

UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA



FACULTAT
DE
FARMÀCIA

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO DE PARASITOLÒGIA HUMANA Y ANIMAL
Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia, España

ESTUDIO EXPERIMENTAL COMPARADO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS EN LA INFECCIÓN POR *FASCIOLA HEPATICA* Y *F. GIGANTICA*

COMPARED EXPERIMENTAL STUDY OF BIOCHEMICAL MARKERS IN *FASCIOLA HEPATICA* AND *F. GIGANTICA* INFECTION

Por
Carla Quesada Sánchez

Directores

Dra. María Adela Valero Aleixandre

Catedrática del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València,
Valencia, España

Y

Prof. Dr. Dr. H.c. Santiago Mas-Coma

Catedrático del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València,
Valencia, España

Valencia, Octubre 2017

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA
FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Av. Vicent Andrés Estellés s/n
46100 BURJASSOT-VALENCIA
ESPAÑA
Tel. +34.96.354.4298 / Fax. +34.96.354.4769

Los abajo firmantes, Dra. MARÍA ADELA VALERO ALEIXANDRE, Catedrática del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València y el Prof. Dr. Dr. H.c. SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático del citado Departamento, por la presente:

CERTIFICAN:

Que Doña CARLA QUESADA SÁNCHEZ ha realizado íntegramente el trabajo titulado “Estudio experimental comparado de marcadores bioquímicos en la infección por *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*” en el laboratorio del Departamento antedicho de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València bajo su dirección y con el fin de optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, a 30 de Septiembre de 2017.

Fdo.

Dra.

MARÍA ADELA VALERO ALEIXANDRE

Fdo.

Dr.Dr.h.c.

SANTIAGO MAS-COMA

El físico atrae, pero el biólogo enamora...

Agradecimientos

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Centro Colaborador de la OMS en Fascioliasis y sus Moluscos Vectores, WHO Collaborating Centre on Fascioliasis and Its Vectors (Referencia de la Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS): WHO CC SPA-37; Fecha de renovación del Nombramiento: 31 de marzo de 2015). Esta asignación corresponde con la Human Parasitic Disease Unit (Unidad de Parasitología Sanitaria), Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. El Director asignado al Centro es el Prof. Dr. Dr. Honoris Causa SANTIAGO MAS-COMA, Catedrático de Parasitología. El Oficial de la OMS responsable del enlace es el Dr. ANTONIO MONTRESOR, Coordinator, Preventive Chemotherapy and Transmission Control (HTM/NTD/PCT), Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, WHO Headquarters, Avenue Appia No. 20, 1211 Geneva 27, Switzerland.

En primer lugar, deseo expresar mi mayor agradecimiento a la Dra. M.ª ADELA VALERO ALEIXANDRE, Catedrática de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por todos estos años de formación, conocimientos, paciencia y apoyo que me ha proporcionado,

además de por la madurez académica que he podido adquirir gracias a ella, le quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

Al mismo tiempo deseo agradecer al Profesor Dr. SANTIAGO MAS COMA, Catedrático de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València, el haberme permitido formar parte de este gran equipo. Le agradezco su dedicación, sus conocimientos, y su disponibilidad prestada, así como la confianza puesta en mí en todo momento.

Quiero expresar mi agradecimiento particularmente a la Dra. M.ª DOLORES BARGUES CASTELLO, Catedrática de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, y a todo su equipo, ya que sin su colaboración éste trabajo no hubiera sido posible. Gracias a ellos se han llevado a cabo los procesos de recolección, transporte, mantenimiento y cría de los caracoles hospedadores intermediarios. Además de ello, su equipo también se ha encargado de las infecciones experimentales de los moluscos para la obtención, el almacenamiento y el suministro de las metacercarias utilizadas en el proceso de infección experimental de los ovinos empleados en el presente trabajo.

Me gustaría agradecer al Dr. PATRICIO ARTIGAS BASCUR y al Dr. MESSAOUD KHOUBBANE la dedicación puesta durante todo el transcurso de la investigación, agradezco todos los conocimientos que me han aportado y su ayuda siempre que la he requerido, sin su esfuerzo no habría sido posible la realización de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio, Doña RAQUEL VIEIRA PEIXOTO, Doña ÁNGELA DEBENEDETI, Doña LUCÍA MATEO ARENAS, Doña VIVIAN CHAGAS, Doña SONIA ADAM NAVARRO, Doña ALBA CORTÉS, Doña MARÍA JOSÉ IRISARRI Y Don RAIMUNDO SEGUÍ, todos los buenos momentos compartidos. En especial quiero agradecer a mis grandes apoyos Doña ALICIA GALIANO HERNÁNDEZ Y Doña MARTA REGUERA GÓMEZ su amistad, consejos, apoyo, y un sinfín de cosas más. También me gustaría hacer una mención especial a mi amiga, compañera y guía desde el comienzo de la carrera MARÍA RIOS IBÁÑEZ.

Me gustaría hacer mención del resto de miembros del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, para agradecerles a todos ellos su afectuoso trato diario y su ayuda prestada siempre que ha sido necesaria, a los profesores y profesoras: Dr. JOSÉ GUILLERMO ESTEBAN SANCHÍS, Dr. RAFAEL TOLEDO NAVARRO y Dra. CARLA MUÑOZ ANTOLI-CANDELA, así como al administrativo del Departamento CLEMENTE BAÑULS y a la Técnico del laboratorio ARACELI TERRONES.

También me gustaría agradecer a todo el equipo de investigación de la Dra. MARA ROSENTVIZT del laboratorio de BMHiD, del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica de la Facultad de Medicina- Universidad de Buenos aires (IMPAM-CONICET-UBA), el haber hecho de mi estadía una gran experiencia, en especial agradecer al Dr. FEDERICO CAMICIA todos los conocimientos que me ha podido transmitir durante aquellos maravillosos tres meses.

Para finalizar, agradecer a mis padres y a mi chico toda su paciencia, apoyo y esfuerzo, por intentar comprender mi trabajo durante todo este tiempo.

El presente trabajo forma parte de un Proyecto Multidisciplinar de Investigación en Fascioliasis que se desarrolla en nuestro Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València. Estos estudios se han llevado a cabo gracias a financiaciones proporcionadas por distintos proyectos y programas de diferentes organismos e instituciones:

-Proyectos número 2012/042 y 2016/099, Programa PROMETEO, Generalitat Valenciana, València, España

-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET, Instituto de Salud Carlos III (RD16/0027/0023)

-Proyecto de Investigación en Salud (Instituto de Salud Carlos III, MINECO, Madrid, España PI16/00520)

-Proyecto 2016/27 de Cooperación al Desarrollo de la Universitat de València (V convocatòria de la Universitat de València)

Los estudios de esta Tesis Doctoral han sido realizados dentro del marco de la Iniciativa Mundial de la OMS contra la Fascioliasis humana (WHO Headquarters, Geneva, Switzerland).

Quesada (C.), 2017.- Estudio experimental comparado de marcadores bioquímicos en la infección por *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*. Tesis doctoral (Dir. M.A. Valero y S. Mas-Coma). Facultat de Farmàcia. Universitat de València, 174 pp.

Abstract

Fascioliasis is caused by the genetically and phenotypically very close *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. The latter, always considered secondary in human infection, appears nowadays increasingly involved in human endemic areas of Africa and Asia. Unfortunately, little is known about the pathogenicity of this liver fluke species, mainly due to difficulties assessing the moment of a patient's infection in the anamnesis and in the differential diagnosis with *F. hepatica*. This is the first experimental study comparing *F. hepatica* and *F. gigantica* in a long-term study of up to 24 weeks with genotypically and phenotypically standardised fluke strains in the same animal model host, the Guirra sheep breed susceptible to both species. Serum biochemical parameters of liver damage (aspartate aminotransferase AST, alanine aminotransferase ALT, γ -glutamyl transferase GGT, total bilirubin, alkaline phosphatase AP), serum electrolytes (calcium, chloride, phosphore), protein metabolism (creatinine, blood urea nitrogen), plasma proteins (albumin, total proteins), carbohydrate metabolism (glucose, amylase), hepatic lipid metabolism (total cholesterol, triglycerides) and inflammation (C-reactive protein), were analysed on a biweekly basis as morbidity indicators. Serum anti-*Fasciola* IgG, coproantigen and egg shedding were simultaneously followed up. DNA sequencing of rDNA ITS-2 and ITS-1 and mtDNA *cox1* and

nad1, as well as the morphometric study by CIAS, showed the two fasciolid strains used to fit respective standard species characteristics. Results demonstrated that *F. gigantica* is more pathogenic than *F. hepatica*, mostly due to its bigger size. *Fasciola gigantica* shows a delayed development of 1-2 weeks regarding both biliary phase and beginning of egg laying, with the respective consequences on the biochemical marker profile modifications in both the acute and chronic periods. A review on the physiopathogenicity by *F. gigantica* compared to that by *F. hepatica* is made. A biochemical marker baseline for human infection by *F. gigantica* is proposed to help physicians and health officers in *F. gigantica* human endemic areas.

Key words: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, physiopathogenicity, biochemical parameters, morbidity indicators, IgG, coproantigen, egg shedding, sheep experimental infection, acute and chronic phases, human disease extrapolation, *F. gigantica* marker baseline.

Índice general

Agradecimientos	I
Abstract	V
Índice general	VII
Índice de figuras y tablas	XI
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Interés del estudio	4
1.2. Objetivos	7
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	11
2.1. Agentes etiológicos implicados	11
2.2. Clasificación taxonómica	11
2.2.1. Caracterización morfológica.....	12
2.2.2. Ciclo biológico	14
2.3. Fuentes de infección de la Fascioliasis	20
2.4. Fases y patología de la enfermedad.....	21
2.5. Alteraciones hematológicas en la Fascioliasis.....	25
2.6. Alteraciones bioquímicas en la Fascioliasis	27
2.7. Diagnóstico de la Fascioliasis.....	28

3. MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1. Material	33
3.1.1. Hospedadores intermediarios experimentales.....	33
3.1.2. Hospedador definitivo experimental	34
3.1.3. Diseño experimental	35
3.2. Métodos y técnicas	37
3.2.1. Métodos parasitológicos	37
3.2.1.1. Técnica de infestación monomiracidial al molusco.....	37
3.2.1.2. Mantenimiento de moluscos en el laboratorio.....	37
3.2.1.3. Obtención experimental de metacercarias infestantes	38
3.2.1.4. Parasitación experimental del hospedador definitivo	39
3.2.2. Estudios efectuados sobre el hospedador definitivo.....	40
3.2.2.1. Muestras sanguíneas	40
3.2.2.2. Muestras fecales	40
3.2.2.3. Técnicas ELISA utilizadas	41
3.2.2.3.1. MM3-SERO ELISA.....	42
3.2.2.3.2. MM3-COPRO ELISA	43
3.2.2.4. Estudios bioquímicos.....	45
3.2.2.5. Obtención de Trematodos adultos.....	47
3.2.2.5.1. Estudio del hígado y canales biliares.....	48
3.2.3. Estudios efectuados sobre el parásito.....	49
3.2.3.1. Técnicas de secuenciación de DNA.....	49
3.2.3.2. Técnicas helmintológicas.....	51
3.2.3.2.1. Técnicas microscópicas generales.....	51
3.2.3.2.1.1. Fijación	51

3.2.3.2.1.2. Conservación	53
3.2.3.2.1.3. Coloración	53
3.2.3.2.1.4. Diferenciación	54
3.2.3.2.1.5. Deshidratación	55
3.2.3.2.1.6. Montaje	55
3.2.3.3. Estudio morfométrico CIAS	56
3.2.3.4. Análisis de componentes principales	60
3.2.3.5. Determinación cuantitativa de huevos del parásito en heces: técnica Kato-Katz	61
3.2.4. Análisis estadístico	63
4. PARASITOLOGICAL RESULTS.....	67
4.1. Animal infection	67
4.2. Molecular characterization and morphometric measurements.....	70
5. BIOCHEMICAL RESULTS.....	79
5.1. Biochemical parameters and time	79
5.2. Biochemical parameters comparison between Fasciola infected groups	93
5.3. Biochemical parameters vs burden and parasite biomass.....	93
5.4. Biochemical parameters and immunological response	94
6. DISCUSSION.....	99

6.1. Infection by <i>Fasciola</i> species	101
6.2. Behaviour and pathogenesis	102
6.3. Hepatic function and biochemical parametres.....	103
6.4. Specific diagnosis.....	105
6.5. Morbidity markers	107
6.5.1. Liver damage	107
6.5.2. Serum electrolites	109
6.5.3. Protein metabolism	110
6.5.4. Plasma proteins	110
6.5.5. Carbohidrate metabolism	111
6.6.6. Hepatic metabolism of lipids.....	112
6.5.7. Inflammation	112
7. CONCLUSIONS	117
8. BIBLIOGRAPHY	123
9. ANEXO.....	163

