

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“ESTUDIO DE LOS POSIBLES RESERVORIOS DE  
LA FASCIOSIS EN GALICIA”**

**PABLO PIÑEIRO FRAGA**

*Lugo, octubre de 2013*



DÑA. MARÍA SOL ARIAS VÁZQUEZ, Profesora del Área de Sanidade Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

DÑA. PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

D. ADOLFO PAZ SILVA, Profesor del Área de Sanidade Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

**INFORMAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO DE LOS POSIBLES RESERVORIOS DE LA FASCIOSIS EN GALICIA”**, que presenta el Licenciado con Grado en Veterinaria D. PABLO PIÑEIRO FRAGA para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 2 de septiembre de 2013.

María Sol Arias Vázquez

Patrocinio Morrondo Pelayo

Adolfo Paz Silva

---

## **FINANCIACIÓN**

---

El presente Trabajo ha sido posible gracias a la financiación y colaboración de los organismos públicos y privados que se relatan a continuación:

### **Proyectos de Investigación**

**“Incorporación de hongos parasiticidas autóctonos a piensos comerciales para prevenir la Infección de animales de renta”**, Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).

**“Desarrollo de ganadería ecológica: de la sostenibilidad a la inclusión social”**, Consellería de Economía e Industria, Xunta de Galicia (2010-2012).

**“Estrategias de control biológico de los parásitos del caballo salvaje para la gestión sostenible de la biomasa en el monte gallego”**, Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2007-2010).

**“Análisis de la intervención de rumiantes silvestres como reservorios de trematodosis y nematodosis parasitarias de ganado vacuno en extensivo”**. (FAU2006-00006-00-00). Ministerio de Educación y Ciencia. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (2007-2009).

**“Estudio de los principales endoparásitos del corzo (*Capreolus capreolus*) en Galicia: repercusiones sobre la calidad del trofeo e implicaciones socioeconómicas para las zonas de explotación cinegética en el medio rural”**. (Ref. 07MRU034261PR). Consejería de Innovación e Industria. Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación da Xunta de Galicia. (2007-2009).

**"Estudio de las principales parasitosis del caballo gallego"**, Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (2006-2007).

### **Contratos de Investigación**

**“Estudo das principais parasitoses do cabalo de pura raza galega”**, Asociación de Criadores de Cabalos Pura Raza Galega (PURAGA, Muras, Lugo) (2007-2008).

**“Principales parasitosis del caballo en extensivo”**, Laboratorios Karizoo S.A. P.I. (Barcelona) (2008).

**“Estudio de las posibilidades de control de enfermedades parasitarias en caballos de Galicia”, PFIZER, S.A. (Madrid) (2008).**

**"Estudio do estado sanitario do cabalo Pura Raza Galega: efecto das parasitoses na reprodución", A. y C. MARPU S.L. (A Coruña).**

**"Aplicación de técnicas de proteómica a la investigación en Parasitología veterinaria", CELTA INGENIEROS (A Coruña) (2008-2010).**

**"Asesoramiento en el control de parasitosis en caballos mantenidos en extensivo en la comarca de la Cerdanya (Cataluña)", Joves Agricultors i Ramaders de Catalunya (JARC) (2009-2010).**



## PUBLICACIONES

---

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de este Trabajo han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

### Capítulos de libro:

M. Arias, R. Sánchez-Andrade, J.L. Suárez, P. Piñeiro, R. Francisco, C. Cazapal-Monteiro, F.J. Cortiñas, I. Francisco, A. Romasanta, A. Paz-Silva. (2011). Parasitic diseases in livestock under different types of grazing management. Diagnosis and possibilities for their control. En: **Livestock: Rearing, Farming Practices and Diseases**. Editor: **TARIQ JAVED**. Nova Science Publishers, Hauppauge NY (USA). ISBN: 978-1-62100-181-2

### Publicaciones indexadas:

\*- Arias, M.S.; Francisco, I.; Sanchís, J.; Francisco, R.; Piñeiro, P.; Cazapal-Monteiro, C.; Cortiñas, F.J.; Suárez, J.L.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2013). The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle *Veterinary Parasitology* (en prensa).

\*- Arias, M.S.; Piñeiro, P.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Hillyer, G.V.; Díez-Baños, P.; Paz-Silva, A.; Morrondo, P. (2013). Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic área. *Research in Veterinary Science* (en prensa).

\*- Arias, M.S.; Suárez, J.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Francisco, I.; López-Arellano, M.E.; Piñeiro, P.; Suárez, J.L.; Sánchez-Andrade, R.; Mendoza de Gives, P.; Paz-Silva, A. (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biology* (en prensa).

\*- Sanchís, J.; Sánchez-Andrade, R.; Macchi, M.I.; Piñeiro, P.; Suárez, J.L.; Cazapal-Monteiro, C.; Maldini, G.; Venzal, J.M.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. (2013). Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain. *Veterinary Parasitology*, 191: 165-171.

\*- Arias, M.; Piñeiro, P.; Hillyer, G.V.; Francisco, I.; Cazapal-Monteiro, C.; Suárez, J.L.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2012). Enzyme-linked immunosorbent

assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. *Parasitology Research*, 110: 1001-1007.

\*- Arias, M.; Lomba, C.; Dacal, V.; Vázquez, L.; Pedreira, J.; Francisco, I.; Piñeiro, P.; Cazapal-Monteiro, C.; Suárez, J.L.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade R.; Paz-Silva, A. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and NW Spain. *Veterinary Record*, 168: 408-413.

\*- Arias, M.S.; Piñeiro, P.; Hillyer, G.V.; Suárez, J.L.; Francisco, I.; Cortiñas, F.J.; Díez Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade. R.; Paz-Silva, A. (2010). An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle-management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *The Journal of Parasitology*, 96: 626-631.

#### **Publicaciones no indexadas:**

\*- Sanchís, J.; Miguélez, S.; Solari, M.A.; Piñeiro, P.; Macchi, M.I.; Maldini, G.; Venzal, J.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. (2012). Seroprevalencia de las fasciolosis bovina en el departamento de Salto (Uruguay). *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 70: 163-171.

- Sanchís, J.; Miguélez, S.; Macchi, M.I.; Maldini, G.; Piñeiro, P.; Venzal, J.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Arias, M. (2011). Estudio epidemiológico transversal de la fasciolosis en ganado vacuno del Uruguay. Revista de la Asociación Interprofesional para el desarrollo Agrario **(AIDA). ITEA**, información técnica económica agraria. Tomo II: 768-770. Zaragoza, 17-18 mayo. Comunicación oral.

- Sanchís, J.; Miguélez, S.; Macchi, M.I.; Maldini, G.; Piñeiro, P.; Rodríguez, I.; Venzal, J.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez, J.L.; Paz-Silva, A.; Arias, M. (2011). Factores de riesgo de parafistomosis en bóvidos del Uruguay. Revista de la Asociación Interprofesional para el desarrollo Agrario **(AIDA). ITEA**, información técnica económica agraria. Tomo II: 771-773. Zaragoza, 17-18 mayo. Comunicación oral.

- Piñeiro, P.; Suárez, J.L.; Vázquez, L.; Francisco, I.; Dacal, V.; Francisco, R.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P.; Arias, M. (2011). Quimioterapia frente a la parafistomosis en vacuno Rubia Gallega. Revista de la Asociación Interprofesional para el desarrollo Agrario **(AIDA). ITEA**, información técnica económica agraria. Tomo II: 777-779. Zaragoza, 17-18 mayo. Comunicación oral.

### Comunicaciones presentadas en Congresos:

- Arias, M.S.; Piñeiro, P.; Cazapal, C.; Morrondo, P.; Díez, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz, A. Utilidad de la proteína recombinante FhrAPS para el inmunodiagnóstico de fasciolosis en animales de renta. (2012). III Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. Proteómica. Revista de la Sociedad Española de Proteómica. Nº 8. Pág 125. 9-10 febrero. Santiago de Compostela. Póster.

- Sanchís, J.; Arias, M.; Macchi, M.I.; Miguélez, S.; Maldini, G.; Piñeiro, P.; Solari, M.A.; Rodríguez, I.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R. Seroprevalence of bovine trematodosis in the area of Salto (Uruguay). (2011). 23 Conferencia Internacional de la Asociación Mundial para el Desarrollo de la Parasitología Veterinaria (WAAVP). Libro de resúmenes. Pág 91. 21-25, agosto. Buenos Aires, Argentina. Panel.

- Arias, M.S.; Hillyer, G.V.; Piñeiro, P.; Francisco, I.; Suárez, J.L.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Francisco, R.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2011). Detection of equine antibodies specific a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. XII Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 12). DVD de Actas del XII Congreso Ibérico de Parasitología. Pág. 99. 5-8, julio. Zaragoza, España. Comunicación oral.

- Piñeiro, P.; Pedreira, J.; Francisco, I.; Romasanta, A, Suárez, J.L.; Francisco, R.; Díez, P.; Morrondo, P.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. (2011). Successful of chemotherapy against *Calicophoron daubneyi* in grazing cattle. XII Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 12). DVD de Actas del XII Congreso Ibérico de Parasitología. Pág. 189. 5-8, julio. Zaragoza, España. Panel.

- Arias-Vázquez, M.S.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Suárez-García de Paredes, J.L.; Francisco-Vázquez, I.; Piñeiro-Fraga, P.; Molinar-Min, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo-Pelayo, P., Rossi, L. (2011). Comparison of trematoda antigens for the diagnosis of *Fascioloides magna* infections in red deer (*Cervus elaphus*) of the La Mandria Regional Park (Piedmont, Italy). XII Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 12). DVD de Actas del XII Congreso Ibérico de Parasitología. Pag. 310. 5-8, julio. Zaragoza, España. Panel.

\*- Arias, M.S.; Francisco, I.; Piñeiro, P.; Vázquez, L.; Dacal, V.; Cazapal, C.; Suárez, J.L.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Morrondo, P. (2010). Prevalence of paramphistomosis in cattle slaughtered in SW Europe. XVIII International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants. Pag.: 93. Mayo 26-29. Durres, Albania. Panel.

\*- Piñeiro, P.; Arias, M.S.; Pedreira, J.; Francisco, R.; Vázquez, L.; Cazapal-Monteiro, C.; Suárez, J.L.; Morrondo, P.; Paz-Silva, A. (2010). La paramfistomosis bovina: ¿enfermedad emergente en ganado vacuno autóctono Rubia Gallega? II Congreso Nacional de Zootecnia. Las razas puras fuente de riqueza para la cabaña ganadera española. Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (Feagas). Libro de Actas del II Congreso Nacional de Zootecnia. Pag 148-150. 28 y 29, octubre. Lugo. Comunicación oral.

\*- Francisco, I.; Sánchez, J.A.; Cortiñas, F.J.; Vázquez, L.; Suárez, J.; Francisco, R.; Cazapal-Monteiro, C.; Arias, M.; Piñeiro, P.; Suárez, J.L.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2010). Encuesta sobre el control parasitario de equinos de pura raza en Galicia. XI Congreso Internacional de Medicina y cirugía Equina. Salón Internacional de Caballo de Pura Raza Española (SICAB). Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Libro de Actas del XI Congreso Internacional de Medicina y cirugía Equina. Pag: 219-224. 26-27, noviembre. Sevilla. Panel.

\*- Arias, M.; Piñeiro, P.; Hillyer, G.V.; Suárez, J.L.; Francisco, I.; Cortiñas, F.J.; Pedreira, J.; Francisco, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. (2009). "Empleo de una proteína recombinante de 2'9 kDa para evaluar el riesgo de fasciolosis en vacas mostrencas". XI Congreso Ibérico de Parasitología. Sociedad Portuguesa de Parasitología. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 16(1/2): 428-429. 15-18, septiembre. Lisboa, Portugal. Panel.



## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis directores, los profesores Maria Sol Arias Vázquez, M<sup>a</sup> Patrocinio Morrondo Pelayo y Adolfo Paz Silva, por su dedicación, su grandísima valía personal y profesional que me intentaron transmitir en todo momento, por estar ahí incondicionalmente y ser, además de unos grandes directores, grandes amigos, confidentes y compañeros de trabajo.

Al Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por su apoyo y ayuda inestimable en el desarrollo de este estudio, así como por aportarme todos sus conocimientos y experiencia siempre que lo he necesitado.

Al Dr. José Luis Suárez García de Paredes y la Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade Fernández, por su saber estar, por sus grandes conocimientos profesionales y por cuidarnos en todo momento, por transmitirnos seguridad y tranquilidad siempre de un modo correcto y profesional, a la vez que afectivo y cercano.

A la Profesores Rosario Panadero, Ceferino López y Pablo Díaz, por sus buenos consejos y estar siempre dispuestos a prestar ayuda cuando fuese necesaria.

A todos mis compañeros con los que compartí tareas en el laboratorio, Luis, Vicente, Jesús, Jaime, Quique, Andreu, Belén y en especial a Silvia, Isabel y la gran Cristiana, por hacerme los días de laboratorio mucho más agradables, su simpatía, apoyo, ayuda y por favorecer la creación de un ambiente tan agradable. Por su amistad.

A toda mi familia y en especial a mi padre José Manuel, por mantenerse siempre tan unida y transmitirme constantemente valores de cariño, trabajo, educación, apoyo y comprensión.

A mi cuñada, Adriana Mendez Martinez, por iniciar conmigo los pasos en esta profesión, por su ayuda continua tanto personal como profesional, por su cariño y comprensión.

A mi compañero, socio y amigo, Dr. Iván Francisco Vázquez, por aportarme sensatez y calma en el trabajo, por introducirme en esta y otras etapas tan importantes de mi vida, por ser una gran persona y apoyo constante.

Este trabajo está dedicado, de manera muy especial, a mi hija Blanca y mi hijo Daniel, a mi mujer Blanca, a mi hermano Óscar y a mi madre Beatriz, por estar presentes en mi vida incondicionalmente, por su apoyo constante en cada paso que doy, por ilusionarse conmigo y ayudarme día a día, por ser tal como son. Sin ellos, seguro que este trabajo y mi vida no sería lo que son.



## LISTA DE ACRÓNIMOS EMPLEADOS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DO	Densidad óptica
EITB	Enzyme-inmuno-transferblot, inmuno-electro-transferencia
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, enzimo-inmuno ensayo
ELISA-d	ELISA directo
ELISA-i	ELISA indirecto
ES	Antígeno metabólico o de excreción/secreción
FABP	Fatty acid binding protein, proteínas transportadoras de lípidos
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FhES	Antígeno de ES de <i>F. hepatica</i>
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Ges
h.p.g.	Huevos por gramo de heces
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodalton
Kg. p.v. <sup>-1</sup>	Kilogramos por peso vivo
mc	Metacercaria
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
OPD	Ortho-phenylenediamine
PBS	Phosphate buffered saline, tampón fosfato
PCR	Polimerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PT	PBS + Tween 20, solución de lavado
PTL	PBS + Tween 20 + leche desnatada en polvo
p.v.	Peso vivo
rFhAPS	Proteína recombinante expresada por el Clon 17 de <i>F. hepatica</i>
RPMI	Medio de cultivo desarrollado en el Roswell Park Memorial Institute (Buffalo, NY, USA)
Se	Sensibilidad
Sp	Especificidad
s.p.i.	Semana post infección



<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
1.1. ANTECEDENTES DEL TEMA .....	21
1.1.1. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR <i>Fasciola hepática</i> .....	22
a) Técnicas directas. ....	22
b) Técnicas indirectas .....	28
1.1.2. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i> EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.....	36
a) Vacuno. ....	36
b) Corzos. ....	40
c) Équidos.....	42
1.1.3. FACTORES DE RIESGO QUE INFLUYEN SOBRE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR <i>F. hepatica</i> . ....	45
a) Extrínsecos. ....	45
b) Intrínsecos. ....	47
1.2. UNIDAD TEMÁTICA.....	49
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>3. PUBLICACIONES .....</b>	<b>59</b>
3.1. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and North - west Spain.....	61
3.2. An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal –and recombinant– based ELISAs.....	67

3.3.	Relationship between exposure to liver trematode in roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> ) and in cattle extensively reared in an endemic area.....	75
3.4.	Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant <i>Fasciola hepatica</i> surface antigen in an endemic area.....	81
4.	<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>89</b>
5.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
6.	<b>RESUMEN.....</b>	<b>103</b>
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>





# 1. Introducción



## 1. 1. INTRODUCCIÓN

En Galicia, el progresivo abandono de las tierras de cultivo marginales ha hecho que, en la actualidad, el estrato agrario en gran parte de esta Comunidad Autónoma esté compuesto por un mosaico de parcelas de cultivo y extensiones medias o pequeñas de monte, que constituyen el medio ideal para su utilización por los équidos, especialmente los de raza autóctona o caballos de monte, del ganado vacuno en extensivo y de los corzos que es la principal especie de ungulado silvestre.

La explotación de las especies animales antes citadas es una importante fuente de ingresos para los habitantes del medio rural gallego, al tiempo que permite alcanzar el principal objetivo de la política diseñada por la Unión Europea para el desarrollo rural, es decir, diversificar el sistema productivo económico a través de la creación de actividades complementarias al sistema tradicional agro-ganadero. Este aspecto adquiere una singular importancia en Galicia debido a dos factores relevantes, la menor competitividad de la actividad agro-ganadera y el progresivo abandono del trabajo de campo, especialmente en las zonas de montaña.

*Fasciola hepatica* tiene una distribución cosmopolita, aunque es más frecuente en áreas húmedas, donde la vegetación y las temperaturas moderadas permiten la supervivencia de *Galba truncatula* que es el principal hospedador intermediario (H.I.) de este trematodo (Rondelaud *et al.*, 2001; Phiri *et al.*, 2005).

En España, según Rojo y Ferre (1999), la fasciolosis está ampliamente difundida en diferentes regiones, siendo más frecuente en el Norte de España (Manga *et al.*, 1991; Díez *et al.*, 1994; Ferre *et al.*, 1995; Luzón *et al.*, 1997) y, especialmente en Galicia, donde concurren las condiciones climáticas y edáficas idóneas para el desarrollo del ciclo externo de este trematodo hepático (Morrondo *et al.*, 1994). No obstante, la infección por *F. hepatica* no afecta por igual a todas las especies animales, siendo los rumiantes y en especial el ganado ovino los más sensibles, ocasionando importantes pérdidas económicas, tanto directas (muerte de los animales, especialmente en la fasciolosis aguda) como indirectas (decomiso de hígados, disminución de las producciones, gastos en tratamientos de los animales afectados, etc).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio hemos constatado que la prevalencia de infección por *F. hepatica* tanto en ganado vacuno (Morrondo *et al.*, 1994; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995, 2000, 2002; Paz Silva *et al.*, 2007) como en ovino (Díez *et*

*al.*, 1994; Pedreira *et al.*, 2001; Paz Silva *et al.*, 1997, 2003a) es muy elevada. No obstante, se desconoce en gran medida la importancia que en zonas endémicas puedan tener los rumiantes silvestres (Díez-Baños *et al.*, 2009a; Vázquez *et al.*, 2009a, b; Arias *et al.*, 2010) y otros animales monogástricos como los équidos (Apt *et al.* 1993; Haridy *et al.* 2002; Morsy *et al.* 2005).

Debido a que los estudios que constituyen esta Tesis Doctoral ya se han publicado en revistas indexadas y para cumplir con la Normativa que regula la presentación de estas Tesis, este apartado se ha dividido en 2 sub-apartados: **Antecedentes del Tema y Unidad Temática.**



## 1.1. Antecedentes del tema

### 1.1.1. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *Fasciola hepatica*

El diagnóstico de la fasciolosis, conlleva el diagnóstico clínico-epidemiológico, el exámen post-mortem y la utilización de técnicas de laboratorio específicas (biopatológicas y parasitológicas).

Entre las principales técnicas parasitológicas, están las **directas** que ponen de manifiesto la presencia del parásito en el hospedador mediante necropsia, coprología y detección de antígenos circulantes y las **indirectas** que detectan las reacciones inmunitarias que se producen en el hospedador como consecuencia del contacto con el trematodo (ELISA, EITB).

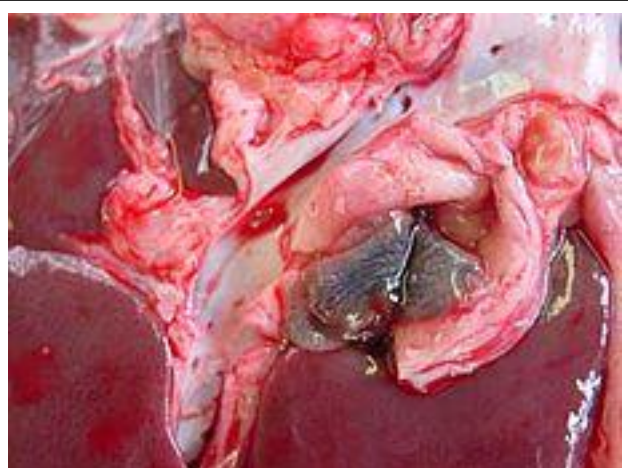
#### a. **TÉCNICAS DIRECTAS**

Los métodos más utilizados para el diagnóstico directo de las infecciones por *F. hepatica* han sido la necropsia y los exámenes coprológicos, aunque en los últimos años se han puesto a punto técnicas que detectan antígenos, mediante ELISA, en heces y suero de los animales infectados.

##### i. **Necropsia**

Según Rojo y Ferre (1999) las espinas cuticulares y las ventosas de *F. hepatica*, provocan una intensa irritación de las células epiteliales del hospedador, modificando su estructura y provocando una intensa reacción inflamatoria; la llegada de las fasciolas al hígado produce necrosis y hemorragias.

En la fasciolosis crónica, se observa fibrosis hepática resultado de la reorganización de los trayectos migratorios originados por las fasciolas, y colangitis hiperplásica, por la presencia de los ejemplares adultos en los conductos biliares y vesícula. La fibrosis hepática se puede observar en todo el hígado, aunque es más frecuente en el lóbulo ventral por ser



*F. hepatica* en necropsia

preferentemente éste el lugar de entrada de las fasciolas. La colangitis hiperplásica se

produce como consecuencia del traumatismo que originan los adultos en la mucosa de los conductos biliares.

Behm y Sangster (1999) señalaron que a medida que las formas juveniles maduraban e iban aumentando de tamaño, también lo hacía la respuesta inflamatoria; las infecciones con pequeñas dosis de metacercarias adquiridas de forma repetida *trickle infection* son las más frecuentes, y en este tipo de infecciones, tanto las formas juveniles como las adultas producen lesiones.



El número de ejemplares de *F. hepatica* recuperados tras la necropsia de corderos infectados con metacercarias, varía en los diferentes estudios. Ramajo *et al.* (2001) en corderos infectados con 100 metacercarias, recuperaron entre  $51 \pm 14.7$  y  $29 \pm 13.7$  a la 9ª y 14ª s.p.i., respectivamente. Morrondo (2000), en corderos infectados con una sólo dosis de 200 metacercarias de *F. hepatica*, obtuvo cifras medias de  $29 \pm 6.2$ . Sin embargo, Lomba (2005), en corderos infectados con la misma dosis (200 metacercarias) que en el estudio anterior, obtuvo cifras medias superiores ( $54 \pm 16$  adultos del trematodo).

En el ganado ovino, según Chauvin *et al.* (1995), la primoinfección con *F. hepatica* no estimula fenómenos de resistencia frente a la reinfección y la proporción de adultos en ovejas primo y reinfectadas es similar, aunque estos autores señalaron que las fasciolas durante la reinfección migran más rápidamente hacia los conductos biliares que en la primoinfección. En este sentido, Martínez-Fernández *et al.* (2004) cuando infectaron y reinfectaron a los corderos con un total de 200 metacercarias, en la reinfección obtuvieron un número similar de ejemplares adultos ( $74.7 \pm 16.2$ ) que en la primoinfección. Asimismo, Pérez *et al.* (2002) en ovejas primoinfectadas (con 175 metacercarias de *F. hepatica*) y reinfectadas con la misma dosis, obtuvieron cifras medias superiores de fasciolas adultas en el grupo reinfectado ( $88.71 \pm 27.8$ ) que en el primoinfectado ( $55.29 \pm 25.4$ ). Posteriormente, López-Abán *et al.* (2007), en corderos infectados con 100 metacercarias de *F. hepatica* y reinfectadas a las 19 s.p.i. con la misma dosis, recuperaron cifras medias de  $24.3$  fasciolas.

Pérez *et al.* (2002, 2005) estudiaron, en corderos, el efecto que la primoinfección y la reinfección tenía sobre las lesiones hepáticas, comprobando que la distribución de los infiltrados inflamatorios era similar en los animales primo o reinfectedados, aunque los daños hepáticos (cirrosis, fibrosis portal, hiperplasia de los conductos biliares) eran más intensos en los reinfectedados. Además, Pérez *et al.* (2002, 2005) en corderos infectados y posteriormente tratados con triclabendazol y después reinfectedados, comprobaron que aunque el tratamiento provocaba la eliminación de las fasciolas y la cicatrización de la mayoría de las lesiones hepáticas, cuando los animales se volvían a reinfectedar se observaban mayor número de células inflamatorias que en los animales primoinfectados y reinfectedados.

En cabras infectadas y reinfectedadas experimentalmente con *F. hepatica*, Martínez-Moreno *et al.* (1999) observaron que la respuesta inmunitaria no era protectora frente a la reinfección; puesto que, en el hígado de los primoinfectadas se visualizaron trayectos blanquecinos causados por la migración del trematodo en la superficie y en el parénquima hepático, mientras que en las reinfectedadas, las lesiones eran más marcadas, apreciándose destrucción de la arquitectura normal del tejido hepático que comprometía el funcionamiento del hígado. La media de fasciolas recuperadas fue de 41´8 en las cabras primoinfectadas con 200 metacercarias, y de 83 en los animales primoinfectados con el mismo número de metacercarias y reinfectedados después con otras 50 mc.

## **ii. Análisis coprológicos**

Es uno de los procedimientos más utilizado para el diagnóstico de las infecciones por *F. hepatica*, puesto que la coprología es una técnica muy específica que permite identificar a los animales infectados; sin embargo, presenta el inconveniente de que los huevos no se observan en las heces hasta 10-12 semanas después de la infección, es decir cuando las fasciolas han alcanzado la madurez sexual y ya han producido lesiones hepáticas en los animales (Rodríguez-Pérez y Hillyer, 1995; Rojo y Ferre, 1999; Cordero y Rojo, 1999; Rojo-Vázquez *et al.*, 2003).

Debido a las variaciones considerables en la eliminación diaria de huevos de *F. hepatica* en el ganado ovino (Düwell y Reisenleiter, 1984), se recomienda la recogida de muestras a partir del mediodía, y siempre a la misma hora.



Método de sedimentación

Se han descrito numerosos métodos coprológicos, desde simples extensiones hasta laboriosas técnicas cuantitativas, en las que los huevos se concentran por flotación o sedimentación (Rojo y Ferre, 1999). Los métodos de sedimentación son los de elección por su sencillez y simplicidad (Rojo-Vázquez *et al.*, 2003) y se basan en que los huevos de los trematodos tienen mayor densidad que los detritus de las heces. No obstante, la

interpretación de los resultados obtenidos por sedimentación no es sencilla, pues no suelen guardar relación directa con la intensidad de la infección, además, el número de huevos eliminados es mayor en animales jóvenes que en adultos. El porcentaje de animales positivos aumenta cuanto mayor es la media de huevos por gramo de heces. En este sentido, Düwell y Reisenleiter (1984) señalaron que los recuentos fecales no permiten un cálculo muy fiable de la intensidad de la infección; en cambio, Happic y Boray (1969) calcularon que, en procesos crónicos, a cada *F. hepatica* adulta le corresponderían 20 h.p.g. aproximadamente. Asimismo, Düwell y Reisenleiter (1984), tras infectar ovejas merinas con 50, 100 y 250 metacercarias de *Fasciola*, concluyeron que el ritmo de eliminación de huevos en las heces no era uniforme, y que dependía del momento del día; observando que el número de huevos por gramo de heces osciló entre 10 (en casos de infección leve) y 3500 en infecciones intensas, en tanto que se situaron en torno a 180-620 h.p.g. en las infecciones de intensidad intermedia.

Respecto al tiempo que transcurre desde la infección de los animales hasta que eliminan huevos, Kelly y Campbell (1979) en ovejas con infectadas con 400 metacercarias de *F. hepatica*, observaron que el período de prepatencia era de 12 s.p.i. La eliminación media de huevos osciló entre 2 (12<sup>a</sup> s.p.i.) y 112 h.p.g. (16<sup>a</sup> s.p.i.). Tras reinfectar estos animales, no observaron signos de reducción de la intensidad de la parasitación, y a las 14 semanas post-reinfección se encontraron las cifras más elevadas (421 h.p.g.). Posteriormente, Zimmerman *et al.* (1982) infectaron 2 grupos de ovejas con 100 y 500 metacercarias de *F. hepatica*, respectivamente, observando los primeros huevos a las 10 s.p.i. y obtuvieron cifras medias de  $73 \pm 9$  h.p.g. en el grupo infectado con 100 metacercarias, y de  $182 \pm 65$  en el que recibió 500 mc.

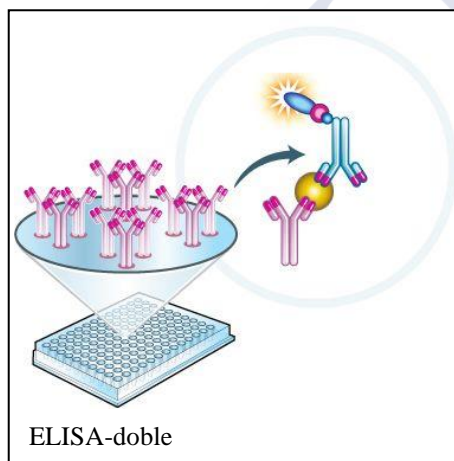
En diversos estudios realizados en nuestro laboratorio (Morrondo *et al.*, 2000, 2005; Morrondo y Díez, 2001; Arias *et al.*, 2004; Lomba, 2005; López-Abán, *et al.*, 2007) sobre

infecciones experimentales de ovinos, se comprobó que las primeras eliminaciones de huevos de *F. hepatica* se observaban entre la 9ª y la 11ª s.p.i., obteniendo cifras medias entre  $34'3 \pm 23'1$  y  $135'7 \pm 79'9$ . Asimismo, en los animales re infectados los valores medios de eliminación ( $39'5 \pm 21'9$  y  $273'5 \pm 137'5$ ) fueron ligeramente superiores a los de los primoinfectados.

A pesar de los inconvenientes atribuidos a la coprología, como el hecho de que las infecciones leves pueden pasar desapercibidas debido a que se eliminan pocos huevos en las heces (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Rojo-Vázquez *et al.*, 2003), lo que conduce a que estos animales actúen como portadores asintomáticos, pocos métodos de diagnóstico pueden competir con su rapidez, sencillez y bajo coste (Cordero, 1989).

### iii. ELISA-doble

En muchas infecciones parasitarias se liberan al torrente sanguíneo o al lumen intestinal, **sustancias antigénicas** que son útiles para diagnosticar las infecciones mediante la detección de antígenos circulantes en diferentes fluidos corporales (sangre, leche y secreciones nasales) e incluso en heces.



Para la detección de **antígenos circulantes en suero o en heces (coproantígenos)** se ha empleado la técnica ELISA, utilizando anticuerpos policlonales (IgG) obtenidos de conejos inmunizados con antígeno del parásito y, posteriormente, se ha puesto a punto con anticuerpos monoclonales. Estas técnicas directas de diagnóstico, se utilizan para detectar infecciones activas por *F. hepatica*, tanto en animales como en el hombre (Espino *et al.*, 1997; Mansour *et al.*, 1998; Hegab y Hassan, 2003).

En ovejas infectadas experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*, mediante ELISA-doble e IgG policlonal anti-*F. hepatica*, Rodríguez-Pérez y Hillyer (1995) detectaron antígenos circulantes del trematodo entre las 2 y 6 s.p.i. y obtuvieron las cifras más elevadas a las 8 s.p.i.

Guobadia y Fagbemi (1997) inmunizaron conejos con 2 polipéptidos de 69 y 17 kDa del antígeno de excreción/secreción de *F. gigantica*, y emplearon las IgG frente a estas proteínas para el diagnóstico de fasciolosis ovina. Estos autores observaron que la detección del péptido de 17 kDa era más específica y sensible que la de 69 kDa.

Duménigo *et al.* (2000) utilizaron un ELISA y anticuerpo monoclonal (ES78) para la detección de antígenos en suero y heces de 10 ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica*. Todos los animales infectados presentaron anticuerpos en la 1ª s.p.i. La antigenemia sólo se detectó tras 3 s.p.i. en 4 animales; a las 4 s.p.i. en 5 animales y solamente en 1 tras 5 s.p.i. Por otro lado, la detección de coproantígenos (Fag) sólo fue posible en 5 ovejas a la 4ª s.p.i., en 4 a la 5ª s.p.i. y en 1 a la 6ª s.p.i. Posteriormente compararon esta técnica con el ELISA para la detección de anticuerpos, utilizando antígeno FhES, demostrando que existía una correlación significativa entre los Fag, los huevos eliminados y el número de trematodos adultos; además, indicaron con este método era posible el diagnóstico de fasciolosis activa en ovejas en todos los estadios de la infección.

En nuestro laboratorio hemos realizado diversos estudios (Paz-Silva *et al.*, 1999; Morrondo *et al.*, 2000, 2005; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2004; Lomba, 2005) sobre la utilidad del ELISA-doble para detectar infecciones experimentales de ovinos, comprobando que esta técnica es muy útil para el diagnóstico de infecciones activas, y para valorar la eficacia de tratamientos antihelmínticos.

Esta técnica se ha empleado para detectar infecciones activas por *F. hepatica* en otras especies animales (vacas y ratas). En terneros infectados experimentalmente con *F. gigantica*, Viyanant *et al.* (1997) detectaron antígenos circulantes entre la 1ª y la 32ª s.p.i.; asimismo, en animales infectados naturalmente, obtuvieron una sensibilidad del 86´6%. Leclipteux *et al.* (1998) infectaron experimentalmente terneros y detectaron antígenos circulantes a los 6 días p.i., concluyendo que este método era más precoz que la detección de los anticuerpos y que era muy útil para el diagnóstico temprano de la fasciolosis en el período prepatente; no obstante, señalaron que la intensidad de la infección sólo se podía establecer mediante la determinación de la actividad de las enzimas hepáticas.

Duménigo *et al.* (1996) desarrollaron un ELISA basado en anticuerpos monoclonales (mAb sandwich ELISA) para detectar coproantígenos de *F. hepatica* en heces de ganado vacuno, comprobando que en las heces de todos los animales se hallaban coproantígenos, concluyendo que el mAb-ELISA es un método rápido, simple y útil en el diagnóstico de la infección activa por *F. hepatica* en bovinos. Asimismo, Mezo *et al.* (2004) utilizaron un

ELISA con un anticuerpo monoclonal (mAbMM3), obtenido por inmunización de ratones con la fracción de *F. hepatica* de 7 a 40 kDa purificada y O-glicosilada (ESAs). La especificidad y sensibilidad del MM3 captura ELISA se probó con muestras de heces de ovejas y vacas infectadas. El test detectó un 100% de las ovejas con 1 trematodo, el 100% de las vacas con 2 trematodos y 2 de las 7 vacas con 1 parásito. La concentración de coproantígeno se correlacionó positivamente con la carga parasitaria, y negativamente con el tiempo transcurrido entre la infección y la primera vez que se detectó el coproantígeno. En todos los animales se detectaron antes coproantígenos por MM3 ELISA de captura que por coprología. En ovejas experimentalmente infectadas y no tratadas, los coproantígenos se mantuvieron detectables hasta la 48 s.p.i., mientras que en ovejas tratadas, ya no se detectaron desde la semana 1 a 3 después del tratamiento.

En estudios realizados utilizando ratas infectadas de forma experimental con metacercarias de *F. hepatica*, Langley y Hillyer (1989) emplearon ELISA con IgG policlonal anti-*F. hepatica* obtenida en conejos y compararon los resultados obtenidos por ELISA-d y el ELISA-i, concluyendo que los antígenos de *F. hepatica* se detectaban antes que los anticuerpos. Espino *et al.* (1997) pusieron a punto un ELISA empleando un anticuerpo monoclonal, y observaron antígenos circulantes entre la 1ª y la 3ª s.p.i., coincidiendo con la migración de las fasciolas por el parénquima hepático.

Paz-Silva *et al.* (2002) re infectaron dos grupos de ratas en periodos diferentes; a las 4 semanas p.i., es decir, en la fase aguda de la primoinfección y otro a las 11 s.p.i., esto es en la fase crónica de la primoinfección, comprobando que en las ratas re infectadas en fase aguda, los coproantígenos se detectaban antes que en las re infectadas en fase crónica, concluyendo que el periodo en el que se re infectan los animales modifica la cinética de coproantígenos.

### **b. TÉCNICAS INDIRECTAS**

Hasta hace algunos años, las pruebas indirectas para detectar infecciones por *F. hepatica* se basaban fundamentalmente en la determinación de la actividad de algunas enzimas séricas (Barnouin *et al.*, 1981; Díez *et al.*, 1994; Mezo *et al.*, 1994; Ferre *et al.*, 1997) como glutamato deshidrogenasa (GLDH) o  $\gamma$ -glutamyl-transferasa ( $\gamma$ -GT). En la actualidad, se basa fundamentalmente en la detección de anticuerpos mediante la utilización de la técnica inmunoenzimática ELISA y, en menor proporción, debido a su

mayor complejidad de realización, en la técnica de inmuno-electro-transferencia (EITB) o western-blotting.

### ***i. ELISA con antígenos nativos***

Entre las técnicas inmunológicas se incluyen la hemaglutinación indirecta, la inmunoprecipitación (inmunodifusión doble, contraelectroforesis e inmunoelectroforesis) y la inmunofluorescencia indirecta. Todas ellas se han visto superadas por el ensayo de inmunoenzimología o ELISA, que presenta numerosas ventajas, entre las que cabe destacar su alta sensibilidad, buena especificidad y fácil reproducibilidad (Wescott *et al.*, 1984; Welch *et al.*, 1987; Pfister, 1990; Marín *et al.*, 1993; Ibarra *et al.*, 1998). El ELISA también detecta la mayoría de las infecciones parasitarias precozmente (O'Farrell *et al.*, 1981; Oldham, 1982; Wickoff III y Bradley, 1986); además, tiene una gran fiabilidad, que llega a alcanzar el 100% cuando el porcentaje de parasitación del rebaño es superior al 40% (Wescott *et al.*, 1984). Otras ventajas del ELISA derivan de su posible automatización, y del ahorro de reactivos y personal (Heyden Van Der, 1983; Turilli *et al.*, 1984; Trudgett *et al.*, 1988).



