- 171. Gaasenbeek, C.P., Over, J.H., Noorman, N. y de Leeuw, W.A.** (1992). An epidemiological study of *Fasciola hepatica* in The Netherlands. *Vet. Q.* 14:140–144.
- 172. Gabrashanska, M., Teodorova, S.E. y 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.
- 173. Gajewska, A., Smaga-Kozłowska, K. y Wisniewski, M.** (2005). Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiad Parazytol.* 1: 115-123.
- 174. Galtier, P., Larrieu, G., Tufenkji, A.E. y Franc, M.** (1986). Influence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Drug Metab. Dispos.* 14: 137-141.

- 175. Gameel, A.A.** (1982). *Fasciola hepatica*: Plasma ascorbic acid, plasma iron and iron-binding capacity in experimentally infected sheep. *Zeitsc. Für Parasit.* 68: 185-189.
- 176. García-Pérez, A.L. y Juste-Jordán, R.A.** (1987). Helminths parasites of the sheep in the País Vasco. *Rev Iber Parasitol (Suppl)*: 195-113.
- 177. Gasser, R.B.** (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 84: 229-258.
- 178. Gasser, R.B.** (2006). Molecular technologies in parasitology, with an emphasis on genomic approaches for investigating parasitic nematodes. *Parassitologia* 48: 9-11.
- 179. Genicot, B., Moulihgneau, F. y Lekeux, P.** (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *Journal of Vet. Med.* 38: 203-208.
- 180. Geurden, T., Bartram, D., Van Brussel, L., Bo, L., Scott-Baird, E. y Rugg, D.,** (2012). Evaluation of the comparative efficacy of a moxidectin plus triclabendazole pour-on solution against adult and immature liver fluke, *Fasciola hepatica*, in cattle. *Vet. Parasitol.* 189: 227-232.
- 181. Gökçe, M., Sahiner, U., Unal, S., Parlakay, A., Oncel, I., Saçkesen, C., Kara, A. y Gümrük, F.** (2011). An unexpected parasitic cause of hypereosinophilia: fascioliasis. *Turk. J. Pediatr.* 53: 111-113.
- 182. Gold, D. y Goldberg, M.** (1976). Effect of light and temperature of hatching in *Fasciola hepatica* (Trematoda: Fasciolidae). *Israel J. Zoology*, 35: 178-185.
- 183. Gómez-Bautista, M. y Rojo-Vázquez, F.A.** (1994a). Etiología y Biología (Fasciolosis). *Ovis* 34: 11-19.

- 184. Gómez-Bautista, M. y Rojo-Vázquez, F.A.** (1994b). Tratamiento, Profilaxis y Control (Fasciolosis). *Ovis* 34: 53-59.
- 185. González, P., Tuñón, M.J., López, P., Díez, N. y González, J.** (1991). Hepatic disposition of organic anions in rats infested with *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 73: 396-402.
- 186. González-Lanza, C., Manga-González, Y., Del-Pozo-Carnero, P. e Hidalgo-Argüello, R.** (1989). Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Vet. Parasitol.* 34, 35-43.
- 187. Gonzalo-Orden, M., Millán, L., Alvarez, M., Sánchez-Campos, S., Jiménez, R., González-Gallego, J. y Tuñón, M.J.** (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. *Parasitol. Res.* 90: 359-364.
- 188. Goose, J.** (1978). Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by *Fasciola hepatica*. *Nature* 275: 216-217.
- 189. Gottschall, D.W., Theodorides, V.J. y Wang R.** (1990). The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol. Today* 6: 115-124.
- 190. Graczyk, T.K. y Fried, B.** (1999). Development of *Fasciola hepatica* in the intermediate host. En: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, pp.31-46.
- 191. Gunaratne, S.P., Chandrasiri, A.D., Hemalatha, W.A.P. y Roberts, J.A.** (1993). Feed resource base for scavenging village chickens in Sri Lanka. *Trop. Anim. Health Prod.* 26: 249-257.
- 192. Haçariz, O., Sayers, G., Flynn, R.J., Lejeune, A. y Mulcahy, G.** (2009). IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep. *Parasite Immunol.* 31: 613-622.

- 193. Hagan, P.** (1993). IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol.* 15: 1-4.
- 194. Halferty, L., Brennan, G.P., Trudgett, A., Hoey, E. y Fairweather, I.** (2009). Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 159: 126-138.
- 195. Han, J.K., Jang, H.J., Choi, B.I., Kim, S.H., Kim, T.K., Won, H.J., Kim, Y.I. y Cho, S.Y.** (1999). Experimental hepatobiliary fascioliasis in rabbits: a radiology-pathology correlation. *Invest. Radiol.* 34: 99-108.
- 196. Hanna, R.E.B.** (1980a). *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Exp Parasitol*, 50: 155-70.
- 197. Hanna, R.E.B.** (1980b). *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.*, 50: 103-114.
- 198. Hanna, R.E., Edgar, H.W., McConnell, S., Toner, E., McConville, M., Brennan, G.P., Devine, C., Flanagan, A., Halferty, L., Meaney, M., Shaw, L., Moffett, D., McCoy, M. y Fairweather I.** (2010). *Fasciola hepatica*: histological changes in the reproductive structures of triclabendazole (TCBZ)-sensitive and TCBZ-resistant flukes after treatment in vivo with TCBZ and the related benzimidazole derivative, Compound Alpha. *Vet. Parasitol.* 168: 240-254.
- 199. Hanna, R.E., Scarcella, S., Solana, H., McConnell, S. y Fairweather, I.** (2012). Early onset of changes to the reproductive system of *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with triclabendazole. *Vet. Parasitol.* 184: 341-347.
- 200. Happich, F.A. y Boray, J.C.** (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Aust. Vet. J.* 45: 326-328.

- 201. Harmsen, M.M., Cornelissen, J.B., Buijs, H.E., Boersma, W.J., Jeurissen, S.H. y van Milligen, F.J.** (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int. J. Parasitol.* 34: 675-682.
- 202. Haroun, E.M. e Hillyer, G.V.** (1986). Resistance to Fasciolosis – a review. *Vet. Parasitol.* 20: 63-93.
- 203. Haroun, E.M. y Hussein, M.F.** (1975) Clinico-pathological studies on naturallyoccurring bovine fascioliasis in the Sudan. *J. Helminthol.* 49: 143-152.
- 204. Haseeb, M.A. y Fried, B.** (1997). Modes of transmission of trematode infections and their control. En: Fried, B. y Graczyk, T.K. (Eds). *Advances in Trematode Biology*, Florida, pp 31-56.
- 205. Hawkins, C.D. y Morris, R.S.** (1978). Depression of productivity in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 4: 341-351.
- 206. Hein, W.R. y Harrison, G.B.** (2005). Vaccines against veterinary helminths. *Vet. Parasitol.* 132: 217-222.
- 207. Heneberg, P.** (2013). Phylogenetic data suggest the reclassification of *Fasciola jacksoni* (Digenea: Fasciolidae) as *Fascioloides jacksoni comb. nov.* *Parasitol. Res.* 112: 1679-1689.
- 208. Hidalgo, M.R., Díez-Baños, N., Calvo, E. y Rojo-Vázquez, F.A.** (1995). Estudio parasitológico en el ganado ovino de la provincia de Burgos. *Med. Vet.* 6: 397-405.
- 209. Hillyer, G.V.** (1987). Heterologous resistance in schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 171-174.