Índice de figuras y tablas

Figuras

Fig.1. Ciclo biológico de <i>Fasciola</i> sp.....	19
Fig.2. Diseño experimental. Un total de 22 ovejas de 4-5 semanas de edad fueron divididas aleatoriamente en tres grupos. Grupo control (12 ovejas), grupo <i>F. hepatica</i> (5 ovejas) y grupo <i>F. gigantica</i> (5 ovejas). En cada caso se les administró por vía oral 200 metacercarias de <i>F. hepatica</i> y <i>F. gigantica</i> respectivamente. Transcurridas 24 semanas se obtuvieron los Trematodos adultos. spi= semanas post-infección.....	36
Fig.3. Medidas estandarizadas aplicadas a especímenes adultos grávidos de <i>F. hepatica</i> (A) y <i>F. gigantica</i> (B) (Periago <i>et al.</i> , 2006).....	59
Fig.4. Specimen of <i>F. hepatica</i> obtained in the experimental parasite in Guirra sheep.....	75
Fig.5. Specimen of <i>F. gigantica</i> obtained in the experimental parasite in Guirra sheep.....	75
Fig.6. Factor map corresponding to <i>F. hepatica</i> and <i>F. gigantica</i> specimens from experimentally infected Guirra sheep. Samples are projected onto the first (PCI, 59%) and second (PCII, 17%) principal components. Each group is represented by its perimeter.....	76
Fig.7. Liver marker values (arithmetic mean± SE) in <i>F. hepatica</i> infected (n=5), <i>F. gigantica</i> infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) aspartate aminotransferase (AST) (in international units per litre IU/L); (B) alanine aminotransferase (ALT) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in <i>F. hepatica</i> (9 weeks) and <i>F. gigantica</i> (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....	81
Fig.8. Liver marker values (arithmetic mean± SE) in <i>F. hepatica</i> infected (n=5), <i>F. gigantica</i> infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) gamma glutamyl transferase (GGT) (IU/L); (B) alkaline phosphatase (AP) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in <i>F. hepatica</i> (9 weeks) and <i>F. gigantica</i> (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....	82

Fig.9.a. Serum electrolyte and inflammation marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) calcium (Ca) (mg/dl); (B) chloride (Cl) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....84

Fig.9.b. Serum electrolyte and inflammation marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (C) phosphore (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....85

Fig.10. Protein metabolism marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) creatinine (Cre) (mg/dl); (B) urea (Ure) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.86

Fig.11. Protein metabolism marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) albumin (Alb) (g/dl); (B) total proteins (T-Pro) (g/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....87

Fig.12. Carbohydrate and lipid metabolism marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) glucose (Glu) (mg/dL); (B) amylase (Amy) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....90

Fig.13. Carbohydrate and lipid metabolism marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) total cholesterol (T-Cho) (mg/d); (B) triglycerides (Trigly) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....91

Fig.14. Carbohydrate and lipid metabolism marker values (arithmetic mean± SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) C-reactive protein (CRP) (mg/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.....92

Tablas

Table 1. Experimental design and parasitological results obtained. NA: not applicable. A) number of flukes per sheep; b) number of flukes obtained/number of metacercariae inoculated; c) significant using U Mann-Whitney ($p < 0.05$).....69

Table 2. Results of the genotypic characterisation of the *F. hepatica* and *F. gigantica* strains used in the long-term experimental infection of Guirra breed sheep. mtDNA cox1: nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA COX1: amino acid sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA nad1: nucleotide sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA NAD1: amino acid sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA. rDNA ITS-1: nucleotide sequence of the first internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA. rDNA ITS-2: nucleotide sequence of the second internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA.....73

Table 3. Results of phenotypic characterisation of the *F. hepatica* and *F. gigantica* strains used in the long-term experimental infection of Guirra breed sheep. Morphometric values of *F. hepatica* and *F. gigantica* experimental materials..... 74

Table 4.a. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *F. hepatica* and *F. gigantica*. Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non-significant increase of the biochemical parameter value; -: significant decrease of the biochemical parameter value; (-): non-significant decrease of the biochemical parameter value.....96

Table 4.b. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *F. hepatica* and *F. gigantica*. Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non-significant increase of the biochemical parameter value; -: significant decrease of the biochemical parameter value; (-): non-significant decrease of the biochemical parameter value.....97

Table 4.c. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *F. hepatica* and *F. gigantica*. Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non-significant increase of the biochemical parameter value; -: significant decrease of the biochemical parameter value; (-): non-significant decrease of the biochemical parameter value.....98

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCTION

1. INTRODUCCIÓN

La Fascioliasis es una enfermedad parasitaria causada por dos especies de Trematodos, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) y *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855) (Trematoda: Fasciolidae). Clásicamente esta enfermedad estaba asociada al ganado (Hillyer & Apt, 1997), sin embargo, a partir de los años 90 comenzó a valorarse su importancia a nivel humano (Mas-Coma *et al.*, 2003). Actualmente, las trematodiasis ocupan un puesto importante dentro del conjunto mundial de enfermedades infecciosas. Los cambios climáticos (Mas-Coma *et al.*, 2009a) y globales, entre los que se incluyen las variaciones antropogénicas del medio ambiente (Afshan *et al.*, 2014), los viajes (Ashrafi *et al.*, 2014) y la importación/exportación de ganado (Mas-Coma *et al.*, 2009b), han provocado con el tiempo, variaciones en la prevalencia, intensidad y distribución geográfica de este tipo de enfermedades (Mas-Coma *et al.*, 2008, 2009b; Boissier *et al.*, 2015). Entre ellas, la Fascioliasis merece una consideración particular, debido a su amplia distribución en el ganado y a una estimación de hasta 17 millones de personas infectadas en distintos países de Europa, África, Asia, el Caribe, América y Oceanía (Mas-Coma *et al.*, 2009b), lugares donde existe la tradición de comer vegetales crudos contaminados con el parásito (Ashrafi *et al.*, 2006a). La creciente importancia de la Fascioliasis, surge por la gran morbilidad de los sujetos infectados en estas áreas endémicas, principalmente en los niños, los cuales suelen encontrarse en la fase crónica de la enfermedad (Valero *et al.*, 2003, 2006, 2008, 2012a). Por otro lado, la dificultad en su diagnóstico, la complejidad clínica de los síntomas y síndromes, y todo un conjunto de resultados recientes sobre la

patogenicidad y respuesta inmune de la Fascioliasis (Valero *et al.*, 2008, 2016), están en la base de la decisión de considerarla como una trematodiasis de prioridad transmitida por alimentos, dentro de la agenda de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2013).

1.1. INTERÉS DEL ESTUDIO

Hasta hace muy poco, *F. hepatica* se consideraba como único agente causal de la Fascioliasis humana, describiéndose únicamente *F. gigantica* en casos aislados (Stemmermann, 1953; Janssens *et al.*, 1968). Sin embargo, el creciente número de casos de Fascioliasis humana en zonas endémicas de África y Asia, como por ejemplo, Egipto (Curtale *et al.*, 2007), Irán (Ashrafi *et al.*, 2015), Pakistán (Afshan *et al.*, 2014), Vietnam (Hung & Dung, 2011) y China (Chen *et al.*, 2013), donde *F. gigantica* está presente, conlleva la necesidad de considerar la capacidad potencial de esta especie para infectar también a seres humanos. El conocimiento actual sobre las características de infección por *F. gigantica* es muy escaso (a diferencia de lo que sucede con *F. hepatica*), y la enfermedad genera muchos interrogantes sobre diversos aspectos de su transmisión, epidemiología, diagnóstico y patogenicidad. En cuanto a la transmisión y la epidemiología, ya se están realizando esfuerzos exhaustivos (Afshan *et al.*, 2014; Ashrafi & Mas-Coma, 2014; Ashrafi *et al.*, 2015), sin embargo, los conocimientos acerca del diagnóstico y la patogenicidad aún están a la espera de ser mejorados.

Por lo que respecta al diagnóstico de la Fascioliasis, sabemos que las técnicas serológicas son muy útiles en la fase aguda de la enfermedad, sin

embargo, presentan problemas relacionados con su especificidad y sensibilidad (Mas-Coma *et al.*, 2014a), además, permiten la detección tanto de una infección reciente como pasada, por lo que no informan de una infección presente y actual. Para poder diagnosticar una Fascioliasis reciente, se pueden emplear técnicas de detección de huevos en heces, técnicas de búsqueda de antígeno sérico (válida de 7-21 días post infección) (Langley & Hillyer, 1989), y técnicas de búsqueda de antígenos ES fecales (coproantígenos), detectables tras 5-6 semanas post infección mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales (Abdel-Rahman *et al.*, 1998; Duménigo *et al.*, 2000; Almazán *et al.*, 2001).

En cuanto al diagnóstico diferencial entre los pacientes infectados por *F. hepatica* y *F. gigantica*, muchos son los problemas generados por la cercanía genotípica y fenotípica de ambas especies. Estudios enzimáticos sugieren que *F. hepatica* y *F. gigantica* se separaron hace aproximadamente 19 millones de años (Irving *et al.*, 2003). Los espaciadores ITS-1 e ITS-2 del DNA ribosomal (DNAr) de estos Trematodos, considerados como los mejores marcadores para la diferenciación de invertebrados a nivel de especie, nos informan de la variabilidad interespecífica existente entre estos fasciólidos (Remigio & Blair, 1997; Mas-Coma & Bargues, 2009). Concretamente, 5 posiciones diferentes para el ITS-1 y 5 posiciones para el ITS-2, nos informan de dicha variabilidad (Mas-Coma *et al.*, 2009b). Además de estas pequeñas diferencias genotípicas, existen variaciones alométricas y morfométricas en los adultos de estos fasciólidos, como son por ejemplo, la distancia entre la ventosa ventral y el extremo posterior del cuerpo (VS-P), la circularidad corporal (BR) y la relación entre la longitud corporal y la anchura corporal (BL/BW). Así también hay variaciones interespecíficas en diferentes medidas

1. INTRODUCCIÓN

morfométricas de los huevos de estos fasciólidos, como son, la longitud del huevo (EL), el perímetro del huevo (EP) y el área del huevo (EA) (Periago *et al.*, 2006). Cabe decir, que las características morfométricas difieren según la especie de hospedador definitivo en el cual se encuentre el parásito (Valero *et al.*, 2005; Ashrafi *et al.*, 2015).

Para el diagnóstico diferencial entre *F. hepatica* y *F. gigantica* existen en la actualidad métodos y técnicas que permiten la recuperación de los Trematodos adultos y sus huevos (obtenidos en muestras fecales y/o contenido duodenal o bilis) (Mas-Coma *et al.*, 1999). Sin embargo, hay que tener en cuenta el problema que surge en áreas de solapamiento de África y Asia, donde especímenes híbridos pueden aparecer, presentando formas intermedias tanto en el estadio adulto como en los huevos (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2009b, 2014c, d; Valero *et al.*, 2009a).

En cuanto a la patogenicidad, el escaso número de pacientes infectados por *F. gigantica* y los problemas en el diagnóstico diferencial, hacen que los conocimientos sobre esta especie de fasciólido sean escasos. Es por ello necesario seguir investigando para arrojar más luz sobre los mecanismos de infección de estas dos especies de Trematodos.

1.2. OBJETIVOS

En la presente investigación se lleva a cabo por primera vez un estudio comparativo a largo plazo del poder patógeno de *F. hepatica* y *F. gigantica*.

El objetivo del estudio es contribuir al conocimiento de la fisiopatogenicidad de *F. gigantica* durante todo el transcurso de la Fascioliasis. Los análisis se centran en parámetros bioquímicos seleccionados los cuales aportan información sobre el daño hepático, la capacidad de síntesis de proteínas, el metabolismo de sustancias exógenas (como son carbohidratos y grasas), la función renal y la inflamación.

Con ello se pretende alcanzar una mejor comprensión de la morbilidad comparada de estas dos especies de Trematodos, así como ampliar la información disponible acerca del diagnóstico específico de ambos fasciólidos.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

BIBLIOGRAPHIC BACKGROUND

2. ANTECEDENES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. AGENTES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS

Los Trematodos Digénidos empleados en el estudio son, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) y *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1855).