Placa de ELISA

Es fundamental estandarizar las condiciones de realización del ELISA; en este sentido, Marín (1992) expresó la importancia de establecer correctamente el valor límite de la densidad óptica a partir de la cual se consideren positivas las muestras, es decir, el denominado punto de corte, que puede variar según las condiciones de aplicación de la técnica (modelo de placas utilizado,

naturaleza y dilución del conjugado, estado de los tampones, temperatura del laboratorio, etc).

En el ELISA se pueden emplear dos tipos de antígenos, los somáticos y los de excreción/secreción (ES). Los resultados varían según los diferentes autores; así, Hillyer y Allain, 1979; Hillyer, 1980; Pfister *et al.*, 1984; Sinclair y Wassal, 1988; y Marín, 1992, obtuvieron mejores resultados cuando utilizaron antígenos metabólicos, que son menos complejos que los somáticos; mientras que otros (Lehner y Sewell, 1980; Arriaga de Morilla

*et al.*, 1983, 1989; Sexton *et al.*, 1994 y Morrondo *et al.*, 1997), lograron resultados similares con ambos tipos de antígenos.

En **ganado ovino** infectado experimentalmente, Zimmerman *et al.* (1982) mediante ELISA y antígeno somático de *F. hepatica*, comprobaron que, aunque los anticuerpos se detectaban a partir de la 2ª s.p.i., los niveles positivos no se alcanzaban hasta las 6ª-8ª s.p.i. Además, estos autores, no hallaron relación entre la intensidad de parasitación y las absorbancias obtenidas con el ELISA. En ovejas infectadas de forma experimental, Ferre (1994) observó que los niveles de IgG aumentaban a partir de las 2 s.p.i., alcanzando el máximo a las 8 s.p.i.

Mezo *et al.* (2003) fraccionaron antígeno nativo de ES de *F. hepatica* (FhES) por FPLC de gel-filtración. Tras el análisis de los antígenos contenidos en las fracciones obtenidas (del I al IV) enfrentados con sueros de 4 grupos de ovinos (con infección natural, sin fasciolosis pero con otras parasitaciones por nematodos intestinales, corderos infectados experimentalmente con 10-40 metacercarias de *F. hepatica* y corderos no infectados), observaron que las fracciones de III y IV mostraron una buena discriminación entre animales infectados y no infectados, con un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad. Con western-blot se determinó que el peso molecular de la fracción IV era de 7-40 kDa y resultaba específico para el serodiagnóstico, puesto que detectaba animales infectados (incluso los infectados con 10 metacercarias) desde las 3-5 s.p.i. y hasta el final del estudio (14 s.p.i.).

Ruíz *et al.* (2003) analizaron la utilidad de dos cisteín-proteinasas de 28 y 34 kDa (P28 y P34) obtenidas de adultos de *F. hepatica*, para el serodiagnóstico de fasciolosis caprina con ELISA-indirecto. Con las dos proteinasas se detectaron las IgG de forma rápida en todas las cabras infectadas (2-6 s.p.i.).

Con una cisteín-proteinasas de 28 kDa, Dixit *et al.* (2002) desarrollaron un dipstick-ELISA para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos con infección experimental con *F. gigantica* y comprobaron que todas las ovejas eran positivas al utilizar ELISA y/o dipstick-ELISA a partir de la 4ª s.p.i.

Ibarra *et al.* (1998) realizaron un estudio para comparar la sensibilidad, especificidad y utilidad del DIG-ELISA, DOT-ELISA, y ELISA-i en la determinación de la seroprevalencia de fasciolosis en ganado vacuno. Utilizaron sueros de vacas de un área endémica de fasciolosis y otros sueros de vacas de una zona libre del parásito. Al comparar los

resultados con la sedimentación se apreció que las tres técnicas detectaban un alto porcentaje de animales positivos, y que la especificidad y sensibilidad de las mismas superaban el 80%. Además observaron que únicamente un suero presentaba reacciones cruzadas con *Paramphistomum* spp. mediante DOT-ELISA. Concluyeron que estos test son sensibles, específicos y recomendables para el serodiagnóstico de la fasciolosis.

No obstante, diversos autores (Hillyer *et al.*, 1985; Boulard *et al.*, 1985; Boulard, 1988; Miller, 1990; Marín, 1992; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995, 2000; Paz *et al.*, 1998a), consideran que la interpretación de los datos del ELISA deben efectuarse con prudencia, debido a que en las primeras fases de la infección (antes de la 6ª s.p.i.) pueden detectarse algunos falsos negativos y que también pueden resultar falsos negativos los animales muy jóvenes con el sistema inmunitario poco desarrollado.

Además, aunque el ELISA presenta gran sensibilidad y especificidad, la persistencia de una elevada tasa de anticuerpos durante largos periodos de tiempo, incluso cuando los animales han sido capaces de eliminar de forma natural la infección o tras la administración de un tratamiento eficaz, supone un inconveniente importante como han señalado diversos autores (Boulard *et al.*, 1985; Mezo *et al.*, 1995; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001).

Como afirmamos antes, algunos de los inconvenientes del ELISA-indirecto se han superado con la utilización del ELISA-doble, comprobando que esta técnica es muy útil en el diagnóstico de infecciones activas, y para valorar la eficacia de tratamientos antihelmínticos (Fagbemi *et al.*, 1995; Espino *et al.*, 1997; Paz *et al.*, 1999; Duménigo y Mezo, 1999). Asimismo, Lomba (2005) comprobó que algunas fracciones (18 y 23´5 kDa) obtenidas por electroelución del antígeno FhES eran útiles para valorar los tratamientos antihelmínticos.

## **ii. Inmunolectrotransferencia**

Esta técnica se basa en la separación de los diferentes componentes antigénicos mediante electroforesis, y en su posterior evaluación como sustancias antigénicas utilizando una membrana de nitrocelulosa.

La utilidad de la EITB en el inmunodiagnóstico de las infecciones por *F. hepatica* se ha comprobado empleando animales de laboratorio (ratas y conejos) y de renta (ovejas y vacas).



pesos moleculares de 9-10 kDa, 25-27 kDa, 30-37 kDa, 40-45 kDa y 51-59 kDa, comprobando que en los sueros de terneras infectadas y reinfectadas experimentalmente con *F. hepatica*, los de 25-27 kDa fueron los únicos polipeptidos reconocidos por todos los sueros en las diferentes fases de infección y reinfección de los animales.

En **ovejas** infectadas experimentalmente, Ruíz-Navarrete *et al.* (1993) comprobaron que todos los sueros de ovejas infectadas reaccionaban frente a la fracción proteica de 20-23 kDa del antígeno somático, y frente a la de 23-27 kDa del antígeno de ES; detectando anticuerpos frente a estos componentes antigénicos a partir de la 2ª s.p.i.

Ferre (1994), en ovejas infectadas experimentalmente, comprobó que a partir de la 6ª s.p.i. las bandas que se apreciaban con mayor intensidad eran las de peso molecular de 14-30 kDa y que, entre la 8ª y la 16ª s.p.i., se detectaron péptidos de 19 y 25 kDa. Asimismo, Chauvin *et al.* (1995) señalaron el reconocimiento secuencial de proteínas de alto a bajo peso molecular, sugiriendo la liberación de productos de excreción/secreción por parte de las fasciolas juveniles durante su migración por el parénquima hepático; además, en animales reinfectados a las 6 semanas de la primoinfección, obtuvieron una marcada respuesta frente a péptidos de 12-30 kDa, en tanto que se redujo la intensidad del reconocimiento de proteínas de peso molecular alto, que habían sido observadas de forma precoz en la primoinfección.

### **iii. ELISA con proteínas recombinantes.**

Desde finales de la década de los 90, se han realizado diversos estudios sobre el empleo de algunas proteínas recombinantes como antígenos para el diagnóstico de las infecciones por *F. hepatica* mediante ELISA. Heussler y Dobbelaere (1994) obtuvieron una proteína recombinante de *F. hepatica* con secuencia N-terminal similar a la catepsina B identificada en extracto somático de formas juveniles recién desenquistadas.

Posteriormente, Tkalcevic *et al.* (1995) y Creaney *et al.* (1996) localizaron catepsina B en el intestino de fasciolas juveniles y Wilson *et al.* (1998) demostraron que la principal actividad proteasa en los productos de ES de estas formas juveniles estaba desarrollada por la catepsina B.

Dowd *et al.* (1997), identificaron dos formas diferentes de catepsina L-like proteasa recombinantes, catepsina L1 y catepsina L2, que tenían especificidad de sustrato.

Roche *et al.* (1997) obtuvieron la catepsina L1 recombinante, útil para el diagnóstico de infecciones por *F. hepatica* en ovinos, pero la producción de suficiente cantidad de esta proteína era un proceso largo, complejo y costoso. Para superar este problema, O'Neill *et al.* (1998, 1999) pusieron a punto un ELISA con catepsina L1 purificada a partir de FhES, comprobando que con esta proteína recombinante se diferenciaban mejor los sueros positivos de los negativos que con el antígeno de ES.

Wilson *et al.* (1998) observaron que la catepsina B (FhCatB) se libera de forma precoz (5ª s.p.i.), sugiriendo que esta proteasa está relacionada con el desenquistamiento y/o migración de las formas juveniles por los tejidos del hospedador.

Carnevale *et al.* (2001) comprobaron que la gastrodermis de las fases juveniles y de los adultos de *F. hepatica* secretan una cisteín-proteasa denominada Catepsina L1, que presenta una proregión (rproCL1); emplearon sueros de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* para determinar el valor antigénico de esta procatepsina L1 recombinante (rproCL1) mediante ELISA-indirecto y detectaron valores positivos de IgG a partir de la 3ª s.p.i., concluyendo que la procatepsina L1 recombinante (rproCL1) es útil para el diagnóstico de la fasciolosis aguda en las ovejas.

Cornelissen *et al.* (2001) desarrollaron un ELISA con catepsina L-like recombinante, comprobando que la sensibilidad de esta técnica era del 99'1 y del 100% para ovejas y terneros, respectivamente. Además, comprobaron que, en animales infectados de forma experimental, se detectaban anticuerpos específicos entre las semanas 5ª y 7ª p.i., concluyendo que este ELISA era más rápido para detectar la infección que el recuento de huevos en heces.

En ovejas infectadas con metacercarias de *F. hepatica*, Law *et al.* (2003) analizaron la respuesta inmunitaria mediante ELISA y la proteína recombinante Catepsina B; comprobando que era una proteasa secretada por las formas juveniles de *F. hepatica*, de gran utilidad para el diagnóstico de la infección durante la fase aguda, puesto que se detectaban anticuerpos entre la 2ª y 5ª semana p.i.

Silva *et al.* (2004) infectaron experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica* diferentes H.D. (conejos, ratas, ovejas y vacas) con objeto de valorar una proteína recombinante, denominada rFh8 que es la forma recombinante de un antígeno de ES de adultos del trematodo, concluyendo que esta proteína era producida por *F. hepatica* en un estadio muy temprano de la infección en conejos, ovejas y vacas, por lo que es de utilidad

para el diagnóstico temprano en estos hospedadores; por el contrario, los sueros de ratas sólo reaccionaban frente a esta proteína durante un corto periodo de la infección.

Arias (2003) y Paz-Silva *et al.* (2005) a partir de una biblioteca de ADNc obtuvieron 3 clones de *F. hepatica* que codifican para la expresión de proteínas de 16, 12´3 y 2´9 kDa, comprobando que en ratas infectadas con este trematodo, la proteína expresada por el clon de 2´9 kDa permitía detectar anticuerpos a la 2ª s.p.i. tanto por ELISA-i como por western-blot. Posteriormente, evaluaron esta proteína en sueros de ovejas infectadas experimentalmente con *F. hepatica* y observaron (Arias *et al.*, 2006) que en la 1ª s.p.i. ya se detectaban IgG, concluyendo que esta proteína, probablemente perteneciente al tegumento parasitario, resultaba muy útil en el diagnóstico de infecciones recientes.



### 1.1.2. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *F. hepatica* EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.

El desarrollo del ciclo de *F. hepatica* depende de varios factores (temperatura, humedad, presencia de H.I. adecuados, etc) y en consecuencia, la prevalencia de infección de los H.D. varía sensiblemente de unas zonas a otras y, como señalamos anteriormente, de unas especies animales a otras.

En este apartado y, debido a que son las especies en las que nos hemos centrado, revisaremos la prevalencia de infección de algunos rumiantes domésticos (vacas) y silvestres (corzo) y de los équidos. Así como los principales factores extrínsecos e intrínsecos que influyen sobre la prevalencia de infección por *F. hepatica* en estas especies animales.

#### a. EN GANADO VACUNO

Las **técnicas directas** más utilizadas han sido la necropsia y la coprología, y más recientemente, el ELIS A-doble.



Bovino pastando en extensivo

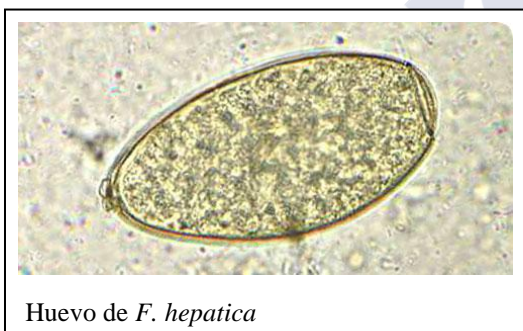
Debido al alto valor económico de estos animales, los datos de necropsia se reducen a trabajos puntuales que se han realizado en matadero. (Abunna *et al.*, 2009; Bernardo *et al.*, 2011; Borjl *et al.*, 2012).

En ganado vacuno sacrificado en el N.O. de España y N.E. de Portugal, Arias *et al.* (2011) hallaron que el 28% de los animales albergaban adultos de *F. hepatica*.

Los **análisis coprológicos** son de gran utilidad debido a su alta especificidad, sencillez de realización y bajo coste económico. No obstante, como señalamos anteriormente se ha demostrado que la carga parasitaria no está relacionada directamente

con el número de huevos que eliminan los animales. Lafay y Mage (1976) observaron que sólo en el 50% de las vacas que tenían lesiones hepáticas compatibles con fasciolosis, se identificaron huevos del trematodo. Asimismo, en terneros infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*, Hall *et al.* (1982) comprobaron que el número de huevos eliminados en las heces no estaba relacionado con el número de adultos que recuperaban en la necropsia. Además, Dwinger *et al.* (1982) observaron que sólo el 14% de vacas sacrificadas que tenían fasciolas en el hígado, eliminaban huevos del trematodo en las heces.

Aunque la especificidad de las técnicas coprológicas son elevadas, no obstante, diversos autores (Düwell y Reisenleiter, 1990; Mage, 1990; Chauvin, 1994), han señalado que es necesario realizar varios análisis antes de pronunciarse si un animal está o no infectado por *F. hepatica* y que como mínimo deberían realizarse 2 ó 3 coprologías, realizadas con intervalos de algunos días e incluso semanas; además, se ha comprobado que, cuando los análisis coprológicos se realizan una sola vez, puede haber hasta un 65% de falsos negativos.



El porcentaje de animales que eliminan huevos de *F. hepatica* varía mucho de unos países a otros, como consecuencia de los diferentes factores extrínsecos e intrínsecos que influyen sobre el ciclo biológico de este trematodo y por ello se considera que es suficiente referirse a las prevalencias de infección de nuestro país.

En España son numerosos los autores que han aportado datos respecto a la prevalencia e intensidad de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno. Según Cordero y Rojo (1983), hasta el 20% del censo de ganado vacuno de Castilla-León estaba infectado por este trematodo, aunque en algunas zonas el porcentaje de animales afectados superaba el 90%. En vacas en pastoreo en la provincia de León, González-Lanza *et al.* (1989) y Ferre *et al.* (1994) obtuvieron porcentajes de infección del 30 y del 11%, respectivamente. En Asturias, Cornejo *et al.* (1986) analizaron 266 muestras fecales de ganado vacuno tomadas al azar de 44 explotaciones, obteniendo porcentajes de parasitación que oscilaban entre el 0 y el 33%; asimismo, Rojo Vázquez (1986) comprobó que entre el 3'7 y el 35'6% de los bovinos asturianos estaban infectados por *F. hepatica*. En Huesca, Sánchez-Acedo (1983) señaló que el 5% de los bovinos eliminaban huevos de *F.*

*hepatica* y en áreas concretas de Andalucía y Extremadura, Martínez y Hernández (1983) citaron prevalencias de hasta el 50%.

Diversos estudios realizados en Galicia, demuestran la importancia de la fasciolosis bovina, siendo el porcentaje individual de animales y las cifras medias de eliminación muy variables. Díez-Baños *et al.* (1989), en la provincia de Lugo, pusieron de manifiesto que el 78'1% de los efectivos de una granja en la que no se adoptaban las medidas control adecuadas, eran positivos y eliminaban cifras medias de 146,6 h.p.g.; por el contrario, en granjas que adoptaban periódicamente medidas profilácticas, la prevalencia (64'4%) y sobre todo la intensidad ( $\bar{x}$  = 30 h.p.g.) descendió mucho. En otro estudio realizado por estos autores (Díez-Baños *et al.*, 1989), en varias localidades de la provincia de A Coruña, comprobaron que en el 28'8% de las explotaciones había animales infectados y que las cifras medias de eliminación eran de 13'1 h.p.g. Díez-Baños *et al.* (1991) y Díez *et al.* (1994) en vacas mantenidas en régimen semiextensivo, en la provincia de Lugo, señalaron que el 27'1% de los animales eliminaban huevos de *F. hepatica* y que la intensidad de infección era moderada. En un estudio más reciente, Díaz (2002) indicó que el 25'3% de las vacas Rubia Gallega eliminaban huevos y que las cifras medias de eliminación eran de 24'4 ± 26'5 h.p.g.

En relación con el porcentaje de explotaciones en las que había algún animal que eliminara huevos de *Fasciola*, Nogareda *et al.* (1987), Díez-Baños *et al.* (1989) y Sánchez-Andrade *et al.* (1995) señalaron prevalencias del 44, 29-78 y 70% en granjas de vacuno de leche de las provincias de Pontevedra, A Coruña y Lugo, respectivamente; posteriormente, Morrondo *et al.* (2003) y Díaz *et al.* (2005) señalaron porcentajes de infección superiores en explotaciones de Rubia Gallega de la provincia de Lugo (64 y 62 %, respectivamente).

Son escasos los estudios de serprevalencia realizados mediante **ELISA-doble** son escasos, probablemente debido a su laboriosidad y a la dificultad de obtención de los diferentes tipos de anticuerpos (mono o policlonales). En nuestro laboratorio, se han realizado diferentes estudios sobre seroprevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno explotados en distintas localidades de Galicia; asimismo, se han comparado los resultados obtenidos mediante esta técnica y los hallados por ELISA- indirecto.

Paz-Silva *et al.* (1998b), utilizando IgG policlonal anti-*F. hepatica*, hallaron que en el 37% de los sueros de vacas explotadas en la provincia de Lugo, tenían antígenos circulantes del trematodo. Posteriormente, Sánchez-Andrade *et al.* (2000) en vacas de aptitud láctea, compararon los resultados hallados por ELISA-indirecto y ELISA-doble,

comprobando que el 85'1% de las muestras examinadas se consideraban positivas al utilizar el ELISA-indirecto, siendo este porcentaje sensiblemente inferior con el ELISA-doble (37'3%). Además, estos autores determinaron que sólo el 38'3% de las muestras fueron positivas con ambas técnicas, lo que indica que la de detección conjunta de antígenos circulantes y de anticuerpos, es lo más apropiado para realizar estudios epidemiológicos amplios.

Entre las **técnicas indirectas**, destacan los estudios de seroprevalencia realizados mediante ELISA-indirecto; inicialmente se hicieron con **antígenos nativos** y posteriormente, empleando diferentes **proteínas recombinantes**.

Al utilizar **ELISA con antígenos nativos**, Marín *et al.* (1993), mediante ELISA y FhES, indicaron que el 60% del ganado vacuno de Asturias presentaban títulos positivos de anticuerpos frente a *F. hepatica*.

Luzón Peña (1995), utilizando como antígeno la fracción específica  $f_2$ , estudiaron la prevalencia de parasitación por *F. hepatica* en diferentes zonas de España, comprobando que el 82% del ganado vacuno mantenidos, en régimen semiextensivo, en Galicia, León y Lérica, tenían títulos de anticuerpos positivos.

En nuestro laboratorio, desde la década de los 90, se han realizado diferentes estudios sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno explotado en semiextensivo en diferentes distintas localidades de Galicia. Sánchez-Andrade *et al.* (1995) observaron que el 88'8% de los sueros de vacas, explotadas en la provincia de Lugo, tenían títulos de anticuerpos positivos, aunque señalaron que el 21'9% de los animales presentaban cifras de absorbancia compatibles con un escaso estímulo antigénico; asimismo, comprobaron que la seroprevalencia variaba con la zona de procedencia de las muestras, siendo superior en la zona de montaña y en el sur de Lugo y menor en el centro. Moledo (1996), mediante un ELISA-indirecto y antígeno de ES, comprobó que en el 64'7% de los sueros de ganado vacuno procedentes de las cuatro provincias gallegas, se detectaban anticuerpos frente a *F. hepatica*.

Al utilizar **ELISA-indirecto con proteínas recombinantes**, Kozak-Cieszczyk (2006) en Polonia, mediante esta técnica y utilizando una cisteínproteínasa recombinante, obtuvieron prevalencias del 34'8%.

En ovejas infectadas de forma natural, al pastar en zonas en las que había gran cantidad de metacercarias de *F. hepatica*, Cornelissen *et al.* (2001) comprobaron mediante ELISA-indirecto y una catepsina L recombinante, que a la 5ª semana, el 33% de los animales tenían anticuerpos y que los seropositivos aumentaban gradualmente hasta la semana 17 (79% de corderos con anticuerpos); además comprobó que este método de diagnóstico era más precoz que la coprología, puesto que las ovejas no eliminaron huevos hasta la 9ª semana después de su introducción en los pastos y que en la semana 17, el 53% de los animales eliminaban huevos.

## b. EN CORZOS

Los diferentes niveles de susceptibilidad de las especies animales frente a *F. hepatica* explican la presentación de diferentes patrones de la infección. En algunos estudios se ha indicado que la evolución de las infecciones causadas por trematodos resulta diferente en los animales silvestres y domésticos. En la fasciolosis crónica, un pequeño número de metacercarias son ingeridas durante un largo período de tiempo por animales con una resistencia retardada frente al trematodo. No habrá pérdida de peso, anemia y diarrea crónica. Esta es la típica situación de los cérvidos, el ganado vacuno, y el muflón (Kassai, 1999). Según Pybus (2001), *F. hepatica* puede parasitar, ocasionalmente, a ungulados silvestres (ciervo, gamo y corzo).



Corzo europeo

El corzo europeo es muy susceptible a la infección por fasciolas (*F. hepatica* y *F. magna*) y unas pocas son capaces de causar enfermedad grave (Dunn, 1988). En infecciones experimentales, Barth y Schaich (1973) comprobaron que *F. hepatica* era más patógena en corzo que en ciervo, por lo que concluyeron que, en condiciones naturales, la supervivencia de los corzos se vería comprometida. En los Países Bajos, existen

datos sobre el incremento de la mortalidad en corzos infectados (Pybus, 2001).

Dentro de las estrategias de gestión cinegética del corzo, es necesario saber qué parasitosis afectan a diferentes poblaciones y su epidemiología, a fin de aplicar acciones preventivas dirigidas a obtener un buen estado sanitario y la mejor explotación.

En corzos abatidos en Bielorusia, Shimalov y Shimalov (2000) no observaron huevos de *F. hepatica*, pero en un estudio posterior, Shimalov y Shimalov (2003) hallaron una media de 4 ejemplares adultos en el 6,3% de los hígados. En Checoslovaquia, en la región de Opava, Tomanek (1967) señaló una prevalencia del 11,7%. En Polonia, la prevalencia de infección fue del 19% (Drozdz y Bezubik (1993); Drozdz, 1996). En corzos abatidos en Alemania, Graubmann *et al.* (1978) señalaron que en el 43,5% de los hígados había adultos de *F. hepatica* aunque no observaron las típicas calcificaciones en ninguno. Posteriormente, Düwel (1988) en un estudio realizado durante 9 años no encontró parasitados ninguno de los 197 animales estudiados. Sharhuu y Sharkhuu (2004) informaron sobre la ausencia del trematodo hepático en corzos y otras siete especies de rumiantes silvestres en seis regiones geográficas de Mongolia. En la región de Strakonice, Vetyska (1980) no observaron corzos infectados, a pesar de que la prevalencia de infección por *F. hepatica* era elevada en el ganado vacuno de esa zona.

En España, *F. hepatica* se ha encontrado en el hígado de corzo, gamo, muflón europeo, cabra pirenaica y rebeco (Lavín *et al.*, 1995). En corzos abatidos en diferentes localidades de la provincia de Salamanca, Ramajo *et al.* (2007) no observaron ningún animal infectado por este trematodo. Asimismo, en corzos de 3 reservas regionales de caza del Norte de la provincia de León, Díez-Baños *et al.* (2009b) observaron que únicamente 1 animal (0,25%) eliminaba huevos de *F. hepatica*, aunque las cifras medias se pueden considerar como elevadas (139 hpg). En un estudio más amplio sobre los endoparásitos de los rumiantes en la vertiente leonesa de la Cordillera Cantábrica, Díez-Baños *et al.* (2009a) no detectaron huevos de *Fasciola* en las heces de los corzos.

En diversos estudios realizados, por nuestro grupo de investigación (Morrondo *et al.*, 2008; 2010a, b), en corzos abatidos en diferentes localidades de Galicia, no observaron huevos de *Fasciola*. Al tener en cuenta estas observaciones, la posibilidad de que los ungulados silvestres puedan estar infectados por *F. hepatica* nos llevó a considerar la utilidad de un **ELISA** para tratar de demostrar el contacto entre los corzos y las formas de resistencia de las fasciolas (metacercarias). En la Comunidad Autónoma Gallega, Arias *et al.* (2009), mediante ELISA, detectaron una seroprevalencia del 25%, concluyendo que aunque los corzos hubieran ingerido un pequeño número de metacercarias, posteriormente los adultos de *F. hepatica* no habrían llegado a establecerse en los conductos biliares.

En cuanto al desarrollo de los trematodos adultos en el corzo, todos los trematodos son adultos a los 100 días después de la infección, mientras en el ciervo un tercio de las fasciolas continúan inmaduras en el parénquima hepático en este momento (Radostits *et al.*,

2000). Samuel *et al.* (2001) señalaron que los cérvidos probablemente tienen una resistencia innata a la infección por *F. hepatica* y que, por ello, su importancia como reservorios de este trematodo para los rumiantes domésticos es escasa. Las bajas prevalencias de infección por *F. hepatica* en el corzo pueden ser debidas a barreras ecológicas que limitan la exposición y / o a la resistencia inherente a la infección. Por lo tanto, es poco probable que las infecciones en los cérvidos silvestres constituyan un riesgo para el ganado (Pybus, 2001). Pese a quien pese, y pareciendo una paradoja, Boray (1969) afirma que "... la supervivencia de *F. hepatica*, y los brotes de fasciolosis puede deberse principalmente a la presencia de explotaciones de las especies bovina y ovina, junto con la intervención humana". Longhurst (1953) apuntaba que a menos que los corzos sean obligados a pastar, la práctica del ramoneo y sus hábitos de bebida pueden impedir en gran medida la exposición a metacercarias de *F. hepatica*.

Se debe tener en cuenta que la presencia de animales domésticos en los territorios de los corzos resulta decisiva en la prevalencia de infección por *F. hepatica* en estos ungulados silvestres. En este sentido, Taber y Dassmann (1958) observó que en el Condado de Lake, California, *F. hepatica* se encuentra con frecuencia en los ciervos que comparten pastos con ovejas (10% de los ciervos recogidos estaban infectados), pero en zonas donde no hay ganado pastando, la infección era rara en estos animales. Esta observación sugiere que el ciervo de cola blanca es incapaz de mantener la infección de *F. hepatica*, y por lo tanto no sirve como reservorio natural importante para el ganado y las ovejas. En base a los resultados experimentales, el ciervo es más a la infección por *F. hepatica* que el ganado ovino (Kirstner, 1975), y posee menor resistencia temprana a *F. hepatica* que las ovejas (Boray, 1969).

### c. EN ÉQUIDOS

Los estudios sobre infecciones por *F. hepatica* en équidos son escasos. Este trematodo ha sido detectado en caballos de América del Sur, África y Europa (Alves *et al.*, 1988; Gorman *et al.*, 1997). El pequeño número de investigaciones realizadas en países como España podría deberse a que por tradición la carne de caballo no se suele consumir.

*Fasciola* se encuentra ocasionalmente en el hígado de los equinos y se detecta durante el **examen post-mortem** (Mehlhorn, 2008). Uno de los principales problemas en el estudio de la prevalencia de fasciolosis en equinos es la dificultad del diagnóstico, puesto que la mayoría de los trematodos no llegan a alcanzar el estadio adulto, y el examen fecal de huevos no es fiable (Grelck *et al.*, 1977; Nelis *et al.*, 2010). Por esta razón los caballos se

consideran parcialmente resistentes a la infección por *Fasciola* (Soykan y Öge, 2012), como se comprobó en infecciones experimentales (Alves *et al.*, 1988).

En análisis copromicroscópicos realizados en équidos que pastaban en áreas endémicas de fasciolosis en Chile (Apt *et al.* 1993) la prevalencia de infección fue del 13,5%. En Turquía, la prevalencia resultó del 3´6% (Uslu *et al.*, 2007), 4´82% (Umur *et al.*, 2009), 5´8% (Karaca *et al.*, 2005), y 8´5% (Acici *et al.*, 2013). En Egipto también se demostró una prevalencia de infección fue muy baja (0%-1´5%) (Haridy *et al.*, 2002; Morsy *et al.*, 2005).



Caballos conviviendo con bovinos

Se han realizado pocos estudios sobre los signos clínicos y la patología causada por este trematodo en el hígado de los caballos (Owen, 1977; Getachew *et al.*, 2010; Nelis, *et al.*, 2010; Paz-Silva, 2012; Suárez *et al.*, 2012). La dificultad de interpretación de estos signos supone que con frecuencia la infección no se llegue a diagnosticar resultando imprescindibles la aplicación de algunos **procedimientos serológicos** (Haridy *et al.*, 2007; Awad *et al.*, 2009). Por este motivo se han desarrollado estudios moleculares para avanzar en su diagnóstico (Amor *et al.*, 2011, Bohórquez *et al.*, 2013).

Una posible alternativa es la detección de anticuerpos frente a *F. hepatica* en suero mediante pruebas inmunoenzimáticas (Gorman *et al.*, 1997; Nelis *et al.*, 2010; Acici *et al.*, 2013). En caballos infectados experimentalmente con metacercarias de *F. hepatica*, Soulé *et al.* (1989) detectaron anticuerpos a partir entre la 3<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> s.p.i. y se alcanzaban los valores más elevados desde la 10<sup>a</sup>-17<sup>a</sup> s.p.i. El retraso en el desarrollo de las fasciolas adultas podría suponer un incremento en el tiempo de contacto entre el sistema inmunitario y los trematodos y sus antígenos, generándose así una fuerte respuesta inmunitaria humoral (Phiri *et al.*, 2006).

La seroprevalencia de fasciolosis detectada mediante ELISA y antígeno de excreción/secreción de *F. hepatica* en caballos de Turquía fue del 18% (Acici *et al.*, 2013). Además los caballos positivos por coprología resultaron seropositivos mediante ELISA y western blot. Empleando sueros positivos y con antígenos de excreción/secreción y somático de *F. hepatica* se revelaron tres bandas proteicas con pesos moleculares de 13, 30-40, y 40-65 kDa. Ninguno de los sueros de animales seronegativos fueron positivos

mediante inmunoelectrotransferencia. En contraste, el 19'3% de los animales seropositivos no presentaban signos clínicos de la infección. Gorman *et al.* (1997) detectaron tres bandas de 14-17, 22-30 y 40-42 kDa útiles para el diagnóstico de fasciolosis. Siendo, los polipéptidos de 22-30 kDa los más adecuados para el uso en el inmunodiagnóstico de la fasciolosis equina.



### 1.1.3. FACTORES DE RIESGO QUE INFLUYEN SOBRE LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *F. hepatica*.

Sobre la distribución y prevalencia de este trematodo influyen **factores extrínsecos** (condiciones climáticas y orográficas, tipo de manejo o explotación de los animales, etc.) y **factores intrínsecos** o derivados del hospedador (especie de H.D., edad, raza, etc.).

#### a. Extrínsecos.

En las infecciones por *Fasciola hepatica* tienen una gran importancia las **condiciones ambientales**, fundamentalmente la temperatura y sobre todo la humedad y/o las precipitaciones, que permiten la supervivencia de los huevos en el exterior y propicien la presencia de H.I.

En **ganado vacuno**, diversos autores (Díez-Baños *et al.*, 1989; Rojo y Ferre, 1999; Abrous *et al.*, 1999; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2003 a; Otranto y Traversa, 2003; Arias *et al.*, 2011) han señalado que las infecciones por *Fasciola* son enzoóticas en áreas donde haya elevadas precipitaciones anuales y terrenos mal drenados, que constituyen el hábitat idóneo para *Galba (= Lymnaea) truncatula* que, en Europa, son los principales H.I. Además, se ha comprobado que en la prevalencia de infección por *F. hepatica* más que de las condiciones climáticas registradas ese año, influyen las que haya habido el año anterior (Díez-Baños *et al.*, 1989; Rojo *et al.*, 1989; González-Lanza *et al.*, 1989; Manga *et al.*, 1991; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2007a; Arias *et al.*, 2011).

Con temperaturas superiores a 10°C y suficiente humedad, Morrondo *et al.* (1994) comprobaron que había ejemplares de *L. truncatula* activos durante prácticamente todo el año en la provincia de La Coruña; además estos autores y, al igual que había observado González-Lanza *et al.* (1989) en la provincia de León, en los pastos hay, durante todo el año, un importante número de metacercarias por lo que los H.D. pueden infectarse durante todo el año.

También influyen las **condiciones orográficas**, como el tipo de suelo, la pendiente, etc. (Rojo y Ferre, 1999). En este sentido, Otranto y Traversa (2003) han señalado que, en los últimos 50 años, el hombre ha realizado cambios en el medio, mediante la construcción

de presas, diversos sistemas de irrigación, etc., de modo que ha transformado lugares secos en húmedos, lo que ha contribuido notablemente a la expansión geográfica de la fasciolosis.

En Galicia, Díez-Baños *et al.* (1989) comprobaron que el porcentaje de animales infectados por *F. hepatica* era inferior en áreas de mayor altitud, debido a las elevadas pendientes existentes y a la presencia de cursos fluviales escasos; además, señalaron que la prevalencia de infección por este trematodo se relaciona con la temperatura y las precipitaciones registradas el año anterior y que, en otoño e invierno, había mayor porcentaje de animales que eliminaban huevos de este trematodo.

Morrondo *et al.* (1997) al analizar mediante ELISA-indirecto, la seroprevalencia de infección en diversas localidades gallegas, obtuvieron la más elevadas en la Montaña (92%) y las más bajas en el Centro (74%) y la Costa (63%); concluyendo que la temperatura y la seroprevalencia de infección están inversamente relacionadas, mientras que están relacionadas positivamente con la humedad y la altitud de la zona, probablemente debido a que en las zonas húmedas y con temperaturas moderadas, la densidad del hospedador intermediario *L. truncatula* es mayor, y por tanto, es de esperar que también lo sea el número de metacercarias que se encuentran enquistadas en la hierba a disposición de los hospedadores definitivos. Asimismo, mediante ELISA-directo e indirecto, Sánchez-Andrade *et al.* (1995, 2001 a, 2002), obtuvieron mayores seroprevalencias en zonas en las que se registraban menores temperaturas y mayores precipitaciones como en la Montaña (42´6; 95´3%) y más reducidas (30´5; 61´7%) en la Costa en la que hay menor altitud y temperaturas más elevadas.

Arias *et al.* (2004) en vacas Rubia Gallega en pastoreo en la provincia de Lugo, mediante coprología y ELISA-indirecto, empleando una proteína de 2´9 kDa, observaron que el porcentaje más elevado (27´7%) correspondía a animales que pastaban en zonas entre 500 y 700 m y con precipitaciones inferiores a 1200 mm<sup>3</sup>. Asimismo, Morrondo *et al.* (2005) señalaron que la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno en pastoreo en diferentes localidades de Galicia, era mayor en las zonas en las que la altitud era media y las precipitaciones y la temperatura eran moderadas. Posteriormente, Arias *et al.* (2011) en un estudio realizado en ganado vacuno sacrificado en el NE de Portugal y NO de España, concluyeron que no existía relación entre las condiciones climáticas (lluvia y temperatura) y la prevalencia e intensidad de infección por *F. hepatica*.

### **b. Intrínsecos.**

En relación con la **edad** de los animales, en las infecciones por *F. hepatica*, en el parénquima hepático y en los conductos biliares se produce tejido fibrótico (Cheema y Hooshmand-Rad, 1985) de forma que puede llegar a encapsular a las fasciolas e impedir su migración hacia la vesícula. Además, las reinfecciones se caracterizan porque existe mayor infiltración de las áreas portales y por el reemplazo de grandes áreas de parénquima; estos cambios pueden actuar como una barrera, impidiendo que la infección progrese, al tiempo que les confiere una resistencia adquirida a los animales, de modo que, se establecen menor número de fasciolas a los conductos biliares y, por lo tanto, los animales adultos eliminan menor número de huevos. Por el contrario, para otros autores (González-Lanza *et al.*, 1989; Waruiru *et al.*, 2000; Sánchez-Andrade *et al.*, 2002) la prevalencia de infección por *F. hepatica*, es superior en los animales de mayor edad, debido a que han tenido más posibilidades de ingerir metacercarias que los más jóvenes que todavía no hayan tenido la oportunidad de infectarse al no haber salido al pasto.