- 210. Hillyer, G.V.** (1995). Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa *Fasciola hepatica* antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 90: 249-253.
- 211. Hillyer, G.V. y Soler de Galanes, M.** (1991). Initial feasibility studies of the fast-ELISA for the immunodiagnosis of fascioliasis. *J. Parasitol.* 77: 362-365.
- 212. Hoover, R.C., Lincoln, S.D., Hall, F.R. y Wescott, R.** (1984). Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* to cattle in northwestern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 695-698.
- 213. Hope-Cawdery, M.J.** (1975). Preliminary observations on the availability of infective metacercariae on reclaimed peat pastures in western Ireland. H.J. Over, J. Armour (Eds.), *Facts and Reflections II. Workshop on Fascioliasis*, Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, pp. 19-27.
- 214. Hope-Cawdery, M. J.** (1976). The effects of fascioliasis on ewe fertility. *British Veterinary Journal* 132:568-575.
- 215. Hope-Cawdery, M.J., Gettinby, G. y Grainger, J.N.R.** (1978). Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. En: *Weather and Parasitic Animal Disease*. World Meteorological Organisation Technical Note N° 159, pp 21-38.
- 216. Hope-Cawdery, M.J., Stickland, K.L., Conway, A. y Crowe, P.J.** (1977). Production effects of liver fluke in cattle. I. The effects of infection on live weight gain, food intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Veterinary Journal.* 133: 145-159.
- 217. Hopkins, D.R.** (1992). Homing in on helminths. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 626-634.

- 218. Hourdin, P., Rondelaud, D. y Cabaret, J.** (1993). The development of *Fasciola hepatica* parthenitae in *Lymnaea truncatula* by modification of *Muellerius capillaris* infection. *Int. J. Parasitol.* 23: 235-243.
- 219. Howell, R.M.** (1966). Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature.* 209: 713-714.
- 220. Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A. y 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.
- 221. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra A. y Murphy, K.M.** (1993). Development of Th1 CD4+ cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.
- 222. Huang, W.Y., He, B., Wang, C.R. y Zhu, X.Q.** (2004). Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Vet. Parasitol.* 120: 75-83.
- 223. Hughes, A.** (1962). Observations on the immunology of *Fasciola hepatica* infections in mice and rabbits. *Parasitology* 52: 4.
- 224. Hughes, D.L., Hanna, R.E. y Symonds, H.W.** (1981). *Fasciola hepatica*: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. *Exp. Parasitol.* 52: 271-279.
- 225. Hughes, D.L., Harness, E. y Doy T.G.** (1976). The establishment and duration of *Fasciola hepatica* infections in two strains of rats and the development of acquired resistance. *Res. Vet. Sci.* 20: 207-211.

- 226. Hughes, D.L., Treacher, R.J. y Harness, E.** (1973). Plasma enzyme change in goats with *Fasciola hepatica* and the effect of nitroxylinil. *Res. Vet. Sci.* 15: 249-255.
- 227. Hurtrez-Boussès, S., Durand, P., Jabbour-Zahab, R., Guégan, J.F., Meunier, C., Bargues, M.D., Mas-Coma, S. y Renaud, F.** (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Mol. Eco. Notes* 4: 689-690.
- 228. Itagaki, T., Kikawa, M., Sakaguchi, K., Shimo, J., Terasaki, K., Shibahara, T. y Fukuda, K.** (2005a). Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 131: 679-685.
- 229. Itagaki, T., Kikawa, M., Terasaki, K., Shibahara, T. y Fukuda, K.** (2005b). Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 1115-1118.
- 230. Itagaki, T. y Tsutsumi, K.** (1998). Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *Int. J. Parasitol.* 28: 777-781.
- 231. Itagaki, T., Tsutsumi, K.I., Ito, K. y Tsutsumi, Y.** (1998). Taxonomic status of the Japanese triploid forms of *Fasciola*: comparison of mitochondrial ND1 and COI sequences with *F. hepatica* and *F. gigantica*. *J. Parasitol.* 84: 445-448.
- 232. Jackson, F. y Coop, R.L.** (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: 95-107.

- 233. Jankovic, D., Liu, Z. y Gause, W.C.** (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22: 450-457.
- 234. Jemli, M.H., Braun, J.P., Dorchies, P., Romdhane M.N. y Kilani, M.** (1993). Exploration biochimique et hematologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 169: 241-249.
- 235. Jennings F.W.** (1976). The anaemias of parasitic infections. En: Soulsby, E.J.L. (Ed.). *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academic Press, Nueva York, pp. 41-67.
- 236. Jiang, S.X., Bayón, J.E., Ferre, I., Mao, X.Z. y González-Gallego, J.** (2000). Effect of experimental fasciolosis on antipyrine metabolism and clearance in water buffaloes. *Vet.Parasitol.* 88: 177-186.
- 237. Jones, A.** (2002). Family *Fasciolidae* Railliet 1895. En: Gibson, Jones, Bray (Eds.), *Keys to the Trematoda*, CAB International Publishing, Wallingford and the Natural History Museum, London, UK, vol. 1, 79-95.
- 238. Jones, P. y George, A.** (2005). Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *Int. J. Parasitol.* 35: 555-566.
- 239. Kahn, L.P., Knox, M.R., Gray, G.D., Lea, J.M. y Walkden-Brown, S.W.** (2003). Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet. Parasitol.* 112: 211-225.
- 240. Kantzoura, V., Kouam, M.K., Demiris, N., Feidas, H. y 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.

- 241. Katsoulos, P.D., Christodoulopoulos, G., Karatzia, M.A., Pourliotis, K. y Minas, A.** (2011). Liver flukes promote cholelithiasis in sheep. *Vet. Parasitol.* 179: 262-265.
- 242. Keegan, P.S. y Trudgett, A.** (1992). *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasit. Immunol.* 14: 657-669.
- 243. Kelly, W.R.** (1993). The liver and biliary system. En: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. y Palmer N. (eds.). *Pathology of domestic animals*. pp. 319-407.
- 244. Kelly, M.E. y Chan, A.C.** (2000). Regulation of B cellfunction by linker proteins. *Curr. Opin Immunol.* 12: 267-275.
- 245. Kendall, S.B.** (1965). Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan host. *Adv. Parasitol.* 3: 59-98.
- 246. Kendall, S.B. Y Parfitt, J.W.** (1962). The chemotherapy of fascioliasis. *British Veterinary Journal* 118: 1-10.
- 247. Khalil, L.F.** (1961). On the capture and destruction of miracidia by *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta). *J. Helminthol.* 35: 269-274.
- 248. Kohyama, M., Sugahara, D., Hosokawa, H., Kubo, M. y 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.
- 249. Koie, M., Christense, N.O. y Nansen, P.** (1976). Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Fasciola hepatica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 51: 79-90.