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según los trabajos de Yamaguti *et al.* (1958), Pantelouris (1965), Schell (1970), Borchet (1981), Boray (1982), Boch & Supperer (1982), Euzéby (1984) y Urquhart *et al.* (1987), la clasificación taxonómica de los trematodos en estudio queda de la siguiente manera:

Phylum Platyhelminthe

Clase Trematoda

Subclase Digenea

Orden Echinostomatida

Suborden Prosomata (Odhner, 1905)

Familia Fasciolidae (Railliet, 1985)

Género *Fasciola* (Linnaeus, 1758)

Especie *F. hepatica* (Linnaeus, 1758)

Especie *F. gigantica* (Cobbold, 1855)

2.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los estados adultos de *F. hepatica* y *F. gigantea* se caracterizan por presentar diferentes medidas corporales, las cuales suelen rondar los 30 mm y 75 mm de longitud respectivamente (Piedrafita *et al.*, 2004). El adulto de *F. hepatica*, presenta un cuerpo foliáceo aplanado dorsoventralmente, con una anchura comprendida entre 6 y 13 mm, y una longitud de entre 20 y 30 mm. Por otro lado, *F. gigantea* presenta un tamaño de 24 a 75 mm de largo y de 5 a 13 mm de ancho. Por lo tanto, *F. gigantea* es más alargada y estrecha, con paredes laterales (las cuales tienden a ser paralelas), y con un cono apical más pequeño, cuyos hombros resultan menos marcados e incluso inexistentes (Mas-Coma & Bargues, 1997; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Ambas especies comparten muchos rasgos morfológicos. El tegumento es blando y carnoso, revestido por una cutícula gruesa, la cual se encuentra provista de salientes espinas triangulares dirigidas hacia atrás, que ayudan al parásito a mantener la ubicación dentro de los canales biliares. El tegumento también interviene en el intercambio de nutrientes y ayuda a erosionar los epitelios durante la migración (Quiroz, 2005; Carrada-Bravo & Martínez, 2005).

Poseen dos ventosas, las cuales sirven para fijarse al cuerpo del hospedador (Carrada-Bravo & Martínez, 2005). En la porción apical se encuentra la ventosa oral, y a la altura de lo que podríamos denominar hombros, se sitúa la ventosa ventral. La ventosa oral, da lugar a una faringe musculosa y un esófago con dos bifurcaciones principales de ciegos intestinales, ramificados en un complejo de ramas laterales secundarias y terciarias (Borchet, 1981; Boray, 1982; Ibarra *et al.*, 2011). En *F. gigantea*, los

ciegos están más ramificados que en *F. hepatica* (Periago *et al.*, 2006). El sistema excretor se abre en la región posterior del cuerpo, y está formado por solenocitos o células en flama, los cuales se encuentran conectados a túbulos, que liberan los productos de deshecho del parásito a través de un poro o vesícula excretora (Fairweather *et al.*, 1999; Carrada-Bravo & Martínez, 2005).

El adulto de *Fasciola* sp. es hermafrodita (Martínez *et al.*, 2012), y posee tanto testículos como ovario. En su hábitat natural puede haber copulación entre dos individuos (cuando existen más de dos), o puede darse autocopulación. El poro genital se abre anteriormente a la ventosa ventral (Urquhart & Armour, 2001; Haro, 2016). El ovario ramificado está localizado en el lado derecho, y a partir de este se origina un oviducto estrecho. Tras el ootipo se forma un útero tubuloso y ondulado. Las glándulas vitelógenas, formadas por células arracimadas en forma de folículos y situadas en los márgenes laterales del cuerpo, actúan produciendo sustancias de reserva. Presentan dos testículos ramificados, uno anterior y otro posterior, los cuales ocupan una gran porción del cuerpo del parásito (Borchet, 1981; Boray, 1982; Beaver *et al.*, 1986; Carrada-Bravo & Martínez, 2005). A partir de ellos, se originan dos conductos eferentes, que se dirigen hacia la parte anterior, uniéndose para formar el conducto deferente en la base de la bolsa del cirro, situada a nivel de la ventosa ventral. La primera parte de este conducto es ancha y forma la vesícula seminal. Posteriormente sufre un estrechamiento, rodeándose de glándulas prostáticas. Finalmente aparece el órgano copulador o cirro (Olsen, 1977; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Los huevos de *Fasciola* sp. son operculados, ovoides, amarillos y no embrionados en el momento de la puesta. Los huevos de *F. hepatica* suelen

medir entre 130-150 μm de largo y 60-90 μm de ancho (Martínez *et al.*, 2012), mientras que los de *F. gigantea* suelen ser mayores en longitud y anchura. Las dimensiones están relacionadas con la especie de hospedador definitivo que alberga el parásito (Valero *et al.*, 2001, 2002, 2009a; Prepelitchi & Wisnivesky-Colli, 2013).

La cubierta de los huevos del parásito deriva principalmente de los gránulos contenidos en las células vitelinas, que albergan dos componentes necesarios para la cubierta de esclerotina: polifenoles y proteínas (Irwin & Threadgold, 1972; Ramalingam, 1973a, b; Wharton, 1983).

2.2.2. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de *F. hepatica* fue descrito por primera vez por Thomas (Inglaterra) y Leuckart (Alemania) en 1883. Se trata de un ciclo biológico diheteroxeno, el cual alterna entre una fase asexual en un hospedador intermediario (respecto al cual presenta una alta especificidad de tipo estenoxeno), y una fase sexual en un hospedador definitivo (respecto al cual no es tan específico) (Fig.1). El hospedador intermediario es un invertebrado (Molusco Gasterópodo) y el hospedador definitivo es un mamífero (Boray, 1981, 1982; Chen & Mott, 1990; Olaechea, 2004; Mas-Coma *et al.*, 2014b).

El ciclo biológico de ambas especies es similar y dura de 14 a 23 semanas (Lapage, 1968; Boray, 1969; Mas-Coma *et al.*, 2014a). Como hospedadores definitivos, además del humano, pueden actuar muchas y diferentes especies, siendo muy frecuente la parasitación en el ganado

ovino, vacuno y caprino. Los vectores de *F. hepatica* y *F. gigantica* son caracoles pertenecientes a la familia Lymnaeidae (Ibarra *et al.*, 2011). Cada especie de lymnaeido muestra una marcada y diferente especificidad. Hay especies de Lymnaeidae que no actúan como hospedadores de fasciólidos, otras especies que sólo pueden transmitir *F. hepatica*, otras que sólo son capaces de transmitir *F. gigantica* y otras pocas que pueden actuar como hospedadores intermediarios de ambas especies de fasciólidos. *F. hepatica* es transmitida principalmente por especies del grupo *Galba/Fossaria* (Bargues *et al.*, 2007, 2011), siendo el vector principal *Galba truncatula*, único en Europa, pero también presente en África, Asia y Sudamérica. *F. gigantica* es transmitida por especies del género *Radix*, como *R. natalensis* en África y *R. auricularis* y *R. viridis* en Asia. En Europa, sin embargo, el género *Radix* no cobra importancia epidemiológica, ya que solo está presente *F. hepatica* (Bargues *et al.*, 2001).

Los fasciólidos adultos emiten huevos sin embrionar, los cuales son liberados por las heces del hospedador definitivo al medio exterior (Quiroz, 2005). La viabilidad de los huevos puede mantenerse en el interior de las heces desde semanas hasta meses, lo cual depende del porcentaje de humedad de éstas (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960). Una vez en el exterior, el parásito sigue un ciclo de vida acuático, ya que los huevos necesitan agua para madurar. Si las condiciones son favorables, en particular la temperatura y la humedad (Roberts, 1950; Pantelouris, 1965; Taylor, 1965; Boray, 1982; Rojo-Vázquez, 1991; Ibarra *et al.*, 2011) los huevos se embrionan y transcurridos unos días, eclosiona un embrión ciliado o miracidio, el cual resulta ser de mayor tamaño en *F. gigantica* (Phale *et al.*, 2015). Este proceso ocurre en un lapso de unos 15 días, a temperaturas de alrededor de 22°C

(Haro, 2016). Parece ser que el estímulo final que desencadena el mecanismo de eclosión del miracidio es la luz (Roberts, 1950; Rowan, 1956; Al-Habbib, 1974), produciendo una alteración de la permeabilidad de la membrana (Wilson, 1968), lo cual provoca un aumento de la presión osmótica interna que impulsa la apertura del opérculo y la salida del miracidio. Se ha podido comprobar que el miracidio de *F. gigantica* en el interior del huevo se desarrolla a mayor velocidad que en el caso de *F. hepatica*, produciéndose una salida de este más temprana (Phale *et al.*, 2015).

El miracidio nada de forma activa gracias a sus cilios (Carrada-Bravo & Martínez, 2005). La penetración en el caracol ocurre tan pronto como lo encuentre, ya que el miracidio tiene únicamente energía para 24 horas, y tras este periodo muere (tanto en el caso de *F. hepatica*, como en el de *F. gigantica*) (Olsen, 1974; Quiroz, 2005; Phale *et al.*, 2015). El contacto y la unión del miracidio al tegumento del caracol, parece estar inducido por la presencia de mucus, penetrando preferentemente a nivel de manto, pie y tentáculos (Smith & Halton, 1983; Ibarra *et al.*, 2011). Tras la penetración, pierde los cilios convirtiéndose en un esporocisto elíptico y sacular (Dawes, 1960a, b).

El esporocisto posee un extremo redondeado y otro cónico. Transcurridos alrededor de 14 días tras la penetración, el esporocisto da lugar a una sucesión de generaciones de redias (Haro, 2016). Se producen hasta cuatro generaciones de redias, siendo las tres primeras bipotenciales: rediógenas y cercariógena (con capacidad de producir redias y cercarías) y la cuarta unipotencial cercariógena. Tras 5 a 7 semanas post-infección, se producen múltiples cercarías (Hope Cawdery *et al.*, 1978), las cuales son emitidas al agua por el caracol mediante un fenómeno pasivo. Se ha

estimado que por cada miracidio salen alrededor de 250 cercarias (Haro, 2004).

La cercaría es de tipo gymnocéfalo, con cuerpo globoso y cola larga y fina. Las cercarias nadan en el agua por muy poco tiempo (una hora aproximadamente), hasta ponerse en contacto con un sustrato inerte donde se fijan, pierden la cola y se enquistan, transformándose en metacercarias (Dixon, 1964, 1965, 1968; Haro, 2016). Las metacercarias enquistadas son muy resistentes puesto que poseen una doble pared protectora (Ibarra *et al.*, 2011) y presentan un amplio margen de supervivencia en ambientes húmedos, siendo destruidas por el exceso de calor o sequedad (Quiroz, 2005). Así, por ejemplo, pueden permanecer viables en heno seco hasta 5 meses (Haseeb *et al.*, 2002), en épocas invernales pueden aguantar infectivas hasta 5 o 6 meses (Rowcliffe & Ollerenshaw, 1960), e incluso con escasa humedad y muy bajas temperaturas pueden ser viables durante 3 meses (Enigk & hildebrandt, 1964). Algunas metacercarias no se fijan al sustrato y flotan en la superficie del agua, son las denominadas “metacercarias flotantes” (Vareille-Morel *et al.*, 1993; Dreyfuss & Rondelaud, 1994; Mas-Coma *et al.*, 2000).

El hospedador definitivo se infesta al ingerir la metacercaria, pero una gran proporción de metacercarias mueren en el tracto gastrointestinal y relativamente pocas de ellas llegan a desarrollarse. Aproximadamente una hora después de la ingestión, las metacercarias se desenquistan en el intestino delgado (Martínez *et al.*, 2012). Los vermes atraviesan la pared intestinal y por la cavidad abdominal alcanzan el hígado tras aproximadamente seis días. Allí, los juveniles migran alimentándose del parénquima hepático hasta finalmente llegar a la luz de los conductos

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

biliares, donde alcanzan su madurez sexual y por tanto la capacidad de emitir huevos (Dawes & Hugues, 1964, 1970; Smith & Halton, 1983).

En un mismo hospedador, *F. hepatica* alcanzará los conductos biliares y habrá madurado transcurridas 7-10 semanas post-infección. No sucederá lo mismo con *F. gigantica*, la cual comenzará su oviposición en un lapso de 12-16 semanas post-infección (Dawes & Hugues, 1964, Boray 1969)

En el ser humano, *F. hepatica* necesita un periodo de 3 a 4 meses para que los adultos maduren sexualmente (Facey & Marsden, 1960), transcurrido este tiempo puede llegar a vivir hasta incluso 13 años en su interior (Mas-Coma *et al.*, 2014a).