En **ganado vacuno**, la mayoría de los autores (Boray *et al.*, 1985; Soulsby, 1987; Rojo *et al.* 1989; Quiroz, 1986; Rojo y Ferre, 1999) han señalado que tras una exposición inicial a *F. hepatica* los animales desarrollan una respuesta inmunitaria protectora que reduce el número de trematodos o bien inhiben su desarrollo, reduciéndose la eliminación de huevos (Hillyer *et al.*, 1996). Además, en los bovinos, según Rojo y Ferre (1999) como consecuencia de la primoinfección se desarrolla una extensa fibrosis hepática que aumenta la resistencia a sucesivas reinfecciones.

En la provincia de León, González-Lanza *et al.* (1989), observaron que la prevalencia de infección por *F. hepatica* se incrementaba con la edad de los animales, pero se mantenía estable a partir de los 3-4 años de edad (30-38%).

En **Galicia**, Morrondo *et al.* (1994) comprobaron que la prevalencia de infección era superior en las novillas (88%) que en las vacas adultas (70%). En trabajos posteriores mediante ELISA-indirecto, diversos autores (Morrondo *et al.*, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995, 2002; Arias *et al.*, 2010), detectaron que la seroprevalencia de infección era superior en los animales de mayor edad que en los más jóvenes.

En un estudio realizado en ganado vacuno sacrificado en el NE de Portugal y NO de España, Arias *et al.* (2011), hallaron en los animales de más de 10 años mayor prevalencia (39%) de parasitación por *F. hepatica* que en los menores de 3 años (12%).

En **corzos**, mediante ELISA-indirecto, Arias *et al.* (2009, 2013) hallaron mayor seroprevalencia de infección en los de mayor edad (32%) que en los más jóvenes.

En **équidos**, Getachew *et al.* (2010) hallaron una correlación positiva y significativa entre el prevalencia de *F. hepatica* y la edad de los animales, lo que concuerda con lo observado por Sánchez-Andrade *et al.* (2000, 2002) en ganado vacuno, quienes sugirieron que la exposición a este trematodo se incrementa con la edad de los animales debido al efecto acumulativo de ingestión de metacercarias a lo largo de su vida.

En el examen post-mortem de ponis jóvenes la prevalencia de *F. hepatica* oscilaba entre rango 0'2%-41% (Grelck *et al.*, 1977). Acici *et al.* (2013) detectaron diferencias estadísticamente significativas según la edad de los animales, siendo la seroprevalencia más elevada en los individuos de más de 3 años de edad.

Respecto a la **raza o aptitud** de los animales, en **ganado vacuno**, Sánchez-Andrade *et al.* (2000, 2001), comprobaron que en los bovinos procedentes de cruces el porcentaje de seropositivo era superior al hallado en los de razas más seleccionadas (Frisona, Parda Alpina, Rubia Gallega) y que eran los comprendidos entre 3 y 5 años los que presentaban mayor seroprevalencia; concluyendo que más que la raza lo que realmente influía sobre la seroprevalencia era el tipo de manejo de las vacas.

## 1.2. Unidad temática

La fasciolosis es una trematodosis parasitaria ampliamente difundida en diferentes regiones españolas, afectando en especial al ganado vacuno que se explota en el Norte del país, y en menor proporción al ovino. Debido a que en estas zonas concurren condiciones climáticas y edáficas idóneas para el desarrollo del ciclo externo de *Fasciola hepatica*, como sucede en Galicia, los valores de prevalencia en los rumiantes son elevados.

A pesar de que, desde hace mucho tiempo, se vienen sugiriendo diferentes medidas para el control de la fasciolosis en la Comunidad Autónoma Gallega su prevalencia en los rumiantes no ha disminuido, suponiendo una gran parte del coste económico dedicado a la lucha frente a las enfermedades parasitarias, puesto que ésta se basa casi exclusivamente en la administración de antihelmínticos.

La infección por *F. hepatica* no afecta por igual a todas las especies animales, en el ganado vacuno la parasitación cursa de forma subclínica, y se asocia a pérdidas indirectas causadas por decomisos de hígados, disminución de la producción, reducción de índices de conversión, costes derivados del tratamiento de los animales afectados, infecciones concomitantes, etc.

Con objeto de disponer de información actualizada de la distribución e importancia de esta trematodosis hepática en el ganado vacuno y en otras especies animales (corzos y équidos) que pudiesen actuar como reservorios de la infección, en esta Tesis Doctoral nos planteamos una serie de estudios con objeto de dilucidar estas cuestiones.

En un **PRIMER ESTUDIO**, realizado entre febrero de 2007 y marzo de 2009, se efectuaron diversas visitas a un matadero de Lugo, en el que se sacrificaban reses procedentes de Galicia, Norte de Portugal, León y Asturias. Para no entorpecer el quehacer diario del matadero, se estableció que semanalmente y durante 24 semanas, se seleccionarían los 8 primeros bovinos sacrificados, procediéndose a continuación al examen de su tracto digestivo (hígado, vesícula biliar, esófago y estómagos –rumen y retículo-) en busca de trematodos parásitos de los géneros *Fasciola*, *Paramphistomum* y *Dicrocoelium*. Se examinaron un total de 776 animales y además de establecer la prevalencia de infección por los diferentes trematodos hallados, esta se relacionó con la raza, sexo, edad y procedencia de los animales, así como, con las las condiciones climáticas durante el periodo de estudio.

Aunque el diagnóstico *post-mortem* resulta de sumo interés para conocer la importancia de las infecciones parasitarias, este es caro y laborioso y además los efectos patógenos ya se han producido. Por ello es de gran interés disponer de otras técnicas de diagnóstico que no conlleven el sacrificio de los animales y que, además, nos permita un diagnóstico precoz de la infección para poder establecer las medidas de control oportunas. En esta línea, las técnicas serológicas entre las que se incluyen las inmunoenzimáticas proporcionan una herramienta muy útil para determinar la exposición a agentes etiológicos, mediante la demostración de anticuerpos específicos frente a antígenos parasitarios.

En el **SEGUNDO ENSAYO**, y con objeto de establecer la seroprevalencia de infección de *F. hepatica* se tomaron muestras de sangre de un total de 1.034 vacas que se analizaron mediante 2 técnicas inmunoenzimáticas. Con ELISA-indirecto y una proteína recombinante de 2,9 kDa (FhrAPS) se evidenció la respuesta humoral IgG (Paz-Silva *et al.*, 2007). Asimismo, mediante ELISA-directo y un anticuerpo policlonal IgG anti-*F. hepatica* se detectó la presencia de antígenos circulantes (Sánchez-Andrade *et al.*, 2000).

Además para determinar la importancia que, en el mantenimiento de las infecciones por *F. hepatica*, pueden tener los diferentes tipos de razas de ganado vacuno y, en especial, el tipo de manejo de estos animales, de las 1.034 muestras, 330 eran de ganado vacuno mostrenco que se caracteriza por pastar libremente en el monte y no estar sometido a ningún tipo de control sanitario, 346 sueros eran de vacas Rubia Gallega que se explotan en régimen semiextensivo y que se tratan con albendazol 2 veces al año y las otras 358 muestras pertenecían a vacas Frisonas mantenidas en intensivo pero que en su alimentación se incluía hierba fresca y ensilado.

Una vez que se dispuso de datos actuales sobre la prevalencia de infección de *F. hepatica* en ganado vacuno, nos propusimos estudiar la posible intervención de los rumiantes silvestres y de los équidos como reservorios de este trematodo hepático. Se consideran que son reservorios los hospedadores que mantienen el ciclo de los parásitos, y aunque no siempre resultan imprescindibles para el mantenimiento de las infecciones, a menudo son muy importantes en su distribución puesto que en ocasiones no reciben la atención y los cuidados necesarios para el control de las parasitosis, bien porque se trate de animales de difícil manejo o porque se no se conoce totalmente su comportamiento ante las infecciones.

Por eso, en el **TERCER ESTUDIO**, nos planteamos contribuir al mejor conocimiento de la intervención del corzo (*Capreolus capreolus*) como posible reservorio de la infección de *F. hepatica* para el ganado vacuno. Este trematodo se ha citado en un amplio número de especies, entre las que se incluyen algunos rumiantes silvestres como el gamo (*Dama dama*), el ciervo (*Cervus elaphus*), la cabra ibérica (*Capra pyrenaica*), el muflón (*Ovis aries*) y el rebeco (*Rupicapra pyrenaica*); sin embargo, existe poca información relativa a las infecciones por *F. hepatica* en el corzo.

Además, hay que tener en cuenta que, en Galicia, el corzo es la especie de rumiante silvestre más abundante y, en estudios previos, nuestro grupo de investigación había comprobado que estos ungulados y los rumiantes domésticos comparten algunas especies de protozoos, de helmintos y de ectoparásitos, debido a que es frecuente que compartan pastos con el ganado que se explota en extensivo. Asimismo, es necesario destacar que los animales silvestres además de actuar como reservorios de diferentes patógenos también son útiles como centinelas de las infecciones que afectan a los animales domésticos.

En este tercer estudio, como métodos directos para observar la posible infección por *F. hepatica*, se examinaron los hígados y las heces de 301 corzos. Además y con objeto de detectar si estos ungulados habían ingerido metacercarias de este trematodo, se analizaron las correspondientes muestras de suero mediante 2 técnicas ELISA, en una se utilizó antígenos de excreción-secreción y en la otra se empleó la proteína recombinante de 2,9 kDa (FhrAPS). Además, en 15 zonas de Galicia de donde procedían los corzos, se tomaron muestras de heces y de sangre de 676 vacas que pastaban en extensivo en las que se detectaron la presencia de anticuerpos con ELISA y proteína FhrAPS y la de huevos mediante análisis coprológicos.

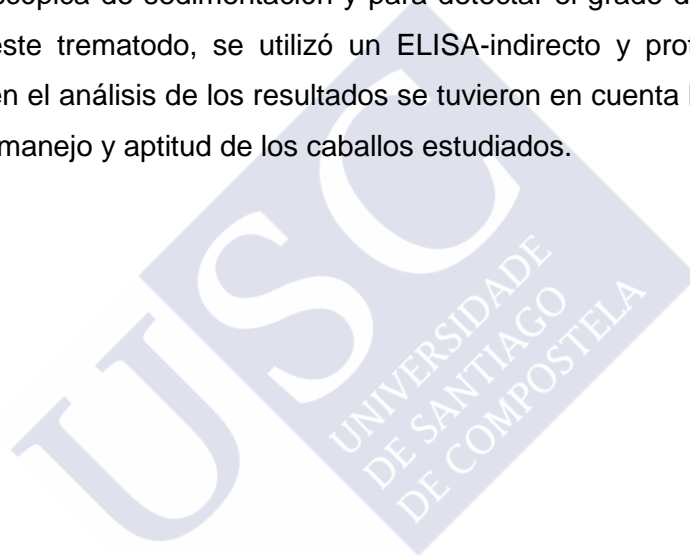
La prevalencia de infección hallada tanto en los corzos como en las vacas se relacionó con el sexo, la edad de los animales y con la zona de procedencia de las muestras.

En el **CUARTO ESTUDIO** nos planteamos conocer el papel que pueden tener los équidos como reservorios de *F. hepatica*.

En Galicia, desde hace algunos años, se ha incrementando notablemente el número de caballos debido a que, en la actualidad, aprovechan pastos que antes se utilizaban para

el ganado vacuno. Además, con la actual crisis económica, se ha incrementado el traslado de caballos desde zonas con escasos recursos naturales (Sur de España) a otras (Norte) donde los pastos son más abundantes y con ello se reduce el coste de alimentación de estos animales, por lo que al aprovechar prados donde antes se mantenían vacas, existe un evidente riesgo de ingestión de metacercarias de *F. hepatica*.

El ciclo endógeno de *F. hepatica* se completa en los équidos, aunque el número de trematodos que se desarrolla en estos animales es escaso y no está clara su intervención como reservorio que facilite la infección de los ruminantes domésticos. Con objeto de contribuir a su mejor conocimiento, se recogieron muestras de heces y de sangre de 536 caballos. Para comprobar si los animales eliminaban huevos de *Fasciola* se empleó la técnica copromicroscópica de sedimentación y para detectar el grado de exposición de los caballos frente a este trematodo, se utilizó un ELISA-indirecto y proteína recombinante FhrAPS. Además, en el análisis de los resultados se tuvieron en cuenta la edad, raza, sexo, tipo de alojamiento/manejo y aptitud de los caballos estudiados.







## **2. Objetivos**



Teniendo en cuenta los antecedentes antes expuestos, en esta Tesis Doctoral nos propusimos conseguir los siguientes **OBJETIVOS**:

1º.- Determinar, tras el examen *post-mortem*, qué especies de trematodos son más prevalentes en ganado vacuno procedente del Norte de la Península Ibérica.

2º.- Analizar la posible influencia que, sobre la prevalencia de infección de los trematodos hallados en las reses, puedan tener algunos factores intrínsecos (edad, raza) y extrínsecos (tipo de manejo de las reses, condiciones edafo-climáticas de la zona de procedencia).

3º.- Establecer la seroprevalencia de *F. hepatica*, mediante 2 técnicas inmunoenzimáticas que evidencien la presencia de antígenos y de anticuerpos frente a este trematodo, en ganado vacuno en pastoreo en el Noroeste de España.

4º.- Conocer la validez de estas técnicas de diagnóstico para el análisis de la posible influencia de algunos factores intrínsecos y extrínsecos sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*.

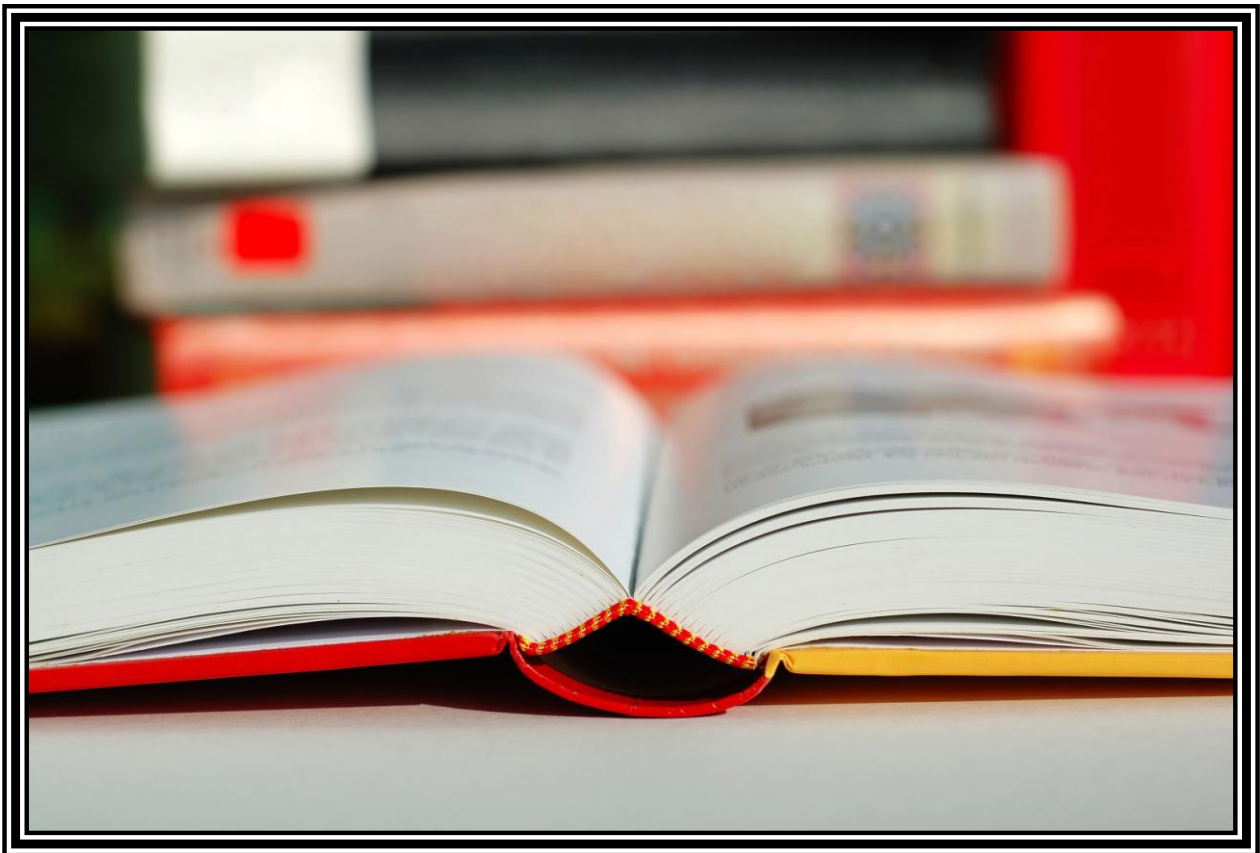
5º.- Poner a punto la técnica inmunoenzimática ELISA-indirecto utilizando una proteína de 2'9 kDa (FhrAPS) para detectar la respuesta humoral frente a *F. hepatica* en corzos.

6º.- Establecer, mediante técnicas directas e indirectas, si los corzos intervienen como reservorios de la infección de *F. hepatica* para el ganado vacuno en zonas endémicas de fasciolosis en las que, ocasionalmente, compartan pastos.

7º.- Determinar mediante técnicas directas (análisis coprológicos) e indirectas (ELISA-indirecto y proteína FhrAPS) la prevalencia de infección por *F. hepatica* en équidos que pastan en zonas de elevada prevalencia de fasciolosis en rumiantes domésticos,

8º.- Analizar la posible influencia de algunos factores intrínsecos (edad, raza, aptitud) y extrínsecos (número de caballos en las explotaciones, tipo de manejo de los mismos) sobre la prevalencia de infección de *F. hepatica* en équidos.





## **3. Publicaciones**



**Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and North-west Spain**

## Papers

# Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain

M. Arias, C. Lomba, V. Dacal, L. Vázquez, J. Pedreira, I. Francisco, P. Piñeiro, C. Cazapal-Monteiro, J. L. Suárez, P. Díez-Baños, P. Morrondo, R. Sánchez-Andrade, A. Paz-Silva

**Between February 2007 and January 2009, a total of 776 slaughtered animals were examined for the presence of Trematoda in the liver, gall bladder, oesophagus and stomach (rumen and reticulum). Data collected were analysed by the age and breed of the animals. The percentage of cattle from which Trematoda were found was 38 per cent (95 per cent confidence interval [CI] 35 to 41 per cent); 28 per cent (95 per cent CI 25 to 31 per cent) had *Fasciola hepatica*, 12 per cent (95 per cent CI 10 to 14 per cent) *Calicophoron daubneyi* and 6 per cent (95 per cent CI 4 to 8 per cent) *Dicrocoelium* species. A significantly high prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis was observed in cattle over 10 years of age. Autochthonous Rubia Gallega cattle had the highest prevalence of fasciolosis and crossbred cattle had the highest prevalence of dicrocoeliosis ( $P < 0.05$ ). Twenty per cent (95 per cent CI 15 to 25 per cent) of the cattle positive for *Fasciola* also had *Calicophoron* species; 10 per cent (95 per cent CI 6 to 14 per cent) also had small liver flukes (*Dicrocoelium* species).**

INFECTION of ruminants by the liver trematode parasite *Fasciola hepatica* is distributed worldwide, especially in areas under oceanic climate conditions (Arias and others 2009), where the presence of elevated humidity, frequent rainfall and mild temperatures provides a suitable environment for the development of its intermediate host, *Galba truncatula* (Rondelaud and others 2001, Phiri and others 2005). As *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) (Dinnik 1962, Eduardo 1983) and *F. hepatica* use the same lymnaeid (*G. truncatula*) in their life cycle, the presence of mixed infections by liver and ruminant flukes has been reported both in the lymnaeids and in the cattle (Abrous and others 1999, Dreyfuss and others 2008).

*Dicrocoelium* species is a trematode parasite affecting a broad range of mammals, generally ruminants. It is found where dry and calcareous or alkaline soils provide a favourable biotope for their intermediate hosts, several species of land molluscs and various ants (Manga-González and others 2001, Otranto and Traversa 2003). Although the climatic conditions are quite different for the presence of fasciolosis and paramphistomosis or dicrocoeliosis, all of these parasites

have been found in ruminants in north-west Spain (Díaz and others 2007b).

Mage and others (2002) reported that the prevalence of paramphistomosis, identified using coproscopic techniques, appeared to be increasing in cattle from central France, but no variation in the prevalence of natural infection of *F. hepatica* in snails was reported. Recent investigations carried out in north-west Spain using immunoenzymatic assays showed that the seroprevalence of fasciolosis had not decreased in the past 10 years, even though specific chemotherapy was given to most of the cattle (Arias and others 2010). There can be problems assessing the presence of trematodes as the prevalence of trematode infections can be underestimated when coprological methods are applied, and the use of immunoenzymatic tests does not allow the detection of current infections (Arias and others 2010).

The aim of this study was to estimate the prevalence of trematodes in cattle from northern Portugal and north-west Spain. Meat inspection records in an abattoir located in Lugo (north-west Spain) from February 2007 to January 2009 were used. Data were analysed by the age and the breed of the animals.

Veterinary Record (2011) 168, 408

doi: 10.1136/vr.d85

M. Arias, DVM, PhD,  
C. Lomba, DVM, PhD,  
V. Dacal, DVM, PhD,  
L. Vázquez, DVM, PhD,  
J. Pedreira, DVM, PhD,  
I. Francisco, DVM, PhD,  
P. Piñeiro, DVM, PhD,  
C. Cazapal-Monteiro, DVM,  
J. L. Suárez, DVM, PhD,  
P. Díez-Baños, DVM, PhD,  
P. Morrondo, DVM, PhD,  
R. Sánchez-Andrade, DVM, PhD,

A. Paz-Silva, DVM, PhD, DipEVPC,  
Parasitic Diseases, Epidemiology  
and Zoonoses, Animal Pathology  
Department, University of Santiago de  
Compostela, 27002-Lugo, Spain

E-mail for correspondence:  
[marisol.arias@usc.es](mailto:marisol.arias@usc.es)

Provenance: not commissioned,  
externally peer reviewed

Published Online First March 31, 2011

## Materials and methods

### Study area

The area of study (Fig 1) comprises a total surface area of 77,036.57 km<sup>2</sup> and it is located at latitudes 40° to 60°N under an oceanic climate characterised by regular precipitation and a narrow interval of temperatures throughout the year (Kottek and others 2006, Díaz and others 2007a). The approximate number of cattle is 1.7 million heads, distributed in the regions of León (113,134), Asturias (398,401), Galicia (980,368) and Minho-Douro (220,918).

The altitude varies from sea level (coastal zone) to 1285 m in the Oriental mountains. The slope is variable and there is an extensive plateau area. Lowland pastures are intensively used and fertilised, whereas in the highlands (highest altitude and mean slope) agriculture is seldom developed due to the difficulty in using vehicles and machinery (Díaz and others 2007b).

## Papers

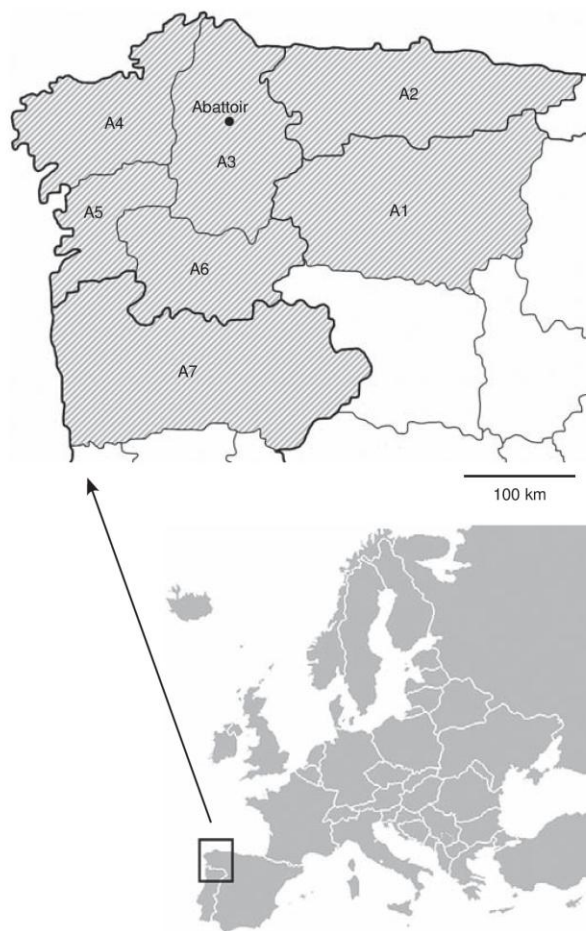


FIG 1: Area of study in northern Portugal and north-west Spain (77,036.57 km<sup>2</sup>). A1 León, A2 Asturias, A3 Lugo, A4 A Coruña, A5 Pontevedra, A6 Ourense, A7 Minho-Douro. A3, A4, A5 and A6 make up the region of Galicia

### Sampling

From February 2007 to January 2009, a survey was conducted at an abattoir located in Lugo (north-west Spain), where approximately 1300 cattle (young and adult) coming from northern Portugal and north-west Spain are slaughtered every week. There are several abattoirs in the study area, interspersed over more than 200 km, but this abattoir was chosen because all the others in the area slaughtered mainly calves and a very low number of adult cattle (fewer than 30 per week).

So as not to disturb the regular work of the abattoir, it was decided to sample the first eight cattle slaughtered one day a week during 24 months. A total of 776 animals were examined. Data regarding age, breed, sex and origin of the animals were also provided.

During the period of study, animals belonging to the autochthonous Rubia Gallega breed, crossbreeds, Friesians and Swiss brown breed were slaughtered. Four age groups were established, group 1 (less than three years), group 2 (three to six years), group 3 (seven to 10 years) and group 4 (> 10 years) (Sánchez-Andrade and others 2002).

### Parasitological examination

The digestive tract (liver, gall bladder, oesophagus and stomach [rumen and reticulum]) of each animal was checked for the presence of trematode flukes. First, a gross visual inspection of all the organs was carried out, and then each one was dissected carefully. Livers were inspected by cutting the lobes twice and making a deep cut with a number of small subcuts. Gall bladders were opened using a scalpel and their contents collected and filtered using a 300 µm mesh to retain the parasites.

Finally, a longitudinal incision was made to the oesophagus, rumen and reticulum to examine the presence of trematode specimens.

All the flukes were collected and stored in PBS (pH 7.4) before being transported to the laboratory, where the quantification and identification were done with reference to their morphological characteristics.

### Variations on climatic parameters

With the purpose of investigating the possible relationship between the climatic conditions and the prevalence of the parasite infections, data corresponding to mean and minimum temperatures and rainfall were obtained monthly from 24 automated meteorological stations.

### Statistical analysis

The percentages of prevalence were expressed as the value and the 95 per cent confidence interval (CI), and analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered as significant when  $P < 0.05$ .

By considering that there were no statistical differences in the climatic data or in the parasite prevalence that were observed monthly over the two years, the monthly variations were represented as an annual pattern of the region of study. This way, each prevalence value represents the mean of the two months examined (corresponding to the periods 2007 to 2008 and 2008 to 2009). The monthly variations of the prevalence of the trematodes were analysed by means of the chi-squared test, by considering each month as a separate category.

The parasitic burden was stated by the median as the corresponding measure of central tendency, and the interquartile range (the difference between the values of the upper and lower quartiles) as a measure of statistical dispersion. These data were analysed by means of the Kruskal-Wallis test. The possible relationship between the breed, age and the prevalence of *Trematoda* was established by calculating the odds ratio (OR) (Thrusfield 2005).

The possible correlation among the different parameters was assessed by the estimation of the Spearman's  $\rho$  value, which is a measure of the linear relationship between two variables (Corder and Foreman 2009).

Finally, all the data were classified by using the chi-squared automatic interaction detector (CHAID) test, a procedure that creates a tree-based model based upon adjusted significance testing (Bonferroni testing) (Magidson 1994). It classifies cases into groups or predicts values of a dependent (target) variable based on values of independent (predictor) variables. CHAID is often used as an exploratory technique and is an alternative to multiple linear regression and logistic regression, especially when the data set is not well suited to regression analysis.

All tests were done using SPSS for Windows (15.0).

### Results

Trematode specimens of *F. hepatica*, *C. daubneyi* and *Dicrocoelium* species were found in the liver, gall bladder, oesophagus and stomach (rumen and reticulum) of the slaughtered cattle.

#### *F. hepatica*

The percentage of cattle with *F. hepatica* flukes was 28 per cent (95 per cent CI 25 to 31 per cent) (Table 1), ranging from 25 per cent (95 per cent CI 0 to 40 per cent) in the Friesian cattle to 44 per cent (95 per cent CI 34 to 55 per cent) in the Rubia Gallega cattle. Significant differences were obtained using the Kruskal-Wallis test ( $\chi^2 = 16.454$ ,  $P = 0.001$ ), and the OR was 2.3 (1.9 to 2.9) for the autochthonous Rubia Gallega cows and 0.54 (0.21 to 0.8) for the Friesians.

The median burden of *F. hepatica* flukes was significantly higher in Friesians and Swiss brown cattle (Table 1).

The prevalence of fasciolosis increased with the age of the animals (Table 2). The highest percentage was achieved in the cattle of group 4 (> 10 years) (OR=1.92; 1.5 to 2.5) and the lowest in the group 1 (OR=0.33; 0.15 to 0.5). The median was highest in the seven- to 10-year-old cattle and lowest in the three- to six-year-old animals ( $P < 0.05$ ).

Considering all the factors together (Fig 2a), the prevalence of fasciolosis was first sorted into three groups based on the age of the cattle,

TABLE 1: Breed-associated prevalence and burden of Trematoda among cattle from northern Portugal and north-west Spain (n=776)

Breed	<i>Fasciola hepatica</i>			<i>Calicophoron daubneyi</i>			<i>Dicrocoelium</i> species		
	Positive cattle N (%)	Me	IQR	Positive cattle N (%)	Me	IQR	Positive cattle N (%)	Me	IQR
Friesian (n=574)	141 (25)	12	22	64 (10)	200	848	27 (5)	25	30
Rubia Gallega (n=90)	40 (44)	9	17	13 (14)	600	1800	8 (9)	83	348
Swiss brown (n=20)	6 (30)	12	18	2 (10)	95	10	2 (10)	250	301
Crossbred (n=92)	30 (33)	9	16	16 (17)	300	1600	13 (14)	20	65
Total	217 (28)	15	17	95 (12)	32	1150	50 (6)	82	67
$\chi^2$	16.454	17.236		3.408	3.902		13.212	14.039	
P	0.001	0.001		0.333	0.272		0.004	0.003	

IQR Interquartile range, Me Median

TABLE 2: Age-associated prevalence and burden of Trematoda among cattle from northern Portugal and north-west Spain (n=776)

Age (years)	<i>Fasciola hepatica</i>			<i>Calicophoron daubneyi</i>			<i>Dicrocoelium</i> species		
	Positive cattle N (%)	Me	IQR	Positive cattle N (%)	Me	IQR	Positive cattle N (%)	Me	IQR
Group 1: <3 (n=83)	10 (12)	10	26	4 (5)	100	424	8 (10)	58	57
Group 2: 3 to 6 (n=248)	59 (24)	8	13	31 (12)	200	454	17 (7)	33	59
Group 3: 7 to 10 (n=295)	89 (30)	13	14	43 (15)	400	1950	9 (3)	15	19
Group 4: >10 (n=150)	59 (39)	11	28	17 (11)	200	301	16 (11)	31	245
Total	217 (28)	15	17	95 (12)	32	1150	50 (6)	82	67
$\chi^2$	22.980	23.398		1.787	5.999		11.531	11.673	
P	0.001	0.001		0.148	0.112		0.009	0.009	

IQR Interquartile range, Me Median

with the highest values seen in the three- to 11-year-old cattle (group 2 and group 3), then accordingly to the breed, with the lowest prevalence in the Friesians.

The prevalence of fasciolosis was above 23 per cent (95 per cent CI 20 to 26 per cent) throughout the study (Fig 3), rising from March (23 per cent; 95 per cent CI 20 to 26 per cent) to June (36 per cent; 95 per cent CI 33 to 39 per cent) and between August (23 per cent; 95 per cent CI 20 to 26 per cent) and December (35 per cent; 95 per cent CI 32 to 38 per cent). Significant differences concerning climatic parameters were not recorded. No correlations among the climatic records (rainfall and temperature) and either the prevalence of fasciolosis or the numbers of *Fasciola* were obtained.

### *C daubneyi*

Twelve per cent (95 per cent CI 10 to 14 per cent) of the animals had *Calicophoron* flukes in the stomach (rumen and reticulum). No significant differences were observed in the prevalence of paramphistomosis or in the fluke median regarding the breed of the animals ( $P > 0.05$ ).

The analysis of the percentages of infection by *C daubneyi* showed there were no age-related differences (Table 2), and the same was obtained by checking the fluke values ( $P > 0.05$ ).

Fig 3 shows that the prevalence of paramphistomosis peaked in October (19 per cent; 95 per cent CI 16 to 22 per cent), but statistical differences according to the climatic parameters were not observed. No correlation between the climatic data (rainfall and temperature) and the prevalence of paramphistomosis or the numbers of *C daubneyi* was seen.

### *Dicrocoelium* species

The percentage of cattle with *Dicrocoelium* flukes was 6 per cent (95 per cent CI 4 to 8 per cent). Crossbreeds showed a significantly higher prevalence of dicrocoeliosis than the other breeds (OR=2.9; 95 per cent CI 2.4 to 3.6 per cent) and Friesians a significantly lower prevalence (OR=0.4; 95 per cent CI 0.2 to 0.7 per cent). A significantly higher median of flukes in the Swiss brown cattle was observed.

The oldest (>10 years) cattle had the highest percentage of positivity to *Dicrocoelium* (OR=2.1; 95 per cent CI 1.5 to 2.8 per cent), and the lowest was observed in group 3 (seven to 10 years) (OR=0.3; 95 per cent CI 0.15 to 0.6 per cent) (Table 2).

Significant differences according to the age were observed, with the highest value for median fluke in the youngest animals (group 1).

When taking into account both the breed and the age (Fig 2b), two groups were seen, with the highest prevalence in the Rubia Gallega, Swiss brown and crossbred cattle and the lowest in the Friesians. This group was clustered according to age into younger than three years and older than three years.

A positive significant correlation between the minimal temperature and both the prevalence of dicrocoeliosis (Spearman's correlation coefficient (CC)=0.132,  $P=0.001$ ) and the numbers of *Dicrocoelium* (CC=0.127,  $P=0.001$ ) was seen.

The highest prevalences were recorded between June and October (Fig 3), and statistical differences were seen ( $\chi^2=21.210$ ,  $P=0.020$ ).

### Mixed infections

Twenty-eight per cent (95 per cent CI 25 to 31 per cent) of the cattle were infected with trematodes; infection by all three parasites was detected in 1 per cent (95 per cent CI 0 to 2 per cent) of cattle and infection, by two was detected in 21 per cent (95 per cent CI 18 to 24 per cent) of cattle. Twenty per cent (95 per cent CI 15 to 25 per cent)

of the cattle positive for *Fasciola* had also *Calicophoron* species and 10 per cent (95 per cent CI 6 to 14 per cent) of the animals had both *Fasciola* and *Dicrocoelium* species. By means of the Spearman's test, a weak association between the numbers of *F hepatica* and *C daubneyi*, and also between *F hepatica* and *Dicrocoelium* was observed (CC=0.148;  $P=0.001$  and CC=0.076;  $P=0.035$ , respectively).

The most frequent mixed infection in Friesian (16 per cent; 95 per cent CI 11 to 21 per cent) and Rubia Gallega (12 per cent; 95 per cent CI 3 to 21 per cent) cattle was caused by *F hepatica* and *C daubneyi*, and in crossbreeds, the most frequent mixed infection was *F hepatica* and *Dicrocoelium* species (18 per cent; 95 per cent CI 7 to 29 per cent). A similar percentage (12 per cent; 95 per cent CI 0 to 34 per cent) of Swiss brown animals with *F hepatica* and *C daubneyi* or *F hepatica* and *Dicrocoelium* species was recorded.

When considering age, the most prevalent mixed infection was *F hepatica* and *C daubneyi* flukes in the animals aged seven to 10 years (19 per cent; 95 per cent CI 12 to 26 per cent) and *F hepatica* and *Dicrocoelium* species in cattle under three years (18 per cent; 95 per cent CI 0 to 36 per cent).

### Discussion

The most prevalent trematode infections in cattle in Europe are frequently caused by flukes belonging to the genera *Fasciola*, *Paramphistomum* and *Dicrocoelium*. Although many studies regarding ruminant infection by *Fasciola* have been conducted, only a few concerning the infection by *Paramphistomum* or *Dicrocoelium* have been developed (Szmidi-Adjidé and others 2000, Manga-González and González-Lanza 2005, Phiri and others 2006, 2007, Goater and Colwell 2007).

In the present study, most of the slaughtered animals at other abattoirs were calves with only a few adult cattle being slaughtered. For this reason the investigation was conducted in the main livestock abattoir in the area as it received cattle of different ages. The prevalence of fasciolosis was highest, followed by paramphistomosis and dicrocoeliosis. The prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis was significantly associated with the cattle breed, with the highest percentages of infection in the autochthonous Rubia Gallega and in crossbreeds, respectively.