- 250. Konopka, B.** (1993). Occurrence of parasites in slaughter animals in Kielce region (central Poland) in 1987-1992. *Medycyna Weterynaryjna* 49: 373-374.
- 251. Kouider, S.A. and Kolb, E.** (1994). Content of ascorbic acid, glucose, total protein, ALT and AST blood plasma from healthy and parasitized sheep before and after intravenous injection of ascorbic acid solution. *Mon. Für Vet.* 49: 135-141.
- 252. 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.
- 253. Krämer, F. y Schnieder, T.** (1998). Sequence heterogeneity in a repetitive DNA element of *Fasciola*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1923-1929.
- 254. Lacey, E., Brady, R.L., Prichard, R.K. y Watson, T.R.** (1987). Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet. Parasitol.* 23: 105-119.
- 255. Lacey, E. y Prichard, R.K.** (1986). Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Mol. Bioche. Parasitol.* 189: 171-181.
- 256. Lagrange, E. y Gutmann, A.** (1961). Sur l'infestation experimentale de la souris par *Fasciola hepatica*. *Rivista di Parassitologia* 22: 93-101.
- 257. Lahmar, S., Lahmar, S., Boufana, B., Bradshaw, H. y Craig, P.S.** (2007). Screening for *Echinococcus granulosus* in dogs: Comparison between arecoline purgation, coproELISA and coproPCR with necropsy in pre-patent infections. *Vet. Parasitol.* 144: 287-292.
- 258. Lane, G.** (1998). Anthelmintic resistance. *Vet. Rec.* 143: 232.

- 259. Lang, B.Z., Hall, R.F., Kirstein, K.W. y Wescott, R.B.** (1980). Reduced reproductive potential of *Fasciola hepatica* surviving in cattle treated with albendazole. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 75: 1853-1857.
- 260. Leclipteux, T., Torgerson, P.R., Doherty, M.L., McCole, D., Protz, M., Farnir, F. y Losson, B.** (1998). Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet. Parasitol.* 77: 103-114.
- 261. Lee, C.G., Homer, R.J., Cohn, L., Link, H., Jung, S., Craft, J.E., Graham, B.S., Johnson, T.R. y 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: 35466-74.
- 262. Lehner, R.P. y Sewell, M.M.H.** (1979). Attempted immunization of laboratory animals with metabolic antigens of *Fasciola hepatica*. *Vet. Sci. Comm.* 2: 337-340.
- 263. Li, Q.Y., Dong, S.J., Zhang, W.Y., Lin, R.Q., Wang, C.R., Qian, D.X., Lun, Z.R., Song, H.Q. y Zhu, X.Q.** (2009). Sequence-related amplified polymorphism, an effective molecular approach for studying genetic variation in *Fasciola* spp. of human and animal health significance. *Electrophoresis* 30: 403-409.
- 264. Lin, R.Q., Dong, S.J., Nie, K., Wang, C.R., Song, H.Q., Li, A.X., Huang, W.Y. y Zhu, X.Q.** (2007). Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. *Parasitol. Res.* 101:813-817.

- 265. Lincke, C.R., Broeks, A., The, I., Plasterk, R.H. y Borst, P.** (1993). The expression of two P-glycoprotein (Pgp) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans* is confined to intestinal cells. *EMBO J.* 12: 1615-1620.
- 266. Lincke, C.R., The, I., van Groenigen, M. y Borst, P.** (1992). The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 228: 701-711.
- 267. López-Abán, J., Casanueva, P., Nogal, J., Arias, M., Morrondo, P., Diez-Baños, P., Hillyer, G.V., Martínez-Fernández, A.R. y 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.
- 268. Lubega, G.W. y Prichard, R.K.** (1991). Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Exp. Parasitol.* 73: 203-213.
- 269. Luzón-Peña, M., Cerrada, C., Meana, A. y Gómez-Bautista, M.** (1997). Prevalencia de fasciolosis en ovino en áreas de alta producción de España. *Albóitar* 11:16.
- 270. Luzón-Peña, M., Manga-González, Y. y Ramajo, V.** (1994a). Epidemiología (Fasciolosis). *Ovis* 34: 21-32.
- 271. Luzón-Peña, M., Rojo-Vázquez, F.A. y Gómez-Bautista, M.** (1992). The overwintering of *Fasciola hepatica* eggs under semi-arid and temperate Mediterranean climate (Madrid, Spain). *J. Vet. Med. Ser. B.* 39: 369-375.
- 272. Luzón-Peña, M., Rojo-Vázquez, F.A., y Gómez-Bautista, M.** (1994b). The overwintering of eggs, intramolluscal stages and metacercarie of *Fasciola*

hepatica under temperatures of a Mediterranean area (Madrid, Spain). *Vet. Parasitol.* 55:143-148.

- 273. Maizels, R.M., Bundy, D.A., Selkirk, M.E., Smith, D.F., y Anderson, R.M.** (1993). Immunological modulation and evasion by helminth parasite in human population. *Nature* 365: 797-805.
- 274. Malek, E.A.** (1962). *Laboratory Guide and Notes por Medical Malacology.* Burgess Publishing Company, Minneapolis, 162 pp.
- 275. Malone, J.B.** (1986). Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. (Food animal Pract.)* 2: 261-275.
- 276. Mandal, S., Mukhopadhyay, S.K., Ganguly, S. y Jana, S.** (2012). Immunodiagnosis as an aid for early detection of *Fasciola gigantica* by glutathione S-transferase (GST). *J. Parasit. Dis.* 36: 207-209.
- 277. Manga-González M.Y., González-Lanza, C., Pozo-Carnero, M.P. e 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.
- 278. Mansour, M.M., Dixon, J.B., Clarkson, M.J., Carter, S.D., Rowan, T.G.y Hammet, N.C.** (1990). Bovine immune recognition of larval *Ostertagia ostertagi* antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24: 361-371.
- 279. Marcos, L.A., Terashima, A. y Gotuzzo, E.** (2008). Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21: 523-530.
- 280. Marcos, L.A., Yi, P., Machicado, A., Andrade, R., Samalvides, F., Sánchez, J. y Terashima, A.** (2007). Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *J. Helminthol.* 81:381-386.

- 281. 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.
- 282. Marley, S.E., Corwin, R.M. y Hutcheson, D.P.** (1996). Effect of *Fasciola hepatica* on the productivity of beef steers from pasture through feedlot. *Agri-Practice* 17: 18-23.
- 283. Martin, P.J., Anderson, N. y Jarrett, R.G.** (1989). Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Aust. Vet. J.* 62: 38-43.
- 284. Martínez-Cruz, S., Rodríguez, R., Becerra, C. y Martínez-Moreno, A.** (1993). Seroprevalencia de la fasciolosis caprina en Andalucía. *Acta Parasitol. Port.* 1:209.
- 285. Martínez-Moreno, A., Jiménez-Luque, V., Moreno, T., Redondo, E.S., de las Mulas, J.M. y Pérez, J.** (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet.Parasitol.* 82: 19-33.
- 286. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A. y 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.
- 287. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.** (2014a). Immunological features of LPS from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 97: 329-332.
- 288. Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.** (2014b). Effect of dietary supplementation with flaxseed oil or

vitamin E on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.* 97: 71-79.