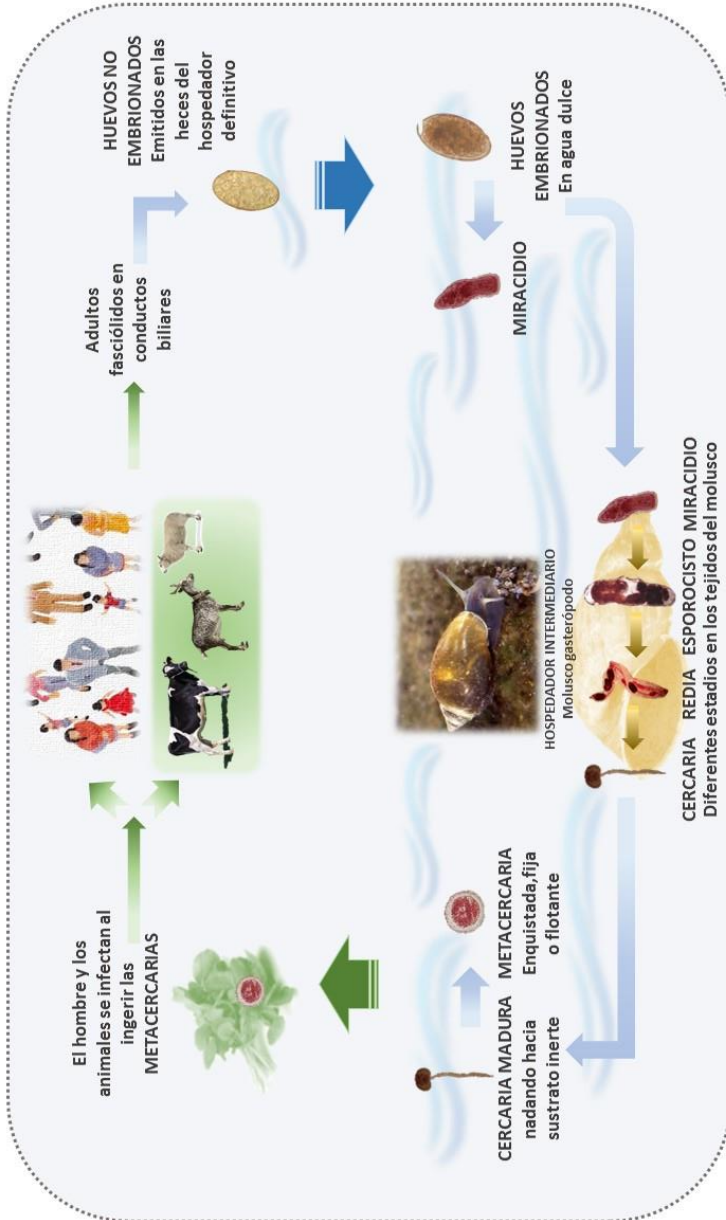


Fig.1. Ciclo biológico de *F. hepatica*.

2.3. FUENTES DE INFECCIÓN DE LA FASCIOLIASIS

La infectividad de las metacercarias también depende del tiempo de vida de estas. Cuanto más longevas sean, menor será la infectividad, siendo la longevidad máxima de unas 48 semanas. Cabe decir, que la viabilidad y la infectividad de las metacercarias no sufre variaciones en las diferentes especies de reservorios, y que la transmisión de la enfermedad siempre se va a ver más favorecida en zonas con un panorama climático y medioambiental más favorable (Valero & Mas-Coma, 2000; Nyindo & Lukambagire, 2015).

La ingesta de metacercarias en humanos puede ocurrir de diferentes maneras. Las fuentes de infección se citan a continuación (Mas-Coma, 2004):

- ingesta de plantas silvestres de agua dulce: importante en zonas endémicas de animales;
- ingesta de plantas de cultivo de agua dulce: principalmente berros;
- ingesta de agua contaminada;
- ingesta de platos y sopas hechas con agua contaminada;
- lavado de utensilios de cocina u otros objetos con agua contaminada;
- ingesta de hígado crudo infectado con metacercarias migratorias: estas pueden poseer la capacidad de reiniciar la migración.

Existe una clara relación entre la Fascioliasis y el hábito de comer verduras crudas. El hecho de adquirir la enfermedad por la ingesta de vegetales diferentes al berro, sugiere la presencia de formas infectantes en el agua empleada para el lavado de dichos alimentos (Zumaquero-Ríos *et al.*, 2013, Krauth *et al.*, 2015).

Las tradiciones culturales cobran un papel importante en determinadas zonas endémicas. Estudios experimentales en provincias como Gilán (Irán), muestran el papel que los alimentos vegetales pueden desempeñar en la infección humana por Fascioliasis (Ashrafi *et al.*, 2006a).

Además de las vías de infección ya citadas, existen otros factores que contribuyen al aumento de la transmisión humana de la Fascioliasis, como son por ejemplo, la alta densidad de poblaciones de animales que viven próximas a zonas domésticas, y el uso de agua no tratada para uso doméstico y/o uso de aguas residuales destinadas a la agricultura (Carrique-Mas & Bryant, 2013).

Cabe decir, que estudios epidemiológicos de zonas endémicas combinados con una correcta educación sanitaria, cobran gran importancia en lugares donde todas estas prácticas se producen diariamente generando importantes focos de Fascioliasis a nivel mundial (Fentie *et al.*, 2013).

2.4. FASES Y PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La Fascioliasis comprende varios periodos clínicos, los cuales se citan a continuación. Período de incubación, que incluye una duración de unos pocos días, algo menos de tres meses o incluso 6 meses. Este periodo puede variar según el número de metacercarias ingeridas y la respuesta del hospedador (desde la ingesta de las metacercarias hasta la aparición de los primeros síntomas) (Chen & Mott, 1990; Bourée & Thiebault, 1993; Espino *et al.*, 1998); período de fase aguda o invasiva, que incluye de 2 a 4 meses (migración del trematodo hacia los conductos biliares) (Mas-Coma &

Bargues, 1997; Alonso *et al.*, 2013); periodo de fase latente, que incluye una duración de meses a años (maduración de los parásitos y comienzo de la oviposición) (Hardman *et al.*, 1970; Chen & Mott, 1990; Gil-Benito *et al.*, 1991; Apt *et al.*, 1995; Arjona *et al.*, 1995); y periodo de fase biliar o crónica, que puede desarrollarse después de meses a años de infección (los parásitos provocan obstrucción de los canales biliares principales) (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma & Bargues, 1997; Mas-Coma *et al.*, 1999, 2000; Alonso *et al.*, 2013). De estos cuatro períodos, la fase aguda o invasiva y la fase biliar o crónica son las más importantes, y en las que se detecta a la mayoría de los pacientes (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2005, 2008, 2014b).

Algunos de los síntomas característicos de la fase aguda de la enfermedad son: fiebre, dolor abdominal, pérdida de apetito, náuseas, tos y/o dolor torácico. También la urticaria es un hecho distintivo en la fase temprana de la invasión del Trematodo y puede estar acompañada de ataques de asma bronquial (Chen & Mott, 1990; Arjona *et al.*, 1995; Haro, 2016). Entre los signos clínicos de la Fascioliasis es común encontrar: hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis, anemia e ictericia, entre otros (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999, 2014c; Valero *et al.*, 2008, 2017).

La fase crónica puede durar desde meses hasta años, y la mayoría de los sujetos infectados suelen encontrarse en esta fase sin presentar ningún síntoma específico (Mas-Coma *et al.*, 2001, 2005, 2008). A menudo se descubre la enfermedad por la presencia de una eosinofilia inexplicada y prominente (Gil-Benito *et al.*, 1991; Gil-Benito, 1994). Estas personas pueden presentar molestias gastrointestinales, y pueden darse una o más recaídas

de los síntomas agudos típicos de la enfermedad (Facey & Marsden, 1960; Mangos & Menzies, 1973; Mas-Coma & Bargues, 1997).

La patogénesis va a depender de la cantidad de vermes que habiten en el hospedador. En humanos existe muy poca información disponible sobre casos de mortalidad a causa de Fascioliasis, ya que esto ocurre con muy poca frecuencia (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma & Bargues 1997; Prepelitchi & Wisnivesky-Colli, 2013). La penetración de las metacercarias por la pared del duodeno o del yeyuno puede causar hemorragias focales e inflamación, aunque las lesiones pueden no ser clínicamente evidentes. La migración del parásito a través del parénquima hepático durante 4-6 semanas induce los principales cambios patológicos. Los parásitos digieren el tejido hepático causando destrucción del parénquima, lesiones hemorrágicas y reacciones inmunológicas e inflamatorias. En ocasiones, los fasciólidos mueren, dejando cavidades llenas de escombros necróticos, las cuales posteriormente serán cubiertas por tejido cicatricial (Smithers, 1982; Mas-Coma *et al.*, 1999, 2000, 2014b).

Un pequeño porcentaje de parásitos alcanza los conductos biliares, lugar en el cual podrán vivir durante años. La inflamación, la cual resulta en fibrosis, es algo común (Chen y Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 2000, 2014c). La hiperplasia ductal de los conductos biliares, puede ser el factor inicia de la fibrogénesis (Mas-Coma *et al.*, 2014b). Cabe decir, que la hiperplasia es causada principalmente por un producto de excreción-secreción del parásito, la prolina (Isseroff *et al.*, 1972, 1977; Campbell *et al.*, 1981; Modavi & Isseroff, 1984; Kucharz, 2011). Además, los fasciólidos causan colangitis y colecistitis (López *et al.*, 2006), las cuales dan lugar a una importante obstrucción del colédoco (Khorsandi, 1977; Valero *et al.*, 2003).

Las secuelas patogénicas más importantes, dado que la enfermedad afecta principalmente al hígado, son las lesiones hepáticas, la fibrosis, y la inflamación crónica de los conductos biliares. Es también habitual la presencia de litiasis, (Wong *et al.*, 1985; Chen & Mott, 1990; Arjona *et al.*, 1995; Carrada-Bravo & Martínez, 2005), la cual puede incluso estar asociada con la carga parasitaria y con el tiempo de parasitación (Valero *et al.*, 2003). Es importante mencionar que en humanos la hepatolitiasis es un importante factor de riesgo en el desarrollo de colangiocarcinoma (Chapman, 1999; Cohen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003). Sin embargo, a diferencia de la clonorquiasis o la opistochiasis, no se conocen casos de asociación con el carcinoma biliar en la Fascioliasis (Mas-Coma & Bargues, 1997; Mas-Coma *et al.*, 2014b).

También debemos indicar que los Trematodos inmaduros pueden desviarse durante la migración, invadiendo otros órganos, y causando lo que conocemos como Fascioliasis ectópica (Carrada-Bravo & Martínez, 2005). En el ganado, es frecuente encontrar *F. hepatica* en los pulmones (Soulsby, 1965; Quiroz, 2005; Sissay *et al.*, 2007). En el ser humano, las lesiones ectópicas más frecuentes ocurren en el tracto gastrointestinal (Acosta-Ferreira *et al.*, 1979; Makay *et al.*, 2007). Otras localizaciones ectópicas han sido encontradas en: tejido subcutáneo (Ozkan & Genç, 1979; Vajrasthira & Sunthornsiri, 1979; Park *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1991; Prociv *et al.*, 1992; García *et al.*, 2004; Xuan *et al.*, 2005); corazón, vasos sanguíneos, pulmones y cavidad pleural (Moretti *et al.*, 1971; Couraud *et al.*, 1975; García-Rodríguez *et al.*, 1985; El-shazly *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1994); cerebro (Ruggieri *et al.*, 1967; Aguirre Errasti *et al.*, 1981; Arias *et al.*, 1986; Ying *et al.*, 2007); órbita ocular (García-Rodríguez *et al.*, 1985; Cho *et al.*, 1994; Dalimi & Jabarvand,

2005; Zhou *et al.*, 2008); pared abdominal (Sato *et al.*, 1975; Totev & Georgiev, 1979); apéndice (Park *et al.*, 1984); páncreas (Chitchang *et al.*, 1982; Zali *et al.*, 2004); bazo (Wei, 1984; Zali *et al.*, 2004); nódulos inguinales (Arjona *et al.*, 1995); nódulos cervicales (Prociv *et al.*, 1992); músculo esquelético (Park *et al.*, 1984) y epidídimo (Aguirre Errasti *et al.*, 1981). Estos Trematodos ectópicos nunca llegan a madurar. Los principales efectos patológicos en este tipo de lesiones son debidos a los daños titulares causados por los recorridos migratorios. Los parásitos pueden calcificarse o integrarse en el tejido en forma de granuloma (Facey & Marsden, 1960).

2.5. ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS EN LA FASCIOLIASIS

Como se ha comentado anteriormente, existe una marcada relación entre la Fascioliasis y la anemia, la eosinofilia y la leucocitosis. Sin embargo, la Fascioliasis también da lugar a variaciones en la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, y puede provocar resultados anómalos en diferentes pruebas inmunológicas (Chen y Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999, 2000, 2014c). A continuación, se describe cada una de estas alteraciones durante la enfermedad.