The prevalence of fasciolosis and dicrocoeliosis increased significantly with the age of the animals, which disagrees with some previ-

Papers

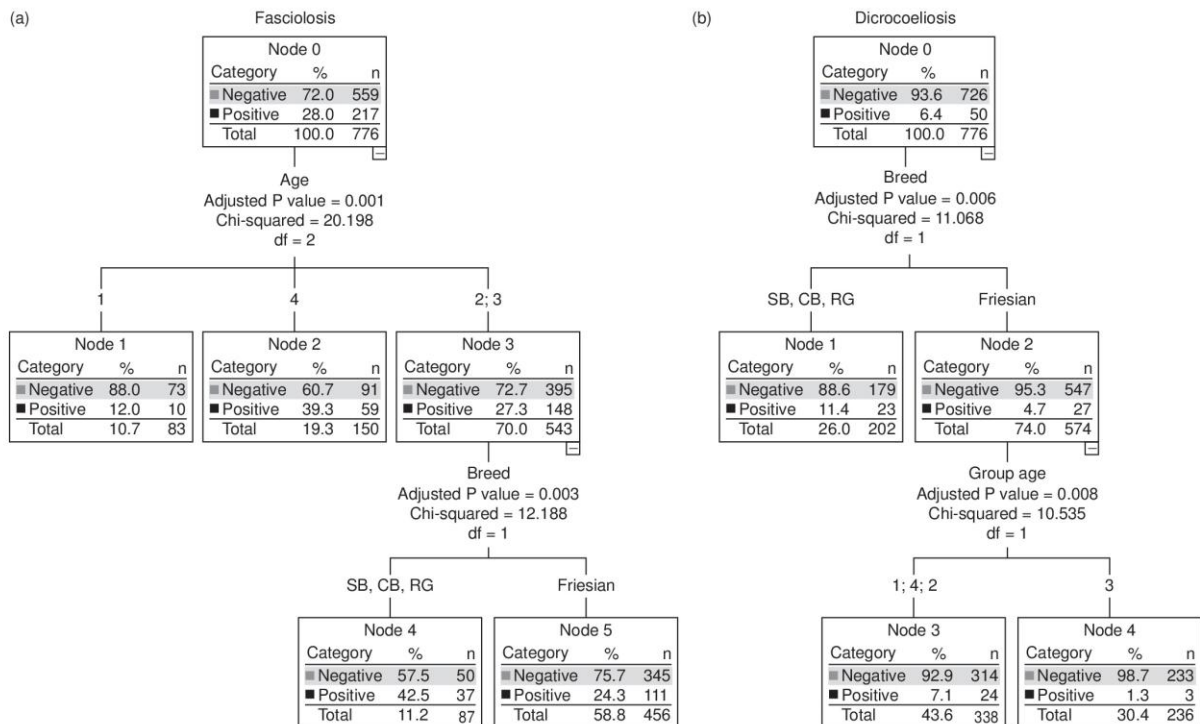


FIG 2: Classification of the prevalence of trematodes in slaughtered cattle from northern Portugal and north-west Spain using the chi-squared automatic interaction detector test (n=776). (a) Fasciolosis, (b) dicrocoeliosis. It should be taken into account that each 'total' corresponds to the 'total' of the previous node. CB Crossbreed, RG Rubia Gallegas, SB Swiss brown

ous reports that indicate the development of resistance after the initial exposure to trematode flukes (Sánchez-Andrade and others 2002, Díaz and others 2006).

Infection of ruminants by both *F hepatica* and *C daubneyi* depends on the presence of aquatic snails belonging to the family Lymnaeidae, thus wet areas have a higher risk. In the present study, the absence of variations in the prevalence of fasciolosis or paramphistomosis over different climates suggests that the snails acting as intermediate hosts can survive throughout the year. As a consequence, cercariae can be released over the whole year, becoming metacercariae (the infective stage) and can be ingested with the grass by the cattle. Infection of cattle by *Dicrocoelium* requires the ingestion of parasitised ants, which live in arid and dry areas. A temperature-dependent occurrence of *Dicrocoelium* infections was recorded, with the highest prevalence when the highest temperatures (late spring to early autumn) and low levels of rainfall were recorded.

There is a lack of information on mixed trematode infections in cattle from north-west Spain and northern Portugal. In the present study, 14 per cent of the cattle had *F hepatica* and *C daubneyi* flukes,

which implies that 20 per cent of ruminants positive for *Fasciola* also have *Calicophoron* specimens. The percentage of cattle with *Fasciola* and *Dicrocoelium* was 6 per cent, that is, 10 per cent of the animals positive for *F hepatica* had also small liver flukes.

The management of the cattle in this area is strongly linked to their breed; Friesians remain stabled or have limited access to cultivated pastures and Rubia Gallegas graze both cultivated and natural meadows (Arias and others 2010). The fact that these pastures are frequently watered during the driest months (summer) explains the improved development and survival of lymnaeid snails in this area. This would also explain the observation that the highest percentage of mixed infection by *Fasciola* and *Calicophoron* exists among the autochthonous cattle. Swiss brown and crossbred cattle are often maintained in mountainous areas on natural pastures, so the possibility of infection by *Dicrocoelium* is enhanced, as stated by Ferre and others (1994).

Livestock in the area of the present study are treated annually with anthelmintics, but this is almost exclusively strategic deworming against *F hepatica* (Paz-Silva and others 2007), probably due to the lack of knowledge about suitable habitats for *Calicophoron* and *Dicrocoelium* in this region. Chemotherapy against *F hepatica* is frequent in dairy cattle (Friesians), being applied during the dry period. In the absence of measures to limit the presence of snails that act as intermediate hosts, the administration of anthelmintics gives only temporary reductions in the number of cattle passing eggs in their faeces. It is of note that a very low percentage of Friesians had *Dicrocoelium* specimens, because only grazing cattle are usually infected by this trematode (Ferre and others 1994).

Data from the present investigation indicate that cattle from northern Portugal and north-west Spain are exposed to infection by *F hepatica*, *C daubneyi* and

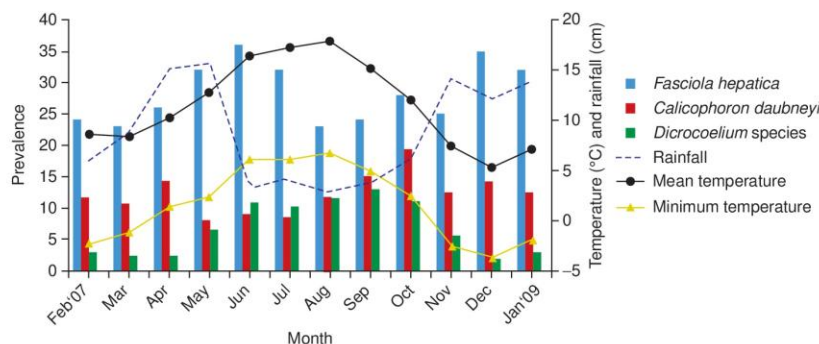


FIG 3: Annual pattern of the climatic data and of the prevalence of fasciolosis, paramphistomosis and dicrocoeliosis in slaughtered cattle from northern Portugal and north-west Spain (n=776)

*Dicrocoelium* species, which marks the need for control measures against them. By considering that most of the chemotherapy is focused against *Fasciola* specimens only, the total effect appears unsatisfactory. More efforts are required to control the habitat of the intermediate hosts; for example, using fencing, drainage for *Fasciola* and *Calicophoron*, and elimination of ant nests for *Dicrocoelium*.

### Acknowledgement

This work was partially supported by the Projects XUGA 07MRU034261PR (Xunta de Galicia, Spain) and FAU2006-00006-00-00 (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, MEC, Spain).

### References

- ABROUS, M., RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G. (1999) *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research* **85**, 765-769
- ARIAS, M., PINEIRO, P., HILLYER, G. V., SUÁREZ, J. L., FRANCISCO, I., CORTIÑAS, E. J., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., SÁNCHEZ-ANDRADE, R. & PAZ-SILVA, A. (2010) An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *Journal of Parasitology* **96**, 626-631
- ARIAS, M. S., SUÁREZ, J. L., HILLYER, G. V., FRANCISCO, I., CALVO, E., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍAZ, P., FRANCISCO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. & PAZ-SILVA, A. (2009) A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fascioliasis. *Veterinary Journal* **182**, 73-78
- CORDER, G. W. & FOREMAN, D. I. (2009) *Non-parametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. John Wiley & Sons
- DÍAZ, P., LOMBA, C., PEDREIRA, J., ARIAS, M., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J. L., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. & PAZ-SILVA, A. (2006) Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae Trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Veterinary Parasitology* **140**, 281-288
- DÍAZ, P., PAZ-SILVA, A., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J. L., PEDREIRA, J., ARIAS, M., DÍEZ-BAÑOS, P. & MORRONDO, P. (2007b) Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Veterinary Parasitology* **149**, 285-289
- DÍAZ, P., PEDREIRA, J., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., SUÁREZ, J. L., ARIAS, M. S., FRANCISCO, I., FERNÁNDEZ, G., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. & PAZ-SILVA, A. (2007a) Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) in cattle from oceanic climate areas. *Parasitology Research* **101**, 339-342
- DINNIK, J. A. (1962) *Paramphistomum daubneyi* sp nov from cattle and its snail host in the Kenya Highland. *Parasitology* **52**, 143-151
- DREYFUSS, G., VIGNOLES, P. & RONDELAUD, D. (2008) *Paramphistomum daubneyi*: the number of sporocysts developing in experimentally and naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitology Research* **103**, 345-349
- EDUARDO, S. L. (1983) The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischeoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Systematic Parasitology* **5**, 25-79
- FERRE, I., ORTEGA-MORA, L. M. & ROJO-VÁZQUEZ, F. A. (1994) Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* infection in León province (NW Spain). *Preventive Veterinary Medicine* **21**, 147-154
- GOATER, C. P. & COLWELL, D. D. (2007) Epidemiological characteristics of an invading parasite: *Dicrocoelium dendriticum* in sympatric wapiti and beef cattle in southern Alberta, Canada. *Journal of Parasitology* **93**, 491-494
- KOTTEK, M., GRIESER, J., BECK, C., RUDOLF, B. & RUBEL, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* **15**, 259-263
- MAGE, C., BOURGNE, H., TOULLIEU, J. M., RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G. (2002) *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research* **33**, 439-447
- MAGIDSON, J. (1994) The CHAID approach to segmentation modeling: chi-squared automatic interaction detection. In *Advanced Methods of Marketing Research*. Ed R. P. Bagozzi. Blackwell. pp 118-159
- MANGA-GONZÁLEZ, M. Y. & GONZÁLEZ-LANZA, C. (2005) Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliosis in northern Spain. *Journal of Helminthology* **79**, 291-302
- MANGA-GONZÁLEZ, M. Y., GONZÁLEZ-LANZA, C., CABANAS, E. & CAMPO, R. (2001) Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology* **123** (Suppl), S91-114
- OTRANTO, D. & TRAVERSA, D. (2003) Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends in Parasitology* **19**, 12-15
- PAZ-SILVA, A., HILLYER, G. V., ARIAS, M. S., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PEDREIRA, J., SUÁREZ, J. L., LOMBA, C., DÍAZ, P., FRANCISCO, I., DÍEZ-BAÑOS, P. & MORRONDO, P. (2007) A cross-sectional study of fascioliasis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. *International Journal of Applied Research In Veterinary Medicine* **5**, 52-56
- PHIRI, A. M., CHOTA, A. & PHIRI, I. K. (2007) Seasonal pattern of bovine amphistomosis in traditionally reared cattle in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. *Tropical Animal Health and Production* **39**, 97-102
- PHIRI, A. M., PHIRI, I. K. & MONRAD, J. (2006) Prevalence of amphistomiasis and its association with *Fasciola gigantica* infections in Zambian cattle from communal grazing areas. *Journal of Helminthology* **80**, 65-68
- PHIRI, A. M., PHIRI, I. K., SIKASUNGE, C. S. & MONRAD, J. (2005) Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **52**, 414-416
- RONDELAUD, D., VIGNOLES, P., ABROUS, M. & DREYFUSS, G. (2001) The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. *Parasitology Research* **87**, 475-478
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., PAZ-SILVA, A., SUÁREZ, J. L., PANADERO, R., PEDREIRA, J., LÓPEZ, C., DÍEZ-BAÑOS, P. & MORRONDO, P. (2002) Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications* **26**, 361-370
- SZMIDTADJIDÉ, V., ABROUS, M., ADJIDÉ, C. C., DREYFUSS, G., LECOMPTE, A., CABARET, J. & RONDELAUD, D. (2000) Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Veterinary Parasitology* **87**, 133-138
- THRUSHFIELD, M. (2005) *Veterinary Epidemiology*. 3rd edn. Blackwell Science

**An approach of the laboratory to the field:  
assessment of the influence of cattle management  
on the seroprevalence of fascioliasis by using  
polyclonal – and recombinant – based ELISAs**

The Journal of

# PARASITOLOGY

**AN APPROACH OF THE LABORATORY TO THE FIELD: ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF CATTLE MANAGEMENT ON THE SEROPREVALENCE OF FASCIOLIASIS BY USING POLYCLONAL- AND RECOMBINANT-BASED ELISAs**

**M. Arias, P. Piñeiro, G. V. Hillyer\*, J. L. Suárez, I. Francisco, F. J. Cortiñas, P. Díez-Baños, P. Morondo, R. Sánchez-Andrade, and A. Paz-Silva**

Animal Pathology Department, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Veterinary College, University of Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Spain. *e-mail: adolfo.paz@usc.es*

**The Journal of the  
American Society of  
Parasitologists**

## AN APPROACH OF THE LABORATORY TO THE FIELD: ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF CATTLE MANAGEMENT ON THE SEROPREVALENCE OF FASCIOLIASIS BY USING POLYCLONAL- AND RECOMBINANT-BASED ELISAs

M. Arias, P. Piñeiro, G. V. Hillyer\*, J. L. Suárez, I. Francisco, F. J. Cortiñas, P. Díez-Baños, P. Morrondo, R. Sánchez-Andrade, and A. Paz-Silva

Animal Pathology Department, Epidemiology, Zoonoses and Parasitic Diseases, Veterinary College, University of Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Spain. e-mail: [adolfo.paz@usc.es](mailto:adolfo.paz@usc.es)

**ABSTRACT:** A cross-sectional study was conducted to assess the seroprevalence of fascioliasis by immunoenzymatic probes in an endemic area (northwestern Spain). Blood samples were collected from 1,034 cattle (crossbred, Rubia Gallega, and Friesian breeds), and the diagnosis of fascioliasis was carried out by determining both the occurrence of antigenemia and the presence of specific IgG antibodies against a *Fasciola hepatica* recombinant protein (FhrAPS). The IgG seroprevalence was 65% (95% CI, 62–68) by the FhrAPS-ELISA, and 32% (29–35) exhibited antigenemia; the lowest percentages occurred in the Friesians, and the highest percentages were found in the crossbreds. These results confirm an elevated seroprevalence of fascioliasis that is unexpected considering that most of the cattle livestock (Friesian and Rubia Gallega) receive fasciolicide treatment. The lack of adequate measures on the environment and erratic chemotherapy seem to be responsible for the fact that control of fascioliasis has not improved in the last 10 yr in the area of study.

Fascioliasis is common in regions where the environment and climatic conditions favor the survival of its intermediate host, *Galba truncatula* (Rondelaud et al., 2001; Phiri et al., 2005). When infected animals pass *Fasciola hepatica* eggs in feces, the hatched miracidia infect the snails, and after a 5- to 7-wk period, the cercariae emerge from snails and encyst as metacercariae on aquatic vegetation. Infection of the animals occurs by the ingestion of metacercariae (Marcos et al., 2007).

Worldwide losses in animal productivity due to fascioliasis have been estimated as over US\$3 billion per annum (FAO, 1994; Kaplan, 2001). Surveys of fascioliasis in cattle from developing countries showed high prevalences (28–78%) by coprological analysis and liver inspections (Anderson et al., 1999; Phiri et al., 2005). Although grazing animals seem to be at higher risk for developing fascioliasis by feeding in contaminated pastures, the ingestion of fresh pasture or hay in the farms might also serve as vehicle for the transmission of metacercariae to stabled cows (Stromberg and Corwin, 1993).

The main alternative for the control of fascioliasis in cattle consists of chemotherapy with antiparasitic drugs. Nevertheless, some factors such as the cattle breed or the management of the animals might influence the application of anthelmintics. Dairy livestock can be dewormed during the dry period only, whereas wild free-grazing cattle are seldom, if ever, treated. Although their success has been proven, environmental actions focused on hampering the external phase of the life cycle of *F. hepatica* are rarely applied (Paz-Silva et al., 2007). In the last few decades, some free-grazing animals (ruminants, horses) have been introduced in forest areas for the control and reduction of weeds and bushes without herbicides. The autochthonous breeds seem to be the best suited for this strategy due to their natural adaptation ability.

Several recombinant proteins have been used in the serological detection of *F. hepatica* infection in sheep and in cattle (O'Neill et al., 1998; Cornelissen et al., 2001; Raina et al., 2006). Their suitability for the detection of early humoral immune response

against the trematode has also been demonstrated (Arias et al., 2006), and hence it has potential usefulness as a marker for early and active infection by *F. hepatica* (Arias et al., 2007). More recently, the possibility for its use in assessing fasciolicide efficacy has also been explored (Arias et al., 2009).

Herein, we report the results of a cross-sectional study designed to test the possible effect of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis. Sera samples from different cattle breeds were collected and evaluated by means of an ELISA test with the 2.9 kDa *F. hepatica* recombinant protein (FhrAPS) to evaluate the IgG humoral response. A polyclonal IgG-based ELISA was also used to show the existence of active fascioliasis by demonstrating the presence of antigenemia. Results were analyzed with regard to the breed and the age of the cattle.

### MATERIALS AND METHODS

#### Field study area

From December 2007 to April 2008, a serological survey was conducted using cattle from northwestern Spain (42°20'–43°45'N, 6°49'–8°00'W). This is an agricultural area with a cattle population about 900,000 animals, where the main breeds are Friesian (focused on milk production), the autochthonous Rubia Gallega (production of calves with outdoor grass fattening), and the crossbred (reduction of unwanted vegetation in forests and production of calves).

The climate in this area is oceanic, which is typically found along the west coasts at the middle latitudes (40°–60°N) of all the world continents and in southeastern Australia (Kottek et al., 2006). The presence of mild temperatures and frequent rainfall throughout the year favors the survival of *Galba truncatula*, the snail that acts as the intermediate host for this trematode (Ollerenshaw and Smith, 1969).

#### Bovine management

In the study area, 3 main types of management are applied, depending on the local need and the bovine breed. Forests and natural pastures are characterized by the presence of *Calluna vulgaris*, *Erica arborea*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Plantago major*, *Phleum pratense*, and *Chamomilla recutita*. No land-management operations are used, and there is no rotation of pastures. Free-grazing cattle produced by crossing different breeds are maintained under extensive management throughout the year; food supplementation, deworming, and some measure for the control of parasites are never applied. Generally, the autochthonous Rubia Gallega breed shares these grazing areas. The main contact with these animals occurs when the autochthonous Official Veterinary Services impose an obligatory program to survey for brucellosis, leucosis, peripneumonia, and tuberculosis.

Received 11 September 2009; revised 16 November 2009; accepted 19 November 2009.

\*Laboratory of Parasite Immunology and Pathology, Suite 617-A, School of Medicine, Medical Sciences Campus, University of Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico 00936-50.

DOI: 10.1645/GE-2333.1

TABLE I. Seroprevalence of cattle fascioliasis in NW Spain by breed and age (N = 1,034). Results are expressed as percentages and the 95% confidence interval. AP: apparent prevalence; TP: true prevalence.

Breed	Age (yr)	Total	Antigenemia			FhrAPS		
			Pos (n)	% AP (95% CI)	% TP (95% CI)	Pos (n)	% AP (95% CI)	% TP (95% CI)
Crossbred	1	69	20	29 (20,41)	34 (21,46)	37	54 (42,65)	56 (40,72)
	2	35	18	51 (36,67)	60 (41,79)	26	74 (58,86)	84 (65,100)
	3	66	37	56 (44,67)	65 (51,79)	52	79 (67,87)	90 (77,100)
	4	21	11	52 (32,72)	61 (36,86)	18	86 (65,95)	100 (79,100)
	5	24	12	50 (31,69)	58 (35,81)	20	83 (64,93)	96 (76,100)
	6	33	12	36 (22,53)	42 (23,61)	26	79 (62,89)	90 (71,100)
	7	27	9	33 (19,52)	39 (18,59)	19	70 (52,84)	79 (56,100)
	8	55	18	33 (22,46)	38 (24,52)	36	65 (52,77)	72 (55,89)
	Total	330	137	42 (37,42)	48 (42,54)	234	71 (66,76)	80 (73,86)
Friesian	1	61	13	21 (13,33)	25 (13,37)	29	48 (36,60)	48 (31,65)
	2	40	13	32 (20,48)	38 (21,55)	25	63 (47,76)	68 (48,89)
	3	49	14	29 (18,42)	33 (19,48)	34	69 (55,80)	78 (60,95)
	4	27	8	30 (16,48)	34 (14,54)	18	67 (48,81)	74 (50,98)
	5	43	8	19 (10,33)	22 (8,45)	28	65 (50,78)	72 (53,91)
	6	42	9	21 (12,36)	25 (10,39)	27	64 (49,77)	71 (51,90)
	7	48	14	29 (18,43)	34 (19,49)	36	75 (61,85)	85 (69,100)
	8	48	6	13 (6,25)	15 (4,25)	16	33 (22,47)	29 (11,47)
	Total	358	85	24 (20,28)	28 (22,33)	213	60 (54,64)	64 (57,71)
Rubia Gallega	1	48	14	29 (17,45)	34 (17,50)	27	56 (41,71)	60 (39,82)
	2	43	18	42 (26,59)	49 (29,69)	29	67 (49,85)	75 (53,98)
	3	53	22	42 (28,57)	48 (31,65)	38	72 (57,83)	81 (63,99)
	4	40	13	33 (17,52)	38 (15,59)	29	73 (53,87)	82 (64,100)
	5	38	12	32 (19,47)	37 (20,54)	25	66 (46,82)	73 (47,99)
	6	43	11	26 (15,40)	30 (15,45)	29	67 (48,81)	75 (52,99)
	7	43	12	28 (17,43)	32 (17,48)	22	51 (32,70)	53 (26,81)
	8	38	8	21 (11,36)	24 (9,40)	23	61 (44,78)	66 (39,85)
	Total	346	110	32 (27,37)	37 (31,43)	222	64 (58,70)	70 (61,78)
TOTAL		1,034	332	32 (29,35)	37 (34,41)	669	65 (62,68)	71 (67,75)

The Rubia Gallega cattle are animals kept under field conditions outside and are only brought into the paddocks at night. As mentioned already, the grazing herd feeds on natural pastures, although cultured pastures composed of *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, and *Dactylis glomerata* are also used. Rotation of pastures is carried out every 2–4 yr. Control of parasites is based on the administration of albendazole twice a year, in spring and autumn (Paz-Silva et al., 2007).

Most of the Friesian cows are exploited under an intensive regime, and fresh pasture or hay is often provided according to the season. Cultured pastures are managed every year, and drainage is sometimes applied. Because these are milking cattle, control of parasites is administered during the dry period; drugs used include albendazole, triclabendazole, or eprinomectin.

### Sampling

Blood samples from 1,034 female cattle were collected with the support of 15 clinician veterinarians collaborating with the Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela. The natural life span of a dairy cow is approximately 20 to 25 yr, but milk cows are usually slaughtered at the age of 7 to 9 yr. For this reason, cattle younger than 9 yr were used in the current investigation.

A list with all the bovine farms in the area of Lugo (NW Spain) was provided by a government quota department, for which farmers are obliged to list all their cattle. For each cow, this directory includes age, breed, aptitude, date of entry in the farm (purchase or birth), and an identification number.

The animals were randomly chosen by using the SPSS statistical package (SPSS, v. 15.0; IBM, Chicago, Illinois) to select the cows from the list of all the animals. Friesian and Rubia Gallega cows were sampled based on a plan designed by the clinicians. Crossbred cattle were sampled to coincide with the survey for brucellosis, leucosis, peripneumonia, and tuberculosis by the autochthonous Official Veterinary Services.

Based on a seroprevalence of 71% previously obtained for Rubia Gallega cows (Paz-Silva et al., 2007), the required sample size for each breed was estimated at 317 (Thrusfield et al., 2005). Table I shows the distribution of the sera with respect to the age and the breed of the animals.

### FhrAPS-ELISA protocol

The humoral IgG response against FhrAPS was evaluated on serum samples using polystyrene plates (Paz-Silva et al., 2007). Thirty sera samples were obtained from animals from a farm found by repeated coprological examinations to be free of fascioliasis for more than 6 yr and were used as negative controls. The cut-off point for a positive result was taken as the mean optical density (OD) of all the negative sera plus 3 standard deviations (Sánchez-Andrade et al., 2002). The mean OD for the negative sera was 0.261, with a standard deviation of 0.045. Thus, samples were considered as positive when O.D. values were >0.396.

To obtain the values of sensitivity and specificity, fecal and serum samples were obtained from 95 naturally infected cattle. The feces were examined using the coprological sedimentation technique, and sera samples were examined using an ELISA and recombinant protein. The levels of sensitivity and specificity of the ELISA + FhAPS were 86% and 88%, respectively.

### Antigen capture ELISA protocol

Detection of circulating antigens of *F. hepatica* was done by a direct ELISA using a polyclonal IgG anti-*F. hepatica* (Sánchez-Andrade et al., 2000). The sera employed as negative controls were the same as those used to detect specific antibody against the FhrAPS by means of the indirect ELISA. Positive values were taken as those for which the OD was more than the mean OD of all the negative sera plus 3 standard deviations. The mean OD value for the negative sera was 0.103, with a standard deviation of 0.067. Thus, positive values were equal to 0.304, or higher.

### Statistical analysis

The percentages of seroprevalence are expressed as the value and the 95% confidence interval, and these were analyzed by using the  $\chi^2$  test. Differences were considered as significant when  $P < 0.05$ . The interpretation of serological surveys of disease is difficult because most diagnostic (or screening) tests have imperfect sensitivity and specificity. Thus, there is a distinction between true prevalence (the proportion of a population that is actually infected) and apparent prevalence (the proportion of the population that tests positive for the disease; Greiner and Gardner, 2000). Here, both the apparent and true prevalence values are provided. Nevertheless, to make possible a comparison with data from other studies, only the apparent seroprevalence is discussed in the text. Given point estimates for sensitivity (se), specificity (sp), and apparent prevalence (AP), the true prevalence was calculated using the following expression (Rogan and Gladen, 1978):

$$\text{True prevalence (TP)} = (\text{AP} + \text{sp} - 1) / (\text{se} + \text{sp} - 1).$$

The possible relationships among the breed, age, and seroprevalence were estimated by calculating the odds ratio (OR) values (Thrusfield, 2005). Finally, all the data were classified using the CHAID (Chi-square Automatic Interaction Detector) test. All tests were done using SPSS for Windows (15.0).

## RESULTS

### Antigenemia

The percentage of cows with antigenemia was 33% (CI 95%, 31–35). The lowest percentages of positive cattle were significantly observed in the Friesians, and the highest occurred in the crossbreds ( $\chi^2 = 24.904$ ,  $P = 0.001$ ) (Table I). The analysis of odds ratio (OR) revealed a value of 1.85 (1.4–2.44) for the crossbreds, 0.97 (0.74–1.29) for the Rubia Gallega, and 0.54 (0.40–0.72) for the Friesians.

The youngest cows (<1 yr) and the oldest (>6 yr) exhibited the lowest percentages of circulating antigens in the sera, while the highest was found in those aged 2–4 yr (Table I). Significant differences in the prevalence of antigenemia according to age were indicated ( $\chi^2 = 24.094$ ,  $P = 0.001$ ).

When considering the breed and the age together, the lowest percentages of cows with antigenemia were observed in the youngest animals (<1 yr) and in those older than 6 yr for all the breeds studied (Table I), whereas cattle age 2–5 yr exhibited the greatest seroprevalence of antigenemia. By using the CHAID test (Fig. 1), the seroprevalence of antigenemia was initially classified into 3 groups (nodes) according to the breed of the animals, but the analysis concerning the age of the cows showed significant differences for the crossbreds only ( $\chi^2 = 16.216$ ,  $P = 0.023$ ).

### FhrAPS ELISA

Using the cut-off absorbance value defined previously, 65% (62–68) of the sera samples were positive for the FhrAPS ELISA (Table I). Friesians exhibited the lowest seroprevalence of antibodies against the recombinant protein, and crossbreds had the highest ( $\chi^2 = 9.857$ ,  $P = 0.007$ ). The estimation of the OR showed a value of 1.51 (1.14–2.00) for the presence of IgG in the crossbreds, 0.96 (0.74–1.26) for the Rubia Gallega, and 0.71 (0.54–0.92) for the Friesians.

Elevated levels of FhrAPS seroprevalence were observed in the sera from all the age groups in each breed. Table I shows the low seroprevalence of IgG antibodies in the animals younger than 1 yr

( $\chi^2 = 29.259$ ,  $P = 0.001$ ). On considering the breed and the age together, the highest percentages of positive cattle were obtained in the animals aged 2–6 yr (Table I), and the lowest percentages occurred both in the youngest (1 yr) and in the oldest (8 yr) cows. Age-related differences for the crossbreds ( $\chi^2 = 17.992$ ,  $P = 0.012$ ) and Friesians ( $\chi^2 = 25.719$ ,  $P = 0.001$ ) were recorded.

Figure 2 shows the results of an analysis of these data using the CHAID test. Two groups were initially established in relation to the age of the animals, i.e., group 1 formed by 1- and 8-yr-old cattle, and group 2 by cows aged 2 to 7 yr old. In the first group, 2 clusters were observed according to the breed of the animals, one composed of crossbreds and Rubia Gallega cows, and the other by the Friesians. As shown in Figure 2, group 2 (2- to 7-yr-old cows) was classified into another 2 groups, i.e., crossbreds and Friesian + Rubia Gallega cattle ( $\chi^2 = 8.602$ ,  $P = 0.010$ ).

### Antigenemia and FhrAPS ELISA

Upon considering the results from both immunoenzymatic probes simultaneously, 30% (25–35) were negative, 38% (33–43) were positive to the presence of IgG antibodies, 5% (0–10) were positive to antigenemia, and 27% (22–32) were positive both to IgG and circulating antigens.

## DISCUSSION

A cross-sectional study was conducted to assess the seroprevalence of cattle fascioliasis by the application of 2 immunoenzymatic probes in an endemic area (northwestern Spain). Thirty-three percent of the sera analyzed had antigenemia, and the highest values were found in the crossbred cattle. During their migration through the live parenchyma, juvenile flukes release antigens that can be detected by polyclonal or monoclonal ELISAs, so the detection of antigenemia has been related to active infection by *F. hepatica* (Espino et al., 1997; Sánchez-Andrade et al., 2001). The values obtained in the current investigation are greater than those observed in the same region by Sánchez-Andrade et al. (2000), who observed active fascioliasis in 27% crossbred, 25% Rubia Gallega, and 17% Friesian cattle; this implies that the presence of cattle with active infection by *F. hepatica* has increased 30% during the last 10 yr in this region. By analyzing these results according to the age of the cattle, the highest seroprevalence was observed in those aged 2–5 yr for all the breeds studied. The age-dependent development of juvenile flukes observed in crossbreds, opposite to that recorded for the Friesian and Rubia Gallega cows, seems to suggest that chemotherapy administered to these latter breeds reduces the presence of migrating flukes.

The presence of IgG antibodies against the trematode *F. hepatica* was assayed by using a 2.9-kDa recombinant protein. Sixty-five percent of the cattle were positive according to the FhrAPS ELISA, and the highest percentages were observed in the crossbreds. In previous research conducted in the same area, Sánchez-Andrade et al. (2000) reported an IgG seroprevalence of 82% in Friesian, 83% in Rubia Gallega, and 92% in crossbred cattle. The results in the present study demonstrate a notable reduction (around 20%) in the percentage of bovine developing IgG antibodies against *F. hepatica*, especially in the Rubia Gallega and Friesian animals, probably since these cattle are focused on the production of calves and milk, respectively, and,

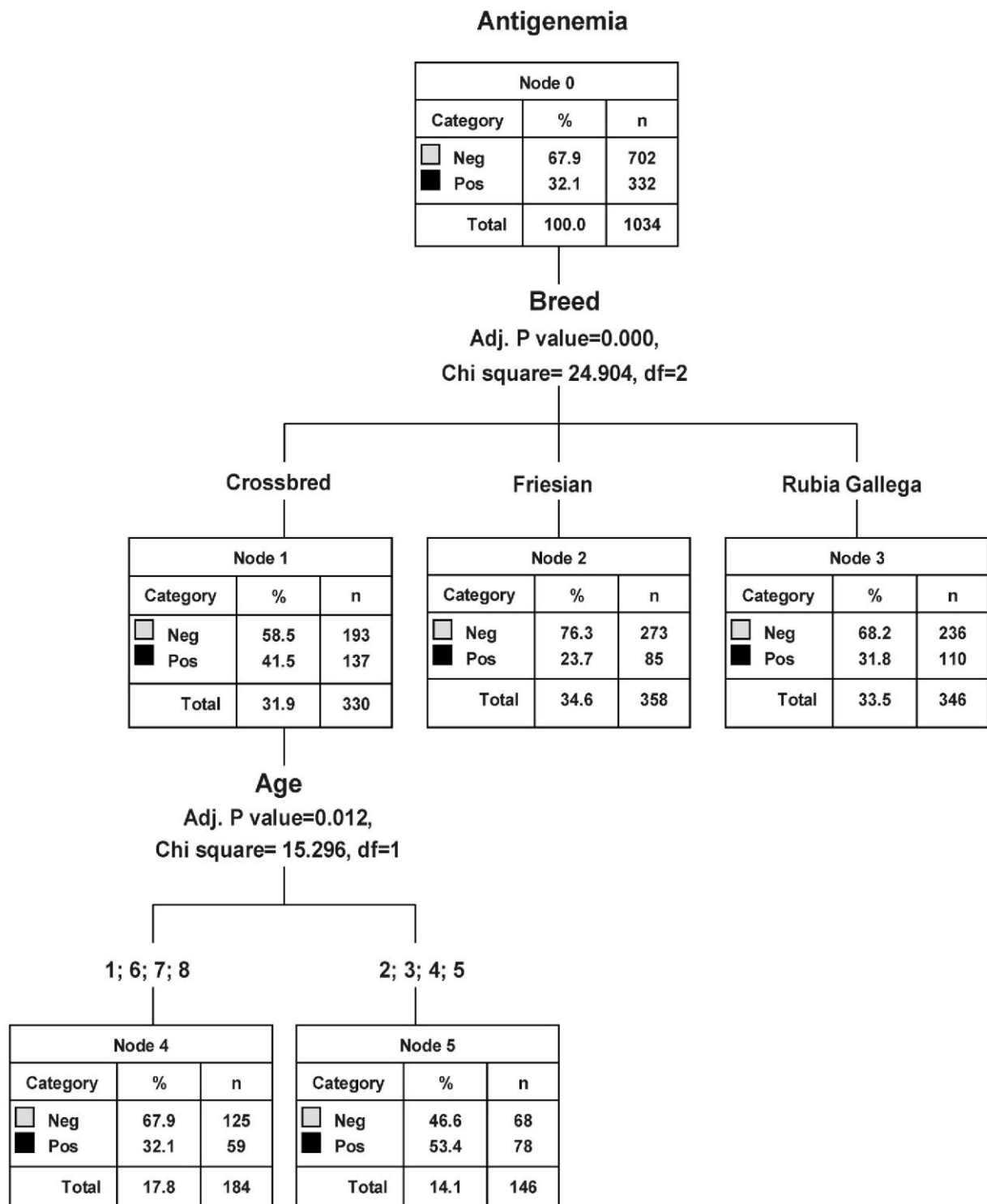


FIGURE 1. Classification of the seroprevalence of antigenemia in cattle naturally exposed to *F. hepatica* by using the CHAID test (N = 1,034).

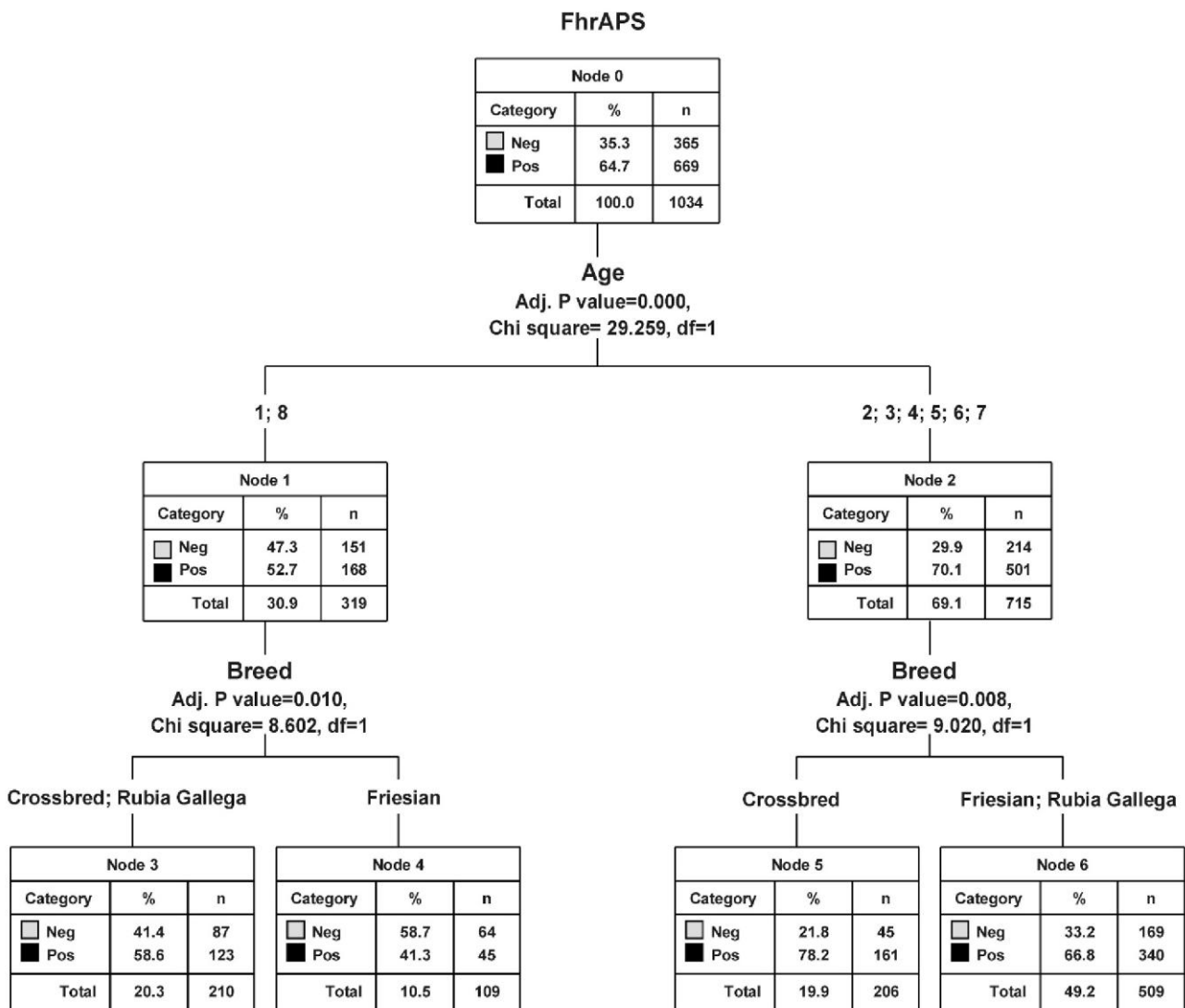


FIGURE 2. Classification of the antibody seroprevalence in cattle naturally exposed to *F. hepatica* by using the CHAID test (N = 1,034).

consequently, they receive appropriate food and care, including anthelmintics.