- 289. 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. y Martínez-Valladares, M.** (2013). Effect of lipopolysaccharide (LPS) from *Ochrobactrum intermedium* on sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 112: 2913-2923.
- 290. Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C., Castañón-Ordóñez, L., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N. y Rojo-Vázquez, F.A.** (2010b). Efficacy of a moxidectin/triclabendazole oral formulation against mixed infections of *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 174: 166-169.
- 291. 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.
- 292. Martínez-Valladares, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C. y Rojo-Vázquez, F.A.** (2010a). Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitol. Res.* 107: 1205-1211.
- 293. 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. y 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. *Parasitol. Vectors* 6: 282.

- 294. Martínez-Valladares, M. y Rojo-Vázquez, F.A.** (2014). Intraspecific mitochondrial DNA variation of *Fasciola hepatica* eggs from sheep with different level of anthelmintic resistance. *Parasitol. Res.* 113: 2733-2741.
- 295. Martínez-Valladares, M., Vara-Del Río, M.P., Cruz-Rojo, M.A. y 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.
- 296. Mas-Coma, M.S., Bargues, M.D. y Esteban, J.G.** (1999). In: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, pp. 411-434.
- 297. Mas-Coma, S., Bargues, M.D. y Valero, M.A.** (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35: 1255-1278.
- 298. Mas-Coma, S., Valero, M.A. y Bargues, M.D.** (2009). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet. Parasitol.* 163: 264-280.
- 299. Mastellos, D. y Lambris, J.D.** (2002). Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trend Immunol.* 23: 485-91.
- 300. Mathis, A. y Deplazes, P.** (2006). Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.* 55: 87-90
- 301. Matsui, M., Fowler, J.H. y Walling, L.L.** (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 1535-1544.
- 302. Mauri, C. y Ehrenstein, M.R.** (2008). The “short” history of regulatory B cells. *Trends in Immunol.* 29: 34-40.
- 303. McCann, C.M., Baylis, M. y Williams, D.J.** (2010). Seroprevalence and spatial distribution of *Fasciola hepatica*-infected dairy herds in England and Wales. *Vet. Rec.* 166: 612-617.

- 304. McConville, M., Brennan, G.P., Flanagan, A., Hanna, R.E., Edgar, H.W., Castillo, R., Hernández-Campos, A. y Fairweather I.** (2009). Surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vivo with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Parasitol. Res.* 105: 757-767.
- 305. McKellar, Q.A. y Scott, E.W.** (1990). The benzimidazole anthelmintic agents, a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13: 223-247.
- 306. McKinstry, B, Fairweather, I., Brennan, G.P. y Forbes, A.B.** (2003). *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxylin (Trodax). *Parasitol. Res.* 91: 251-263.
- 307. McManus, D.P. y Dalton, J.P.** (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133 Suppl., S43-61.
- 308. Meaney, M., Allister, J., McKinstry, B., McLaughlin, K., Brennan, G.P., Forbes, A.B. y Fairweather, I.** (2006). *Fasciola hepatica*: morphological effects of a combination of triclabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parasitol. Res.* 99: 609-621.
- 309. Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G.P. y Forbes, A.B.** (2004). Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon. *Parasitol. Res.* 92: 232-241.
- 310. Meaney, M., Fairweather, I., Brennan, G.P., McDowell, L.S.L. y Forbes, A.B.** (2003). *Fasciola hepatica*: effects of the fasciolicide clorsulon *in vitro* and *in vivo* on the tegumental surface, and a comparison of the effects on young- and old-matures flukes. *Parasitol. Res.* 91: 238-250.

- 311. Medzhitov, R. y Janeway, C.** (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173: 89-97.
- 312. Meeusen, E. y 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.
- 313. Meeusen, E., Lee, C.S., Rickard, M.D. y Brandon, M.R.** (1995). Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.* 17: 35-45.
- 314. Mekroud, A., Chauvin, A. y Rondelaud, D.** (2007). Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep. *Rev. Med. Vet.* 158: 437-441.
- 315. 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.
- 316. Mercado, R., Canales, M. y Atias, A.** (1985). Inmunoelectroforesis, doble difusión en agar y hemaglutinación indirecta en fasciolosis hepática humana. *Parasitol. al día* 9: 36-39.
- 317. Meyer-Lassen, J., Daffalla, A.A. y Madsen, H.** (1994). Evaluation of focal mollusciciding in the Rahad Irrigation Scheme, Sudan. *Acta Trop.* 58: 229-241.
- 318. Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C. y 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.

- 319. Mezo, M., González-Warleta, M. y Ubeira, F.M.** (2007). The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 93: 65-72.
- 320. Miman, Ö., Özkeçeci, T., Okur, N., Çiftci, I.H. y Polat, C.** (2010). A rare cause of obstructive jaundice: fascioliasis. *Turkiye Parazitol. Derg.* 34: 190-192.
- 321. Mitchell, G.B.B., Maris, L. y Bonniwell, M.A.** (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Vet. Rec.* 143: 399.
- 322. Mittrucker, H.W., y Kaufmann, S.H.** (2000) Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* 67: 457-463.
- 323. Modavi, S. e Isseroff, H.** (1984). *Fasciola hepatica*: collagen deposition and other histopathology in the rat host's bile duct caused by the parasite and by proline infusion. *Exp. Parasitol.* 58: 239-244.
- 324. Moll, L., Gaasenbeek, C.P., Vellema, P. y Borgsteede, F.H.** (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 91: 153-158.
- 325. Montgomery, T.D., Leid, R.W. y Wescott, R.B.** (1986). Interaction of bovine complement with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 19: 55-65.
- 326. Morales M.A., Luengo J. y Vásquez J.** (2000). Distribución y tendencia de la fasciolosis en ganado de abasto de Chile, 1989-1995. *Parasitología al día* 24: 115-118. **Moreau, E. y Chauvin, A.** (2010). Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:428593.
- 327. Morozova, E.V., Ryskov, A.P. y Semyenova, S.K.** (2002). RAPD variation in two trematode species (*Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*) from a single cattle population. *Genetika* 38: 1155-1162.

- 328. Morrison, C.A., Colin, T., Sexton, J.L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T. y Spithill, T.W.** (1996). Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 14: 1603-1612.
- 329. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. y Coffman, R.L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
- 330. Mosmann, T.R. y Coffman R.L.** (1989a). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-473.
- 331. Mosmann, T.R. y Coffman, R.L.** (1989b). Heterogeneity of cytokine secretion pattern and functions of helper T cells. *Ad. Immunol.* 46: 111-147.
- 332. Mottier, L., Álvarez, L., Fairweather, I. y Lanusse, C.** (2006). Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *J. Parasitol.* 92: 1355-60.
- 333. Mottier, M.L., Álvarez, L.I., Pis, M.A. y Lanusse, C.E.** (2003). Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients. *Exp. Parasitol.* 103:1-7.
- 334. Moustafa, N.E., Hegab, M.H. y 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.
- 335. Mulcahy, G.** (1999). Immunology of *Fasciola Hepatica* Infection. En: Dalton, J.P. (Ed.) *Fasciolosis*, CABI Publishing, Cambridge UK, pp. 341-376.