La anemia es una de las afecciones más características de la Fascioliasis, especialmente en infecciones severas. La hemoglobina varía entre niveles de 7,0 y 13,5 g/dl, aunque se han llegado a reportar valores tan bajos como 2,8 y 4,0 g/dl (Mas-Coma *et al.*, 2014b). La pérdida de sangre en la bilis es probablemente uno de los factores más contribuyentes a este tipo de afección (Dawes, 1960a, b; Todd & Ross, 1966; Valero *et al.*, 2006, 2008,

2017). Debemos tener en cuenta que los fasciólidos no solo dañan los tejidos provocando hemorragias, sino que también son hematófagos. Los fasciólidos jóvenes se nutren de sangre y tejido hepático, y al alcanzar la madurez también se alimentan de bilis y tejido epitelial proliferado (Quiroz, 2005). Se estima que la cantidad de sangre que se pierde por cada verme/día oscila entre 0,2 y 0,5 ml (Dawes & Hughes, 1964; Jennings, 1976). Se ha podido verificar por análisis multivariante en un modelo experimental *F. hepatica*/rata Wistar, una clara asociación entre la anemia causada por *F. hepatica* y diferentes factores, tales como: la carga parasitaria, huevos por gramo de heces, el área de la superficie corporal del verme, la presencia de sangre en las heces, los niveles de IgG1 y eosinófilos y el % del peso esplénico (Valero *et al.*, 2008).

Las reacciones inflamatorias son comunes durante el transcurso de la enfermedad. Linfocitos, macrófagos y especialmente eosinófilos, aparecen alterados debido al avance del parásito a través de los tejidos del hospedador (Zafra *et al.*, 2013a, b). En la Fascioliasis, la leucocitosis y la eosinofilia son alteraciones características (Rodríguez-Acosta, 2000). En la fase aguda, los recuentos de leucocitos suelen oscilar entre 10.000/mm³-43.000/mm³. El recuento de eosinófilos es casi siempre superior al 5% del total de leucocitos y puede llegar al 83%. En un país desarrollado, la eosinofilia y la ingestión de berros o cualquier otra planta de agua dulce, resultan información útil y sugerente para guiar hacia un diagnóstico de Fascioliasis. Por desgracia, estos dos aspectos no suelen ser útiles en áreas endémicas humanas de países en desarrollo, donde la eosinofilia puede ser causada por otras infecciones helmínticas y donde las tradiciones alimentarias locales pueden enmascarar las fuentes de infección (Mas-Coma *et al.*, 2014b).

En cuanto a la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, esta puede ser alta en la fase aguda alcanzando 165 mm en una hora. Los valores son normales en la fase latente, y puede resultar normal o moderadamente alta en la fase obstructiva (Mas-Coma *et al.*, 2014c; Hosamirudsari & Roudsari, 2015).

Con respecto a las Inmunoglobulinas, los niveles de IgG, IgM e IgE suelen estar elevados (Valero *et al.*, 2008). Sobre todo, es característico en la Fascioliasis un aumento de la IgE. Se ha demostrado que los niveles de IgE específicos están correlacionados positivamente con la cantidad de huevos por gramo de heces (hgh). Cabe decir, que los niveles de IgA suelen ser normales, pero a veces pueden aparecer elevados (Mas-Coma *et al.*, 2014b).

2.6. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS EN LA FASCIOLIASIS

Es común encontrar en la Fascioliasis resultados anormales en las pruebas de función hepática, tanto en el periodo agudo como en el crónico de la enfermedad.

En modelos experimentales, se ha visto que en la fase aguda se produce un aumento de varias aminotransferasas, como son: la alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), y la glutamato deshidrogenasa (GLDH). En la fase crónica es más común encontrar elevada la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) (Robles-Pérez, 2015). La GLDH disminuye conforme los Trematodos van alcanzando la madurez sexual. Esta enzima nos informa también de la necrosis producida durante la migración de los vermes jóvenes por el parénquima hepático (Leclipteux *et al.*, 1998).

La actividad de la alanina amino transferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), y la sorbitol deshidrogenasa (SDH) aumentan durante la migración de los fasciólidos por el parénquima, aunque son enzimas menos hepatoespecíficas que la GLDH (Sykes *et al.*, 1980).

En humanos, se ha observado que los triglicéridos séricos y las lipoproteínas de muy baja densidad aumentan con la infección, mientras que el colesterol sérico total, el colesterol de lipoproteínas de alta densidad y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad aparecen disminuidos significativamente. Estos cambios se encuentran relacionados con el daño degenerativo que sufren los hepatocitos (Mas-Coma *et al.*, 2014b). Como ya hemos comentado anteriormente, en el período biliar la ictericia es una característica prominente (Yalav *et al.*, 2012). Se han reportado niveles séricos de bilirrubina de entre 2,0 y 8,6 mg/dl. Tras el cólico biliar generalmente se produce un aumento de dichos niveles séricos, además de una orina oscura (Mas-Coma *et al.*, 2014b).

La hipoalbuminemia también es común en la fase parenquimatosa de la enfermedad. En el ganado se ha podido comprobar que el daño causado por la migración del parásito provoca una disminución en la concentración plasmática de albúmina, lo cual es debido a una disminución en su síntesis (Anderson *et al.*, 1977).

2.7. DIAGNÓSTICO DE LA FASCIOLIASIS

Existen diferentes herramientas diagnósticas las cuales permiten diferenciar a la Fascioliasis de otras enfermedades. Sin embargo, el diagnóstico diferencial interespecífico es de gran importancia debido a las

diferentes características patológicas, de transmisión y epidemiológicas de estas especies de fasciólidos (Mas-Coma *et al.*, 2014b). Así por ejemplo, las técnicas inmunológicas (pruebas serológicas y de coproantígeno) no diferencian las infecciones por ambas especies, y las técnicas coprológicas suelen ser a menudo insuficientes (debido a la presencia de formas intermedias, y a la emisión de huevos intermitente e incluso inexistente durante todo el transcurso de la infección) (Mas-Coma *et al.*, 2014d). Actualmente, la diferenciación específica de la Fascioliasis puede ser realizada por estudios fenotípicos a nivel de adulto y/o huevo (Periago *et al.*, 2006; Ashrafi *et al.*, 2006b, 2013, 2015; Valero *et al.*, 2009a, 2012b), o mediante estudios genotípicos (Mas-Coma *et al.*, 2009b; Ai *et al.*, 2011).

Clásicamente, la distinción entre las especies de *Fasciola* sp. se ha hecho en base a su morfología. Sin embargo, la diferenciación específica de estos Trematodos hepáticos no puede ser conseguida únicamente por examen morfológico (Periago *et al.*, 2006), siendo también necesario un análisis genético detallado (Itagaki & Tsutsumi, 1998; Marcilla *et al.*, 2002). Además, como hemos comentado anteriormente, en las áreas geográficas donde ambas especies se solapan, la hibridación entre ambos genotipos puede dar lugar a nuevas formas, cuyos tamaños corresponden a formas intermedias de ambos fenotipos (Mas-Coma *et al.*, 2001), lo cual agrava la dificultad diagnóstica.

A pesar del reciente desarrollo de muchas pruebas moleculares, la secuenciación de marcadores de DNA sigue siendo el único método apropiado tanto para el haplotipado de las dos especies de fasciólidos “puros”, como para la detección de hibridación en formas intermedias. Para este propósito, las secuencias completas de los dos espaciadores de DNA ITS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

-2 e ITS-1, junto con la secuencia completa de los genes completos de DNAm^t *cox1* y *nad1*, han demostrado ser hasta ahora los marcadores de elección (Ai *et al.*, 2011; Barges *et al.*, 2017). Las nomenclaturas de estos cuatro marcadores ya han sido publicadas (Mas-Coma *et al.*, 2009b). No obstante, la existencia de sólo 5 posiciones diferentes para ITS-1 e ITS-2 entre ambos Trematodos, hace frecuente la utilización de criterios morfológicos para la identificación del agente etiológico causal.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL AND METHODS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS EXPERIMENTALES

En la presente investigación, se han utilizado como hospedadores intermediarios experimentales caracoles de la familia Lymnaeidae. Se describe a los miembros de la familia Lymnaeidae (Gastropoda) como caracoles de apertura dextrógira, no operculada, holostomados, con peristoma amplio, con parte superior angulosa y parte ventral redondeada. En el extremo inferior de la cabeza poseen una boca amplia y dilatada. Los tentáculos son triangulares aplanados, y los ojos sésiles se encuentran situados en la base interna de los mismos. El pie tiene un extremo posterior redondeado (Castellanos & Landoni, 1981). La rádula es amplia con hileras transversales de dientes. La concha es ovalada, y la córnea puede ser delgada o ligeramente gruesa, la cual contienen espiras más o menos atenuadas y que varían considerablemente en longitud, altura y número. El axis o eje de la columela gira típicamente haciendo una espiral (Dung *et al.*, 2013)

Como hospedador intermediario experimental de *F. hepatica* se ha empleado caracoles de la especie *Galba truncatula* (Müller, 1974). Los gasterópodos proceden de la Albufera, Valencia, España. Como hospedador intermediario experimental de *F. gigantica*, se ha empleado caracoles de la especie *Radix natalensis caillaudi* (Bourguignat, 1883). Estos gasterópodos proceden de Faraoun Prince, Alexandria, Egipto.

3.1.2. HOSPEDADOR DEFINITIVO EXPERIMENTAL

Existe una amplia gama de especies capaces de actuar como hospedadores definitivos para *F. hepatica*, las cuales pueden utilizarse como modelos experimentales para estudiar la patogenicidad y la respuesta inmunitarias de la Fascioliasis en el laboratorio, como son por ejemplo los roedores (Gironés *et al.*, 2007). Sin embargo, *F. gigantica* no desarrolla una infección completa en este tipo de animales (Mango *et al.*, 1972; Spithill *et al.*, 1999; Piedrafita *et al.*, 2004). La raza de ovejas autóctonas Guirra (ANGUIRRA, 2009), cuya susceptibilidad a ambas especies de fasciólidos ya fue previamente evaluada (Valero *et al.*, 2009b), ha sido utilizada para los experimentos.

La raza Guirra también se denomina raza Roja Levantina. Estos ovinos deben su nombre al color rojo de la piel y del pelo, así como también a su localización en el Levante español. Su antecesor inmediato es la raza ovina africana Bení Ahsen, de la Costa Atlántica de Marruecos, cuya llegada a España se vio favorecida por las buenas relaciones comerciales que han existido entre los dos puntos indicados: el Levante español y la citada zona africana. Esta especie de ovinos es considerada como raza de protección oficial, según el Catálogo Oficial de Razas de Ganado en España. Los ejemplares presentan desarrollo corporal consecuente a la geografía y las posibilidades nutritivas de esta, alcanzando un peso medio de 80-90 kg los machos y de 50-60 kg las hembras (MAPAMA, 2017).

3.1.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

La Fascioliasis es una enfermedad sumamente patógena en el periodo crónico avanzado. Según la Normativa Ética actual que regula la experimentación con modelos de animales mamíferos, es necesario establecer para el experimento el número mínimo de animales el cual permita ofrecer resultados significativos. Para ello se ha utilizado el software Ene 3.0 (Servei de d'Estadística Aplicada, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles, España, distribuido por GlaxoSmithKline).

Así, se emplearon un total de 22 ovinos Guirra machos de entre 4 y 5 semanas. Los animales se dividieron en tres grupos: A) 12 ovinos, utilizados como grupo control; B) 5 ovinos infestados con 200 metacercarias de *F. hepatica*; C) 5 ovinos infestados con 200 metacercarias de *F. gigantica* (Fig.1.). Los animales se criaron y mantuvieron en la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia. La comida y el agua fueron proporcionadas *ad libitum*. El diseño experimental fue planificado para la obtención de una $p < 0.05$ y un power del 80%.

El experimento se realizó durante un periodo de 6 meses. Previamente se obtuvo el correspondiente permiso del Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (P2-13-07-09), siguiendo las directrices de la directiva 2010/63/EU.