Elevated levels of FhrAPS seroprevalence were observed in the sera from all the age groups in each breed. Results from the CHAID test showed the lowest values of IgG seropositivity in 1-yr-old Friesian calves, which could indicate that management inhibits the frequent ingestion of *F. hepatica* metacercariae, and, thus, an IgG-antibody response was elicited in a lower percentage of animals. The observation of lowest values of IgG seroprevalence in Friesian and Rubia Gallega cattle age 2 to 7 yr old may be attributable to the administration of chemotherapy, since both the crossbred and Rubia Gallega cows are maintained outside.

The occurrence of antigenemia reflects the migration of flukes through the liver parenchyma (Duménigo et al., 2000), while positive IgG values against FhrAPS are detected during early infection by *F. hepatica* (Arias et al., 2006). When these values are considered jointly, we concluded that 70% of the cows are suffering a prepatent infection by *F. hepatica*. It is worth noting that the main

lesions in fascioliasis occur during the prepatent period of the infection (Bossaert et al., 2000; Raadsma et al., 2007).

The information obtained by using the 2 immunoenzymatic probes reveals an elevated seroprevalence of fascioliasis that was unexpected for livestock (Friesian and Rubia Gallega) that received anthelmintic treatment. However, the administration of some drugs, such as triclabendazole, only during the dry period does not show any advantage over no treatment (Mezo et al., 2008). This is probably because the interval between chemotherapy application exceeds the prepatent period of *F. hepatica* (Parr and Gray, 2000). This may explain the similar seroprevalences found in the cattle grazing during semi-extensive or extensive management, i.e., Rubia Gallega (treated) and crossbred (untreated).

Data from the present investigation seem to indicate first that the management of Friesians is not adequate, and it provides the possibility of infection by *F. hepatica* through feeding (hay or ensilage contaminated, or fresh pasture; Stromberg and Corwin, 1993). Second, suitable action on the environment (fencing,

drainage) is needed to reduce the habitat of the intermediate host, and thus the risk for infecting cattle. Kemper and Henze (2009) reported a reduction of the prevalence of fascioliasis from 80% in 1969 to 0.005% in 1992 in northern Germany by the combination of chemotherapy and pasture draining on large scale. Finally, the number of existing snails *Galba truncatula* on the pasture is critical for the transmission of *F. hepatica*, as well as the presence of excreted eggs (Ross, 1977). The percentage of cattle passing *F. hepatica* eggs by feces is about 35% (data not shown).

The combined use of a polyclonal ELISA for the detection of antigenemia and the FhrAPS ELISA to observe IgG antibodies offers a very useful strategy to assess the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis. In considering these results, we conclude that the management of dairy cattle (with predominance of stabling) prevents the infection by *F. hepatica* in 1-yr-old calves only, as opposed to that recorded for the same aged calves maintained outside (crossbred and Rubia Gallega). The lack of adequate reduction in intermediate host habitat (fencing, drainage) and the erratic administration of chemotherapy without respecting suitable periods necessary to prevent the life cycle of *F. hepatica* from being completed show that control of fascioliasis is not improving.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Projects XUGA 07MRU034261PR (Xunta de Galicia, Spain) and FAU2006-00006-00-00 (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, MEC, Spain).

#### LITERATURE CITED

- ANDERSON, N., T. T. LUONG, N. G. VO, K. L. BUI, P. M. SMOOKER, AND T. W. SPITHILL. 1999. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary Parasitology* **83**: 15–24.
- ARIAS, M., G. V. HILLYER, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, J. L. SUÁREZ, J. PEDREIRA, C. LOMBA, P. DÍAZ, P. MORRONDO, P. DIEZ-BAÑOS, AND A. PAZ-SILVA. 2006. A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein-based ELISA test for the detection of current-ovine fascioliasis trickle infected. *Veterinary Parasitology* **137**: 67–73.
- , P. MORRONDO, G. V. HILLYER, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, J. L. SUÁREZ, C. LOMBA, J. PEDREIRA, P. DÍAZ, P. DIEZ-BAÑOS, AND A. PAZ-SILVA. 2007. Immunodiagnosis of current fascioliasis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Veterinary Parasitology* **146**: 46–49.
- ARIAS, M. S., J. L. SUÁREZ, G. V. HILLYER, I. FRANCISCO, E. CALVO, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, P. DÍAZ, R. FRANCISCO, P. DIEZ-BAÑOS, P. MORRONDO, AND A. PAZ-SILVA. 2009. A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fascioliasis. *The Veterinary Journal* **182**: 73–78.
- BOSSAERT, K., E. JACQUINET, J. SAUNDERS, F. FARNIR, AND B. LOSSON. 2000. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **88**: 17–34.
- CORNELISSEN, J. B., C. P. GAASENBEEK, F. H. BORGSTEEDE, W. G. HOLLAND, M. M. HARMSSEN, AND W. J. BOERSMA. 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal for Parasitology* **31**: 728–737.
- DUMÉNIL, B. E., A. M. ESPINO, C. M. FINLAY, AND M. MEZO. 2000. Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* **89**: 153–161.
- ESPINO, A. M., R. MARCET, AND C. M. FINLAY. 1997. *Fasciola hepatica*: Detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology* **85**: 117–120.
- FAO. 1994. Disease of domestic animals caused by flukes. Food and Agricultural Organisation, Rome, Italy, 171 p.
- GREINER, M., AND I. A. GARDNER. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine* **45**: 43–59.
- KAPLAN, R. M. 2001. *Fasciola hepatica*: A review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics* **2**: 40–50.
- KEMPER, N., AND C. HENZE. 2009. Effects of pastures' re-wetting on endoparasites in cattle in northern Germany. *Veterinary Parasitology* **161**: 302–306.
- KOTTEK, M., J. GRIESER, C. BECK, B. RUDOLF, AND F. RUBEL. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* **15**: 259–263.
- MARCOS, L. A., A. TERASHIMA, G. LEGUIA, M. CANALES, J. R. ESPINOZA, AND E. GOTUZZO. 2007. *Fasciola hepatica* infection in Peru: An emergent disease. *Revista de Gastroenterología Peruana* **27**: 389–396.
- MEZO, M., M. GONZÁLEZ-WARLETA, J. A. CASTRO-HERMIDA, AND F. M. UBEIRA. 2008. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* **157**: 235–243.
- OLLERENSHAW, C. B., AND L. P. SMITH. 1969. Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Advances in Parasitology* **7**: 283–323.
- O'NEILL, S. M., M. PARKINSON, W. STRAUSS, R. ANGLES, AND J. P. DALTON. 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**: 417–423.
- PARR, S. L., AND J. S. GRAY. 2001. A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. *Veterinary Parasitology* **88**: 187–197.
- PAZ-SILVA, A., G. V. HILLYER, M. S. ARIAS, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, J. PEDREIRA, J. L. SUÁREZ, C. LOMBA, P. DÍAZ, I. FRANCISCO, P. DIEZ-BAÑOS, AND P. MORRONDO. 2007. A cross-sectional study of fascioliasis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* **5**: 52–56.
- PHIRI, A. M., I. K. PHIRI, C. S. SIKASUNGEL, AND J. MONRAD. 2005. Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **52**: 414–416.
- RAADSMA, H. W., N. M. KINGSFORD, SUHARYANTA, T. W. SPITHILL, AND D. PIEDRAFITA. 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Veterinary Parasitology* **143**: 275–286.
- RAINA, O. K., S. C. YADAV, D. SRIVENY, AND S. C. GUPTA. 2006. Immunodiagnosis of bubaline fasciolosis with *Fasciola gigantica* cathepsin-L and recombinant cathepsin-L 1-D proteases. *Acta Tropica* **98**: 145–151.
- ROGAN, W. J., AND B. GLADEN. 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology* **107**: 71–76.
- RONDELAUD, D., P. VIGNOLES, M. ABROUS, AND G. DREYFUSS. 2001. The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. *Parasitology Research* **87**: 475–478.
- ROSS, J. G. 1977. A five-year study of the epidemiology of fascioliasis in the north, east and west of Scotland. *British Veterinary Journal* **133**: 263–272.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R., A. PAZ-SILVA, J. SUÁREZ, R. PANADERO, P. DIEZ-BAÑOS, AND P. MORRONDO. 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* **93**: 39–46.
- , ———, ———, J. PEDREIRA, P. DIEZ-BAÑOS, AND P. MORRONDO. 2001. Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* **87**: 609–614.
- , ———, ———, ———, C. LÓPEZ, P. DIEZ-BAÑOS, AND P. MORRONDO. 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications* **26**: 361–370.
- STROMBERG, B. E., AND R. M. CORWIN. 1993. Epizootiology of *Ostertagia ostertagi* in cow-calf production systems in the American Midwest. *Veterinary Parasitology* **46**: 297–302.
- THRUSFIELD, M. 2005. *Veterinary epidemiology*. Blackwell, Oxford, U.K., 584 p.

**Relationship between exposure to liver trematode in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in cattle extensively reared in an endemic area.**

## ARTICLE IN PRESS

Research in Veterinary Science xxx (2013) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

## Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)

## Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic area

M.S. Arias<sup>a,\*</sup>, P. Piñeiro<sup>a</sup>, R. Sánchez-Andrade<sup>a</sup>, J.L. Suárez<sup>a</sup>, G.V. Hillyer<sup>b</sup>, P. Díez-Baños<sup>a</sup>, A. Paz-Silva<sup>a</sup>, P. Morrondo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Animal Pathology Department, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002 Lugo, Spain

<sup>b</sup>Laboratory of Parasite Immunology and Pathology, School of Medicine, University of Puerto Rico, Suite 617-A, Medical Sciences Campus, San Juan, PR 00936-5067, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 May 2013

Accepted 27 July 2013

Available online xxxx

## Keywords:

Roe deer

*Fasciola hepatica*

ELISA

NW Spain

Cattle

Sharing pastures

## ABSTRACT

The aim of this work is to know the prevalence of *Fasciola hepatica* in 301 roe deer and in 676 beef cattle kept in an endemic area. Detection of antibodies was determined in roe deer using a homemade ELISA with excretory/secretory antigens (FhES) and a recombinant protein (FhrAPS). None of the deer passed eggs by faeces and none flukes in their livers were found. The seroprevalence of *F. hepatica* was 29% using FhES, with significantly higher values in the oldest ones (36%). Twenty-eight percent of the samples were positive to FhrAPS. Twenty-three percent of the cows eliminated eggs of *F. hepatica* and the seroprevalence was 67% using FhrAPS. No relationship between the seropositivity values of deer and cattle was demonstrated. The role of wild ruminants as reservoirs of *F. hepatica* is discussed. We encourage the use of ELISA to know the possibility of exposure to trematodes in wild ruminants.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

European roe deer (*Capreolus capreolus*) is a cynegetic species very frequently hunted in Central Europe and Spain. In the third north Spain, roe deer distribute of homogeneous form in Pirineos, País Vasco and Cantabric range until Los Ancares mountain range in Lugo, and León mountains, where they have colonized most of Galicia. There is a plentiful supply in Galicia (NW Spain) because of woodland conservation. Roe deer are susceptible to various parasite infections that influence the population survival, as occurs in other wild and domestic populations (Pybus, 2001; López et al., 2003; Panadero et al., 2001, 2010; Sharhuu and Sharkhuu, 2004; Díaz et al., 2010; Morrondo et al., 2010; Pato et al., 2013). Only few studies describe the parasites of animals in the wild state, and delay in pulmonary capacity, hair loss, a lowered fecundity and loss of weight, poor formation of the trophy parts, a low resistance to infectious diseases and deficient feeding have been related to several parasitic diseases as the helminthosis (Zaffaroni et al., 1997; Segonds-Pichon et al., 2000; Panayotova-Pencheva, 2006; Dacal et al., 2010; Pato et al., 2013). Besides a substantial risk to the conservation of global biodiversity (Daszak and Cunningham, 2000), the possibility of wildlife diseases can threaten domestic

animals becomes a growing concern worldwide, thus their surveillance must be considered as important as in livestock. It is necessary to underline the fact that wild animals might develop two different roles, as reservoirs of different pathogens or as sentinels for domestic animal diseases.

*Fasciola hepatica* is the common liver fluke of a wide range species of animals and has a global geographical distribution (Rojo-Vázquez et al., 2012). In the Iberian Peninsula, according to Alasaad et al. (2008), this trematode has been found in the livers of domestic (cattle, sheep, goat, donkey, horse and pig) and wild hosts, including fallow deer (*Dama dama*), red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*C. capreolus*), Iberian ibex (*Capra pyrenaica*), European mouflon (*Ovis aries*), chamois (*Rupicapra pyrenaica*), European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), hare (*Lepus granatensis*) and wild boar (*Sus scrofa*). However, there is scarce information on the presence of *F. hepatica* in roe deer in endemic zones as occurs in our area of study. Previous studies (Sánchez-Andrade et al., 2002; Paz-Silva et al., 2007; Arias et al., 2011) carried out in the area of study demonstrated that in beef cattle the infections by *F. hepatica* is high. Consequently, cross infection from livestock to roe deer can occur in common grazing pastures (Panadero et al., 2010; Vázquez et al., 2011; Pato et al., 2013).

Recently, *F. hepatica* excretory/secretory antigens (FhES) have been used for assessing the exposure of wild ruminants to the liver fluke, based on the demonstration of serum specific antibodies (Arias et al., 2012). Nevertheless further information is necessary to elucidate the importance of *F. hepatica* in this host. Here, we

\* Corresponding author. Address: Facultad de Veterinaria de Lugo, Departamento de Sanidad Animal, Pabellón 1, Planta Baja, Avda. Carvallo Calero, s/n, 27002 Lugo, Spain. Tel.: +34 982822126; fax: +34 982822001.

E-mail address: [mariasol.arias@usc.es](mailto:mariasol.arias@usc.es) (M.S. Arias).

## ARTICLE IN PRESS

2

M.S. Arias et al. / Research in Veterinary Science xxx (2013) xxx–xxx

present a comparative analysis of the usefulness of two ELISA for the detection of IgG antibodies on serum samples, using excretory/secretory antigens and a recombinant *F. hepatica* surface antigen (FhrAPS). The objective of the present study was to analyse by direct and indirect methods the risk of infection by the liver trematode *F. hepatica* in roe deer (*C. capreolus*) sharing pastures with extensively reared livestock from an endemic area (Galicia, NW Spain).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

A total of 301 roe deer killed during two consecutive hunting seasons (April–October 2008–2009) in different counties of the NW of Spain were examined. Table 1 shows the age and sex of the animals. According to their age of deer were divided into 2 groups, young ( $\leq 3$  yr) and adults ( $> 3$  yr). Animals were eviscerated after killing and the different organs were individually bagged up. Individual faecal samples were collected directly from the rectum of each animal. Moreover, one blood sample from the heart of each roe deer was collected *in situ*, with a syringe. Faeces were obtained directly from the rectum in each 676 female cattle, and blood was individually collected by tail vein puncture. By considering the age, cattle were divided into 2 groups: G1 ( $\leq 6$  yr) and G2 ( $> 6$  yr) (Table 1).

### 2.2. Area of study

The current investigation was conducted in northwestern Spain ( $42^{\circ}20'–43^{\circ}45'N$ ,  $6^{\circ}49'–8^{\circ}99'W$ ). This is a 29,574 km<sup>2</sup> agricultural area with a cattle population about 900,000 animals. The climate is characterized by a warm temperature, mild and dry summers and rainy winters with moderate temperatures (Díaz et al., 2007). However, the existence of climatic differences allow a division into three zones, previously described by Vázquez et al. (2011): a Coastal area (0–200 m, mean annual precipitation and temperature of 1300–1500 mm and 14 °C, respectively and 13–25% of mean slope); a Central area (200–650 m, 900–1300 mm, 11.5 °C and <13% of slope); and a mountainous area (650–2100 m,  $> 1500$  mm, 10 °C and  $> 25\%$  of slope). This is a hilly area with slightly smooth places in valleys, mountain range (blunt and low) and depressions with lots of small rivers, where the marked slope makes practically impossible land culture. It comprises woodland, scrubland and fields shared by wild animals and extensively reared livestock (cattle, sheep, goats and horses). Woodlands are composed of oak (*Quercus robur*), birch (*Betula pendula*), chestnut tree (*Castanea sativa*), cork oak (*Quercus suber*), holly tree (*Ilex aquifolium*), fir (*Abies alba*), yew tree (*Taxus baccata*) and alder (*Alnus glutinosa*). In the last decades several timber species (*Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster*) are being introduced. The shrublands mainly comprise gorse

**Table 1**  
Seroprevalence of *F. hepatica* in roe deer ( $N = 301$ ) and cattle ( $N = 676$ ) from NW Spain by age and sex. Results are expressed as percentages and the 95% confidence interval.

Age (yr)	Cattle Nr	FhES positive (%)		FhrAPS positive (%)	
		%	Statistics	%	Statistics
Young roe deer	40	10 (1–19)	$\chi^2 = 8.251$	25 (12–38)	$\chi^2 = 0.194$
Adult roe deer	261	32 (27–38)	$P = 0.004$	28 (23–33)	$P = 0.660$
G1	464	–	–	66 (62–70)	$\chi^2 = 1.125$
G2	212	–	–	70 (64–76)	$P = 0.289$
Sex	Roe deer Nr				
Female	40	23 (10–35)	$\chi^2 = 1.012$	30 (16–44)	$\chi^2 = 0.100$
Male	261	30 (25–36)	$P = 0.314$	28 (22–33)	$P = 0.441$

(*Ulex europaeus*), heath (*Erica* spp.) and retama (*Retama sphaerocarpa*). The progressive abandonment of agricultural lands in the northwest of Spain has caused the appearance of alternating grazing and forest areas, representing an ideal environment for roe deer, and the great diversity of plant resources in this area has led to a considerable increase in the census of that ungulate in the last three decades (Centenera, 2005).

In this area, the principal breeds of cattle that are exploited in extensive (Sánchez-Andrade et al., 2002; Díaz et al., 2007) are the autochthonous Rubia Gallega (production of calves with outdoor grass fattening), and the crossbred (reduction of unwanted vegetation in forests and production of calves). As represented in Table 3, deer and cattle were sampled in 15 counties comprising a total extension of 12219.28 km<sup>2</sup>. In these areas it is common that cattle and roe deer share pastures, in especially, when the roe deer come out of the woods to feed grazing areas during twilight.

### 2.3. Parasitological examination

The liver of each roe deer were checked for the presence of flukes. A gross visual inspection of the entire organ was first performed, and then it was carefully dissected. Livers were then inspected by cutting the lobes twice and making a deep cut with 10–15 small sub-cuts. Faecal samples of roe deer and cattle were processed by the sedimentation technique, and the egg counts presented as number of eggs per gram of faeces (epg).

### 2.4. Serological procedures

Serum samples were obtained by centrifugation and stored at  $-20$  °C in 2 ml microtubes until analyzed. The presence of IgG antibodies against *F. hepatica* in roe deer was assessed by using a homemade ELISA. Two antigens were used for coating the titter plates, excretory/secretory antigens from adult flukes (FhES) and the 2.9-kDa recombinant surface protein (FhrAPS). These products were obtained according to Sánchez-Andrade et al. (2000) and Arias et al. (2007). In previous studies 92% sensitivity and 94.4% specificity for FhES-ELISA, and 86% and 88%, respectively for the FhrAPS-ELISA have been reported (Sánchez-Andrade et al., 2002; Arias et al., 2010). Detection of IgG antibodies against the FhES in roe deer was done according to Arias et al. (2012). Briefly, plate wells were coated with  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  FhES, serum samples diluted (1/100) in PBS containing 0.05% Tween and 1% skimmed milk, and then anti-Deer IgG peroxidase-labelled (Sigma–Aldrich, MO, USA) (1/1000) was added. The optical densities (OD) were read by using a plate spectrophotometer (Titertek, Hämminlina, Finland) at 492 nm. Detection of IgG antibodies against the recombinant protein were performed in U-bottom microtiter plates (Costar®, Barcelona, Spain) coated with  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  FhrAPS, sera at 1/100 and anti-Deer IgG peroxidase-labelled at 1/1000. The immune humoral response against FhrAPS in cattle was done according to Paz-Silva et al. (2007).

Pooled sera from five uninfected and five infected wild animals in each case were used as negative and positive controls, respectively. Positive control sera were obtained from roe deer shoot in mountains from León (NW Spain) which did albeit *F. hepatica*

**Table 2**  
Comparison of results obtained by two immunoenzymatic probes in roe deer.

FhES	FhrAPS	Nr	%
+	+	43	14 (10–18)
+	–	45	15 (11–19)
–	+	41	14 (10–17)
–	–	172	57 (52–63)
	Total	301	100

## ARTICLE IN PRESS

M.S. Arias et al. / Research in Veterinary Science xxx (2013) xxx–xxx

3

**Table 3**  
Sample distribution according the counties in NW Spain.

Area	County	Extension (km <sup>2</sup> )	Roe deer			Cattle	
			Shot	% FhES	% FhrAPS	Nr	% FhrAPS
Coastal	1	538.6	12	42 (14–70)	25 (1–50)	–	–
	2	676.84	9	56 (23–88)	44 (12–77)	–	–
	3	1395.51	44	20 (9–32)	27 (14–40)	67	48 (36–60)
	4	755.57	5	20 (0–55)	0	56	39 (26–52)
	5	391.72	13	8 (0–22)	8 (0–22)	–	–
	Total	3758.24	83	25 (16–35)	24 (15–33)	123	44 (35–53)
Central	6	462.25	7	29 (0–62)	57 (20–94)	–	–
	7	940.48	13	46 (19–73)	23 (0–46)	63	76 (66–87)
	8	1362.8	36	42 (26–58)	31 (16–46)	73	63 (52–74)
	9	836.24	18	11 (0–26)	22 (3–41)	75	71 (60–81)
	10	1823.03	51	24 (12–35)	29 (17–42)	68	66 (55–77)
	11	417.87	7	57 (20–94)	43 (6–80)	–	–
	Total	5842.67	132	31 (23–39)	30 (22–38)	279	69 (4–10)
Mountainous	12	1048.64	38	32 (17–46)	37 (22–52)	72	85 (76–93)
	13	679.53	24	38 (18–57)	13 (0–26)	80	84 (76–92)
	14	311.77	15	33 (9–57)	40 (15–65)	52	69 (57–82)
	15	578.43	9	0	11 (0–32)	70	66 (55–77)
	Total	2618.37	86	31 (22–41)	28 (18–37)	274	77 (72–84)
	Total	12219.28	301	29 (24–34)	28 (23–33)	676	67 (64–71)

flukes at necropsy. Negative control sera were obtained from animals younger than 2 yr which did not have flukes at necropsy. The cut-off point for a positive result was taken as the mean optical density (OD) of negative sera plus 3 SD (Sánchez-Andrade et al., 2000), and a value of 0.2475 for the FhES-ELISA and 0.2765 for the FhrAPS were thus estimated.

Positive control sera were obtained from 15 naturally infected cattle. The faeces were examined using the coprological sedimentation technique. Fifteen sera samples were obtained from cattle from a farm found by repeated coprological examinations to be free of fasciolosis for more than 8 yr and were used as negative controls. The mean OD for the negative sera was 0.261 for the FhrAPS, with a standard deviation of 0.045. Thus, samples were considered as positive when OD values were 0.396.

### 2.5. Statistics

Statistical analysis has been performed by means of the SPSS, version 18.0 (SPSS Inc., 2009). Prevalence values were expressed as the percentages and the 95% Confidence Interval (95% CI) (Thrusfield, 2005). The differences in the prevalence were analyzed by the Chi square test. Statistical significance was established when  $P < 0.05$ . The possible correlation between the IgG values against the different antigens was assessed by using the Pearson's test, whereas the non-parametric Spearman's rank correlation test was used for analysing the correlation between the prevalence values. For establishing the agreement in the diagnostics according to the two immunoenzymatic probes, the kappa ( $\kappa$ ) statistics was calculated.

### 3. Results

None of the deer livers examined had *F. hepatica* flukes and nor lesions at necropsy, and trematode-eggs in their faeces were not observed. On the contrary, 23.5% of the cows eliminated eggs of *F. hepatica*, with a mean number of elimination between 6 and 15 epg.

Regarding seroprevalence in roe deer, the overall 29% (95% CI 24–34) of IgG antibodies against the FhES was obtained, which increased significantly with the age (Table 1). By opposite, no sex-related differences were recorded. When facing the deer sera against the FhrAPS, a total of 28% (23–33) of the samples were

positive (Table 1). No age- or sex-differences were observed, though the highest values among the oldest and female deer were achieved.

A significant correlation between the IgG values against the FhES and the FhrAPS was recorded ( $r = 0.148$ ,  $P = 0.010$ ). Table 2 shows the comparison among data obtained by using the two *Fasciola* antigens. Fifty-seven percent (52–63) of deer were negative to both immunoenzymatic probes, whereas the percentage of double positive cases was 14% (10–18). A fair agreement between the results provided by the two antigenic products by means of the kappa statistical was observed ( $\kappa = 0.300$ ,  $P = 0.001$ ).

Considering the deer origin (Table 3), all the counties except 1 had seropositive deer to FhES ranging from 8% (0–22) to 57% (20–94) ( $P > 0.05$ ). Similar results were provided by the FhrAPS-ELISA ( $P > 0.05$ ). In both cases, no differences in the seroprevalences were observed depending on climatic areas from deer origin.

When facing the cattle sera against the FhrAPS, a total of 67% (64–71) of the samples were positive (Table 1). No age-differences were observed, though the slightly highest values among the oldest were achieved.

According to cattle origin (Table 3), seropositive animals to the FhrAPS-ELISA were recorded in all the counties, and the seroprevalence oscillated between 48% (36–60) and 85% (76–93) ( $P > 0.05$ ). The seroprevalence was higher in the mountain than the other areas, although, no significant differences were observed.

Although in cattle, seroprevalence found with FhrAPS clearly exceeded that observed in the deer, no agreement was recorded between the prevalence or IgG values of *F. hepatica* in wild and domestic ruminants.

### 4. Discussion

Infection by the liver fluke *F. hepatica* is common in humid and temperate areas where the presence of herbage enhances the development of the external phase of its life-cycle (Morrodo-Pelayo et al., 1994; Sánchez-Andrade et al., 2001, 2002). While fasciolosis in domestic ruminants has been widely detected by different procedures (coprological, serological, image analysis), few information in wild ruminants is available, especially in areas classified as endemic.

With the purpose to gain information regarding the occurrence of *F. hepatica* in roe deer from an endemic area in Spain, samples

## ARTICLE IN PRESS

4

M.S. Arias et al./Research in Veterinary Science xxx (2013) xxx–xxx

(blood, faecal and liver) were collected from shot animals during the hunting seasons. No *F. hepatica*-eggs were observed in the stools, pointing the absence of mature flukes in the biliary ducts as Shimalov and Shimalov (2000) observed in Belarus. The absence of *F. hepatica* flukes in roe deer has been reported in regions of Czechoslovakia (Vetyska, 1980), in Germany (Düwel, 1988) and in Mongolia (Sharhuu and Sharkhuu, 2004). On the contrary, in other countries, different authors observed prevalences between 6.3% in Belarus (Shimalov and Shimalov, 2003) and 19% (Drozd, 1966; Drozd and Bezubik, 1993) in Poland.

In western Spain (Salamanca), Ramajo-Martín et al. (2007) neither did not find *F. hepatica* in roe deer, which is currently expanding over the boundaries of the game reserve, from the mount slopes to the adjacent extensive farms devoted to the livestock breeding. Also, a very low prevalence (2%) of roe deer with flukes in their livers has been pointed in a border region (León, NW Spain) close to the area of study (Díez-Baños et al., 2009).

There has been stated that some animal species (horses, red deer) seem to present certain resistance to the flukes develop in the liver parenchyma, and thus the presence of *F. hepatica*-eggs in the faeces becomes significantly delayed (Soulé et al. 1989; Gorman et al. 1997; Radostits et al., 2000). Nevertheless, no flukes were recovered from the liver (parenchyma or biliar ducts) in the current investigation. Application of immunoenzymatic probes for the detection of exposure to trematode parasites in wild ruminants has been recently recommended (Arias et al., 2012). In the present investigation, two antigens for testing the presence of IgG antibodies in deer sera were utilized. Despite of very similar seroprevalences were obtained by using either the *F. hepatica* excretory/secretory antigens (29%) or the FhrAPS recombinant protein (28%), only a fair agreement among the results provided by both immunoassays was achieved. Differences in the composition of the antigens appear to explain partially the disagreement. The crude extracts of *F. hepatica* are composed by numerous peptides, and cross-reaction with other helminth antigens has been demonstrated (Romasanta et al., 2003; Paz-Silva et al., 2010). The FhrAPS is a recombinant protein from the tegument of the flukes (Paz-Silva et al., 2005). Although hopeful results for the detection of early and current infection in experimentally infected sheep have been previously reported (Arias et al., 2006, 2007), application of the FhrAPS-ELISA to the diagnostics of fasciolosis among cattle naturally infected provided only promising results (Paz-Silva et al., 2007; Arias et al., 2009).

The demonstration of an age-cumulative effect in the seroprevalence of *F. hepatica* in extensive regimes is in agreement with that reported for several breed of cattle and husbandry systems in the area of study and the same occurs with the absence of sex-differences (Sánchez-Andrade et al., 2002). According our results, in a previous study Sánchez-Andrade et al. (2001) detected the highest percentage of positive animals by ELISA in cattle grazing in the mountains (95.3%) and the lowest prevalence in sea areas (61.7%) of NW Spain.

On the basis of wild ruminants can feed on grasslands where domestic herbivores (cattle mainly) remain frequently grazing; suspicion of the possibility of *Fasciola* could be transmitted from domestic to wild animals sounds reasonable, especially in endemic areas. For trying to elucidate this feature, in the current investigation, roe deer seroprevalences were compared to those observed in cattle from the same region and maintained under extensive regimes. Positive cattle were detected in all the sampled counties, and the seropositivity values ranged from 45% to 85%, confirming the endemicity of the area of study. Furthermore, a significantly higher seroprevalence of *Fasciola* in cattle than in roe deer was achieved, and no relationship between the values in both animal species could be demonstrated. These results agree with previously

reported in some areas of Czechoslovakia, where high *F. hepatica* infection levels in cattle have been reported (Vetyska, 1980).

Nutrition of cervids (as roe deer) consists of bushes and low trees leaves, grass, berries and young shoots (Acevedo et al., 2005). They forage primarily in forest and open grasslands (especially enriched in legumes) with herbaceous plants, an ecosystem known as *mosaic structure* because of the combination of small grassland lots with bushes and big wooded areas. Their preference for feeding on areas close to watercourses looks indicate a possible risk of fasciolosis, due to lymnaeid snails (*Galba truncatula*) acting as intermediate hosts for *F. hepatica* might find a suitable habitat for their survival in these localizations (Arias et al., 2012). On the basis of trematode eggs or flukes were not observed, together with a low seroprevalence of IgG antibodies among the roe deer, a minor risk of infection in the wild ruminants should be suspected.

Forests and natural pastures are also pastured by cattle maintained under extensive management, and current infection in 67% of these animals has been demonstrated. This possibly implies that domestic and wild ruminants are sharing grasslands low contaminated by *F. hepatica* metacercariae, lessening the risk of exposure to the liver trematode among roe deer, and clarifying in consequence their seroprevalence values. In a recent study conducted among horses in NW Spain, the presence of IgG antibodies against the FhrAPS in 65% animals was principally attributed to horses are feeding on pastures previously grazed by cattle (Arias et al., 2012).

Data collected in the current research look to support that wild species cannot maintain populations of liver fluke in the absence of suitable domestic hosts, as formerly reported (Boray, 1969; Pybus, 2001).

In conclusion, the low level of exposure to *F. hepatica* in roe deer belonging to an endemic area shown in the present investigation, in comparison to that occurring in extensively reared cattle, led us to consider that roe deer are not involved as a reservoir of the liver trematode, and their role in transmission of *F. hepatica* to domestic livestock should be minimized. In this endemic area of fasciolosis is required to pursue studies in other wild animals (wild boar, red deer, rabbit) that can act as end hosts participating in the maintenance of infection.

#### Conflict of interest statement

None of the authors has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the paper.

#### Acknowledgements

We are grateful to Research National Institute and Agrarian and Feed Technology (I.N.I.A.), Spain by the concession of the research project FAU2006-00006-00-00 and 07MRU034 261PR (Xunta de Galicia). Also this work was supported by a "Parga Pondal" post-doctoral research grant (Xunta de Galicia, Spain) to M.S. Arias and by the Program for Consolidating and Structuring Competitive Research Groups (CN2012/326, Xunta de Galicia).

#### References

- Alasaad, S., Li, Q.Y., Lin, R.Q., Martín-Atance, P., Granados, J.E., Díez-baños, P., Pérez, J.M., 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.
- Acevedo, P., Delibes-Mateos, M., Escudero, M.A., Vicente, J., Marco, J., Gortázar, C., 2005. Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *Journal of Biogeography* 32, 1671–1680.

## ARTICLE IN PRESS

M.S. Arias et al. / Research in Veterinary Science xxx (2013) xxx–xxx

5

- Arias, M., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Lomba, C., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A., 2006. A 2.9 kDa *Fasciola hepatica* – recombinant protein based test for the detection of ovine fasciolosis trickle infected. *Veterinary Parasitology* 137, 67–73.
- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., Piñeiro, P., Cazal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and NW Spain. *Veterinary Record* 168, 408.
- Arias, M.S., Martínez-Carrasco, C., León-Vizcaíno, L., Paz-Silva, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Alonso, F., 2012. Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. *Journal of Parasitology* 98, 754–759.
- Arias, M., Morrondo, P., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Lomba, C., Pedreira, J., Díaz, P., Díez-Baños, P., Paz-Silva, A., 2007. Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Veterinary Parasitology* 146, 46–49.
- Arias, M.S., Piñeiro, P., Hillyer, G.V., Suárez, J.L., Francisco, I., Cortiñas, F.J., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., 2010. An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle-management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *The Journal of Parasitology* 96, 626–631.
- Arias, M.S., Suárez, J.L., Hillyer, G.V., Francisco, I., Calvo, E., Sánchez-Andrade, R., Díaz, P., Pisco, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2009. A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fasciolosis. *Veterinary Journal* 182, 73–78.
- Boray, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology* 7, 95–210.
- Centenera, R., 2005. El Corzo: Acercamiento a Una Realidad: Expansión, Caza y Gestión. La Trébera, Madrid, 192 pp.
- Dacal, V., Vázquez, L., Pato, F.J., Cienfuegos, S., Panadero, R., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2010. Changes in pulmonary capacity in roe deer (*Capreolus capreolus*) infected by bronchopulmonary nematoda in NW of Spain. *Galemys* 22, 233–242.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., 2000. More on the ecological impact of fungal infections on wildlife populations. *Parasitology Today* 16, 404–405.
- Díaz, P., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2007. Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Veterinary Parasitology* 149, 285–289.
- Díaz, P., Paineira, A., Dacal, V., Vázquez, L., Cienfuegos, S., Pato, F.J., Paz-Silva, A., Panadero, R., Sánchez-Andrade, R., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2010. Eimeria infections in wild ruminants (*Capreolus capreolus*) and extensive reared domestic ruminant from Galicia (N.W. Spain). *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología* 69, 83–89.
- Díez-Baños, N., Martínez, A., Hidalgo, M.R., 2009. Comparative survey of hepatic parasites in wild ruminants from three regional hunting reserves in the North of Leon Province (Spain). *Acta Parasitologica Portuguesa* 16, 138.
- Drozd, J., 1996. Studies on helminths and helminthiases in Cervidae II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. *Acta Parasitologica Polonica* 14, 1–13.
- Drozd, J., Bezubik, B., 1993. The epidemiological situation of parasite infections in wild ruminants. *Wiadomości Parazytologiczne* 39, 95–98.
- Düwel, D., 1988. Helminthiases of roe deer (*Capreolus capreolus*). Diagnostic symptoms and intensity of infection over several years. Diseases of zoo animals. In: 30th International Symposium on Diseases of Zoo and Wild Animals. Sofia, Bulgaria.
- Gorman, T., Aballay, J., Fredes, F., Silva, M., Aguillón, J.C., Alcaíno, H.A., 1997. Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using Western blots. *International Journal of Parasitology* 27, 1429–1432.
- López, C., Panadero, R., Bravo, A., Paz, A., Sánchez-Andrade, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2003. *Sarcocystis* spp. infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the north-west of Spain. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 49, 211–218.
- Morrondo-Pelayo, P., Sánchez-Andrade, R., Díez-Baños, P., Pérez-Verdugo, L., López-Sánchez, C., 1994. Dynamics of *Fasciola hepatica* egg elimination and *Lymnaea truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West Spain). *Research and Reviews in Parasitology* 54, 47–50.
- Morrondo, P., Vázquez, L., Díez-Baños, P., 2010. Parasitic infections of wild ruminants in Spain with special attention to roe deer and chamois. *Parassitologia* 52, 155–158.
- Panadero, R., Carrillo, E.B., López, C., Díez-Baños, N., Díez-Baños, P., Morrondo, M.P., 2001. Bronchopulmonary helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the northwest of Spain. *Veterinary Parasitology* 99, 221–229.
- Panadero, R., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Paz, A., Díaz, P., Dacal, V., Cienfuegos, S., Fernández, G., Lago, N., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Research in Veterinary Science* 88, 111–115.
- Panayotova-Pencheva, M.S., 2006. New records of protostrongylid lungworms from wild ruminants in Bulgaria. *Veterinarni Medicina* 51, 477–484.
- Pato, F.J., Vázquez, L., Díez-Baños, N., López, C., Sánchez-Andrade, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., 2013. Gastrointestinal nematode infections in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the NW of the Iberian Peninsula: assessment of some risk factors. *Veterinary Parasitology* 196, 136–142.
- Paz-Silva, A., Hillyer, G.V., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., Pedreira, J., Suárez, J.L., Lomba, C., Díaz, P., Francisco, I., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2007. A cross-sectional study of fasciolosis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 5, 52–56.
- Paz-Silva, A., Arias, M., Francisco, I., Cortiñas, F.J., Francisco, R., Mochales, E., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., 2010. Cross-Immunity and Interpretation of the Diagnostics of Parasitic Trematodosis in Ruminants by Means of Immunoenzymatic Probes. In: LaMann, G.V. (Ed.), *Veterinary Parasitology*. Nova, New York, pp. 289–302.
- Paz-Silva, A., Hillyer, G.V., Sánchez-Andrade, R., Rodríguez-Medina, J.R., Arias, M., Morrondo, P., Díez-Baños, P., 2005. Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fascioliasis. *Parasitology Research* 95, 129–135.
- Pybus, M.J., 2001. Liver flukes. In: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals*, second ed. Manson Publishing, The Veterinary Press, London, U. K., pp. 121–149.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2000. *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. Saunders W.B. Co., Ltd., London, U.K., pp. 948–958.
- Ramajo-Martín, V., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A., 2007. Preliminary data about the parasitism caused by Protozoa, Helminths and Ticks in cervids and wild bovids from Salamanca (western Spain). *Revista Iberica de Parasitología-Research and Reviews in Parasitology* 67, 69–77.
- Rojo-Vázquez, F.A., Meana, A., Valcárcel, F., Martínez-Valladares, M., 2012. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 189, 15–38.
- Romasanta, A., Romero, J.L., Arias, M., Sánchez-Andrade, R., López, C., Suárez, J.L., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2003. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunological Investigations* 32, 131–142.
- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology* 93, 39–46.
- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications* 26, 361–370.
- Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Paz-Silva, A., Panadero, R., Martínez, M.J., Pedreira, J., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2001. Seroprevalence of *Fasciola hepatica* by direct-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and indirect-ELISA of bovine from Galicia (NW Spain) according to their origin. *Revista Iberica de Parasitología* 61, 97–101.
- Segonds-Pichon, A., Ferté, H., Gaillard, J.M., Lamarque, F., Duncan, P., 2000. Nematode infestation and body condition in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Game and Wildlife Science* 17, 241–258.
- Sharhuu, C., Sharkhuu, T., 2004. The helminth fauna of wild and domestic ruminants in Mongolia—a review. *European Journal of Wildlife Research* 50, 150–156.
- Shimalov, V.V., Shimalov, V.T., 2000. Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus 1758, in wild animals in Belorussian Polesye. *Parasitology Research* 86, 342.
- Shimalov, V.V., Shimalov, V.T., 2003. Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. *Parasitology Research* 89, 75–76.
- Soulé, C., Boulard, C., Levieux, D., Barnouin, J., Plateau, E., 1989. Experimental equine fascioliasis: evolution of serologic, enzymatic and parasitic parameters. *Annales de Recherches Veterinaires* 20, 295–307.
- Thrusfield, M., 2005. *Veterinary Epidemiology*, third ed. Blackwell Science, Oxford, U.K., 624 pp.
- Vázquez, L., Panadero, R., Dacal, V., Pato, F.J., López, C., Díaz, P., Arias, M.S., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2011. Tick infestation (Acari: Ixodidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain: population dynamics and risk stratification. *Experimental and Applied Acarology* 53, 399–409.
- Vetyska, V., 1980. Endoparasites of roe deer in the Strakonice region. *Acta Veterinaria Brno* 49, 91–103.
- Zaffaroni, E., Citterio, C., Sala, M., Lauzi, S., 1997. Impact of abomasal nematodes on roe deer and chamois body condition in an alpine environment. *Parassitologia* 39, 313–317.

**Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area**

## Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area

María Sol Arias · Pablo Piñeiro · George V. Hillyer · Iván Francisco ·  
Cristiana Filipa Cazapal-Monteiro · José Luis Suárez · Patrocinio Morrondo ·  
Rita Sánchez-Andrade · Adolfo Paz-Silva

Received: 24 May 2011 / Accepted: 1 August 2011 / Published online: 17 August 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** The utility of an enzyme-linked immunosorbent assay to determine the sensitization against the trematode *Fasciola hepatica* in horses from an endemic area (NW Spain) was assessed. Blood samples were collected from 536 horses and tested against a 2.9-kDa recombinant surface protein (FhrAPS) to estimate the presence of IgG antibodies. Data were analysed regarding several intrinsic (age, gender and breed) and extrinsic factors (aptitude and housing). The farm size (number of horses/farm) was also considered. Sixty percent (95% CI 56, 64) of the horses were positive to the FhrAPS-ELISA, with a significantly higher seroprevalence in the mares (67%). Foals reached the lowest percentage of sensitization against the trematode (12%), and a significant positive correlation between the seroprevalence of fasciolosis and the age of the horses was established. When considering all the factors together, the seroprevalence of fasciolosis was initially classified into two groups (nodes) regarding the age of the horses. The node composed of the horses older than 1 year was then divided into two other clusters according to their gender. The mares were finally classified and grouped into two

nodes regarding their breed. We concluded that the FhrAPS-ELISA is very useful for the demonstration of specific equine IgG antibodies against *F. hepatica*. An elevated risk of exposition to this trematode in horses maintained in endemic areas was proven. The possible role of horses as reservoirs for *F. hepatica* infections is discussed.

### Introduction

Fasciolosis (*Fasciola hepatica*) is a liver parasitic infection affecting mainly both domestic and wild ruminants, but monogastrics (horses, pigs) and even humans can be infected (Knubben-Schweizer et al. 2010). This is a cosmopolitan parasitosis more frequent in wet areas, where vegetation and mild temperatures enhance the development and survival of the intermediate host, an amphibious snail belonging to the *Lymnaea* genus.

Infection occurs when the final hosts ingest metacercariae (the infective stages) with the grass (Arias et al. 2010). After their arrival to the intestine, metacercariae excyst, and newly excysted juvenile specimens of the trematode migrate through the peritoneum to the liver and then migrate through the parenchyma to the bile ducts, where sexual maturity is attained. The presence of spines around their cuticle provokes a severe syndrome characterised by extensive parenchymal destruction with intensive haemorrhages. The consequences of liver injury compromises liver function, causing direct losses consisting of a decrease of the rate of weight gain, decrease of milk production or loss of wool (Gajewska et al. 2005).

The trematoda develop to mature stages in the bile ducts (and gall bladder), and eggs are passed in the faeces

M. S. Arias · P. Piñeiro · I. Francisco · C. F. Cazapal-Monteiro ·  
J. L. Suárez · P. Morrondo · R. Sánchez-Andrade ·

A. Paz-Silva (✉)

Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses), Animal Pathology Department, Veterinary Faculty, Santiago de Compostela University, 27002, Lugo, Spain  
e-mail: adolfo.paz@usc.es

G. V. Hillyer  
Laboratory of Parasite Immunology and Pathology,  
School of Medicine, University of Puerto Rico,  
Suite 617-A, Medical Sciences Campus,  
San Juan, PR 00936-5067, USA

together with the bile, which allows the diagnostics of the infection by the sedimentation copromicroscopical procedure (Rodríguez-Pérez and Hillyer 1995).

The sedimentation technique allows the direct diagnosis of fasciolosis by the visualization of eggs in faecal samples but only provides useful results after the period of prepatency occurred, when most of the pathological lesions have been taken into account (Carnevale et al. 2001). However, this method is not sensitive, and infections where the parasite burden is low or when the host is harbouring immature flukes in the liver parenchyma or the bile ducts may go undetected. Moreover, fluke egg elimination until 14–15 weeks occurred after the experimental infection of horses with *F. hepatica* metacercariae has been reported (Soulé et al. 1989) and an intermittent egg output in these animals also (Gorman et al. 1997).

On the basis that an early humoral immune response is elicited in the final host during the infection by *F. hepatica*, numerous tests have been applied to the immunodiagnosis of fasciolosis, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in particular, has shown adequate sensitivity and specificity for this purpose (Phiri et al. 2006). Nevertheless, the persistence of IgG antibodies for long periods, even after the removal of flukes (Sánchez-Andrade et al. 2000, 2001; Paz-Silva et al. 2003), reduces the usefulness of this probe, and the presence of antibodies may only indicate exposure to the parasite (Espino et al. 1998).

In the last decades, loss of productivity has provoked the abandonment of an elevated number of dairy bovine farms in many regions of Europe. As a consequence, the diminution in the rural inhabitants has been accompanied by the abandonment of vast cultivated areas formerly employed for the ruminants' feeding, which can imply an elevated risk of fire because of the growth of unwanted vegetation and shrubs.

A new situation has been outlined in response to these changes, where cattle are being replaced by other livestock species such as sheep, horses or donkeys. The feeding of the animals and the control of vegetation are thus simultaneously guaranteed, but they could also represent a risk for exposition to *F. hepatica* metacercariae in areas where bovines were firstly exploited.

Previous investigations conducted in the same area of study revealed a prevalence of fasciolosis ranging from 28% to 65% in ruminants by coprology and necropsy (Paz-Silva et al. 2003; Arias et al. 2011). The values of seroprevalence oscillated between 65% and 92% (Sánchez-Andrade et al. 2000, 2002; Paz-Silva et al. 2007; Arias et al. 2009).

Although fasciolosis has been widely analysed in ruminants, there is lack of information regarding other animal species such as horses. In the current investigation, the possibility of sensitization against *F. hepatica* in horses

has been investigated by means of an ELISA and the FhrAPS recombinant surface antigen (Paz-Silva et al. 2005). Results were analysed concerning some intrinsic (age, gender, breed) and extrinsic factors (housing, aptitude). The number of horses per farm was also taken into account.

## Materials and methods

### Field study area

The current study was conducted in Northwest Spain (42° 20'–43°45' N, 6°49'–8°00' W). This is an agricultural region where cattle are the main livestock. As stated previously, the oceanic climate favours the survival of *Galba truncatula*, the intermediate host for *F. hepatica* (Paz-Silva et al. 2010; Arias et al. 2010).

### Horses

Between December 2009 and May 2010, faecal and blood samples were obtained from 536 horses in NW Spain. By considering the age, horses were divided into four groups: G1 (<1 year), G2 (1–2.9), G3 (>3–8.9) and G4 (>9) (Table 1). According to the breed, seven groups were established: Anglo-Arab Breed (AAB), Spanish Sport Horse (SSH), Spanish Pure Breed (SPB), Crossbred (CB), English Pure Breed (EPB), Arabian Pure Breed (APB) and the autochthonous Pura Raza Galega (PRG). Equines were also classified according to their housing and aptitude (Table 2). With regard to the housing, and by taking into account that all the horses have access to pastures, two groups were considered, one composed by equines maintained in boxes during the night or under unfavourable weather conditions (indoors) and the other formed by horses remaining outdoors throughout the year. Three groups were considered in respect to the horses' aptitude, farming (horses focused to the maintenance of small pastures near to the owner's house), leisure (riding horses) and silvopasturing (equids maintained under forests).

### Farms

The total number of farms visited was 61, located at different sites scattered within this area, and the distance among the nearer farms was approximately 10–40 km.

The analysis of the farm infection was done regarding the intrinsic and extrinsic factors related above. Three age groups were established, farms with horses <3 years, those with equids >3 years and combined (horses of both groups). The presence of gender-mixed farms (mares + stallions) was also considered.

**Table 1** Prevalence of sensitization to *F. hepatica* in equine farms from NW Spain regarding intrinsic factors ( $N=61$ )

Factor	Categories	<i>N</i>	<i>P</i> (95% CI)	Statistics
Age	<1	5	100% (57, 100)	$\chi^2=4.115$ $P=0.128$
	1–3			
	3–9	49	84% (71, 91)	
	>9			
Gender	Mixed	7	57% (25, 84)	$\chi^2=9.365$ $P=0.009$
	Mares	20	75% (53, 89)	
	Stallions	12	58% (32, 81)	
	Mixed	29	97% (83, 99)	
Breed	Anglo–Arab	13	92% (67, 99)	$\chi^2=11.907$ $P=0.104$
	Spanish Sport	4	100% (51, 100)	
	Crossbred	5	80% (38, 96)	
	Arabian	15	60% (36, 80)	
	Spanish Pure	4	100% (51, 100)	
	Galician Pure	4	50% (15, 85)	
	English Pure	15	93% (70, 99)	
	Mixed	1	100% (21, 100)	
Housing	Mixed	39	82% (67, 91)	$\chi^2=0.001$ $P=0.982$
	Outdoors	22	82% (61, 93)	
Aptitude	Breeding	5	80% (38, 96)	$\chi^2=2.038$ $P=0.565$
	Farming	11	73% (43, 90)	
	Sport/Leisure	30	80% (63, 90)	
	Silvopasturing	15	93% (70, 99)	

Results are expressed as prevalence and 95% confidence interval (CI)

By considering that horses receive different management procedure according to their number in the farm (=size), three groups were considered: S1 (1–4 horses), S2 (5–15) and S3 (>15). Horses belonging to S1 usually graze small pastures under a rotational scheme, near to the stables where they are kept during the night. Appropriate care is provided.

Herds of S2 type frequently feed on large grasslands and are seldom kept in boxes. Due to their elevated number, horses in S3 farms are maintained on vast pastures throughout the year, or even in forests.

#### Parasitological examinations

Individual faecal samples were collected directly from the rectum of the horses and analysed by using coprological methods. Five grams of each faecal sample was processed (in duplicate) by sedimentation (Arias et al. 2009) with a sensitivity of 30 eggs per gram of faeces. The counts of trematode eggs were provided as counts of eggs per gram.

The laboratory technician conducting the microscopic analysis was blinded to the study design of the selection of the stool specimens. A farm was considered positive when at least one of the horses passed *F. hepatica* eggs by faeces.

**Table 2** Prevalence of sensitization to *F. hepatica* in horses from NW Spain regarding extrinsic factors ( $N=536$ )

Factor	Categories	<i>N</i>	<i>P</i> (95% CI)	Statistics
Age	<1	59	12% (6, 22)	$\chi^2=66.730$ $P=0.001$
	1–3	135	60% (52, 68)	
	3–9	198	67% (60, 73)	
	>9	144	70% (63, 78)	
Gender	Mixed			$\chi^2=25.137$ $P=0.001$
	Mares	372	67% (62, 71)	
	Stallions	164	44% (36, 52)	
	Mixed			
Breed	Anglo–Arab	63	60% (48, 71)	$\chi^2=11.712$ $P=0.069$
	Spanish Sport	36	36% (48, 75)	
	Crossbred	136	55% (47, 63)	
	Arabian	12	75% (47, 91)	
	Spanish Pure	44	59% (44, 72)	
	Galician Pure	212	57% (51, 64)	
	English Pure	33	85% (69, 93)	
	Mixed			
Housing	Mixed	250	65% (59, 70)	$\chi^2=4.706$ $P=0.030$
	Outdoors	286	56% (50, 61)	
Aptitude	Breeding	30	40% (25, 58)	$\chi^2=8.177$ $P=0.042$
	Farming	49	59% (45, 72)	
	Sport/Leisure	250	65% (50, 64)	
	Silvopasturing	207	57% (59, 70)	

Results are expressed as prevalence and 95% CI

#### FhrAPS-ELISA

Serum samples were analysed using an ELISA and the FhrAPS surface recombinant protein (Paz-Silva et al. 2005). After checkerboard titration, the optimal concentration of antigen was determined as  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; sera were diluted at 1:100 in 10% PTL (PBS—0.3% Tween 20 and 10% skimmed milk) and tested in duplicate. Horseradish peroxidase conjugated with rabbit anti-horse IgG (Nordic Immunology Laboratories, the Netherlands) was used at a 1:1,000 dilution. Substrate of 10 mg of *ortho*-phenylenediamine in 12 mL of citrate buffer and 10  $\mu\text{L}$  of 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  were then added to each well and the plates incubated in the dark for 10 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 100  $\mu\text{L}$  of 3 N sulphuric acid to each well, and the absorbance was read using a spectrophotometer (Titertek Multiskan) at 492 nm.

Sera from 44 foals (2 months of age) were used to calculate assay cut-off points. Positive values were determined as the mean optical density of all negative sera plus two standard deviations (Arias et al. 2007) and were calculated as  $>0.503$ .

#### Sensitivity and specificity of the ELISA

The sensitivity and specificity of the FhrAPS-ELISA were calculated by using sera from 12 donkeys passing *F.*

*hepatica* in the faeces and 44 foals (2 months of age) negative to the sedimentation test. The feasibility of the immunoenzymatic probe was also established by the estimation of the predictive values and the likelihood ratios (Thrusfield 2005).

#### Statistical analysis

All tests were done using SPSS for Windows (15.1; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The percentages of seroprevalence were expressed as the value and the 95% confidence interval, and analysed by using the  $\chi^2$  test. Differences were considered as significant when  $P < 0.05$ . The interpretation of some serological surveys of disease is difficult because they have imperfect sensitivity and specificity. The true prevalence was calculated by taking into account the values of sensitivity (se), specificity (sp), and apparent prevalence (AP) (Rogan and Gladen 1978):

$$\text{True prevalence(TP)} = (\text{AP} + \text{sp} - 1) / (\text{se} + \text{sp} - 1)$$

Correlation among the different parameters was assessed using Pearson's correlation test. The possible relationship between the breed, age and seroprevalence was estimated by calculating the odds ratio (OR) values and the prevalence ratio when this was not possible (Thrusfield 2005). Finally, all the data were classified by using the chi-square automatic interaction detector test. All tests were done using SPSS for Windows (15.0).

A farm was considered positive if at least one of the horses had positive IgG values by means of the FhrAPS-ELISA.

## Results

#### Statistical analysis of the FhrAPS-ELISA

The sensitivity resulted 83%; and the specificity, 86%. The estimation for the positive predictive value was 67% and 93% for the negative predictive value, 5.93 for the likelihood positive ratio and 0.20 for the negative likelihood ratio. The value for the statistical kappa resulted  $\kappa = 0.622$  ( $P = 0.001$ ).

#### Prevalence of IgG antibodies against the FhrAPS

##### (a) In farms

The percentage of farms with horses positive to the ELISA was 82% (75, 89), and a reduction with the age of the horses was recorded (Table 1), but these differences were not significant.

Ninety-seven percent of the gender-mixed farms (mares + stallions) resulted positive to the sensitization to *F.*

*hepatica*, and statistical differences were recorded. The OR value was 12.7.

Farms containing autochthonous Galicia Pure Breed horses recorded the lowest percentages of seropositivity, but differences were not achieved (Table 1). An identical percentage of farms following an indoors or outdoors regime had horses sensitized to the liver trematode.

Finally, 69% of the farms (S1) with 1–4 horses were considered positive to fasciolosis, 72% S2 herds (5–15 equids) and 100% S3 farms (>15 horses). These differences resulted significant, and an OR value of 1.3 for the biggest herds was obtained.

When considering all the factors together, the seroprevalence of fasciolosis was initially classified into two groups (nodes) regarding the age of the horses, with the lowest values in the foals <1 year (Fig. 1). The node composed of the horses older than 1 year was then divided into two other clusters according to the gender of the equines. The mares were finally classified and grouped into two nodes regarding their breed, with the highest seroprevalences in the Arabian, Spanish Pure Breed, Pura Raza Galega and English Pure Breed horses.

##### (b) In horses

An overall 60% (95% CI 56, 64) seroprevalence of equine fasciolosis was obtained by using the FhrAPS-ELISA. The percentage of positive cases ranged from 12% in the foals to 70% in horses older than 9 years (Table 2). Significant differences were proved in relation to the age, and in the oldest horses (>9 years), the OR value was 1.8, by 1.6 in those 3–9 years of age.

A significant positive correlation between the seroprevalence of fasciolosis and the age of the horses was established by means of Pearson's test ( $r = 0.392$ ,  $P = 0.007$ ).

Sixty-seven percent of the mares were positive to the immunoenzymatic probe, by 44% stallions, and these differences were significant. An OR value of 2.6 for the mares was estimated.

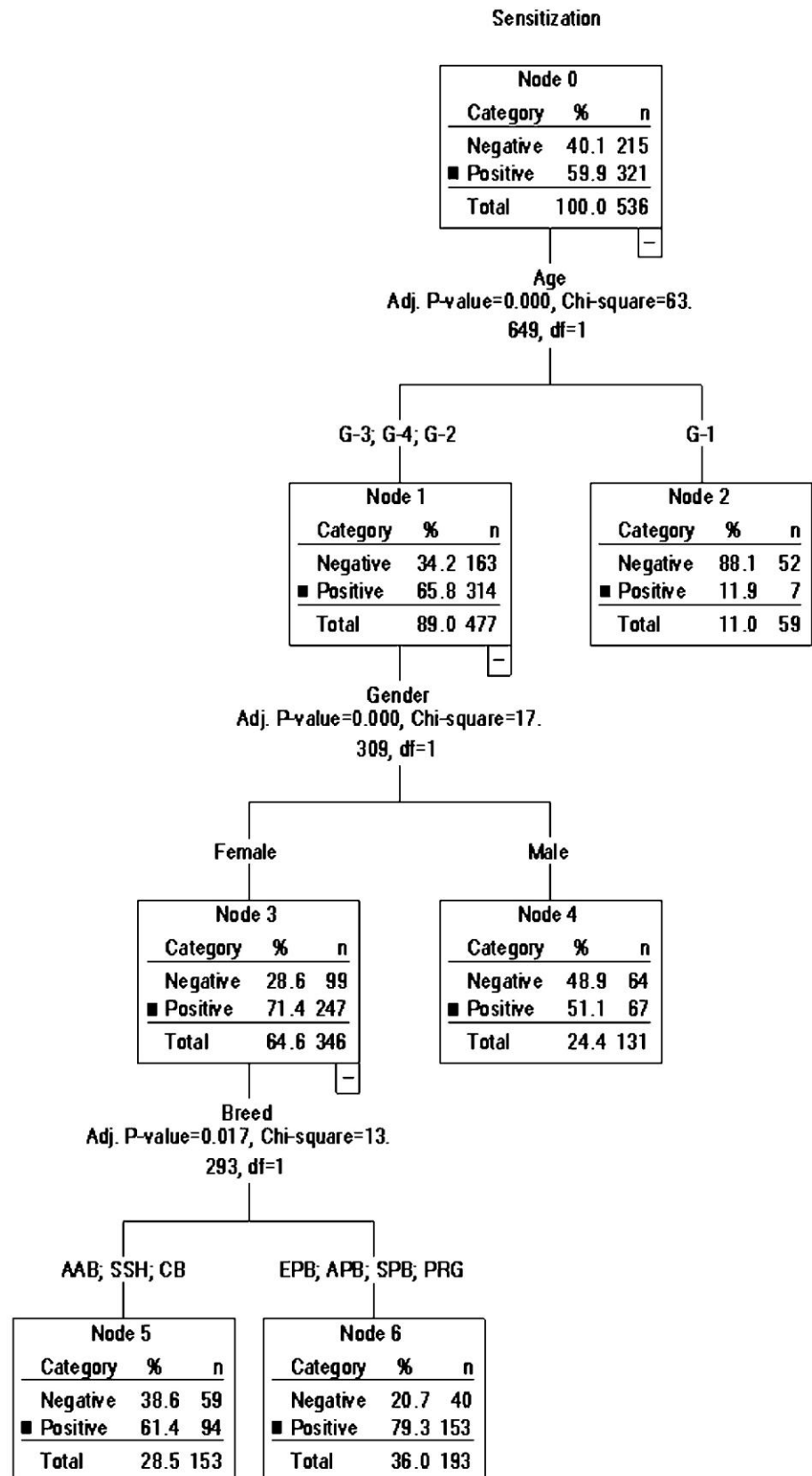
The lowest percentage of horses with antibodies against *F. hepatica* was obtained among the Crossbreds, whereas the English Pure Breed equines achieved the highest values (Table 2). Significant differences were not observed in the seropositivity regarding the equine breed.

As reflected in Table 2, the horses maintained indoors reached significantly higher seroprevalences than those obtained in equines remaining outdoors always. The OR value was 1.5 in the horses kept indoors.

The seroprevalences of fasciolosis were significantly lower in breeding horses, whereas the leisure equines achieved the highest values. The OR value for these horses was 1.5.

No differences in the positive farms in relation to the aptitude of the horses were observed, although the silvopasturing farms reached the highest seroprevalence.

**Fig. 1** Simultaneous analysis of the prevalence of sensitization to *F. hepatica* in horses from NW Spain regarding intrinsic and extrinsic factors ( $N=536$ ). *G1* (<1 year), *G2* (1–2.9), *G3* (>3–8.9) and *G4* (>9). *AAB* Anglo–Arab Breed, *SSH* Spanish Sport Horse, *SPB* Spanish Pure Breed, *CB* Crossbred, *EPB* English Pure Breed, *APB* Arabian Pure Breed, *PRG* Pura Raza Galega



The percentage of seropositive farms was classified into two groups (nodes) according to the number of horses per farm (Fig. 1).

#### Sedimentation technique

None of the sampled horses did pass *F. hepatica* eggs by faeces, as demonstrated by the copromicroscopical sedimentation procedure.

#### Discussion

A parasitological survey to evaluate the possibility of infection by the trematode *F. hepatica* was conducted in horses from an endemic region (NW Spain). The copromicroscopical sedimentation showed none of the equines were shedding trematode eggs by the stools. There have been reported very low prevalences of natural infection by the analysis of faecal samples in some endemic areas of Chile (Apt et al. 1993) and Egypt (Haridy et al. 2002; Morsy et al. 2005). An overall 60% of horses sensitized against the trematode was obtained, which is in agreement with previous works carried out on sheep and cattle in the same area (Paz-Silva et al. 2003; Arias et al. 2009). The foals reached the lowest values of seropositivity. The finding of a significantly positive correlation between the percentage of sensitization against *F. hepatica* and the age of the horses seems to support the hypothesis that the exposition to the trematode increases with the age of the equines and suggests thus a cumulative effect of infection throughout their life, as reported by Getachew et al. (2010) in equids and by Sánchez-Andrade et al. (2000, 2002) in cattle. Alcaino et al. (1992) reported a lower percentage of infection among horses older than 5 years.

Information on equine fasciolosis is sparse, which makes the discussion of the results difficult. It has been shown that mares attained a higher risk of exposure to *F. hepatica*, which could be partly explained by their longer maintenance in pastures, especially after foaling. Elevated prevalences of fasciolosis in cows have been justified in the basis of stress during pregnancy and parturition (Spithill et al. 1999).

Horses for leisure exhibited the highest percentages of IgG to the trematode, whereas the breeding equines achieved the lowest values. The most frequent way of infection occurs by feeding on metacercariae-contaminated pastures, and thus, a higher risk of fasciolosis has been associated to grazing animals (Lean et al. 2008; Khan et al. 2009). Nevertheless, other possibilities consisting of the administration of hay or even silage to stabled livestock, or by the water also, have been pointed as potentially hazardous (Perrucci et al. 2007; Arias et al. 2010).

In the last years, the economical crisis has provoked a notable reduction in the inputs of many horse owners, and as a consequence, the number of horses which have been brought to areas with extensive pastures is increasing, even those of elevated economical value. Although this practice ensures their feeding, most of the grasslands in endemic areas have been taken into advantage by ruminants shedding *F. hepatica* eggs in the faeces. It has been stated that both the number of existing snails *G. truncatula* on the pasture and the presence of excreted eggs are critical for the transmission of *F. hepatica* (Ross 1977). Arias et al. (2010) enunciated that in cattle maintained in the area of study, the interval between chemotherapy applications exceeds the prepatent period of *F. hepatica*, which might be responsible for a high risk of exposition to the trematode by guaranteeing the possibility of infection in the intermediate host.

According to the fact that ruminants are being replaced by horses in broad pasture areas, this appears to give reason for a moderate-elevated prevalence of IgG against the trematode in the horses in the current investigation and to the lack of differences regarding their breed also. This situation can aggravate because moderately abandoned meadows do not receive any type of land-management operations; thus, the adequate environment of the snails acting as intermediate hosts remains intact. The observation in the current study of an increasing percentage of positive herds together with the increment of the number of horses/herd appears to corroborate these hypotheses, because herds with more than five horses frequently graze on large grasslands.

Finally, several investigations noted the absence of information regarding fasciolosis in some animal species such as horses, rabbits and pigs, which in some countries may be important reservoir hosts of infection but are usually disregarded when treatment strategies are implemented (Apt et al. 1993; Gorman et al. 1997). The finding of a 60% seroprevalence hints that an elevated number of horses in the present research were exposed to *F. hepatica* metacercariae, and specific IgG antibodies were synthesized. Because trematode eggs were not observed, the absence of *Fasciola* adult stages was concluded. In view of these results, the role of horses as reservoirs of the trematode should be minimized or revised at least.

Data collected in the current investigation demonstrated the usefulness of an ELISA with the FhrAPS recombinant protein to establish the risk of exposure to *F. hepatica* in horses by demonstrating specific IgG antibodies in their sera. Our results showed that horses in an endemic area exhibit a very high risk of ingestion of metacercariae when grazing grasslands which have been formerly pastured by ruminants. The absence of egg output seems to indicate that fasciolae did not reach the adult stage, but the elevated prevalence of sensitization emphasizes the need for sur-

veillance of this trematodosis on horses receiving grass for their feeding.

**Acknowledgements** This work was supported in part by the Projects XUGA PGIDT06RAG26102PR and 07MDS021261PR (Xunta de Galicia, Spain), and complies with the current laws for Animal Health Research in Spain. Dr. Arias has received a fellowship from the “Ángeles Alvaríño” Research Program (XUGA, Spain). We are in debt to Mrs. B. Valcárcel for preparing and editing the manuscript.

## References

- Alcaino H, Apt W, Vega F, Gorman T, Apt P (1992) Fasciolosis animal en la VII Región de Chile: áreas de distribución e infección en caballos y conejos silvestres. *Parasitol al Día* 16:11–16
- Apt W, Aguiro X, Flavio I, Alcaino H, Zulantq I, Patia AP, González V, Retamal C, Rodríguez J, Sandoval J (1993) Prevalencia de fasciolosis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. *Bol Of Sanit Panam* 11:405–414
- Arias M, Morrondo P, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Lomba C, Pedreira J, Díaz P, Díez-Baños P, Paz-Silva A (2007) Immunodiagnosis of current fasciolosis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Vet Parasitol* 146:46–49
- Arias MS, Suárez JL, Hillyer GV, Francisco I, Calvo E, Sánchez-Andrade R, Díaz P, Francisco R, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A (2009) A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fasciolosis. *Vet J* 182:73–78
- Arias M, Piñeiro P, Hillyer GV, Suárez JL, Francisco I, Cortiñas FJ, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2010) An approach of the laboratory to the field: assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fasciolosis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *J Parasitol* 96:626–631
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec* 168:408–412
- Carnevale S, Rodríguez M, Guarnera EA, Carmona C, Tanos T, Angel S (2001) Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cysteine proteinase. *Diagn Microbiol Infect Dis* 41:43–49
- Espino AM, Díaz A, Pérez A, Finlay CM (1998) Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. *J Clin Microbiol* 36:2723–2726
- Gajewska A, Smaga-Kozłowska K, Wiśniewski M (2005) Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiad Parazytol* 51:115–123
- Getachew M, Innocent GT, Trawford AF, Reid SWJ, Love S (2010) Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. *Vet Parasitol* 169:335–339
- Gorman T, Aballay J, Fredes F, Silva M, Aguillón JC, Alcaino HA (1997) Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. *Int J Parasitol* 27:1429–1432
- Haridy FM, Morsy TA, Gawish NI, Antonios TN, Abdel Gawad AG (2002) The potential reservoir role of donkeys and horses in zoonotic fasciolosis in Gharbia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 32:561–570
- Khan MK, Sajid MS, Khan MN, Iqbal Z, Iqbal MU (2009) Bovine fasciolosis: prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Res Vet Sci* 87:70–75
- Knubben-Schweizer G, Deplazes P, Torgerson PR, Rapsch C, Meli ML, Braun U (2010) Bovine fasciolosis in Switzerland: relevance and control. *Schweiz Arch Tierheilkd* 152:223–229
- Lean I, Westwood C, Playford M (2008) Livestock disease threats associated with intensification of pastoral dairy farming. *N Z Vet J* 56:261–269
- Morsy TA, Salem HS, Haridy FM, Rifaat MM, Abo-Zenadah NY, Adel El-Kadi M (2005) Farm animals' fascioliasis in Ezbet El-Bakly (Tamyia Center) Al-Fayoum Governorate. *J Egypt Soc Parasitol* 35:825–832
- Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Pedreira J, Arias M, López C, Panadero R, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P (2003) Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol Res* 91:328–331
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, Díez-Baños P (2005) Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res* 95:129–135
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Arias MS, Sánchez-Andrade R, Pedreira J, Suárez JL, Lomba C, Díaz P, Francisco I, Díez-Baños P, Morrondo P (2007) A cross-sectional study of fasciolosis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. *Int J Appl Res Vet Med* 5:52–56
- Paz-Silva A, Arias M, Francisco I, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R (2010) Cross-immunity and interpretation of the diagnostics of parasitic trematodosis in ruminants by means of immunoenzymatic probes. In: LaMann GV (ed) *Veterinary parasitology*. Nova, New York, pp 289–302
- Perrucci S, Pinello E, Fichi G, Ciardi E, Bàrberi P, Moonen C, Ragaglini G, Bibbiani C (2007) Parasitic infections in an organic grazing cattle herd in Tuscany using geographic information systems to determine risk factors. *Vet Ital* 43:415–424
- Phiri IK, Phiri AM, Harrison LJ (2006) Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Vet Parasitol* 141:234–242
- Rodríguez-Pérez J, Hillyer GV (1995) Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 56:57–66
- Rogan WJ, Gladen B (1978) Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am J Epidemiol* 107:71–76
- Ross JG (1977) A five-year study of the epidemiology of fasciolosis in the north, east and west of Scotland. *Br Vet J* 133:263–272
- Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez J, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P (2000) Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol* 93:39–46
- Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez JL, Panadero R, Pedreira J, Díez-Baños P, Morrondo P (2001) Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 87:609–614
- Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suárez JL, Panadero R, Pedreira J, López C, Díez-Baños P, Morrondo P (2002) Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Vet Res Commun* 26:361–370
- Soulé C, Boulard C, Levieux D, Barnouin J, Plateau E (1989) Experimental equine fasciolosis: evolution of serologic, enzymatic and parasitic parameters. *Ann Rech Vet* 20:295–307
- Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB (1999) *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (ed) *Fasciolosis*. CABI Pub, Wallingford, Oxon, pp 465–525
- Thusfield M (2005) *Veterinary epidemiology*. Blackwell, Oxford, p 584



## 5. Discusión general



Las trematodosis más prevalentes en ganado vacuno en Europa están provocadas por trematodos de los géneros *Fasciola*, *Paramphistomum* y *Dicrocoelium* (Sánchez Andrade *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2007a; Szmídt-Adjídé *et al.*, 2000; Manga-González y González-Lanza, 2005; Goater y Colwell 2007; Rojo *et al.*, 2012).

Con objeto de disponer de información actualizada de la distribución e importancia de estas trematodosis en ganado vacuno explotado en el Noroeste de la Península Ibérica (Norte de Portugal, Galicia, Asturias y León), en el **PRIMER ESTUDIO**, se recogieron, semanalmente y durante 2 años, 776 hígados de vacas sacrificadas en un matadero de Lugo. Se comprobó que el 38% de los animales albergaban trematodos, siendo *F. hepatica* el más prevalente (28%) y en menor porcentaje se halló *C. daubneyi* (12%) y *Dicrocoelium* spp. (6%).

El hecho de que *F. hepatica* fuera el trematodo más prevalente, coincide con lo observado en estudios previos realizados mediante técnicas coprológicas o inmunológicas (Sánchez-Andrade *et al.*, 1995; Morrondo *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2004) en ganado vacuno explotado en Galicia (25-28%). El segundo trematodo en importancia fue *C. daubneyi*, lo que también concuerda con los señalado por Morrondo *et al.* (2003) y Díaz *et al.* (2004) quienes señalaron que el 16-17% de las vacas eliminaban huevos de este trematodo ruminal. El predominio de *F. hepatica* y *C. daubneyi* era previsible, si se tiene en cuenta que en el Noroeste de España se dan las condiciones climáticas necesarias para el desarrollo del ciclo de ambos trematodos (Morrondo *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 2007a). Asimismo, la menor prevalencia de *Dicrocoelium*, coincide con la escasa prevalencia de eliminación de huevos de este trematodo (6%) en vacas explotadas en régimen semiextensivo en Galicia (Díaz *et al.*, 2007a).

En el presente estudio se comprobó que, en el Noroeste de la Península Ibérica, las condiciones climáticas (precipitaciones y temperaturas) no están correlacionadas con la seroprevalencia de *F. hepatica* y de *C. daubneyi*. Como han señalado diversos autores (Dinnik 1962; Eduardo 1983; Abrous *et al.*, 1999; Rondelaud *et al.*, 2001; Phiri *et al.*, 2005; Dreyfuss *et al.*, 2008) en el ciclo de estos trematodos intervienen como H.I. moluscos de la Familia Lymnaeidae (*Galba truncatula*). En este sentido, en el Noroeste de España (Manga *et al.*, 1991; Morrondo *et al.*, 1994) comprobaron que, en los pastos había ejemplares de *L. truncatula* activos durante todo el año, por lo que los rumiantes podían infectarse continuamente con metacercarias de *F. hepatica*. Por el contrario, la infección por *Dicrocoelium* requiere que los H.D. ingieran hormigas parasitadas y éstas son más abundantes en áreas secas y áridas. Se demostró que existía una que existía una

correlación positiva entre la prevalencia de infección por *Dicrocoelium* y las temperaturas más elevadas registradas a finales primavera y verano) y que esta prevalencia era menor en las épocas (otoño-invierno) en las que se producen mayores precipitaciones, lo que coincide con lo observado por Manga *et al.* (2001, 2005) en estudios realizados en la provincia de León.