- 336. Mulcahy, G., O'Neill, S., Fanning, J., McCarthy, E. y Sekiya, M. (2005).** Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? *Trends Parasitol.* 21: 273-277.
- 337. Muro, A., Ramajo, V., López, J. Simón, F. e 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.
- 338. Murray, M. y Rushton, B. (1975).** The pathology of fascioliasis, with particular reference to hepatic fibrosis. En: Taylor, A.E.R. y Muller, R. (Eds.): *Pathogenic processes in parasitic infections*. Blackwell Sci. Ltd., Oxford, pp. 27-41.
- 339. Musoke, A.J., Rurangirwa, F.R. y Nantulya, V.M. (1986).** Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. En: Morrison, W.I. (Ed.) *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- 340. Nansen, P. (1975).** Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by gamma-ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res. Vet. Sci.* 19: 278-283.
- 341. Nansen, P., Andersen, S. y Hesselholt, M. (1975).** Experimental infection of the horse with *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 37: 15-19.
- 342. Novolbiský, A., Averpil, H.B. y Höglund, J. (2012).** The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 190: 272-276.
- 343. Novolbiský, A., Engström, A., Sollenberg, S., Gustafsson, K., Morrison, D.A. y Höglund, J. (2014).** Transmission patterns of *Fasciola hepatica* to ruminants in Sweden. *Vet. Parasitol.* 203: 276-286.

- 344. Novolbilský, A., Kasný, M., Beran, L., Rondelaud, D. y Höglund, J.** (2013). *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasit. Vectors* 6: 251.
- 345. Nozais, J.P., Datry, A. y Martin, D.** (1997). Fasciolosis, dicrocoeliose, opisthorchiasis. En: *Traité de parasitologie médicale*. Paris: Pradel, pp. 650-689.
- 346. O'Brien, D.J.** (1998). Fasciolosis: a threat to livestock. *Irish Vet. J.* 51: 539-541.
- 347. Olaechea, F.V., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R.** (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet. Parasitol.* 178: 364-366.
- 348. Olaechea, F.V., Thamsborg, M., Christensen, N.O., Nansen, P. y Robles, C.A.** (1991). Interference with sawfly (*Arge pullata*) poisoning in *Fasciola hepatica* infected lambs. *J. Comp. Path.* 104: 419-433.
- 349. Ollerenshaw, C.B.** (1959). The ecology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Vet. Rec.* 71: 957-965.
- 350. Ollerenshaw, C.B.** (1974). Forecasting liver fluke disease. En: The effects of meteorological factors upon Parasites, *Symposium of the British Society for Parasitology* (A.E.R. Taylor & R. Muller edit.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 12: 33-52.
- 351. Ollerenshaw, C.B.y Smith, L.P.** (1969). Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Adv. Parasitol.* 7: 283-323.
- 352. Onar, E.** (1990). Efficacy of thiophanate and albendazole against natural infections of *Dicrocoelium dentriticum*, *Fasciola hepatica*, and gastrointestinal nematodes and cestodes in sheep. *Vet. Parasitol.* 35: 139-145.

- 353. O'Neill, S.M., Brady, M.T., Callanan, J.J., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, K.H. y Dalton, J.P.** (2000). *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.* 22: 147-155.
- 354. Ortiz, P.L., Claxton, J.R., Clarkson, M.J., McGarry, J. y Williams, D.J.** (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 93: 121-134.
- 355. Oullete, M.** (2001). Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop. Med. Int. Health* 6: 874-882.
- 356. Over, H.J. y Dijkstra, J.** (1975). Infection rhythm in fascioliasis. En: *Facts and Reflections. II Workshop on fascioliasis*. Parasitol. Dept., Central Diergeeskundig Institut, Lelystad, pp. 9-18.
- 357. Overend, D.J. y Bowen, F.L.** (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.* 72: 275-276.
- 358. Pantelouris, E.M.** (1965). *The Common Liver Fluke*. Pergamon Press, Londres, Edimburgo, NuevaYork, Paris y Frankfurt.
- 359. Parfitt, J.W. y Banks, A.W.** (1970). A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. *Vet. Rec.* 87: 180-182.
- 360. Paz-Silva, A., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Díaz, P., Panadero, R., Díez-Baños, P. y Morrondo, P.** (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 88: 568-573.
- 361. Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., Lopez, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P. y Morrondo, P.** (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol. Res.* 91: 328-331.

- 362. Pecheur, H.** (1967). A few considerations on the cercariae and metacercariae of *Fasciola hepática*. 2nd Int. Liver Fluke Colloquium. Department of Zoology, Agricultural University, Wageningen. En: Merck, Rahway, NJ. The Netherlands, pp. 148–149.
- 363. Peinado-Peláez, M., Gómez-García, V. y Rodríguez-Osorio, M.** (1989). Estudio epidemiológico de la fasciolosis en el ganado de la provincia de Granada. *Resúmenes del VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología, Cáceres (Spain), 25-29 septiembre.*
- 364. Pérez, J., Martín de las Mulas, J., Carrasco, L., Gutiérrez, P.N., Martínez-Cruz, M.S. y Martínez-Moreno A.** (1999). Pathological and immunohistological study of the liver and hepatic lymph nodes in goats primarily and secondarily infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology* 120: 199-210.
- 365. Perteguer, M.J., Rodríguez, E., García-Sánchez, R.N., Nogal-Ruiz, J.J., Bolas-Fernández, F., Martínez-Fernández, A.R. y Gárate, T.** (2009). Identification of Spanish *Trichinella* isolates by ISSR-PCR: intra-specific variability of *Trichinella britovi*. *Vet. Parasitol.* 159: 206-209.
- 366. Pfister, K.** (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. *Rev. Sci. Technol.* 9: 511-518.
- 367. Pfister, G., El-Nagger, M. y Bahadir, M.** (1994). Evaluation of controlled release molluscicide formulations with improved environmental acceptance. *Chemosphere* 28: 305-312.
- 368. Phiri, I.K., Phiri, A.M. y Harrison, L.J.** (2006). Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Vet. Parasitol.* 141: 234-242.

- 369. Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P. y Carmona, C.** (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67: 1954-1961.
- 370. Piedrafita, D., Raadsma, H., Prowse, R. y Spithill, T.W.** (2004). Immunology of the host parasite relationship in Fasciolosis (*Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*). *Can. J. Zool.* 82: 233-250.
- 371. Pleasance, J., Wiedosari, E., Raadsma, H.W., Meeusen, E. y 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.
- 372. Poglajer, G., Capelli, G., Martini, M. y Zampiccoli, R.** (1995). Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autónoma di Trento. *Acta della Soc. Ital. De Buiatria* 27: 483-489.
- 373. Poitou, I., Baeza E. y Boulard C.** (1992). Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 45: 59-71.
- 374. Poitou, I., Baeza E. y Boulard C.** (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subset in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 49: 179-190.
- 375. Pouliot, J.F., L'Heureux, F., Liu, Z., Prichard, R.K. y Georges, E.** (1997). Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem. Pharmacol.* 53: 17-25.
- 376. Prache, S. y Galtier, P.** (1990). Evolution de la bilirubine et de l'activité plasmatique de la gamma glutamyl-transférase chez les agneaux infestés expérimentalement par *Fasciola hepatica*. *Reprod. Nutr. Dev.* 2: 233-234.