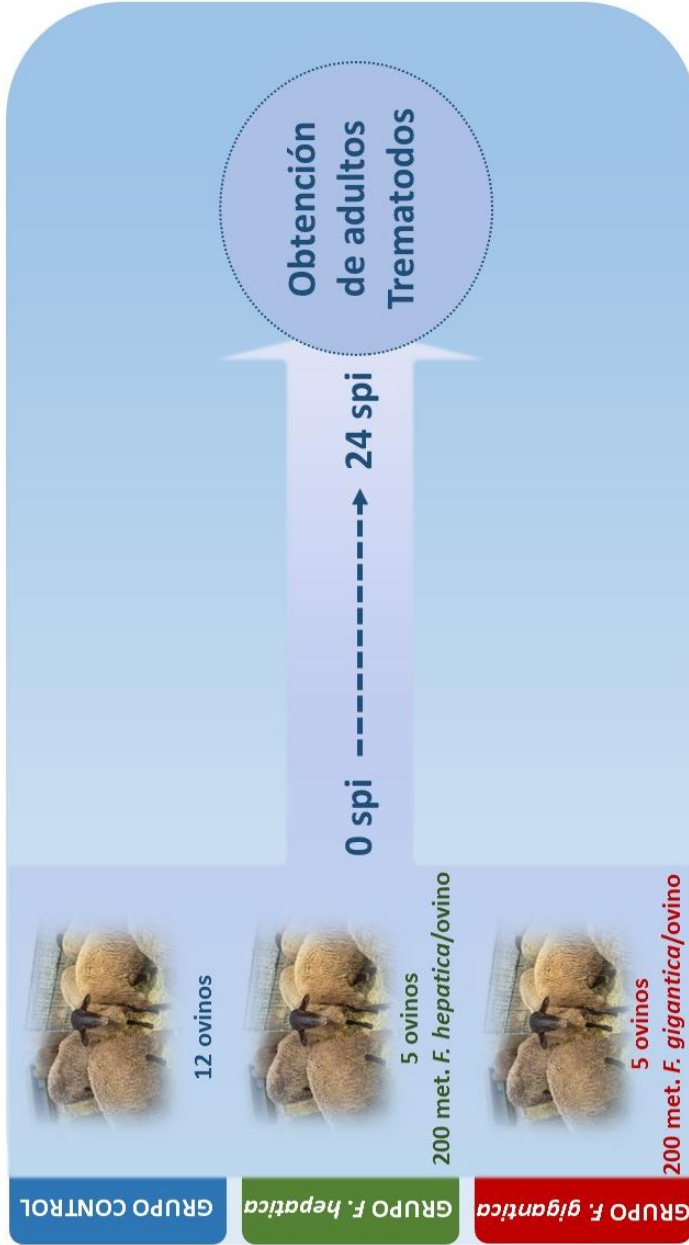


Fig.2. Diseño experimental. Un total de 22 ovejas de 4-5 semanas de edad fueron divididas aleatoriamente en tres grupos. Grupo control (12 ovejas), grupo *F.hepatica* (5 ovejas) y grupo *F.gigantica* (5 ovejas). En cada caso se les administró por vía oral 200 metacercarias de *F. hepatica* y *F. gigantica* respectivamente. Transcurridas 24 semanas se obtuvieron los Trematodos adultos. spi= semanas post-infección.

3.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.2.1. MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Los métodos parasitológicos, desde el filtrado de heces (para la obtención de los huevos de fasciólidos), hasta la obtención de las metacercarias, fueron desarrollados por el equipo dirigido por la Dra. M. DOLORES BARGUES. Para una información más detallada de la metodología utilizada se puede ver el trabajo de Khoubanne (2002).

3.2.1.1. Técnica de infestación monomiracidial al molusco

La parasitación de los moluscos se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. En primer lugar, se colocaron los gasterópodos en placas Petri con 3-4 ml de agua natural. Con una pipeta de punta fina se capturó un miracidio recién eclosionado y se colocó junto al molusco. Durante 4 horas se monitoreó el proceso cada 15 minutos. Transcurrido este periodo, se comprobó que el miracidio había penetrado en el gasterópodo, lo cual se pudo asumir por la ausencia del miracidio en la placa o por signos de estrés del caracol, como inmovilidad o secreción de mucus (Rondelaud & Barthe, 1978a, b, 1987a, b; Busson *et al.*, 1982; Mas-Coma *et al.*, 2001).

3.2.1.2. Mantenimiento de moluscos en el laboratorio

Los moluscos se mantuvieron (antes y después de ser parasitados), en unos recipientes transparentes de plástico, cerrados herméticamente y

con adecuada oxigenación, la cual fue provista por una bomba eléctrica de aire para acuarios. En el fondo de los recipientes se dispuso una fina capa de sedimento de grava calcáreo (Rondelaud & Barthe, 1978a, b; Bouix-Busson *et al.*, 1985a, b, c; Audousset *et al.*, 1989), cubierta por agua mineral y que ocupaba más o menos dos tercios del volumen total del recipiente. Los recipientes de cultivo se mantuvieron en cámaras climáticas (Heraeus Vötsch® modelo HPS 500 y HPS 1500) a una temperatura de 20°C, una humedad relativa del 90%, un fotoperiodo de 12 horas oscuridad/12 horas luz, y una intensidad lumínica de 3500 lux. Como base de alimentación se añadieron cada semana varias hojas de lechuga al recipiente, y se cambió el agua del mismo (Busson *et al.*, 1982; Bouix-Busson *et al.*, 1985a, b). El sedimento calcáreo se renovó cada 2 o 3 meses a medida que este iba ensuciándose.

3.2.1.3. Obtención experimental de metacercarias infestantes

Para comprobar la parasitación de los moluscos (transcurridos unos 30 días), éstos se aislaron en placas Petri con pequeños trozos de lechuga y se verificó la emisión circadiana. También se analizaron los recipientes de cultivo en busca de metacercarias enquistadas en las paredes de plástico o en la lechuga. Diariamente y a una hora establecida, se realizó el control de cada caracol bajo la lupa binocular y se llevó a cabo un recuento de las metacercarias emitidas durante 24 horas (Oviedo, 1992). A su vez, también se realizó el recuento de las metacercarias enquistadas en la lechuga, las adheridas a las paredes del recipiente y las que se encontraban flotando en el agua natural (Audousset *et al.*, 1989; Bargues *et al.*, 1996).

Las metacercarias se separaron del sustrato de fijación con cuidado gracias a la ayuda de un pincel, o bien recortando la zona de la lechuga donde se encontraban enquistadas. Una vez realizado el recuento, se cambió el agua de la placa y se colocó lechuga nueva.

Las metacercarias obtenidas se almacenaron en viales de 10 ml con agua natural, se taparon herméticamente y se aislaron a 4°C. En cada vial se especificó el tipo de metacercaria (enquistadas, fijas o flotantes), el origen de estas, la fecha de emisión y la cantidad recolectada.

3.2.1.4. Parasitación experimental del hospedador definitivo

Bajo la lupa binocular se llevó a cabo la selección de metacercarias viables siguiendo los criterios de Boray (1969). Con la ayuda de un pincel y un punzón se fueron depositando las metacercarias sobre un papel de fumar.

Tanto en la infestación con *F. hepatica* como en la infestación con *F. gigantica*, a cada una de las ovejas de experimentación utilizadas se le administró una dosis de 200 metacercarias. Estas metacercarias se depositaron en el papel previamente humedecido el cual se introdujo en una cápsula de gelatina (esta cápsula fue empleada para favorecer la correcta deglución). La capsula se introdujo en la garganta del ovino, a continuación, se le virtió agua mediante una botella de plástico con dispensador para estimular el reflejo de deglución. La boca del animal se mantuvo cerrada mediante presión, de esta manera evitamos que la cápsula sea escupida. Posteriormente, se observó que ésta no era regurgitada durante 10-15 minutos.

3.2.2. ESTUDIOS EFECTUADOS SOBRE EL HOSPEDADOR DEFINITIVO

3.2.2.1. Muestras sanguíneas

Cada dos semanas, desde el inicio de la infección y hasta la semana 24 después de la infección (p.i.), se extrajo sangre de los ovinos mediante punción en la vena yugular. Esta punción se realizó sin anestésicos, para ello fue necesario inmovilizar al animal. Mientras una persona inmovilizó el cuerpo de la oveja manteniendo la cabeza de esta girada y firme, otra persona procedió a recortar el pelo de la zona yugular mediante el uso de tijeras.

Tras limpiar la zona con alcohol quirúrgico y ejerciendo una ligera presión en la zona del trayecto de la vena, se llevó a cabo la punción sobre la vena. La sangre se recogió en tubos BD VACUTAINER® K2-EDTA. Las muestras de sangre, se centrifugaron a 760 g a 4°C durante 10 minutos (centrifuga BIOFUGE) en el laboratorio de Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València. Las muestras de suero obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su análisis, el cual se efectuó en el Hospital Militar Vázquez Bernabéu.

3.2.2.2. Muestras fecales

Periódicamente, se recogieron heces de los ovinos. Se tomó la primera muestra en el momento de la infección y se terminó el muestreo 24 semanas después de la infección (p.i.). Al comienzo del experimento se obtuvieron muestras fecales cada semana, y a partir de la semana 12, cada 2

semanas (12-24 semanas p.i.). Se recogieron muestras fecales frescas directamente de cada animal, y se almacenaron en bolsas de plástico con autocierre tipo zip previamente etiquetadas. La detección de huevos emitidos por heces se realizó analizando 3-4 láminas de Kato-Katz (Helm-Test1, AK test, AK Industria e Comércio Ltda, Belo Horizonte, Brasil) por muestra/semana hasta que se detectó el primer huevo (Valero *et al.*, 2002, 2012a).

Es necesario tener en cuenta que las heces pueden secarse, por lo que antes del examen en el laboratorio estas fueron colocadas en placas Petri y tapadas para evitar la desecación (Valero *et al.*, 2002, 2011).

3.2.2.3. Técnicas ELISA utilizadas

Con las muestras fecales y el suero obtenido, también llevamos a cabo un análisis de la presencia de antígenos del parásito en heces y de la producción de anticuerpos en suero. Para ello se emplearon dos técnicas ELISA diferentes: MM3-SERO ELISA y MM3-COPRO ELISA (Mezo *et al.*, 2004, 2007; Valero *et al.*, 2009b). Ambas técnicas ELISA están basadas en la utilización del anticuerpo monoclonal MM3. El anticuerpo monoclonal fue proporcionado por el Prof. Dr. FLORENCIO MARTINEZ UBEIRA, de la Universidad De Santiago de Compostela (España). La descripción de su obtención fue detallada previamente por Mezo *et al.* (2004). Ambas pruebas se realizaron periódicamente cada 15 días.

3.2.2.3.1. MM3-SERO ELISA

Para detectar la presencia de anticuerpos en los ovinos se utilizó la técnica previamente descrita por Mezo *et al.* (2007) para su uso en infecciones por *F. hepatica*, y Valero *et al.* (2009) para su uso en infecciones por *F. hepatica* y *F. gigantica*. Los pasos de la técnica se describen a continuación.

En primer lugar, se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno de tiras 1 x 8 F (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) durante 2 horas a 37°C con el anticuerpo monoclonal MM3 (100 µl/pocillo de una solución que contenía 5 µg/ml de MM3 en solución tampón salina fosfato, PBS). Los pocillos sin revestir se bloquearon con caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavó la placa 6 veces con PBS. Utilizamos 4 pocillos por muestra, 2 de test y dos como control, por lo que se añadieron a las filas impares (filas test) 100 µl de antígeno de Escreción-Secreción (AESs) de *Fasciola* (0,15 µg de proteína total en PBS al 0,2% Tween-20 y BSA al 1%), y a las filas pares (filas control), se le añadieron 100 µl de PBS-T. Posteriormente, se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de lavar 6 veces con PBS-T, se añadieron 100 µl/ pocillo de cada muestra de suero diluida (dilución 1:200 en PBS-T). Cada suero se añadió por cuadruplicado (2 pocillos de filas impares más 2 pocillos de filas pares). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C, y se lavaron como anteriormente se ha comentado. Posteriormente, se incubó la placa a 37°C durante 1 hora con 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal (Abm) IgG anti-oveja conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich, Madrid, España, 1: 30.000). Después de lavar nuevamente, se

reveló la unión de Abm añadiendo 100 μ l/pocillo de una solución que contenía el sustrato OPD (tampón H₂O₂ y o-fenilendiamina, Sigma-Aldrich®).

Después de la incubación con el sustrato durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm. El valor de la DO se calculó como DO₁-DO₂, donde DO₁ fue la media de los pocillos de filas impares (tapizados con MM3 y antígeno ES de *Fasciola*), y DO₂ fue la media de los pocillos de filas pares (tapizados con MM3 sin antígeno). El valor de DO para cada muestra se calculó restando la DO de los pocillos pares a la DO de los pocillos impares. El valor de corte usado fue de 0,064.

3.2.2.3.2. MM3-COPRO ELISA

Para la detección de antígenos de *Fasciola* en heces, se utilizó la técnica previamente descrita por Mezo *et al.* (2004) para su uso en infecciones por *F. hepatica*, y Valero *et al.* (2009) para su uso en infecciones por *F. hepatica* y *F. gigantica*. Los pasos de la técnica se describen a continuación.