En las razas de vacas que permanecen más tiempo en los pastos (Rubia Gallega, Cruces y Pardo Alpina) se observó mayor prevalencia de infección por *F. hepatica* que en las que se estabulan mayor tiempo (Frisona), lo que coincide con lo observado en estudios previos realizados por Arias *et al.* (2010), quienes señalaron que las vacas que pastan con mayor frecuencia en prados cultivados o naturales, tienen más oportunidades de ingerir metacercarias que las que permanecen más tiempo estabuladas. Asimismo, el escaso porcentaje de vacas Frisonas que albergaban *Dicrocoelium*, coincide con lo observado por Ferre *et al.* (1994).

Con la edad de los animales se incrementó la prevalencia de infección por *F. hepatica*, lo que concuerda con lo observado en ganado vacuno explotado en el Noroeste de España por diversos autores (González-Lanza *et al.*, 1989; Morrondo *et al.*, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995; Arias *et al.*, 2010). Por el contrario, otros autores (Morrondo *et al.*, 1994; Sánchez-Andrade *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2007b) encontraron que la prevalencia de eliminación de huevos de este trematodo era inferior en los animales de mayor edad y atribuían este hecho a que se hubiera desarrollado una cierta inmunidad protectora frente a las reinfecciones. Sin embargo, en bovinos en pastoreo en el sureste de los Apeninos italianos, Cringoli *et al.* (2002), no observaron diferencias significativas en la prevalencia de eliminación de huevos de *F. hepatica* al considerar la edad de los animales.

La mayor prevalencia de infección de *F. hepatica*, además de lo señalado anteriormente, puede deberse también a que, según Paz-Silva *et al.* (2007) y Díaz *et al.* (2007a), en el Noroeste de España, no se tiene en cuenta que existen hábitats adecuados para el desarrollo de los ciclos de *Calicophoron* y en menor medida de *Dicrocoelium*; además, el control de las trematodosis del ganado vacuno prácticamente se basa en la aplicación de un tratamiento anual con antihelmínticos eficaces frente a *F. hepatica* pero que no lo son contra *C. daubneyi*.

Una vez que se determinó que, en vacas del Noroeste de la Península Ibérica, el trematodo más frecuente y, además, más patógeno era *F. hepatica* (Rojo *et al.*, 2012), se consideró conveniente disponer de un método de diagnóstico *in vivo*, como son las técnicas

inmunoenzimáticas. Por ello, en el **SEGUNDO TRABAJO** se realizó un estudio transversal para determinar, en ganado vacuno explotado en el Noroeste de España, la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*, mediante la aplicación de 2 pruebas inmunoenzimáticas.

Mediante un ELISA con IgG policlonal frente a los antígenos de excreción/secreción de fasciolas adultas (FhES) se demostró que el 33% de los sueros analizados tenían antígenos, es decir, tenían una infección activa por *F. hepatica* puesto que, durante su migración a través del parénquima hepático, las fasciolas juveniles liberan antígenos detectables mediante inmunoensayos con anticuerpos policlonales o monoclonales (Espino *et al.*, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001; Ubeira FM *et al.*, 2009). Además, se comprobó que la prevalencia de infección por este trematodo no había disminuido a pesar de la frecuente e indiscriminada utilización de fasciolicidas, puesto que Sánchez-Andrade *et al.* (2000) habían hallado porcentajes de vacas con antigenemia (38´3%) similares a las de este estudio.

Al relacionar la edad y la raza de los animales con la presencia de antígenos circulantes de *F. hepatica* se observó que, como habíamos hallado en el examen post-mortem, en todas las razas eran los más jóvenes y las Frisonas, en los que se hallaba menor porcentaje de animales con antígenos. Además, al analizar en conjunto la edad y la raza se comprobó que únicamente existía una correlación significativa en los cruces, mientras que no la había en las vacas de raza Frisona y Rubia Gallega, lo que parece sugerir que debido a que en estas 2 últimas razas se aplica un mayor número de tratamientos fasciolicidas, se reduce la presencia de fasciolas emigrando a través del parénquima hepático.

La detección de anticuerpos IgG frente a *F. hepatica* se realizó mediante ELISA-indirecto y una proteína de 2´9 kDa (FhrAPS). En el 65% del ganado vacuno se detectaron anticuerpos frente a este trematodo, mientras que en un estudio previo, mediante ELISA-indirecto y antígenos de excreción/secreción, Sánchez-Andrade *et al.* (2000) habían hallado mayor seroprevalencia de infección (85´1%). Además, la menor seroprevalencia observada en la actualidad fue más acusada en las razas Rubia Gallega y Frisona, probablemente debido a que al dedicarse a la producción de terneros y leche, respectivamente, reciben más atenciones sanitarias que los cruces.

La demostración de antigenemia refleja la migración de trematodos a través del parénquima hepático (Duménigo *et al.*, 2000), mientras que los valores positivos de IgG frente a la FhrAPS son más prevalentes durante la migración precoz de *F. hepatica* (Arias *et*

*al.*, 2006). Cuando estos valores se analizaron de forma conjunta, se concluyó que el 70% de los rumiantes estaba experimentando una infección prepatente por *F. hepatica*. Es necesario destacar que las principales lesiones en la fasciolosis ocurren durante este periodo (Bossaert *et al.*, 2000; Raadsma *et al.*, 2007).

Además, la aplicación conjunta de las 2 técnicas inmunoenzimáticas resultan muy útiles y complementarias para valorar la influencia de los diferentes factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno. De hecho, sorprende el elevado porcentaje de seropositivos hallado en los animales de raza Frisona y Rubia Gallega, pues como se señaló anteriormente se controla su estado sanitario; no obstante, según Mezo *et al.* (2008), la administración del triclabendazol únicamente durante el periodo de secado no supone ninguna ventaja sobre la ausencia de tratamientos fasciolocidas, probablemente porque según Parr y Gray (2000) el intervalo entre la aplicación de estos tratamientos excede el periodo de prepatencia de *F. hepatica*. En consecuencia, es necesario adoptar otras medidas de control que no se basen únicamente en la desparasitación de los animales; de hecho, Kemper y Henze (2009) señalaron que, en el Norte de Alemania, se logró una considerable reducción de la prevalencia de infección (80% en 1969 al 0'005% en 1992) tras el adecuado tratamiento de los animales y un exhaustivo drenado de los pastos.

En Galicia, en determinadas zonas, los corzos se alimentan en prados en los que también lo hacen las vacas explotadas en extensivo. Por ello, en el **TERCER ESTUDIO** nos propusimos conocer la posible intervención de estos rumiantes silvestres como reservorios de fasciolosis. Se recogieron los hígados y muestras de heces y de sangre de 301 corzos y, además, se tomaron muestras de heces y de sangre de 676 vacas explotadas en extensivo en las mismas zonas de procedencia de los corzos.

En los corzos, no se observaron huevos de *Fasciola* en las heces, lo que indica la ausencia de fasciolas adultas y tampoco se hallaron tras el exámen de los hígados; además, en ninguno de los 301 corzos examinados se hallaron lesiones compatibles con infecciones por este trematodo. La ausencia de huevos de *F. hepatica* coincide con lo observado en estudios previos realizados en Galicia por Vázquez *et al.* (2009b), así como con lo hallado en corzos abatidos en la vertiente leonesa de la Cordillera Cantábrica y en la provincia de Salamanca por Díez-Baños *et al.* (2009a) y Ramajo *et al.* (2007), respectivamente. Sin embargo, Díez-Baños *et al.* (2009b) observaron que un pequeño porcentaje (0'25%) de los animales, sacrificados en 3 reservas regionales de caza del Norte de la provincia de León, eliminaban huevos de este trematodo.

El 23% de las vacas eliminaron huevos de *F. hepatica*, siendo esta prevalencia superior a la señalada en otros países europeos (Polonia, Bélgica, República Checa, Italia, Francia) por diferentes autores (Michalski *et al.*, 1990; Genicot *et al.*, 1991; Pavlasek, 1995; Cringoli *et al.*, 2002; Mage, 1989 y Mage *et al.*, 2002; Thamsborg *et al.*, 2005) y resultó similar a la hallada por Pritchard *et al.* (2005) en Inglaterra, lo que demuestra que Galicia es una zona endémica de fasciolosis en ganado vacuno. Por el contrario, la prevalencia de eliminación de huevos de *F. hepatica* hallada en el presente estudio fue similar a la obtenida por otros autores en otras áreas de Noroeste de España, puesto que Cordero y Rojo (1983) señalaron prevalencias del 20% en Castilla y León, del 4-36% en Asturias (Rojo, 1986) y del 30% en la provincia de León (González-Lanza *et al.*, 1989). Asimismo, fue similar a la observada en trabajos previos realizados en Galicia por diversos autores (Sánchez-Andrade *et al.*, 1995; Morrondo *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2004) quienes habían obtenido porcentajes de infección del 27, 25 y 28%, respectivamente.

Para detectar posibles exposiciones de los rumiantes silvestres a las infecciones por trematodos, Arias *et al.* (2012) demostraron la utilidad de las pruebas inmunoenzimáticas. En el presente estudio, se obtuvo una seroprevalencia similar con los productos de excreción/secreción de *Fasciola* (29%) o con la proteína recombinante FhrAPS (28%). Con ambas técnicas se comprobó que la seroprevalencia era superior en los corzos de mayor edad, aunque estas diferencias solo fueron significativas cuando se utilizaron los productos de excreción/secreción. La demostración de un efecto acumulativo de la seroprevalencia de fasciolosis con la edad coincide con lo observado en ganado vacuno en el área de estudio (Sánchez-Andrade *et al.*, 2002). Por el contrario, no se observaron diferencias respecto al sexo de los corzos, lo que concuerda con lo observado en estudios previos realizados en rumiantes domésticos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2010).

En ganado vacuno, el 67% de los animales eran seropositivos mediante ELISA y proteína FhrAPS, siendo esta prevalencia similar a la hallada por nosotros en el primer estudio (Arias *et al.*, 2010). No se hallaron diferencias significativas al considerar la edad de los animales, aunque la seroprevalencia fue superior en los más viejos, hecho que ya habíamos observado previamente en ganado vacuno explotado en diferentes localidades gallegas (Morrondo *et al.*, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995, 2002; Arias *et al.*, 2010).

La ausencia de correlación entre la seroprevalencia de infección hallada en los corzos y en las vacas concuerda con lo observado por Vetyska (1980), en zonas endémicas de fasciolosis en rumiantes domésticos en Checoslovaquia. Además, en los corzos, la

ausencia de adultos y de huevos de *F. hepatica* y la baja seroprevalencia hallada en este trabajo, indican que este ungulado silvestre no es un reservorio de infección para los ruminantes domésticos. Además, estos resultados coinciden con lo señalado por Boray (1969) y Pybus (2001) ya que, según estos autores, las especies silvestres no son capaces de mantener infecciones por trematodos hepáticos en ausencia de hospedadores domésticos adecuados.

Debido a que en los 3 estudios anteriores habíamos comprobado la elevada prevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno explotado en el Noroeste de España y que los corzos no actuaban como reservorios de esta infección, nos planteamos un **CUARTO ESTUDIO**, con objeto de establecer la importancia de los équidos en el ciclo de esta trematodosis, puesto que, en los últimos años, en Galicia, se ha incrementado considerablemente el número de caballos al tiempo que ha disminuido el de vacas. Además, hay que tener en cuenta que los équidos se alimentan en pastos en los que antes lo hacían los ruminantes domésticos, por lo que es muy probable que ingieran metacercarias de este trematodo aunque el ciclo endógeno se desarrolla en ellos con mayor dificultad (Soulé *et al.*, 1989).

Con objeto de conocer si estos animales eliminaban huevos y la respuesta IgG frente a *F. hepatica*, se recogieron muestras de heces y sangre de 536 caballos pertenecientes a 61 explotaciones.

Existe escasa información de fasciolosis equina, lo que dificulta la discusión de los resultados, por lo que también se comparan nuestros resultados con los hallados por otros autores en las infecciones por este trematodo en ruminantes domésticos.

Ninguno de los animales eliminaron huevos, lo que concuerda con las bajas prevalencias de infección obtenidas en équidos explotados en algunas áreas endémicas de Chile (Apt *et al.*, 1993) y Egipto (Haridy *et al.*, 2002; Morsy *et al.*, 2005). Por el contrario, mediante ELISA y proteína recombinante FhrAPS, se comprobó que el 60% de los caballos estaban sensibilizado frente a *F. hepatica*, lo que coincide con la elevada seroprevalencia observada en ganado ovino y vacuno explotado en el mismo área (Paz-Silva *et al.* 2003a, b; Arias *et al.* 2009).

Se obtuvo una correlación positiva entre el porcentaje de sensibilización frente a *F. hepatica* y la edad de los caballos, lo que coincide con lo señalado por Getachew *et al.* (2010) en équidos y por Sánchez-Andrade *et al.* (2000, 2002) en ruminantes domésticos,

puesto que, según estos autores, existe un efecto acumulativo en la infección y por eso se observa mayor seroprevalencia en los animales de más edad. Por el contrario, Alcaino *et al.* (1992) obtuvieron menor porcentaje de infección en los caballos mayores de 5 años que en los de menor edad.

Se demostró que las yeguas tuvieron mayor riesgo de exposición a *F. hepatica*, que podría explicarse en parte por su mayor permanencia en los pastos, especialmente después del parto. En vacas, Spithill *et al.* (1998) justificaron la mayor prevalencia observada tras la preñez y el parto debido al estrés al que están sometidos los animales durante el periparto.

Los caballos dedicados al recreo mostraron prevalencias más elevadas de IgG frente a *F. hepatica* mientras que las más bajas se observaron en los de cría. En principio, esto parece una contradicción, puesto que la vía más frecuente de infección tiene lugar por ingestión de forraje con metacercarias (Lean *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009); sin embargo, hay que tener en cuenta que los animales también se pueden infectar tras el consumo de heno o ensilado en el que haya metacercarias viables e incluso si estas se encuentran en el agua que beben (Perrucci *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2010).

Respecto a la falta de influencia de la raza de los caballos sobre la seroprevalencia de infección, esta puede deberse a que los animales aprovechan prados en los que antes había vacas que eliminaban un considerable número de huevos de *F. hepatica* y a que, además, en estos pastos no realizan ningún tipo de laboreo, por lo que permanece intacto el ambiente adecuado para los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios y en consecuencia se asegura la existencia de metacercarias. Esta hipótesis parece sustentarse por el hecho de haber observado un elevado porcentaje (82%) de explotaciones positivas y porque, además, la seropositividad fue superior en las que había mayor número de caballos por explotación y en consecuencia los animales aprovechan mayor superficie de prados.

La elevada seroprevalencia observada en los équidos, confirma que existe poca información sobre el papel que desempeñan en el ciclo de *F. hepatica* esta y otras especies animales como conejos y cerdos y que, en algunos países o en determinadas áreas, podrían ser reservorios de la infección por este trematodo pero que, con frecuencia, no se tienen en cuenta se implementan estrategias de tratamiento (Apt *et al.*, 1993; Gorman *et al.*, 1997). Por ello, consideramos que es de gran interés este estudio que demuestra la utilidad de un inmunoensayo con la proteína recombinante FhrAPS para establecer el riesgo de exposición a *F. hepatica* en caballos, ya que confirma que los équidos que pasten en áreas

endémicas de fasciolosis en los rumiantes domésticos, tienen un riesgo muy alto de ingestión de metacercarias. Aunque la ausencia de eliminación de huevos parece indicar que la mayoría de las fasciolas no llegan a alcanzar el estadio adulto, la elevada prevalencia de sensibilización frente *F. hepatica* en los caballos hace necesario que se establezcan las oportunas medidas de vigilancia y control de esta trematodosis en los équidos que se exploten en zonas de alta prevalencia de infección en los rumiantes domésticos.





## **5. Conclusiones**



De los resultados obtenidos en los diversos estudios que integran esta Tesis Doctoral se llega a las siguientes **CONCLUSIONES**:

1ª.- En vacuno del Noroeste de España y Norte de Portugal, el examen *post-mortem* pone en evidencia que *Fasciola hepatica* es el principal trematodo que afecta a estos animales. Además, la raza y la edad de las vacas influyen sobre la prevalencia de infección por *F. hepatica*, siendo esta superior en las reses que permanecen mayor tiempo en los pastos y en las de mayor edad, lo que sugiere que existe una escasa inmunidad protectora frente a esta trematodosis hepática.

2ª.- Las técnicas inmunoenzimáticas, ELISA-indirecto con una proteína recombinante de 2'9 kDa y ELISA-directo con IgG policlonal frente a antígenos de excreción/secreción de *F. hepatica*, son complementarias y de gran utilidad para la detección precoz de esta trematodosis. Mediante ambas técnicas se constató la falta de inmunidad protectora frente a las reinfecciones por este trematodo.

3ª.- En los corzos, la ausencia de ejemplares de *F. hepatica* y de lesiones compatibles con esta trematodosis, confirma que no son reservorios de esta infección para el ganado vacuno que, ocasionalmente, comparta pastos con ellos.

4ª.- La aplicación de técnicas inmunoenzimáticas es útil para comprobar la exposición de los corzos a metacercarias de *F. hepatica*.

5ª.- En los équidos, el ELISA-indirecto con la proteína de 2'9 kDa es de gran utilidad para detectar animales seropositivos a *F. hepatica*. Además, permite establecer la influencia que los diversos factores intrínsecos y extrínsecos tienen sobre la prevalencia de esta infección. Se constató que existe una correlación positiva entre el número de caballos que haya en la granja y la seroprevalencia. Asimismo, al considerar los animales individualmente se comprobó que, sobre la seroprevalencia de infección influía el tipo de alojamiento, la aptitud, la raza y la edad de los animales.

6ª.- Los caballos que se alimentan en pastos previamente utilizados por rumiantes domésticos tienen un riesgo elevado de ingerir metacercarias de *F. hepatica*, por lo que es importante poner especial atención en estos animales.





## 6. Resumen



En Galicia, se dan las condiciones climáticas y edáficas que favorecen el ciclo biológico de *Fasciola hepatica*, trematodo que afecta a un elevado número de mamíferos, siendo los rumiantes domésticos los principales hospedadores definitivos. Además de aportar una información actualizada de la prevalencia de esta trematodosis hepática en ganado vacuno, también se analiza la posible intervención de los corzos y de los équidos como posibles reservorios de esta infección.

En el **PRIMER TRABAJO** y con el fin de conocer la prevalencia de infección por trematodos (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi* y *Dicrocoelium* spp.) en ganado vacuno procedente de diferentes zonas del Noroeste de la Península Ibérica (Norte de Portugal, Galicia, Asturias y León), se recogieron, semanalmente y durante 2 años, 776 hígados de vacas sacrificadas en un matadero de Lugo.

Se comprobó que el 38% (95%, IC: 35-41%) de los animales albergaban trematodos, siendo *F. hepatica* el más prevalente (28%; 95%, IC: 25-31%) y en menor porcentaje se halló *C. daubneyi* (12%; 95%, IC: 10-14%) y *Dicrocoelium* spp. (6%; 95%, IC: 4-8%). Además, se constató que la raza y la aptitud de los animales estaba relacionada con la prevalencia de fasciolosis, hallándose mayor porcentaje de infección en las vacas que permanecen más tiempo en los pastos (Rubia Gallega= 44%; Cruces= 33%; Pardo Alpina= 33%) que en las que se estabulan con más frecuencia (Frisona= 25%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2= 16'454$ ;  $P= 0'001$ ). Asimismo, se observó que la edad de los animales también influía sobre la prevalencia de infección, siendo éstas diferencias significativas ( $\chi^2= 22'980$ ;  $P= 0'001$ ) y superiores en los animales mayores de 10 años (39%) que en los menores de 3 (12%).

Una vez demostrado que la fasciolosis es la trematodosis más importante en el ganado vacuno en el Norte de la Península Ibérica, se planteó un **SEGUNDO TRABAJO** en el que se realizó un estudio transversal para determinar la seroprevalencia de infección en vacas de diferentes razas (Rubia Gallega, cruces y Frisonas). Se recogieron un total de 1.034 muestras de sangre que se analizaron mediante 2 pruebas inmunoenzimáticas. Para detectar anticuerpos IgG frente a *F. hepatica* se utilizó un ELISA-indirecto y una proteína recombinante de 2'9 kDa (FhrAPS) y para evidenciar antígenos circulantes se empleó un ELISA-directo con IgG policlonal frente a los antígenos de excreción/secreción de fasciolas adultas (FhES).

En el 65% (95% IC: 62-68%) de los animales se detectaron anticuerpos frente a *F. hepatica*, mientras que el 32% (95% IC: 29-35%) de las vacas tenían antígenos frente a

este trematodo. Además, el empleo conjunto de las 2 técnicas resultaron útiles para constatar la influencia de la edad, de la raza o del tipo de manejo de las vacas sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*; constatándose que el porcentaje más bajo de animales seropositivos correspondía a las Frisonas (61% con ELISA-indirecto y 24% con ELISA-directo) y los más elevados a los cruces (71% con ELISA-indirecto y 46% con ELISA-directo) y a las Rubia Gallega (64% con ELISA-indirecto y 32% con ELISA-directo), siendo estas diferencias significativas. Asimismo, se comprobó que los animales más jóvenes (< 1 año) presentaban las menores seroprevalencias de infección (52,4% con ELISA-indirecto y 26,4% ELISA-directo), siendo estas diferencias significativas con ambas técnicas. Además, al considerar en conjunto la raza y la edad de las vacas, se comprobó que los porcentajes de seropositividad más bajos se observaron en todas las razas en los animales más jóvenes y los más elevados en los de 2 a 6 años, siendo estas diferencias significativas.

En el **TERCER TRABAJO** y como en Galicia los corzos, en ocasiones, se alimentan en prados en los que también lo hacen los rumiantes domésticos, nos propusimos conocer la posible intervención de estos rumiantes silvestres como reservorios de fasciolosis. Se recogieron hígados y muestras de heces y de sangre de 301 corzos; además, se tomaron muestras de heces y de sangre de 676 vacas explotadas en extensivo en las mismas zonas que lo hacían los corzos. Para evidenciar la presencia de huevos se realizó la técnica de sedimentación. La detección de anticuerpos en los corzos se realizó mediante ELISA-indirecto y antígenos de ES de *F. hepatica* (FhES) y además, se puso a punto un ELISA-indirecto utilizando una proteína recombinante (FhrAPS). En los sueros de las vacas, los anticuerpos se detectaron por esta última técnica.

En los corzos, no se observaron huevos de *Fasciola* en las heces, lo que indica la ausencia de fasciolas adultas que se confirmó tras el examen macroscópico de los hígados, en los que no se hallaron ejemplares de *F. hepatica* ni lesiones compatibles con su presencia. Por el contrario, se obtuvo una seroprevalencia del 29% (95%, IC: 24-34%) cuando se emplearon los productos de ES de *Fasciola* y del 28% (95%, IC: 23-33%) cuando se utilizó la proteína recombinante (FhrAPS), existiendo una correlación significativa ( $r=0,148$ ,  $P=0,010$ ) entre los valores de IgG detectados mediante ambas técnicas inmunoenzimáticas.

Al considerar la edad de corzos, mediante las 2 técnicas inmunoenzimáticas, se observó mayor seroprevalencia de infección por *F. hepatica* en los animales de mayor edad que en los más jóvenes, siendo estas diferencias significativas cuando se utilizó la proteína

recombinante. Por el contrario, no se apreciaron diferencias al tener en cuenta la zona de procedencia de los animales.

El 23% de las vacas eliminaron huevos de *F. hepatica* y, mediante ELISA y la proteína recombinante FhrAPS, se detectaron anticuerpos en el 67% (95%; IC: 64-71) de los animales. No se hallaron diferencias significativas al considerar la edad de los animales, aunque la seroprevalencia fue superior en los más viejos. Asimismo, se observó mayor porcentaje de seropositividad en los animales que pastaban en la montaña que en los que lo hacían en otras zonas, aunque estas diferencias no resultaron significativas. No existió correlación entre la seroprevalencia de infección hallada en las vacas y en los corzos; además, la ausencia de adultos y de huevos de *F. hepatica* y la baja seroprevalencia hallada en los corzos, indican que este ungulado silvestre no es un reservorio de infección para los rumiantes domésticos.

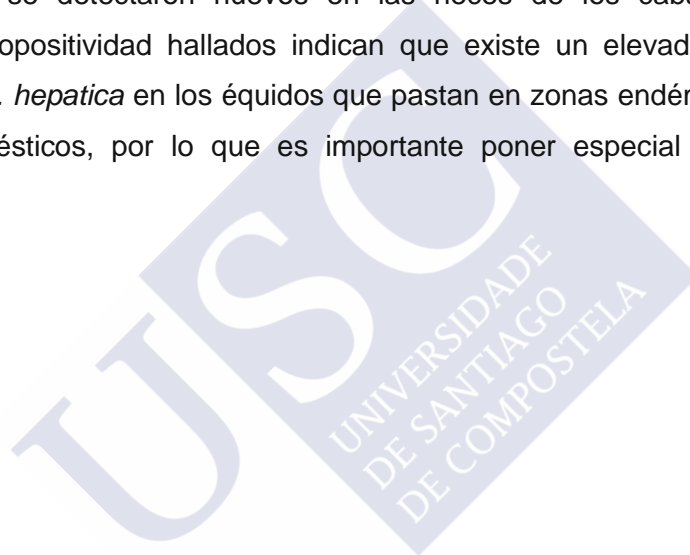
En Galicia, en los últimos años, se está incrementado considerablemente el número de caballos y disminuyendo el de vacas, debido a que los équidos se alimentan en pastos en los que antes lo hacían los rumiantes domésticos. Por ello, nos planteamos un **CUARTO TRABAJO** con objeto de establecer la importancia de los équidos en el mantenimiento del ciclo de *F. hepatica*. Se recogieron muestras de heces y de sangre de 536 caballos pertenecientes a 61 explotaciones. Se realizaron análisis coprológicos mediante sedimentación y la respuesta IgG se estableció mediante ELISA-indirecto y proteína recombinante FhrAPS. Además, se analizó si sobre la seroprevalencia de infección influían diversos factores, tanto intrínsecos (edad, género y raza) como extrínsecos (aptitud y tipo de alojamiento).

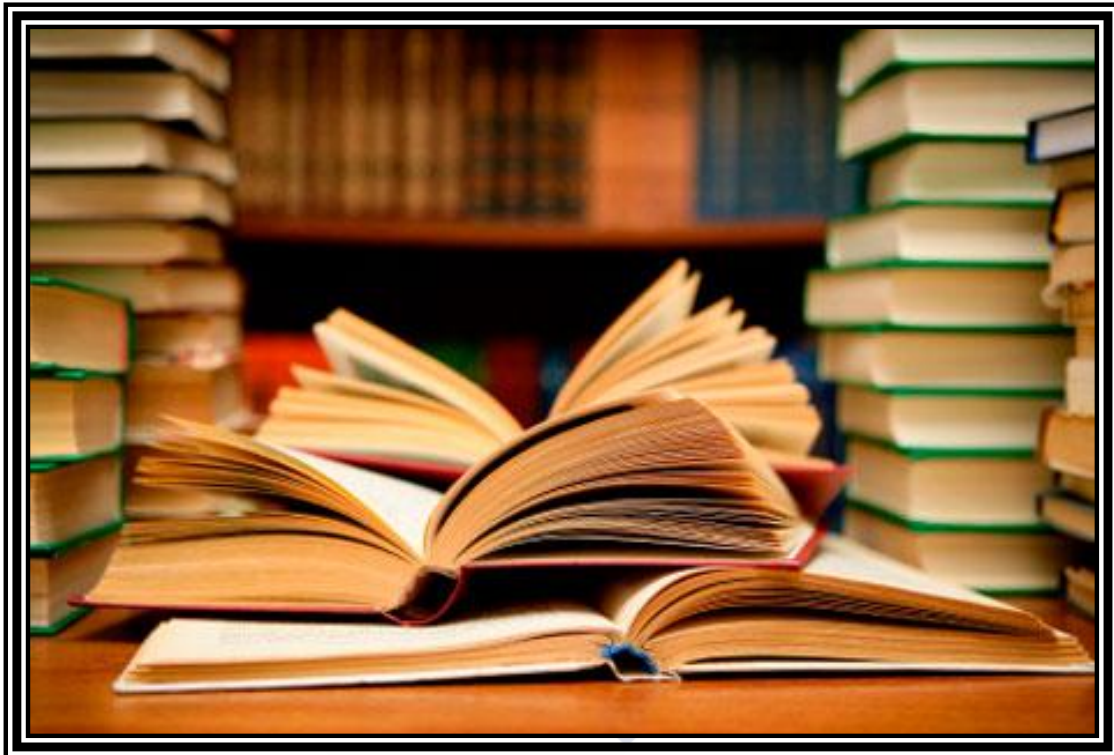
En el 82% (95%, IC: 75-89%) de las explotaciones había caballos seropositivos a *F. hepatica*. Al analizar los diversos factores epidemiológicos, se constató que existían diferencias ( $\chi^2= 9.365$ ;  $P= 0.009$ ) respecto al sexo, siendo la seroprevalencia superior en los rebaños mixtos (97%; IC: 83-99%) que en los sementales (58%; IC: 53-89%). Asimismo, se comprobó que existía mayor riesgo de infección (OR= 1.3) en las granjas que albergaban más de 15 caballos (100% de seroprevalencia) que en las que el número de animales era menor (69% en explotaciones con 1-4 animales y 72% en las de 5-15 caballos).

Al considerar la seroprevalencia individual, se detectaron anticuerpos frente a este trematodo en el 60% (95%, IC: 56-64) de los caballos. Además, se estableció una correlación positiva ( $r= 0.392$ ;  $P=0.007$ ) entre la edad de los animales y el porcentaje de

seropositivos, siendo este más bajo en los menores de 1 año (12%, IC: 6-22%) que en los mayores de 9 (70%, IC: 63-78%), comprobándose que estas diferencias eran significativas ( $\chi^2= 66\text{'}730$ ;  $P= 0\text{'}001$ ). Asimismo, se halló mayor seroprevalencia en los caballos que se mantenían más tiempo estabulados (65%; IC: 59-70%) que en los que permanecían más tiempo en los prados (56%, IC: 50-61%), siendo estas diferencias significativas ( $\chi^2= 4\text{'}706$   $P= 0\text{'}030$ ). También se halló mayor porcentaje de seropositividad en los animales dedicados al ocio (65%; IC: 50-64%) que en los de silvopastoreo (57%; IC: 59-70%), resultando estas diferencias significativas ( $\chi^2= 8\text{'}177$ ;  $P=0\text{'}042$ ). Por el contrario, no se obtuvieron diferencias estadísticas al considerar la raza de los animales, pero se obtuvo mayor seroprevalencia en los de Pura Raza Inglesa.

Aunque no se detectaron huevos en las heces de los caballos, los elevados porcentajes de seropositividad hallados indican que existe un elevado riesgo de ingerir metacercarias de *F. hepatica* en los équidos que pastan en zonas endémicas de fasciolosis en rumiantes domésticos, por lo que es importante poner especial atención en estos animales.





## **7. Bibliografía**



- ABROUS, M.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G. (1999). *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. **Parasitol Res**, **85**: 765-769.
- ABUNNA, F.; ASFAW, L.; MEGERSA, B.; REGASSA, A. (2009) Bovine fasciolosis: coprological, abattoir survey and its economic impact due to liver condemnation at Soddo municipal abattoir, Southern Ethiopia. **Trop Anim Health Prod**, **42**: 289-292.
- ACICI, M.; BOLUKBAS, C.S.; GURLER, A.T.; UMUR, S.; BUYURKTANIR, O. (2013). Seroprevalence of Fasciolosis in Equines of the Black Sea Region, Turkey. **J Equine Vet Sci**, **33**: 62-66.
- ALVES, R.M.; VAN RENSBURG, L.J.; VAN WYK, J.A. (1988). *Fasciola* in horses in the Republic of South Africa: a single natural case of *Fasciola hepatica* and the failure to infest ten horses either with *F. hepatica* or *Fasciola gigantica*. Onderstepoort. **J Vet Res**, **55**: 157-163.
- ALCAINO, H.; APT, W.; VEGA, F.; GORMAN, T.; APT, P. (1992). Fasciolosis animal en la VII Región de Chile: áreas de distribución e infección en caballos y conejos silvestres. **Parasitol al Día** **16**: 11-16.
- AMOR, N.; FARJALLAH, S.; SAID, K.; SLIMANE, B.B. (2011). First report of *Fasciola hepatica* in *Equus caballus* host species from Tunisia based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. **Turk J Vet Anim Sci**, **35**: 319-324.
- APT, W.; AGUIKRA, X.; FLAVIO, I.; ALCAÍNO, H.; ZULANTQ, I.; PATIA, A.P.; GONZÁLEZ, V.; RETAMAL, C.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, J. (1993) Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. **Bol Sanit Panam**, **11**: 405-414.
- ARIAS, M. (2003). **Obtención de proteínas recombinantes para el inmunodiagnóstico de *Fasciola hepatica***. Trabajo de Investigación Tutelado. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- ARIAS, M.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; LOMBA, C.; ÁLVAREZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2004). Prevalence of bovine fasciolosis by using a 2.9 kDa *Fasciola hepatica* recombinant protein. **Parassitologia**, **46**: 21.
- ARIAS, M.; HILLYER, G. V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J. L.; PEDREIRA, J.; LOMBA C.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. (2006). A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. **Vet Parasitol**, **137**: 67-73.

- ARIAS, M.S., SUÁREZ, J.L., HILLYER, G.V., FRANCISCO, I., CALVO, E., SÁNCHEZ-ANDRADE, R., DÍAZ, P., FRANCISCO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., PAZ-SILVA, A., (2009). A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fasciolosis. **Vet J**, **182**: 73-78.
- ARIAS, M.S.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; LEÓN-VIZCAÍNO, L.; PAZ-SILVA, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; ALONSO, F. (2012). Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. **J Parasitol** **98**: 754-759.
- ARRIAGA DE MORILLA, C.; GÓMEZ ARROYO, A.; BAUTISTA GARFIAS, C.R.; MORILLA GONZÁLEZ, A. (1983). Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fascioliasis en bovinos. **Téc Pec Méx**, **44**: 44-51.
- ARRIAGA DE MORILLA, C.; PANIAGUA, R.; RUIZ NAVARRETE, A.; BAUTISTA, C.R.; MORILLA, A. (1989). Comparison of Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-Elisa), passive haemagglutination test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the diagnosis of natural or experimental *F. hepatica* infections in sheep. **Vet Parasitol**, **30**: 197-203.
- AWAD, W.S.; IBRAHIM, A.K.; SALIB, F.A. (2009). Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and donkeys. **Res Vet Sci**, **86**: 466-471.
- BARNOUIN, J.; MIALOT, M.; LEVIEUX, D. (1981). Evaluation de la pathologie hépatique des bovins sur un prélèvement de sang. Relations avec l'histopathologie. **Ann Rech Vet**, **12**: 363-369.
- BARTH, V.D.; SCHAICH, K. (1973). Occurrence of *Fasciola hepatica* in deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) and its control using Rafoxanide. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, **80**: 448-450.
- BEHM, C.A.; SANGSTER, N.C. (1999). **Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects**. En: Fasciolosis. Edit. Dalton, J.P. Cabi Publishing. Oxon. Pp: 185-224.
- BERNARDO, C.D.; CARNEIRO, M.B.; AVELAR, B.R.; DONATELE, D.M.; MARTINS, I.V.; PEREIRA, M.J. (2011) Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. **Rev Bras Parasitol Vet**, **20**: 49-53.
- BOHÓRQUEZ, A.; LLORENS, M.; FLOREZ, E.; PÉREZ RICO, A.; SANMARTÍN SÁNCHEZ, L.; VEGA-PLA, J.L.; ESTEBAN BALLESTEROS, M.; MARTÍNEZ VALLADARES, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; ARIAS, M.S.; PAZ, A.; MEANA, A., (2013). Endoparásitos de caballos en cría libre de Doñana con especial

- relevancia de la población de caballos de las Retuertas. **Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal.** Gran Canaria, España.
- BORAY, J.C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. **Adv Parasitol**, **7**: 95-210.
- BORAY, J.C.; JACKSON, R.; STRONG, M.B. (1985). Chemoprophylaxis of fascioliasis with triclabendazole. **New Zeal Vet J**, **33**: 182-188.
- BORJI, H.; AZIZZADEH, M.; KAMELLI, M.A. (2012). Retrospective study of abattoir condemnation due to parasitic infections: economic importance in Ahwaz, southwestern Iran. **J Parasitol**, **98**: 954-957
- BOSSAERT, K.; FARNIR, F.; LECLIPTEUX, T.; PROTZ, M.; LONNEUX, J.F.; LOSSON, B. (2000). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol**, **87**: 103-123.
- BOULARD, C.; BOUVRY, M.; ARGENTE, G. (1985). Comparison of the detection of foci of fascioliasis by the ELISA test on lactoserum and serum and by coproscopy. **Ann Rech Vet**, **16**: 363-368.
- BOULARD, C. (1988). Le dépistage immunologique de la fasciolose. Monographie. Especial èlevage. Biofutur. **Mens Europ Biotech**, **57**.
- CARNEVALE, S.; RODRÍGUEZ, M.I.; GUARNERA, E.A.; CARMONA, C.; TANOS, T.; ÁNGEL, S.O. (2001). Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. **Diagn Microbiol Infect Dis**, **41**: 43-49.
- CHAUVIN, A. (1994). **Réponses immunitaires locale et générale chez le mouton infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica* Linné, 1758.** Tesis Doctoral. Universidad de Tours, Francia.
- CHAUVIN, A.; BOUVET, G.; BOULARD, C. (1995). Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. **Int J Parasitol**, **25**: 1227-1241.
- CHEEMA, A.H.; HOOSHMAND-RAD, P. (1985). Experimental cholecystitis in goats caused by mature *Fasciola gigantica*. **Res Vet Sci**, **38**: 292-295.
- CORDERO, M.; ROJO, F.A. (1983). Parasitosis del ganado vacuno en la Cuenca del Duero, Norte y Noroeste de España. **I Jornadas de Ganado Vacuno. Hygia Pecoris**. Pp: 385-394.
- CORDERO, M. (1989). Fasciolosis: revisión de algunos aspectos. **Inf Vet**, **87**: 32-40.
- CORDERO, M.; ROJO, F.A. (1999). **Parasitología Veterinaria**. McGraw-Hill. Interamericana.
- CORNEJO, S.; SUÁREZ, L.; ÁLVAREZ, F.; ALUNDA, J.M.; ROJO, F.A. (1986). Estudio parasitológico del ganado vacuno asturiano. **ONE Vet**, **62**: 22-46.