- 377. Prichard, R.K.** (1978). The metabolic profile of adult *Fasciola hepatica* obtained from rafoxanide-treated sheep. *Parasitology* 76: 277-88.
- 378. Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C. y Donald, A.D.** (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56: 239-251.
- 379. Pritchard, D.I., Hewitt C. y Moqbel R.** (1997). The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* 115: 33-44.
- 380. Prichard, R. y Tait, A.** (2001). The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet. Parasitol.* 98: 169-194.
- 381. Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E. y Maliszewski, C.** (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22: 41-47.
- 382. Pulpeiro, J.R., Armesto, V., Varela, J. y Corredoira, J.** (1991). Fascioliasis: findings in 15 patients. *Br. J. Radiol.* 64: 798-801.
- 383. Ramajo-Martín, V. y Simón-Vicente, F.** (1989). Datos epizootiológicos sobre la fasciolosis ovina en praderas de regadío (Salamanca). *VI Cong. Nac. Y I Cong. Ibér. Parasitol.*, Cáceres, p. 213.
- 384. Randell, W.F. y Bradley, R.E.** (1980). Effects of hexachlorethase on the milk yields of dairy cows in North Florida infected with *Fasciola hepatica*. *American Journal of Veterinary Research* 41: 262-264.
- 385. Reddington, J.J., Leid, R.W. y Wescott, R.B.** (1986). The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet. Parasitol.* 19:145-150.
- 386. Rehbein, S. y Visser, M.** (1999). Efficacy of an injectable ivermectin/clorsulon combination against *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Rec.* 145: 468.

- 387. 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.
- 388. Reid, J.F.S.** (1973). Fascioliasis: clinical aspects in diagnosis. En: Urquhart, G.M., Amour, J. (Eds.), *Helminth Diseases of Cattle, Sheep and Horses in Europe*. Robert MacLehose. The University Press, Glasgow, pp. 81–86.
- 389. Reina, D., Navarrete, I., Hernández-Rodríguez, S. y Habela M.** (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. *Rev Iber Parasitol* (Suppl): 85-90.
- 390. Rew, R.S. y Fetterer, R.H.** (1984). Effects of diamfenetide on metabolic and excretory functions of *Fasciola hepatica in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 79: 353-355.
- 391. Richter, J., Freise, S., Mull, R. y Millán, J.** (1999). Fascioliasis: Sonographic abnormalities of the biliary tract and evolution after treatment with triclabendazole. *Trop. Med. Int. Health* 4: 774-781.
- 392. Rim, H.J., Farag, H.F., Sornmani, S. y Cross, J.H.** (1994). Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitol. Today* 10: 207-209.
- 393. Roberts, E.W.** (1950). Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its intermediate host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Muller) in the field and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Trop. Med. & Parasitol.* 44: 187-206.
- 394. Roberts, J.A. y Suhardono** (1996). Approaches to the control of fasciolosis in ruminants. *Int. J. Parasitol.* 26: 971-981.

- 395. Robinson, M.W., Hoey, E.M., Fairweather, I., Dalton, J.P., McGonigle, S. y Trudgett, A.** (2001). Characterisation of a beta-tubulin gene from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 31: 1264-1268.
- 396. Robinson, M.W., Trudgett, A., Hoey, E.M. y Fairweather, I.** (2002). Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: beta-tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole. *Parasitology* 124: 325-338.
- 397. Robles, C. y Olaechea, F.V.** (2001). Salud y enfermedades de las majadas. En: *Ganadería ovina sustentable en la Patagonia Austral*. (Borrelli, P. y Oliva, G. Ed.), pp. 225-243.
- 398. Robles-Pérez, D., García-García, P., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M.** (2014). Analysis of genetic variability of *Fasciola hepatica* populations from different geographical locations by ISSR-PCR. *Parasitology* 30: 1-7.
- 399. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y 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.
- 400. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A. y Martínez-Valladares, M.** (2014). Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Vet. Parasitol.* 203: 217-221.
- 401. Rodríguez-Osorio, M., Rojas, J. y Gómez-García, V.** (1998). *Fasciola hepatica*: partial characterization of circulating antigens. *J. Parasitol.* 84: 1053-1055.
- 402. Roitt, I.** (2006). *Essential Immunology*. 9th ed. Blackwell Science Inc., USA.

- 403. Rojo-Vázquez, F.A. y Ferre-Pérez, I.** (1999). Fasciolosis. En: Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. (Eds.): *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp. 260-272.
- 404. Rojo-Vázquez F.A. y Gómez-Bautista, M.** (1989). Historia y Etiología (trematodosis hepáticas: Fasciolosis). *Bovis* 31:13-16.
- 405. Rojo-Vázquez, F.A. y Hosking, B.C.** (2013). A telephone survey of internal parasite control practices on sheep farms in Spain. *Vet. Parasitol.* 192: 166-172.
- 406. Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F. y Martínez-Valladares, M.** (2012). Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 189:15-38.
- 407. Ross, J.G.** (1977). A five-year study of the epidemiology of fascioliasis in the north, east and west of Scotland. *Br. Vet. J.* 133: 263–272.
- 408. Ross, J.G., Dow, C. y Todd, J.R.** (1967). A study of *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Record* 18: 543-546.
- 409. Roos, M.H., Kwa, M.S.G., Grant, W.N.** (1995). New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Today* 11: 148-150
- 410. Ross, J.G., Todd, J.R. y Dow, C.** (1966). Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *J. Comp. Pathol.* 76: 67-81.
- 411. Rowcliffe, S. A. y Ollerenshaw, C.B.** (1960). Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 54: 172-182.
- 412. Rowlands, D.T. y Clampitt, R.B.** (1979). Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 5: 155-175.

- 413. Ruhston, B.** (1977). Ovine fascioliasis following reinfection. *Research in Veterinary Science* 22: 133-134.
- 414. Rushton, B. y Murray, M.** (1977). Hepatic pathology of a primary experimental infection of *Fasciola hepatica* in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 87: 459-470.
- 415. Sanabria, R, Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C. y Alvarez, L.** (2013). Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Vet. Parasitol.* 193: 105-110.
- 416. Sánchez-Andrade, R., Morrondo, P. López, C., Panadero, R. y Díez, P.** (1995). Evaluation of *Fasciola hepatica* infection prevalence in cattle in Galicia (Northwest Spain) by enzyme linked immunosorbent assay. *Res. Rev. Parasitol* 55: 103-107.
- 417. Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P. y 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.
- 418. Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., Díez-Baños, P. y Morrondo, P.** (2001). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 87: 609-614.
- 419. Sandeman, R.M., Howell, M.J. y Campbell, N.J.** (1980). An attempt to vaccinate sheep against *Fasciola hepatica* using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. *Res. Vet. Sci.* 29: 255-259.
- 420. Sangster, N.** (1994). P-glycoproteins in nematodes. *Parasitol. Today* 10: 319-322.