En primer lugar, se incubaron placas de microtitulación de poliestireno de tiras 1 x 8 F (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) durante toda la noche con 100 μ l/pocillo de una solución que contenía 10 μ g/ml de un anticuerpo de conejo policlonal IgG anti-*Fasciola* en PBS (pocillos de filas impares), o con 100 μ l/pocillo de una solución que contenía 10 μ g/ml de anticuerpos policlonales IgG procedentes de conejos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

no inmunizados (pocillos de filas pares). Al igual como en el MM3-ELISA, las filas impares actuaron como test y las impares actuaron como control experimental. Los pocillos sin revestir se bloquearon con caseinato sódico al 1,5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada sobrenadante fecal (100 μ l) se añadió por cuadruplicado (2 pocillos de filas impares y 2 pocillos de filas pares), y se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de lavar 6 veces con PBS al 0,2% Tween-20 (PBS-T), se añadió a cada pocillo 100 μ l de una solución que contenía 0,3 μ g de anticuerpos biotinados con MM3 en PBS-T más 1% albumina bovina de suero (PBS-T-BSA) y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de lavar, tal y como hemos comentado anteriormente, la unión con el anticuerpo MM3 se detectó mediante incubación, primero con neutravidina-PO (neutravidina conjugada con peroxidasa (Thermo Fisher Scientific®; dilución 1:2000 en PBS-T-BSA)) durante 1 h a 37°C, y después con el substrato OPD (tampón H₂O₂ y o-fenilendiamina, Sigma-Aldrich®).

Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, la reacción se paró mediante la adición de H₂SO₄ 3N. Finalmente, la DO se midió a 492 nm. El valor de la DO se calculó como DO1-DO2, donde DO1 es la media de los pocillos de filas impares (recubiertas con anticuerpos policlonales anti-Fasciola), y DO2 es la media de los pocillos de filas pares (recubiertos con anticuerpos policlonales inespecíficos). El valor de DO para cada muestra se calculó restando la DO de los pocillos pares a la DO de los pocillos impares. El valor de corte usado fue 0,082.

3.2.2.4. Estudios bioquímicos

Lo sueros, como ya se ha comentado anteriormente, se analizaron en el Hospital Militar Vázquez Bernabéu mediante un Autoanalizador Multicanal Automático de Bioquímica (BM/Hitachi 917-rack). La base del análisis se realiza por técnicas colorimétricas, tras incubaciones a 37°C a distintos tiempos (según el parámetro a medir).

Los marcadores bioquímicos analizados se clasifican a continuación según su carácter:

Daño hepático

- Aspartato aminotransferasa (AST o transaminasa glutámica oxalacética, GOT)(IU/L);
- Alanina aminotransferasa (ALT o glutamato-piruvato transaminasa, GPT) (IU/L);
- Gamma glutamil transferasa (GGT o g-glutamyl transpeptidasa) (IU/L);
- Bilirrubina total (T-Bil) (mg/dl);
- Fosfatasa alcalina (AP) (IU/L);

Daño renal

- Creatinina (Cre) (mg/dl);

Electrolitos séricos

- Calcio (Ca) (mg/dl);
- Cloruro (Cl) (mmol/L);
- Fósforo (P) (mg/dl);

Metabolismo proteico

- Urea (Ure) (mg/dl);

Proteínas plasmáticas

- Albúmina (Alb) (g/dl);
- Proteína total (T-Pro) (g/dl);

Metabolismo de los carbohidratos

- Glucosa (Glu) (mg/dl);
- Amilasa (Amy) (IU/L);

Metabolismo hepático de lípidos

- Colesterol total (T-Cho) (mg/dl);
- Triglicéridos (Trigly) (mg/dl);

Inflamación

- Proteína C reactiva (CRP) (mg/L).

3.2.2.5. Obtención de Trematodos adultos

Todas las ovejas fueron eutanizadas transcurridos 6 meses. Durante 3 días se llevó a cabo el proceso mediante una inyección intravenosa con Pentobarbital a una concentración del 18% (200 mg/ml) a una dosis de 200 mg/kg.

Para el proceso se requirió del siguiente material:

- Quirúrgico: bisturí, pinzas de disección (de dientes de ratón y hemostática), y tijeras (punta roma-roma). Todos ellos fueron previamente esterilizados durante 30 minutos en autoclave (TUTTNAUER AUTOCLAVE ST 1035, MODELO 2340M). La cantidad de este material varió según el número de animales a sacrificar cada día. Fue necesario un mínimo de un instrumento por ovino.
- Químico: tubos BD VACUTAINER® K2-EDTA.
- Óptico: lupa binocular.
- Otros: algodón, alcohol, suero fisiológico, tubos Falcon® de 50 ml, cordel, pipetas mecánicas, bandejas de plástico, regla, bolsas de basura, cuchillo grande, jeringuillas y etiquetas.

El proceso de toma de muestras se detalla a continuación:

Los ovinos deben estar en ayuno previo de unas 12 horas para minimizar el contenido de alimento residual en el tracto digestivo.

1. Extracción de sangre en tubos BD VACUTAINER® K2-EDTA y tubos BD VACUTAINER® sin aditivos.
2. Inyección de Pentobarbital (200 mg/kg).

3. Toma/punción del líquido biliar: se extrajo una muestra de líquido biliar el cual fue depositado en tubos Falcon® de 15 ml para su posterior estudio.
4. Ligadura doble del conducto hepático, conducto cístico y colédoco. Esto aseguró que los vermes quedaran retenidos.
5. Necropsia parasitaria: se realizó una evisceración abdominal y torácica. Los órganos fueron depositados sobre bandejas de plástico para su posterior inspección.
6. Inspección de la vesícula biliar, conductos hepáticos y parénquima hepático. Los vermes recogidos se introdujeron en tubos Falcon® de 50 ml los cuales contenían suero fisiológico. Transcurridas unas horas fueron transferidos a tubos Falcon® de 50 ml con alcohol 70°.
7. Inspección general de todos los órganos. Debido a la posible migración hacia focos ectópicos fue necesario llevar a cabo un buen análisis visceral.
8. Fijación de órganos en formalina 10% para posibles estudios posteriores.

3.2.2.5.1. Estudio del hígado y canales biliares

Dado que en *Fasciola* sp. el microhábitat de parasitación específico del adulto es el hígado, se realizó un minucioso estudio de este órgano en oveja Guirra. El hígado se extrajo cortando el canal biliar principal a la altura de su unión con el intestino y se pesó. Así mismo, se tomaron las medidas morfométricas del canal biliar y se fotografiaron las lesiones macroscópicas si las había. El parénquima hepático se examinó pudiéndose encontrar en él

individuos jóvenes del fasciólido que aún no han completado su migración hasta el canal biliar principal (fase de invasión). Los canales biliares suelen aumentar mucho su diámetro en la fase de estado, siendo fácil detectar si existen Trematodos adultos en ellos. Al abrir el canal biliar con unas tijeras, los Digénidos adultos todavía vivos, se recolectaron y fijaron. Posteriormente, se realizó un enjuagado con agua tanto de la cavidad abdominal como de los distintos órganos para tener la seguridad de la total recogida de los parásitos (Pérez-Crespo, 2013).

3.2.3. ESTUDIOS EFECTUADOS SOBRE EL PARÁSITO

3.2.3.1. Técnicas de secuenciación de DNA

Para el procedimiento de extracción de DNA, se utilizó un pequeño fragmento de los fasciólidos recolectados y fijados en etanol 70%. Para la caracterización molecular se llevó a cabo la secuenciación de DNA de los marcadores espaciadores ITS-2 e ITS-1 del DNA ribosomal nuclear (DNAr), y de los genes *cox1* y *nad1* del DNA mitocondrial (DNAm). El procedimiento de extracción fue desarrollado por el equipo dirigido por la Dra. M. DOLORES BARGUES. A continuación, se describe el protocolo realizado.

En primer lugar, se cortó una pequeña fracción del verme. Para ello, se colocó el fasciólido bajo la lupa y se extrajo un pequeño fragmento de su región anterior, el cual se suspendió en 400 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS de dodecil sulfato sódico al 1%) que contenía 500 µg/ml de proteinasa K (Promega, Madison, WI, EE.UU.), colocándose durante 2 horas a 55°C con agitación cada 15 min. El ADN total

3. MATERIAL Y MÉTODOS

se aisló según la extracción con fenol-cloroformo y el método de precipitación con etanol. Cada gránulo se secó y se resuspendió en 30 µl de tampón TE estéril (pH 8,0). Esta suspensión se almacenó a -20°C hasta su uso.

En cada muestra, cada uno de los marcadores de DNA se amplificó por PCR, y cada producto de PCR se secuenció para obtener el haplotipo. Los espaciadores completos ITS-2 e ITS-1 se amplificaron utilizando cebadores previamente descritos (Mas-Coma *et al.*, 2001). Para los genes *cox1* y *nad1* se utilizaron cebadores directos e inversos diseñados para regiones flanqueantes de estos genes (Mas-Coma *et al.*, 2009b). La amplificación de cada uno de los marcadores se llevó a cabo en Mastercycler pro PCR System (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Los productos de PCR se purificaron usando PCR Ultra Clean (MoBio, Solana Beach, CA, EE.UU.) y se resuspendieron en 50 µl de tampón TE 10 mM (pH 7,6). La concentración final de DNA se determinó en un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

La secuenciación de cada marcador molecular se realizó para ambas cadenas génicas por el método de terminación de la cadena didesoxi. Para ello se utilizó el kit de química de terminador de colorante Taq y los analizadores de DNA Applied Bio-systems 3130 y 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) utilizando los cebadores de PCR.

Las secuencias se alinearon utilizando CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) en MEGA 6.0.6 (Tamura *et al.*, 2013), usando valores predeterminados. Las homologías se realizaron utilizando el programa BLASTN del sitio web de

información del Centro Nacional de Biotecnología
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.2.3.2. Técnicas helmintológicas

Las técnicas helmintológicas se utilizan para preparar a los Digénidos para su posterior estudio morfométrico y morfoanatómico.

3.2.3.2.1. Técnicas microscópicas generales

Estas técnicas incluyen los pasos realizados desde la recogida de los vermes hasta su estudio en el microscopio, es decir, la fijación de los Trematodos, su conservación, coloración, diferenciación, deshidratación y el montaje final.

3.2.3.2.1.1. Fijación

Para que la visualización de la anatomía interna del Digénido sea óptima, el verme debe ser fijado *in vivo* y sometido a una ligera presión. Según el tamaño del verme el proceso de fijación sufre pequeñas variaciones las cuales se detallan a continuación.

En el caso de ejemplares pequeños, se coloca el Trematodo vivo con un pincel sobre un portaobjetos en una gota de agua. Se añade una gota de líquido de Bouin en la cara inferior de un cubreobjetos y se coloca sobre el

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Trematodo, debemos cuidar que no se encuentre ladeado, en este caso se enderezará con ayuda de una aguja enmangada. El verme debe permanecer entre porta y cubreobjetos unos 20 minutos. Luego se levanta y se traslada el Trematodo con un pincel a una placa Petri con fijador de Bouin, en el que permanecerá unos 30 minutos. En el caso de ejemplares grandes, los Trematodos son fijados con Bouin entre dos placas Petri. Se introduce líquido de Bouin en una de las placas y con un pincel se coloca el verme vivo sobre dicha placa. Se deja caer la otra placa Petri sobre el Trematodo por su cara inferior procurando que quede lo más plano posible, pero sin ejercer demasiada presión. El Trematodo debe quedar unos 30 minutos entre las dos placas. Posteriormente, con uno o dos pinceles, se pasan a otra placa Petri con líquido de Bouin unos 40 minutos (Peixoto, 2016).

En ambos casos, transcurrido el tiempo establecido, los fasciólidos se introducen en viales con alcohol de 70°, este se renueva cada día hasta que el verme pierde la coloración amarilla dada por el fijador. En nuestro caso oscila entre 30 a 90 días dependiendo del tamaño del Trematodo. El líquido de Bouin se considera uno de los mejores fijadores topográficos. Su composición por cada 100 ml es la siguiente:

- solución acuosa de ácido pícrico 75 ml;
- formol (solución comercial al 40%) 25 ml;
- ácido acético 5 ml.

Se prepara de la siguiente manera: en un matraz, se pone un litro de agua y se calienta hasta que esté templada. Se coloca el matraz sobre un agitador y se le añade poco a poco ácido pícrico hasta conseguir una solución

saturada del mismo, es decir, hasta que el ácido pícrico no se disuelva en el agua. Conseguido esto, se deja reposar 24 horas (solución madre). Para utilizar el fijador se añade a pequeñas fracciones de la mezcla la cantidad correspondiente de ácido acético (por cada 100 partes de solución corresponden 5 partes de acético) (Panova, 2002; Pérez-Crespo, 2013). El líquido de Bouin fija de forma homogénea y penetra rápidamente. La retracción en el momento de la fijación es más débil que con otras buenas mezclas fijadoras (Bargues, 1986).

3.2.3.2.1.2. Conservación

La conservación se realiza en viales con alcohol de 70°, en los cuales los Digénidos pueden permanecer hasta el momento de su tinción (García-Bodelón, 2009).