- CORNELISSEN, J.B.; GAASENBEEK, C.P.; BORGSTEEDE, F.H.; HOLLAND, W.G.; HARMSEM, M.M.; BOERSMA, W.J. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. **Int J Parasitol**, **31**: 728-737.
- CREANEY, J.; WILSON, L.; DOSEN, M.; SANDEMAN, R.M.; SPITHILL, T.W.; PARSONS, J.C. (1996). *Fasciola hepatica*: irradiation-induced alterations in carbohydrate and cathepsin-B protease expression in newly excysted juvenile liver fluke. **Exp Parasitol**, **83**: 202-215.
- CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G.; MALONE, J.B. (2002). cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. **Vet Parasitol**, **108**: 137-143.
- DÍAZ, P. (2002). **Estudio parasitológico de la Rubia Gallega en la provincia de Lugo**. Trabajo de Investigación Tutelado. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- DÍAZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; ÁLVAREZ, A.; ARIAS, M.; LOMBA, C.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. (2004). Bovine paramphistomosis detection by coprology and indirect-ELISA in Lugo (Galicia, NW Spain). **Parassitologia**, **46**: 40.
- DÍAZ, P.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; LOMBA, C.; SUÁREZ, J.L.; PAZ, A.; MORRONDO, P. (2005). Infecciones parasitarias en vacas de raza rubia gallega de la provincia de Lugo: influencia de la edad. **Buiatría española**, **10**: 231-234.
- DÍAZ, P.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2007a). Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). **Vet Parasitol**, **149**: 285-289.
- DÍAZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO-PELAYO, P. (2007b). The electroimmunotransfer blot (EITB) as a useful tool in the early evaluation of two anthelmintics in natural *Fasciola hepatica* infected sheep. **Rev Iber Parasitol**, **67**: 3-8.
- DÍEZ, P.; MEZO, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO, P.; DÍEZ, N. (1994). Experimental bovine fasciolosis. II. Assesment of hepatic indicators in animals treated with triclabendazole. **8th International Congress of Parasitology**. Izmir, Turquía.

- DÍEZ, P.; PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MEZO, M.; LÓPEZ, C.; MORRONDO, P. (1997). Aplicación de EITB en la respuesta humoral de ratas re infectadas durante la fase de migración de *Fasciola hepatica*. **XIII Congreso Federación Latinoamericana de Parasitología**. La Habana, Cuba.
- DÍEZ BAÑOS, P.; MORRONDO PELAYO, P.; BARREIRO LOIS, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (1989). Influencia de las medidas de control en la fasciolosis del ganado vacuno en Galicia. Seminario de Estudios Galegos: **V Jornadas de Estudio de Sanidade Animal en Galicia**. Santiago de Compostela, España.
- DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO PELAYO, M.P.; GOICOA VALDEVIRA, A.; SÁNCHEZ ANDRADE, R. (1991). Eficacia del albendazol, closantel y triclabendazol en bovinos infestados naturalmente por *Fasciola hepatica*. **I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidentales Europeas de Parasitología**. Valencia, España.
- DÍEZ-BAÑOS, N.; FREGENEDA-GRANDES, J.; MARTÍNEZ-DELGADO, A.; HIDALGO-ARGÚELLO, M.R. (2009a). Endoparásitos en rumiantes de la Cordillera Cantábrica en su vertiente leonesa: problemas sanitarios y de Salud Pública. **VIII Congreso de Veterinarios de Castilla y León**. León, España.
- DÍEZ-BAÑOS, N.; MARTÍNEZ, A.; HIDALGO, M.R. (2009b). Comparative survey of hepatic parasites in wild ruminants from three regional hunting reserves in the North of Leon Province (Spain). **Acta Parasitol Port**, **16**: 138.
- DINNIK, J. A. (1962). *Paramphistomum daubneyi* sp. nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highland. **Parasitology**, **52**: 143-151.
- DIXIT, A.K.; YADAV, S.C.; SHARMA, R.L. (2002). 28 kDa *Fasciola gigantica* cysteine proteinase in the diagnosis of prepatent ovine fasciolosis. **Vet Parasitol**, **109**: 233-247.
- DOWD, A.J.; TORT, J.; ROCHE, L.; RYAN, T.; DALTON, J.P. (1997). Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biochem Parasitol**, **88**: 163-174.
- DREYFUSS, G.; VIGNOLES, P.; RONDELAUD, D. (2008). *Paramphistomum daubneyi*: the number of sporocysts developing in experimentally and naturally infected *Galba truncatula*. **Parasitol Res**, **103**: 345-349.
- DROZDZ, J.; BEZUBIK, B. (1993). The epidemiological situation of parasite infections in wild ruminants. **Wiad Parazytol**, **39**: 95-98.
- DROZDZ, J. (1996). Studies on helminths and helminthiases in Cervidae II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. **Acta Parasitol Pol**, **14**: 1-13.

- DUMÉNIGO, B.E.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M. (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. **Res Vet Sci**, **60**: 278-279.
- 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.
- DUMÉNIGO, B.E.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M.; MEZO, M. (2000). Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol**, **89**: 153-161.
- DUNN, A. M. (1988). **Liver fluke**. En: Management and diseases of deer. Veterinary Deer Society, British Veterinary Association, London. Pp: 91-93.
- DÜWELL, D.; REISENLEITER, R. (1984). *Fasciola hepatica*: coproscopic diagnosis compared with the worm burden in the sheep. **Helminthologia**, **21**: 151-159.
- DÜWELL, D. (1988). Helminthiasis of roe deer (*Capreolus capreolus*). Diagnostic symptoms and intensity of infection over several years. Diseases of zoo animals. **30th International Symposium on Diseases of Zoo and Wild Animals**. Sofia, Bulgaria.
- DÜWELL, D.; REISENLEITER, R. (1990). *Fasciola hepatica*: coproscopical diagnostic in comparison to the worm burden of sheep and cattle. **Angew Parasitol**, **31**: 211-217.
- DWINGER, R.H.; LE RICHE, P.D.; KUHNE, G.I. (1982). Fascioliasis in beef cattle in north-west Argentina. **Trop Anim Health Prod**, **14**: 167-171.
- EDUARDO, S. L. (1983). The taxonomy of the family *Paramphistomidae* Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Nasmak, 1937. **Syst Parasitol**, **5**: 25-79.
- ESPINO, A.M.; MARCET, R.; FINLAY, C.M. (1997). *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. **Exp Parasitol**, **85**: 117-120.
- FAGBEMI, B.O.; OBARISIAGBON, I.O.; 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.
- FERRE, I. (1994). **Estudios sobre fasciolosis ovina**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León, Universidad de León.
- FERRE, I.; ORTEGA, L.M.; ROJO, F.A. (1995). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in Northwestern Spain. **Parasitol Res**, **55**: 71-79.

- FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L.M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1997). Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Vet Parasitol**, **68**: 261-267.
- GUOBADIA, E.E.; FAGBEMI, B.O. (1997). The isolation of *Fasciola gigantica*-specific antigens and their use in the serodiagnosis of fasciolosis in sheep by the detection of circulating antigens. **Vet Parasitol**, **68**: 269-282.
- GENICOT, B.; MOULIGNEAU, F.; LEKEUX, P. (1991). Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. **Zentralbl Veterinarmed Reihe B**, **38**: 203-208.
- GETACHEW, M.; INNOCENT, G.T.; TRAWFORD, A.F.; REID, S.W.J.; LOVE, S. (2010). Epidemiological features of fasciolosis in working donkeys in Ethiopia. **Vet Parasitol**, **169**: 335-339
- GOATER, C.P.; COLWELL, D.D. (2007). Epidemiological characteristics of an invading parasite: *Dicrocoelium dendriticum* in sympatric wapiti and beef cattle in southern Alberta, Canada. **J Parasitol**, **93**: 491-494.
- GONZÁLEZ-LANZA, C.; MANGA-GONZÁLEZ, Y.; DEL POZO, P.; 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.
- GORMAN, T.; ABALLAY, J.; FREDES, F.; SILVA, M.; AGUILLÓN, J.C.; ALCAÍNO, H.A. (1997). Immunodiagnosis of fasciolosis in horses and pigs using western blots. **Int J Parasitol**, **27**: 1429-1432.
- GRAUBMANN, H.D.; GRÄFNER, G.; ODENING, K. (1978). Zur paramphistomose des Rot-und Rehwildes. **Vet Med**, **33**: 892-898.
- GRELCK, H.; HÖRCHNER, F.; WÖHRL, H. (1977). Experimental infection of horses with *Fasciola hepatica*. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, **90**: 371-373.
- HALL, R.F.; LANG, B.Z.; WALDHALM, D.G.; FARRELL, C.J.; DELONG, W.J.; EVERSON, D.O. (1982). Experimentally induced *Fasciola hepatica* infection in young calves. **Am J Vet Res**, **43**: 1876-1878.
- HAPPIC, F.A.; BORAY, J.C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infections in sheep. **Aust Vet J**, **45**: 326-328.
- HARIDY, F.M.; MORSY, T.A.; GAWISH, N.I.; ANTONIOS, T.N.; ABDEL GAWAD, A.G. (2002). The potential reservoir role of donkeys and horses in zoonotic fascioliasis in Gharbia Governorate, Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, **32**: 561-570.

- HARIDY, F.M.; MORSY, G.H.; ABDOU, N.E.; MORSY, T.A. (2007). Zoonotic fascioliasis in donkeys: ELISA (Fges) and postmortum examination in the Zoo, Giza, Egypt. **J Egypt Soc Parasitol**, **37**: 1101-1110.
- HEGAB, M.H.; HASSAN, R.M. (2003). Role of circulating *Fasciola* antigens and IgG4 isotype in assessment of cure from fascioliasis. **J Egypt Soc Parasitol**, **33**: 561-570.
- HEUSSLER, V.T.; DOBBELAERE, D.A. (1994). Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol**, **64**: 11-23.
- HEYDEN VAN DER, P. (1983). Experiences with an ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in cattle. **First International Workshop**, Zeist.
- HILLYER, G.V.; ALLAIN, D. (1979). Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica*. III. Comparison of counterelectrophoresis and indirect hemagglutination in infected rabbits. **J Parasitol**, **65**: 960-963.
- HILLYER, G.V. (1980). Isolation of *Fasciola hepatica* teguments antigens. **J Clin Microbiol**, **12**: 695-699.
- HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ, Z.; LEÓN, D. (1985). Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. **J Parasitol**, **71**: 449-454.
- HILLYER, G.V.; SOLER DE GALANES, M.; BUCHON, P.; BJORLAND, J. (1996). Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the altiplano of Bolivia. **Vet Parasitol**, **61**: 211-220.
- IBARRA, F.; MONTENEGRO, N.; VERA, Y.; BOULARD, CH.; QUIROZ, H.; FLORES, J.; OCHOA, P. (1998). Comparison of three ELISA tests for seroprevalence of bovine fasciolosis. **Vet Parasitol**, **77**: 229-236.
- ITAGAKI, T.; SAKOMOTO, T.; ITAGAKI, H. (1995). Analysis of *Fasciola* spp Antigen by enzyme-linked immunotransfer blot using sera from experimentally and natural infected cattle. **J Vet Med Sci**, **57**: 511-513.
- KARACA, M.; AYAZ, E.; TUTUNCU, M.; GUL, A.; AKKAN, H.A. (2005). Van yöresi Atlarında helmint enfeksiyonlarının yayılışı, ı ve bazı kan parametreleri [En turco, con resumen en inglés]. **YYU Vet Fak Derg**, **16**: 71-74.
- KASSAI, T. (1999). **Veterinary Helminthology**. En: Class Trematoda. Butterworth-Heinemann. Oxford.

- KEEGAN, P.S.; TRUDGETT, A. (1992). *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of the resistance to infection. **Parasite Immunol**, **14**: 657-669.
- KELLY, J.D.; CAMPBELL, N.J. (1979). The effect of route of infection on acquired resistance to *Fasciola hepatica* in the rat and sheep. **Res Vet Sci**, **27**: 205-209.
- KEMPER, N.; HENZE, C. (2009). Effects of pastures' re-wetting on endoparasites in cattle in northern Germany. **Vet Parasitol**, **161**: 302-306.
- KHAN, M.K.; SAJID, M.S.; KHAN, M.N.; IQBAL, Z.; IQBAL, M.U. (2009). Bovine fasciolosis: prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. **Res Vet Sci**, **87**: 70-75.
- KIRSTNER, T.P.; KOLLER, L.D. (1975). Experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in black-tailed deer. **J Wildl Dis**, **11**: 214-220.
- 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.
- LAFAY, E.; MAGE, C. (1976). Value of faecal examinations in the diagnosis of fascioliasis in cattle. **Vet Bull**, **47**: 1526.
- LANGLEY, R.J.; HILLYER, G.V. (1989). Detection of circulating immune complexes by the enzyme-linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepatica*. **Am J Trop Med Hyg**, **41**: 9-41.
- LAVÍN, S., MARCO, I.; CASANOVAS, R.Y.; VINAS, L. (1995). Patología dominante en el rebeco (*Rupicapra pyrenaica*). **Vet Praxis**, **10**: 24-27.
- LAW, R.B.P.; SMOOKER, P.M.; IRVING, J.A.; PIEDRAFITA, D.; PONTING, R.; KENNEDY, N.J.; WHISSTOCK, J.C.; PIKE, R.N.; SPITHILL, T.W. (2003). Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. **Infect Immun**, **12**: 6921-6932.
- LEAN, I.; WESTWOOD, C.; PLAYFORD, M (2008). Livestock disease threats associated with intensification of pastoral dairy farming. **N Z Vet J**, **56**: 261-269.
- LECLIPTEUX, T.; TORGERSON, P.R.; DOHERTY, M.L.; MCCOLE, D.; PROTZ, M.; FARNIR, F.; 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.
- LEHNER, R.P.; SEWELL, M.M.H. (1980). A study of the antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintained *in vitro*. **Parasitol Immunol**, **2**: 99-109.

- LOMBA, C. (2005). **Caracterización de la respuesta inmunitaria y estudio de la inmunidad cruzada en fasciolosis ovina**. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- LONGHURST, W.M.; DOUGLAS, J.R. (1953). Parasite interrelationships of domestic sheep and Columbian black-tailed deer. **Trans N Am Wildl Conf**, **18**: 168-188.
- LÓPEZ-ABÁN, J.L.; CASANUEVA, P.; NOGAL, J.; ARIAS, M.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; HILLYER, G.V.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; MURO, A. (2007). Progress in development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. **Vet Parasitol**, **145**: 287-296.
- LUZÓN, M.; MIRANDA, M.; MEANA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. (1997). Prevalencia de la fasciolosis en ovino en pastos húmedos del área septentrional de España. **Med Vet**, **10**: 323-337.
- LUZÓN PEÑA, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; GÓMEZ BAUTISTA, M. (1995). Seasonal availability of *Fasciola hepatica* metacercariae in a temperate Mediterranean area (Madrid, Spain). **Zentralbl Veterinarmed B**, **42**: 577-585.
- MAGE, C. (1989). Épidémiologie de l'infestation par *Fasciola hepatica* chez les bovins en Limousin (France). **Rev Med Vet**, **140**: 407-411.
- MAGE, C. (1990). Epidemiologie, consequences économiques et traitement de la grande douve. **Symposium de Parasitologie Arkovet Ciba-Geigy**. París.
- MAGE, C.; BOURGNE, H.; TOULLIEU, J.M.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. **Vet Res**, **33**: 439-447.
- MANGA-GONZALEZ, M.Y.; GONZALEZ-LANZA, C.; OTERO, C.B. (1991). Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. **J Helminthol** **65**: 15-27.
- MANGA-GONZALEZ, M. Y.; GONZALEZ-LANZA, C.; CABANAS, E.; CAMPO, R. (2001). Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. **Parasitology**, **123**: 91-114.
- MANGA-GONZALEZ, M.Y.; GONZALEZ-LANZA, C. (2005). Field and experimental studies on *Dicrocoelium dendriticum* and dicrocoeliasis in northern Spain. **J Helminthol**, **79**: 291-302.
- MANSOUR, W.A.; KADDAH, M.A.; SHAKER, Z.A.; AL ASSAL, F.M.; DERBALA, M.F. (1998). A monoclonal antibody diagnoses active *Fasciola* infection in humans. **J Egypt Soc Parasitol**, **28**: 711-727.

- MARÍN, M.S. (1992). **Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario.** Tesis Doctoral. Departamento de Biología Funcional, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo.
- MARÍN, M.S.; PRIETO, M.; CARMENES, R.; BOGA, A.; CASAIS, R.; MARTIN, M.; PARRA, F. (1993). Fasciolosis bovina: Revisión de aspectos de la enfermedad y métodos de diagnóstico. **Mundo Ganadero**, **9**: 76-81.
- MARTÍNEZ, F.; HERNÁNDEZ, S. (1983). Parasitosis del ganado vacuno en Andalucía y Extremadura. **I Jornadas de Vacuno. Hygia Pecoris**: 363-364.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; NOGAL-RUÍIZ, J.J.; LOPEZ-ABÁN, J.; RAMAJO, V.; OLEAGA, A.; MANGA-GONZÁLEZ, Y.; HILLYER, G.V.; MURO, A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. **VetParasitol**, **126**: 287-298.
- MARTÍNEZ-MORENO, A.; JIMÉNEZ-LUQUE, V.; MORENO, T.; REDONDO, E. S. H.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. **Vet Parasitol**, **82**: 119-133.
- MEHLHORN H. (2008). **Encyclopedia of parasitology**. 3rd ed. Berlin: Springer.
- MEZO, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ, N. (1994). Experimental bovine fasciolosis. I. Study of activity of hepatic enzymes on calves infected with metacercariae of *Fasciola hepatica*. **8th International Congress of Parasitology**. Izmir, Turkey.
- MEZO MENÉNDEZ, M.; DÍEZ BAÑOS, P.; MORRONDO PELAYO, P.; DÍEZ BAÑOS, N. (1995). Faecal egg output, contamination of pastures and serum pepsinogen concentration in heifers with natural gastrointestinal nematode infections in north-west Spain. **J Helminthol**, **69**: 53-58.
- MEZO, M.; CORREIA, J.M.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P.; SAMPAIO, M.L. (1997). Estudio de la respuesta anticuerpo en bovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. **Acta Parasitol Port**, **4**: 26.
- MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; UBEIRA, F.M. (2003). Optimized serodiagnosis of sheep fasciolosis by Fast-D protein liquid chromatography fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. **Parasitology**, **89**: 843-849.
- MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CARRO, C.; UBEIRA, F.M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). **J Parasitol**, **90**: 845-852.

- MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; UBEIRA, F.M. (2008). Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Vet Parasitol**, **157**: 235-243.
- MICHALSKI, M.M.; GACA-LAGODZINSKA, K.; BRZESKA, E. (1990). Prevalence of *Fasciola hepatica* infestation in cattle from Olsztyn region in 1980-1987. **Acta Acad Agric Tech Olsten Vet**, **19**: 47-56.
- MILLER, H.R.P. (1990). Respuesta inmunitaria contra el parasitismo interno. **OIE Sci Tech Rev**, **9**: 331-334.
- MOLEDO, J.A. (1996). **Estudio de la seroprevalencia de la fasciolosis bovina en Galicia mediante la técnica inmunoenzimática ELISA y antígeno de excreción-secreción de adulto de *Fasciola hepatica***. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- MORRONGO, P. (2000). **Validez y aplicación de la técnica ELISA-doble para el diagnóstico de la fasciolosis ovina y valoración de un fasciolicida: comparación con otros métodos diagnósticos**. Trabajo original de investigación. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- MORRONGO, P.; DÍEZ, P. (2001). Avances en el diagnóstico como base para el control de la fasciolosis ovina. **9º Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes**. León, España.
- MORRONGO, P.; ARIAS, M.S.; LOMBA, C.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ, A.; DÍEZ, P. (2005). Comparative dynamics of the antigens and antibodies in sheep experimentally infected and reinfected with *Fasciola hepatica*. **1st Symposium of Scandinavian-Baltic Society for Parasitology**, Vilnius, Lithuania.
- MORRONGO, P.; VÁZQUEZ, L.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2010). Parasitic infections of wild ruminants in Spain with special attention to roe deer and chamois. **Parassitologia**, **52**: 155-158.
- MORRONGO PELAYO, P.; MOLEDO MARTÍNEZ, J.A.; PAZ SILVA, A.; MORRONGO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ, P.; PÉREZ, L.; LÓPEZ, C.; (1994). Dynamics of *Fasciola hepatica* egg elimination and *Lymnaea truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West Spain). **Res Rev Parasitol**, **54**: 47-50.
- MORRONGO-PELAYO, P.; MOLEDO-MARTÍNEZ, J.A.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ BAÑOS, P. (1997). Estudio de la distribución de la infección

- por *Fasciola hepatica* en el ganado vacuno de las provincias gallegas. **Medicina Veterinaria**, **14**: 234-239.
- MORRONDO, P.; DÍAZ, P.; PEDREIRA, J.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2003). Digestive parasitosis affecting to the autochthonous rubia gallega cattle. **XI International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants**. Olbia, Italy.
- MORRONDO, P.; VÁZQUEZ, L.; PARDO, M.; DACAL, V.; DÍAZ, P.; PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; ARIAS, M.S.; URIARTE, J.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2008) Roe deer (*Capreolus capreolus*) as a reservoir of parasitic infections in domestic ruminants under field conditions in Galicia. **XVI International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants** (Fe.Me.S.P.Rum.). Zadar, Croacia.
- MORSY, T.A.; SALEM, H.S.; HARIDY, F.M.; RIFAAT, M.M.; ABO-ZENADAH, N.Y.; ADEL EL-KADI, M. (2005). Farm animals' fascioliasis in Ezbet El-Bakly (Tamyia Center) Al-Fayoum Governorate. **J Egypt Soc Parasitol**, **35**: 825-832.
- NELIS, H.; GEURDEN, T.E.; CHARLIER, J.; VERBEEK, L.; VERCRUYSSSE, J.; DEPREZ, P. (2010). Development of a serum antibody ELISA to detect *Fasciola hepatica* infections in horses. En: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Disponible en: <http://www.waavp.org/node/6>.
- NOGAREDA, C.; FREIRE, V.; PAZ, P.; ÁLVAREZ, F.; ABAJO, B. (1987). Incidencia parasitológica en ganado vacuno lechero de Silleda (Pontevedra). **ONE Veterinaria**, **66**: 59-68.
- O'NEILL, S.M.; PARKINSON, M.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; DALTON, J.P. (1998). Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. **Am J Trop Med Hyg**, **58**: 417-423.
- O'NEILL, S.M.; PARKINSON, M.; DOWD, A.J.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; DALTON, J.P. (1999). Inmunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. **Am J Trop Med Hyg**, **60**: 794-751.
- O'FARRELL, C.J.; SHEN, D.T.; WESCOTT, R.B.; LANG, B.Z. (1981). An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Am J Vet Res**, **42**: 237-240.
- OLDHAM, G. (1982). Antibody responses to *Fasciola hepatica* antigens during liver fluke infections of cattle. **Curr Top Vet Anim Sci**, 57-82.

- OTRANTO, D.; TRAVERSA, D. (2003). Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. **Trends in Parasitology**, **19**: 12-15.
- OWEN, J.M. (1977). Liver fluke infection in horses and ponies. **Equine Vet J**, **9**: 29-31.
- PARR, S. L.; GRAY, J.S. (2001). A strategic dosing scheme for the control of fasciolosis in cattle and sheep in Ireland. **Vet Parasitol**, **88**: 187-197.
- PAVLÁSEK, I. (1995). Cryptosporidia and other endoparasites in heifers imported into the Czech Republic. **Vet Med**, **40**: 333-336.
- PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO, R.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P. (1998a). IgG isotype specific immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol**, **79**: 229-237.
- PAZ, A.; SUÁREZ, J.L.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MOLEDO, J.A.; DÍEZ BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (1998b). Relación entre las condiciones climáticas y la infección por *Fasciola hepatica* en bóvidos de Galicia. **Consulta**, **54**: 80-82.
- PAZ SILVA, A. (2012). Fasciolosis in (adult) horses. **Annual meeting of the EVPC**. León, España.
- PAZ SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO FONTÁN, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO PELAYO, P. (1997). Histopathological changes and antibody response in rats infected with *Fasciola hepatica* and treated with triclabendazole. **Helminthologia**, **1**: 3-8.
- PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (1999). Aplicación de la detección de antígenos circulantes en la evaluación de antihelmínticos en ovejas con fasciolosis natural. **Med Vet**, **16**: 429-434.
- PAZ-SILVA, A.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. **Parasitol Res**, **88**: 568-573.
- PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUAREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; LOPEZ, C.; PANADERO, R.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2003a). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. **Parasitol Res**, **91**: 328-331.
- PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; LOMBA, C.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2003b). Efficacy of oxyclozanide (Zanil®) on natural ovine fasciolosis. **19th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**. New Orleans, USA.

- PAZ-SILVA, A.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; RODRÍGUEZ-MEDINA, J.R.; ARIAS, M.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. **Parasitol Res**, **95**: 129-135.
- PAZ-SILVA, A.; HILLYER, G.V.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; LOMBA, C.; DÍAZ, P.; FRANCISCO, I.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2007). A cross sectional study of fasciolosis in autochthonous cattle from NW Spain by using a 2.9-kDa recombinant protein. **Int J Appl Res Vet Med**, **5**: 52-56.
- PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; SUÁREZ, J.L.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO, R.; FREIRÍA, D.; PAZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2001). Estudio sobre la parasitación por helmintos en ovinos de Galicia. **IX Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. (Fe.Me.S.P.Rum)**. León, España.
- PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; MORENO, T.; MORRONDO, P.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. **J Comp Pathol**, **127**: 30-36.
- PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; BRAVO, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. **Vet Res**, **36**: 1-12.
- PERRUCCI, S.; PINELLO, E.; FICHI, G.; CIARDI, E.; BÀRBERI, P.; MOONEN, C.; RAGAGLINI, G.; BIBBIANI, C. (2007). Parasitic infections in an organic grazing cattle herd in Tuscany using geographic information systems to determine risk factors. **Vet Ital**, **43**: 415-424.
- PFISTER, K.; DAVEAU, C.H.; AMBROISE-THOMAS, P. (1984). Partial purification of somatic and excretory products of adult *Fasciola hepatica* and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA. **Res Vet Sci**, **37**: 39-43.
- PFISTER, K. (1990). Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. **Rev Sci Technol**, **9**: 511-518.
- PHIRI, A.M.; PHIRI, I.K.; SIKASUNGEL, C.S.; MONRAD, J. (2005). Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. **J Vet Med Series B**, **52**: 414-416.

- PHIRI, I.K.; PHIRI, A.M.; 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.
- POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. (1992). Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica* in the rat. **Vet Parasitol**, **45**: 59-71.
- PRITCHARD, G.C.; FORBES, A.B.; WILLIAMS, D.J.; SALIMI-BEJESTANI, M.R.; DANIEL, R.G. (2005). Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. **Vet Rec**, **157**: 578-582.
- PYBUS, M.J., (2001). **Liver flukes**. En: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals*, second ed. Manson Publishing. Veterinary Press, London, U.K. Pp. 121-149.
- QUIROZ, H. (1986). **Fasciolosis, dicroceliasis y paramfistomosis**. En: *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. Ed. Limusa. Pp: 231-259.
- RAADSMA, H.W.; KINGSFORD, N.M.; SUHARYANTA, L.; SPITHILL, T.W.; PIEDRAFITA, D. (2007). Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. **Vet Parasitol**, **143**: 275-286.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. (2000). **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. W.B. Saunders Co. Ltd, London, 1, 877 pp.
- RAMAJO, V.; OLEAGA, A.; CASANUEVA, P.; HILLYER, G.V.; MURO, A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. **Vet Parasitol**, **97**: 35-46.
- RAMAJO-MARTÍN, V.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; RAMAJO-HERNÁNDEZ, A.; OLEAGA, A. (2007). Preliminary data about the parasitism caused by Protozoa, Helminths and Ticks in cervids and wild bovids from Salamanca (western Spain). **Rev Iber Parasitol**, **67**: 69-77.
- ROCHE, L.; DOWD, A.J.; TORT, J.; MCGONIGLE, S.; MCSWEENEY, A.; CURLEY, G.P.; RYAN, T.; DALTON, J.P. (1997). Functional expression of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur J Biochem**, **245**: 373-380.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; HILLYER, G.V. (1995). Detection of excretory-secretory antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. **Vet Parasitol**, **56**: 57-66.

- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; MEANA, A.; TARAZONA, J.M.; DUNCAN, J.L. (1989). The efficacy of netobimin, 15 mg/Kg, against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. **Vet Rec**, **124**: 512-513.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; MEANA, A.; VALCÁRCEL, F.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. **Vet Parasitol**, **189**: 15-38.
- ROJO, F.A.; FERRE, I. (1999). **Parasitosis hepáticas: Fasciolosis**. En: Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. Pp: 260-272.
- ROJO VÁZQUEZ, F.A. (1986). Epizootiología y control de las parasitosis gastrointestinales y hepáticas de los rumiantes. **ONE, Monografía de ovino**. Pp: 138-143.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; DIÉZ-BAÑOS, P.; MORRONDO-PELAYO, M.P. (2003). **Fasciolosis**. En: Enfermedades parasitarias del ganado ovino y caprino. Veterinaria Esteve, Eficiones GEA, Barcelona. Pp: 62-66.
- RONDELAUD, D.; VIGNOLES, P.; ABROUS, M.; DREYFUSS, G. (2001). The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. **Parasitol Res**, **87**: 475-478.
- RUÍZ, A.; MOLINA, J.M.; GONZÁLEZ, J.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; GUTIÉRREZ, P.N.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2003). Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases of adult fluke. **Vet Res**, **34**: 435-443.
- RUÍZ-NAVARRETE, M. A.; ARRIAGA, C.; BAUTISTA, C. R.; MORILLA, A. (1993). *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. **Rev Latinoam Microbiol**, **35**: 301-307.
- SAMUEL, W.M.; PYBUS, M.J.; KOCAN, A.A. (2001). **Parasitic diseases of wild mammals**. Iowa State University Press.
- SÁNCHEZ ACEDO, C. (1983). Parasitosis del ganado vacuno en el Valle del Ebro, País Vasco-Navarro, Cataluña y País Valenciano. **I Jornadas de Vacuno. Hygia Pecoris**. Pp: 355-361.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO PELAYO, P.; LÓPEZ SÁNDEZ, C.; PANADERO FONTÁN, R.; DÍEZ BAÑOS, 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.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; DÍEZ, N. (1997). Aplicación de EITB en la respuesta humoral de ratas reinfectadas con *Fasciola hepatica*. **Acta Parasitol Port**, **4**: 192.

- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). **Vet Parasitol**, **93**: 39-46.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PANADERO, R.; PEDREIRA, J.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2001). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. **Parasitol Res**, **87**: 609-614.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PANADERO, R.; PEDREIRA, J.; LÓPEZ, C.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). **Vet Res Commun**, **26**: 361-370.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.; LÓPEZ, C.; MORRONDO, P.; SCALA, A. (2003). Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). **Prev Vet Med**, **57**: 1-5.
- SANTIAGO, N.; HILLYER, G.V. (1988). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. **J Parasitol**, **74**: 810-818.
- SEXTON, J.L.; WILCE, M.C.; COLIN, T.; WIJFFELS, G.L.; SALVATORE, L.; FEIL, S.; PARKER, M.W.; SPITHILL, T.W.; MORRISON, C.A. (1994). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three dimensional model of the antigen. **J Immunol**, **152**: 1861-1872.
- SHARHUU, G.; SHARKHUU, T. (2004). The helminth fauna of wild and domestic ruminants in Mongolia-a review. **Eur J Wildl Res**, **50**: 150-156.
- SHIMALOV, V.V.; SHIMALOV, V.T. (2000). Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus 1758, in wild animals in Belorussian Polesye. **Parasitol Res**, **86**: 342.
- SHIMALOV, V.V.; SHIMALOV, V.T. (2003). Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. **Parasitol Res**, **89**: 75-76.
- SILVA, E.; CASTRO, A.; LOPES, A.; RODRIGUES, A.; DIAS, C.; CONCEICAO, A.; ALONSO, J.; CORREIA DA COSTA, J.M.; BASTOS, M.; PARRA, F.; MORADAS-FERREIRA, P.; SILVA, M. (2004). A recombinant antigen recognized by *Fasciola hepatica*-infected hosts. **J Parasitol**, **90**: 746-751.
- SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CABARET, J. (2000). Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. **Vet Rec**, **146**: 674-675.
- SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. (1988). Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. **Vet Parasitol**, **27**: 283-290.

- SOULÉ, C.; BOULARD, C.; LEVIEUX, D.; BARNOUIN, J., PLATEAU, E. (1989). Experimental equine fascioliasis: evolution of serologic, enzymatic and parasitic parameters. **Ann Rech Vet**, **20**: 295-307.
- SOULSBY, E.J.L. (1987). **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. Interamericana México, D.F. Pp: 1-823.
- SOYKAN E, ÓGE H. (2012). The prevalence of liver trematodes in equines in different cities of Turkey. **Turkiye Parazitol Derg**, **36**: 152-155.
- SPITHILL, T.W.; DALTON, J.P. (1998). Progress in development of liver fluke vaccines. **Parasitol Today**, **14**: 224-228.
- SUÁREZ, J.L.; ARIAS M.; MIGUÉLEZ, S.; RODRÍGUEZ, M.I.; CAZAPAL-MONTEIRO C.; OLIVER, A.; SUÁREZ, J.; AGUILERA, E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A. (2012). Trematodosis y encefalopatía hepática en caballos en pastoreo. **13 Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina**, Sevilla, España. Pp: 330-340.
- SZMIDT-ADJIDE, V.; ABROUS, M.; ADJIDE, C.C.; DREYFUSS, G.; LECOMPTE, A.; CABARET, J.; RONDELAUD, D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. **Vet Parasitol**, **87**: 133-138.
- TABER, R.D; DASSMANN, R.F. (1958). **The black-tailed deer of the Chaparral. Its life history and management in the north coast range of California**. Calif. Dept. Fish and Games, Game bull. No. 8, 163 pp.
- THAMSBORG, S.M.; LARSEN, M.; KÄHLER, J.; PEDERSEN, N.D. (2005). Fasciolosis in Danish cattle: a re-emerging problem?. **Bull Scand-Balt Soc Parasitol**, **14**: 150-151.
- TKALCEVIC, J.; ASHMAN, K.; MEEUSEN, E. (1995). *Fasciola hepatica*: rapid identification of newly excysted juvenile proteins. **Biochem Biophysical Res Commun**, **213**: 169-174.
- TOMANEK, J. (1967). Contribution to knowledge of helminth fauna in roe deer of north Moravian region. **Vet Med**, **12**: 739-744.
- TRUDGETT, A.; ANDERSON, A.; HANNA, R.E. (1988). Use of immunosorbent-purified antigens of *Fasciola hepatica* in enzyme immunoassays. **Res Vet Sci**, **44**: 262-263.
- TURILLI, C.; BONSEMBIANTE, P.; TONDELLO, L.; TOLIN, G. (1984). Diagnosi di fascioliasi bovina: ooservazioni preliminari su tre tecniche sierologiche. **Atti della Società Italiana di Buiatria**, **15**: 525-534.
- UBEIRA, F.M.; MUIÑO, L.; VALERO, M.A.; PERIAGO, M.V.; PÉREZ-CRESPO, I.; MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; ROMARÍS, F.; PANIAGUA, E.; CORTIZO, S.; LLOVO, J.; MÁS-COMA, S. (2009). MM3-ELISA detection of

- Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. **Am J Trop Med Hyg**, **81**: 156-162.
- UMUR S, ACICI M. (2009). A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea Region, Turkey. **Turk J Vet Anim Sci**, **33**: 373-378.
- USLU, U.; GUCLU, F. (2007). Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. **B Vet I Pulawy**, **51**: 237-240.
- VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; PATO, J.; PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; ARIAS, M.S.; FRANCISCO, I.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2009a). Occurrence of endoparasites in roe deer (*Capreolus capreolus*) in NW Spain: influence of age. **XVII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**. Perugia, Italia.
- VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; PATO, F.J.; PAZ-SILVA, A.; DÍEZ-BAÑOS, N.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2009b). The occurrence of endoparasites of roe deer (*Capreolus capreolus*) in two different areas from NW Spain. **Rev Ibero-Latinoam Parasitol**, **68**: 25-33.
- VETYSKA, V. (1980). Endoparasites of roe deer in the Strakonice region. **Acta Veterinaria Brno** **49**, 91-103.
- VIYANANT, V.; KRAILAS, D.; SOBHON, P.; UPATHAM, E.S.; KUSAMRAN, T.; CHOMPOOCHAN, T.; THAMMASART, S.; PRASITTIRAT, P. (1997). Diagnosis of cattle fasciolosis by the detection of a circulating antigen using a monoclonal antibody. **Asian Pac J Allergy Immunol**, **15**: 153-159.
- WARUIRU, R.M.; KYVSGAARD, N.C.; THAMSBORG, S.M.; NANSEN, P.; BØGH, H.O.; MUNYUA, W.K.; GATHUMA, J.M. (2000). The prevalence and intensity of helminth and coccidial infections in dairy cattle in central Kenya. **Vet Res Commun**, **24**: 39-53.
- WELCH, R.D.; SMITH, P.H.; MALONE, J.B.; HOLMES, R.A.; GEAGHAN, J.P. (1987). Herd evaluation of *Fasciola hepatica* infection levels in Louisiana cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Vet Res**, **48**: 345-347.
- WESCOTT, R.B.; FARRELL, C.J.; SHEN, D.T. (1984). Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Vet Res**, **45**: 178-179.
- WYCKOFF, J.H.3RD.; BRADLEY, R.E. (1986) An optimized enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative diagnosis of bovine fascioliasis. **J Parasitol**, **72**: 439-444.
- WILSON, L.R.; GOOD, R.T.; PANACCIO, M.; WIJFFELS, G.L.; SANDERMAN, R.M.; SPITHILL, T.W. (1998). *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the

major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. **Exp Parasitol**, **88**: 85-94.

ZIMMERMAN, G.L.; JEN, L.W.; CERRO, J.E.; FARNSWORTH, K.L. (1982). Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Vet Res**, **43**: 2097-2100.