- 421. Sangster, N.C. y Dobson, R.J.** (2002) Anthelmintic Resistance. En: Lee, D. (ed.). *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, Londres y Nueva York, pp. 531-567.
- 422. Scarcella, S., Solana, M.V., Fernández, V., Lamenza, P., Ceballos, L. y Solana, H.** (2013). Increase of glutathione S-transferase, carboxyl esterase and carbonyl reductase in *Fasciola hepatica* recovered from triclabendazole treated sheep. *Mol. Biochem. Parasitol.* 191: 63-65.
- 423. Schallig, H.D., Van Leeuwen, M.A. y Hendriks, W.M.** (1995). Isotype-Specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet. Parasitol.* 56: 149-162.
- 424. Schalm, O., Jain, J. y Carroll, E.** (1981). Hematología Veterinaria. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- 425. Schmidt-Weber, C.B., Alexander, S.I., Henault, L.E., James, L. y Lichtman, A.H.** (1999). IL-4 enhances IL-10 gene expression in murine Th2 cells in the absence of TCR engagement. *J. Immunol.* 162: 238-244.
- 426. Schulman, M.D. y Valentino, D.** (1980). *Fasciola hepatica*: effect of 4-amino-6-trichloroethenyl-1,3-benzenedisulfonamide on glycolysis *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 49: 206-215.
- 427. Schuster, J. y Lammler G.** (1973). *Fasciola hepatica* infection der Albinoratte I untersuchunen zur entwicklung und pathogphysiologie. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 41: 311-326.
- 428. Schwacha, M.G., Samy, T.S., Catania, R.A. y Chaudry, I.H.** (1998). Thermal injury alters macrophage responses to prostaglandin E2: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide synthase activity. *J. Leukoc. Biol.* 64: 740-746.

- 429. Scott, P.R., Sargison, N.D., Macrae, A. y Rhind, S.R.** (2005). An outbreak of subacute fasciolosis in Soay sheep: ultrasonographic biochemical and histological studies. *Vet. J.* 170: 325-331.
- 430. Seder, R.A. y Paul, W.E.** (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635-673.
- 431. Semyonova, S.K., Morozova, E.V., Chrisanfova, G.G., Asatrian, A.M., Movsessian, S.O. y Ryskov, A.P.** (2003). RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica* 48: 125-130.
- 432. Semyonova, S.K., Morozova, E.V., Chrisanfova, G.G., Gorokhov, V.V., Arkhipov, I.A., Moskvina, A.S., Movsessyan, S.O. y Ryskov, A.P.** (2006). Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *J. Parasitol.* 92: 525-530.
- 433. Sexton, J.L., Milner, A.R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T.W., Mitchell, G.F. y et al.** (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 145: 3905-3910.
- 434. Shaka, S. y Nansen, P.** (1979). Epidemiology of fascioliasis in Denmark. Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Vet. Parasitol.* 5: 145-154.
- 435. Sher, A. y Coffman R.L.** (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 10:385-409.
- 436. Shevach, E.M.** (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400.

- 437. Shimalov, V.V. y Shimalov, V.T.** (2000). Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus 1758, in wild animals in Belorussian Pelesye. *Parasitol Res* 86: 342.
- 438. Shukdeo, M.V., Sangster, N.C. y Mettrick, D.F.** (1988). Permanent feeding sites of adult *Fasciola hepatica* in rabbits? *Int. J. for Parasitol.* 18: 509-512.
- 439. Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J. y Cabaret, J.** (2009). Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Mol. Ecol.* 18: 5086-5100.
- 440. Simmank W.** (1987). Der grosse Leberegel (*Fasciola hepatica*) ausfleischhygienischer Sicht. *Rundschau fur Fleischhygiene und Lebensmitteluberwachung* 39, 5-6.
- 441. Simón-Vicente, F. y Ramajo-Martín, V.** (1985). Principales problemas parasitarios ligados al pastoreo en especial en el ganado ovino en la provincia de Salamanca. Las parasitosis de los rumiantes en pastoreo en España. *Inst. Nac. Invest. Agr. Comun INIA Ser. Hig. Sanidad Anim.* 11: 37-59.
- 442. Sinclair, K.B.** (1967). Patogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. *Helminthological Abstracts* 36: 115-134.
- 443. Sinclair, K.B.** (1972). The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in sheep. *Br. Vet. J.* 118: 37-53.
- 444. Sinclair, K.B.** (1975). The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: Studies on the pathophysiology of challenge infections. *Res. Vet. Sci.* 19: 296-30.
- 445. Smith, G. y Grenfell, B.T.** (1984). The influence of water temperature and pH on the survival of *Fasciola hepatica* miracidia. *Parasitology* 88: 97-104.

- 446. Smith, N.C., Ovington, K.S. y Boray J.C.** (1992). *Fasciola hepatica*: Free radical generation by peritoneal leukocytes in challenged rodents. *Int. J. Parasitol.* 22: 281-286.
- 447. Smith, J.M. y Prichard, R.K.** (2002). Localization of p-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug selected and susceptible strains. *J. Parasitol.* 88: 612-620.
- 448. Smith, W.D. y Zarlenga, D.S.** (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Vet. Parasitol.* 139: 347-359.
- 449. Smyth, J.D. y Halton, D.W.** (1983). *The Physiology of Trematodes*. 2° Edn. Cambridge University Press, Cambridge, 446 pp.
- 450. Soulsby E.J.L.** (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias*. 7ª ed. Interamericana, México. pp. 36-37.
- 451. Spithill, T.W. y Dalton, J.P.** (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol. Today* 14: 224-8.
- 452. Spithill, T.W., Piedrafita, D. y Smooker, P.M.** (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *Int. J. Parasitol.* 27: 1221-1235.
- 453. Stitt, A.W. y Fairweather, I.** (1993). *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitol. Res.* 79: 529-36.
- 454. Stitt, A.W., Fairweather, I. y Mackender, R.O.** (1995). The effect of triclabendazole ("Fasinex") on protein synthesis by the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 25: 421-429.
- 455. Sukhdeo, M.V.K y Mettrick, D.F.** (1987). Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Adv. Parasitol.* 26: 73-144.

- 456. Sunita, K. y Singh, D.K.** (2011). Fascioliasis control: in vivo and in vitro phytotherapy of vector snail to kill fasciola larva. *J. Parasitol. Res.* 2011:240807.
- 457. Svetic, C. A., Madden, K.B., Di Zhou, X., Lu, P., Katona, L.M., Finkelman, F.D., Urban, J.F. y William, C.G.** (1993). A primary intestinal helminth infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J. Immunol.* 150: 3434-3441.
- 458. Sykes, A.R., Coop, R.L. y Rushton, B.** (1980). Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Res. in Vet. Science* 28: 63-70.
- 459. Symons, L.E.A.** (1989). Pathophysiology of Endoparasitic Infection. Academic Press, Sydney, 331 pp.
- 460. 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.
- 461. Taylor, E.L.** (1965). La fascioliasis y el distoma hepático. Organización de las Naciones Unidas. Para la Agricultura y la Alimentación. N° 64.
- 462. Taylor, M.** (1987): Liverfluke treatment. *In Practice* 5: 163-166.
- 463. Taylor, M.A., Hunt, K.R. y Goodyear, K.L.** (2002). Anthelmintic resistance detection methods: a review. *Vet. Parasitol.* 103: 183-194.
- 464. Teofanova, D., Kantzoura, V., Walker, S., Radoslavov, G., Hristov, P., Theodoropoulos, G., Bankov, I. y Trudgett, A.** (2011). Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infect. Genet. Evol.* 11: 109-115.
- 465. Terasaki, K., Noda, Y., Shibahara, T. e Itagaki, T.** (2000). Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *J. Parasitol.* 86: 724-729.

- 466. Thomas, I., Coles, G.C. y Duffus, K.** (2000). Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in Southwest Wales. *Vet. Rec.* 146: 200.
- 467. Threadgold, L.T.** (1963). The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica*. *Q.J. Microsc. Sci.* 104: 505-512.
- 468. Tliba, O., Moire, N., Lavern, Y., Boulard, C., Chauvin, A. y Sibille P.** (2002). Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet.Res.* 33: 261-270.
- 469. Torgerson, P. y Claxton, J.** (1998). Epidemiology and control. En "*Fasciolosis*". Dalton, L.P. ed. CABI Publishing. pp. 113-149.
- 470. Trinchieri, G. y Scott, P.** (1994). The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol.Today* 15: 460-463.
- 471. Trudgett, A., McNair, A.T., Hoey, E.M., Keegan, P.S., Dalton, J.P., Rima, B.K., Miller, A. y Ramasamy, P.** (2000). The major tegumental antigen of *Fasciola hepatica* contains repeated elements. *Parasitology* 121: 185-191.
- 472. Tufenkji, A.E., Alvinerie, M., Houlin, G. y Galtier, P.** (1987). Pharmacokinetics of sulphobromophthalein, lidocaine and indocyanine green in the course of subclinical fascioliasis in sheep. *Res. Vet. Sci.* 43: 327-330.
- 473. Tufenkji, A.E., Alvinerie, M., Pineau, T., Boulard, C. y Galtier, P.** (1988). Incidence of a subclinical fascioliasis on antipyrine clearance and metabolite excretion in sheep. *Xenobiotica* 18: 357-364.
- 474. Urban, J.F., Madden, K.B., Svetic, A., Cheever, A., Trotta P.P., Gause, W.C., Katone, I.M. y Finkelman, F.D.** (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127: 205-219.

- 475. Uriarte, J., Cabaret, J. y 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. Vet.* 16:321-325.
- 476. Urquhart, G.M.** (1956). The pathology of experimental fascioliasis in the rabbit. *Journal of Pathology and Bacteriology* 71: 301-310.
- 477. Urquhart, G.M., Armour, J., Doyle, J. y Jennings F.W.** (1970). Studies on ovine fasciolosis. III The comparative use of molluscicide and anthelmintic in the control of the disease. *Vet. Record.* 86: 338–345.
- 478. Taylor, M.A., Coop, R.L. y Wall, R.L.** (2007). *Veterinary Parasitology*, 3rd edition, Wiley Blackwell.
- 479. Valero, M.A., Ubeira, F.M., Khoubbane, M., Artigas, P., Muiño, L., Mezo, M., Pérez-Crespo, I., Periago, M.V. y Mas-Coma, S.** (2009). MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet. Parasitol.* 159: 77-81.
- 480. Van Houtert, M.F. y Sykes, A.R.** (1996). Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int. J. Parasitol.* 26: 1151-1167.
- 481. Vara del Río, M.P.** (2007). *Control de la fasciolosis ovina: estudios sobre las resistencias a los fasciolicidas y desarrollo de técnicas para su detección y métodos de control* (Tesis Doctoral). Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León.
- 482. 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.

- 483. Vázquez, L., Dacal, V., Cienfuegos, S., Díaz, P., Lago, N., Panadero, R., Fernández, G., Morrondo, P. y López, C.** (2008). Occurrence of trematode eggs from Galicia (NW Spain). *XVI Int. Cong. Med. Fed. Health and Prod. Rum.*, Croacia.
- 484. Vázquez-Gómez, M.A., Alunda, J.M., Gómez-Bautista, M., Rojo-Vázquez, F.A.** (1985). Biología de *Fasciola hepatica*: efecto de algunos factores físicos sobre el desarrollo del huevo. *Med. Vet.* 2: 45-48.
- 485. Vázquez-Prieto, S., González-Díaz, H., Paniagua, E., Vilas, R. y Ubeira, F.M.** (2014). A QSPR-like model for multilocus genotype networks of *Fasciola hepatica* in Northwest Spain. *J. Theor. Biol.* 334: 16-24.
- 486. Vázquez-Prieto, S., Vilas, R., Mezo, M., González-Warleta, M., Ubeira, F.M. y Paniagua, E.** (2011). Allozyme markers suitable for population genetic analysis of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 176: 84-88.
- 487. Veerappan, A., Siegel, J.H., Podany, J., Prudente, R. y Gelb, A.** (1991). *Fasciola hepatica* pancreatitis: endoscopic extraction of live parasites. *Gastrointest. Endosc.* 37: 473-475.
- 488. Viallard, J.F., Pellegrin, J.L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., Ragnaud, J.M., Leng, B. Y Moreau, J.F.** (1999). Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* 115: 189-195.
- 489. Vilas, R., Vázquez-Prieto, S. y Paniagua, E.** (2012). Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infect. Genet. Evol.* 12: 45-52.

- 490. Walker, S.M., Prodöhl, P.A., Fletcher, H.L., Hanna, R.E., Kantzoura, V., Hoey, E.M. y Trudgett, A.** (2007). Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101: 117-125.
- 491. Wamae, L.W. e Ihiga, M.K.** (1991). Fasciolosis is a limiting factor in livestock productivity. *Bull. Anim. Health Prod.Afr.* 39: 257-269.
- 492. Wedemeyer, J., Tsai, M. y Galli, S. J.** (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 624- 631.
- 493. Whitlock, H.V.** (1950). A technique for counting trematode eggs in sheep faeces. *J. Helminthol.* 24: 47-52.
- 494. Whitlock, H.V., Kelly, J.D., Porter, C.J., Griffin, D.L., y Martin, I.C.A.** (1980). *In vitro* screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet. Parasitol.* 7: 215-232.
- 495. Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G. y Sangster, N.C.** (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20: 469-476.
- 496. Ximenes, T., Rondelaud, D., Mage, C. y Chermette, R.** (1993). L'elimination de la Linnée tonquée dans les paturages: Controle biologique et lutte intégré contre la fasciolose. *Point Vétérinaire* 24: 55-61.
- 497. Yalav, O., Yagmur, Ö., Ulkü, A., Akcam, A.T. y Sönmez, H.** (2012). A rare cause of obstructive jaundice: *Fasciola hepatica* mimicking cholangiocarcinoma. *Turk J. Gastroenterol.* 23: 604-607.
- 498. Yang, Q., Mao, W.H., Ferre, I., Bayón, J.E., Mao, X.Z. y González-Gallego, J.** (1998). Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase

(GLDH) and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. *Vet. Parasitol.* 78: 129-136.

- 499. 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.
- 500. Zhao, G.H., Li, J., Zou, F.C., Mo, X.H., Yuan, Z.G., Lin, R.Q., Weng, Y.B., Zhu, X.Q.** (2009). ISSR, an effective molecular approach for studying genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different provinces in mainland China. *Infect. Genet. Evol.* 9: 903-907.
- 501. Zhu, X.Q., Podolska, M., Liu, J.S., Yu, H.Q., Chen, H.H., Lin, Z.X., Luo, C.B., Song, H.Q. y Lin, R.Q.** (2007). Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol. Res.* 101: 1703-1707.
- 502. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D.** (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- 503. Zimmerman, G.L., Wallace, D.H., Schons, D.J. y 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.