3.2.3.2.1.3. Coloración

Las tinciones utilizadas dan lugar a preparaciones permanentes, las cuales son imprescindibles en el estudio llevado a cabo. El colorante utilizado es el Carmín Borácico de Grenacher, cuya fórmula es la siguiente:

- solución acuosa de bórax al 4% (8 gramos de bórax en 200 cc de agua destilada);
- carmín (casa Merck).

A continuación, se detalla el protocolo de preparación del carmín Borácico de Grenacher. En un matraz redondo se pone la solución acuosa anterior y se le añaden 5 gramos de carmín. Se calienta un recipiente de reflujo en el cual tenemos un matraz esférico y un refrigerador por el que entra y sale agua. Se deja hervir suavemente durante 30 minutos y se le añaden 200 cc de alcohol de 70°. Se deja reposar 24 horas y se filtra. Los digénidos obtenidos deben permanecer en el colorante un tiempo determinado que depende de su grosor y su capacidad de tomar el colorante. Los adultos de *Fasciola* sp. deben teñirse de forma suficiente pero no excesiva para facilitar su posterior diferenciación. Si los ejemplares se tiñen en exceso deben estar posteriormente más tiempo en el líquido diferenciador, lo cual puede alterar los tejidos del verme. En líneas generales diremos que los adultos de *F. hepatica* de mayor grosor y los adultos de *F. gigantica* se han teñido durante 24 horas en la mezcla de carmín Borácico de Grenacher. La tinción óptima se controla periódicamente bajo la lupa binocular (Pérez-Crespo, 2013; Peixoto, 2016).

3.2.3.2.1.4. Diferenciación

Una vez que el Trematodo ha sido teñido efectuamos la diferenciación en alcohol clorhídrico. Con un pincel bien seco extraemos los vermes del colorante y los colocamos (de uno en uno) en una placa Petri, a continuación, vamos añadiendo gota a gota ácido clorhídrico comercial (35%). El Trematodo va alcanzando una tonalidad rosada a la luz superior de la lupa, debemos observar con la luz inferior todas las estructuras del

parásito por transparencia. La duración de esta operación depende del tamaño y grosor del verme (Panova, 2002).

3.2.3.2.1.5. Deshidratación

Tras la diferenciación, colocamos placas Petri con distintos alcoholes. Con ayuda de un pincel, vamos pasando sucesivamente los parásitos de una placa a otra. En la primera placa, con etanol de 70°, el Digénido debe estar 30 minutos. Después lo llevamos a otra placa con alcohol de 96°, 30 minutos. De esta pasa a alcohol de 100° durante 30 minutos más, posteriormente permanece otros 30 minutos en alcohol butílico y finalmente 15 minutos en xilol, terminando con este paso la cadena de deshidratación (Panova, 2002).

3.2.3.2.1.6. Montaje

El montaje se realiza con un portaobjetos, un cubreobjetos y bálsamo de Canadá (resina comercial que solidifica rápidamente y proporciona preparaciones de larga vida). Sin embargo, para poderla emplear es necesaria una previa deshidratación del material, ya que este no es soluble en agua (Peixoto, 2016).

Para realizar el montaje se coloca sobre el portaobjetos una gota de bálsamo de Canadá y el parásito sobre ella en posición ventral, es decir, con la ventosa o acetábulo ventral de cara al cubreobjetos. Con un pincel mojado en xilol eliminamos las posibles burbujas que se hayan podido formar en el

bálsamo antes de colocar el cubreobjetos sobre él. Si una vez montado el Trematodo no presenta suficiente bálsamo, o si éste se retrae, se puede añadir más pincelando con xilol los bordes entre porta y cubre y añadiendo una gota de bálsamo de Canadá, la cual entra en la preparación por capilaridad. Por último, se introducen las preparaciones en la estufa a 20°C de temperatura de 4 a 24 horas hasta que estén secas. Si el bálsamo se retrae por el calor, se repite la operación anteriormente descrita de pincelado con xilol y bálsamo por capilaridad (Pérez-Crespo, 2013).

3.2.3.3. Estudio morfométrico CIAS

Para la obtención de imágenes y para el cálculo de las diferentes medidas morfométricas se han utilizado los siguientes programas:

- Image-Pro® Plus, versión 5.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). Para las medidas de los adultos se crean macros para el cálculo de las dimensiones de imágenes digitalizadas mediante cámara digital Nikon Coolpix 5400. Para las medidas de ventosas y faringes se utiliza un microscopio Nikon modelo SE equipado con un revolver de 4 objetivos (4x, 10x, 40x, 100x y 2 oculares de 10x), conectado con videocámara de color 3CCD (Sony DXC-930P).
- Microsoft Excel: programa comercializado para análisis y cálculos de datos. Los datos obtenidos a través de Image-Pro® Plus se exportan a los archivos de dicho programa para poder operar después con ellos.

La estandarización de la metodología para la realización de las medidas es fundamental en cualquier estudio morfométrico (Valero & Mas-Coma, 1985; Valero, 1986; Valero *et al.*, 1987; Valero *et al.*, 1996, 2005, 2006, 2011, 2012b; Periago *et al.*, 2006, 2008). Los trabajos de Valero *et al.* (1996, 2005) y Periago *et al.* (2006, 2008) proponen la metodología Computer Image Analysis System (CIAS) para el estudio morfométrico de los adultos fasciólidos. Se han realizado mediciones de adultos de fasciólidos en material fijado y montado en preparaciones permanentes.

Los parámetros morfométricos analizados en el adulto son los siguientes (ver Fig.3.):

Características biométricas lineares:

BL= longitud corporal; BW= anchura corporal; BW_{Ov}= anchura corporal a nivel del ovario; BP= perímetro corporal; BR= circularidad corporal ($BR=BP^2/4\pi BW$); CL= longitud del cono; CW= anchura del cono; OS_{Max}= diámetro máximo de la ventosa oral; OS_{min}= diámetro mínimo de la ventosa oral; VS_{Max}= diámetro máximo de la ventosa ventral; VS_{min}= diámetro mínimo de la ventosa ventral; A-VS= distancia desde el extremo anterior del cuerpo hasta la ventosa ventral; OS-VS= distancia desde la ventosa oral hasta la ventosa ventral; VS-Vit= distancia entre la ventosa ventral hasta el final de las glándulas vitelógenas; Vit-P= distancia entre las glándulas vitelógenas hasta la parte posterior corporal; VS-P= distancia entre la ventosa ventral y la parte posterior corporal; PhL= longitud de la faringe; PhW= anchura de la faringe; TL= longitud testicular; TW= anchura testicular; TP= perímetro testicular; TR= circularidad testicular ($TR=TP^2/4\pi TW$).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Superficies:

BA= superficie corporal; OSA= superficie de la ventosa oral; VSA= superficie de la ventosa ventral; PhA= superficie de la faringe; TA= superficie testicular.

Relaciones:

BL/BW= relación entre la longitud corporal y la anchura corporal; BWOv/CW= relación entre la anchura corporal a nivel de ovario y la anchura del cono; BL/VS-P= relación entre la longitud corporal y la distancia entre la ventosa ventral y el final corporal; OS/VS= relación entre el área de la ventosa oral y el área de la ventosa ventral.

La medida de la circularidad se utiliza para cuantificar su forma. Esta medida sirve para conocer como de circular es un objeto. Un objeto circular tendrá una circularidad de 1.0, cuanto más irregular es el objeto más grande son los valores (Periago *et al.*, 2008).

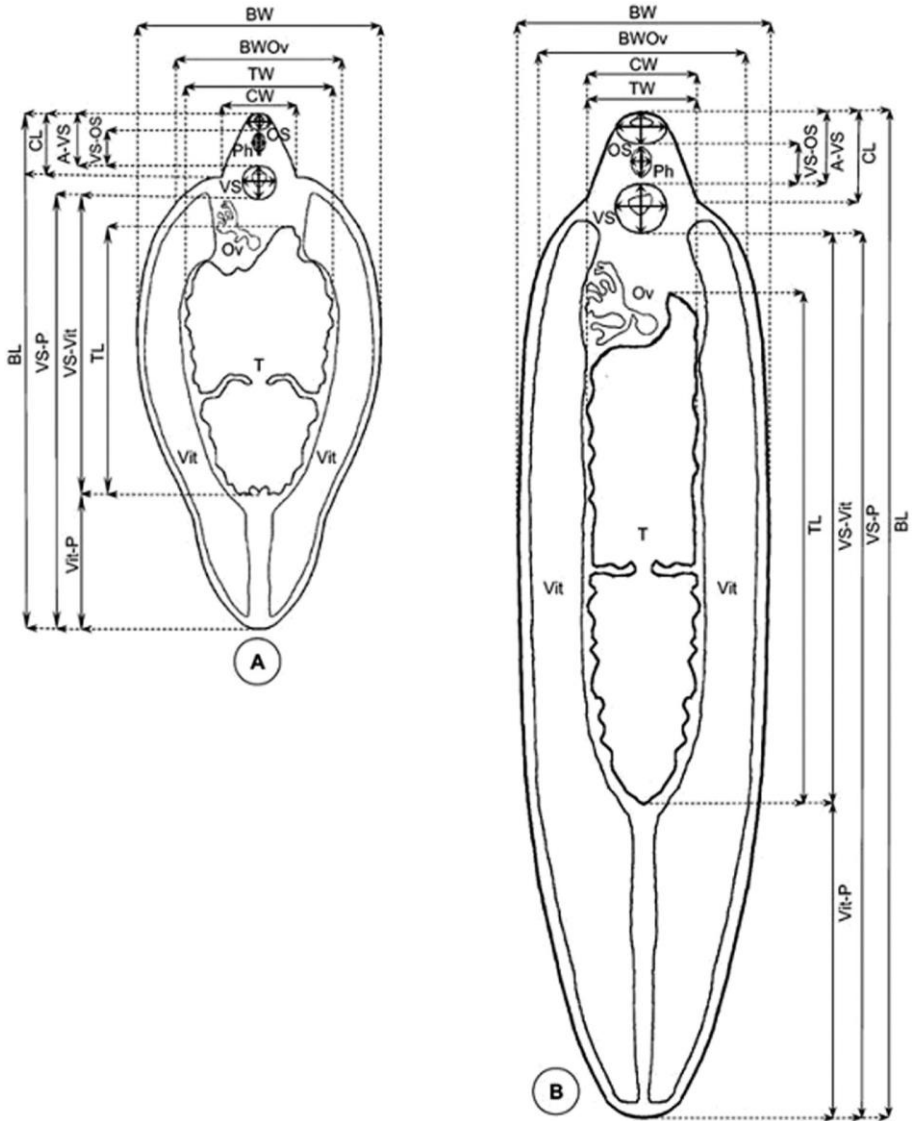


Fig.3. Medidas estandarizadas aplicadas a especímenes adultos grávidos de *F. hepatica* (A) y *F. gigantica* (B) (Periago *et al.*, 2006).

3.2.3.4. Análisis de componentes principales

El análisis de los componentes principales (ACP), permite explorar la variación individual y reconocer eventualmente los agrupamientos particulares sobre un mapa factorial, que generalmente se trata de un “plot” de los dos primeros componentes principales (Bookstein, 1989; Rohlf & Marcus, 1993; Klingenberg, 1996; Dujardin *et al.*, 2002; Dujardin & Le pont, 2004). Este análisis no toma en cuenta la pertenencia de cada individuo a grupos distintos. Es un análisis ciego, por lo que puede detectar estos grupos a partir de los valores individuales (Dujardin *et al.*, 2002). En resumen, la función del análisis en componentes principales es doble. Por una parte, permite reconocer una estructuración en particular de los individuos, correspondiente o no a su clasificación inicial, pudiendo de este modo ser utilizado como instrumento de clasificación. Por otra parte, el análisis en componentes principales presenta el interés adicional de proporcionar una variable de tamaño, que corresponde generalmente con el primer componente principal (CPI), variable que será utilizada después para eliminar el efecto tamaño de las poblaciones en comparación (Dujardin *et al.*, 2002). Así, el análisis en componentes principales brinda una variable de tamaño (CPI), que es la combinación lineal que representa la varianza máxima. Además, geoméricamente CPI se corresponde con la dirección del eje más largo a través de la nube de puntos. Las subsiguientes variables (CPII, CPIII, etc.), matemáticamente independientes, alcanzan la varianza máxima, siendo un eje ortogonal al resto de los componentes (Klingenberg, 1996). Además este tipo de análisis permite separar la influencia del tamaño de la influencia de la forma sobre la estructuración observada. Para llevar a cabo el análisis se emplea el software BAC v.2 (Dujardin *et al.*, 2002). Para realizar

de manera óptima los dos objetivos del análisis en componentes principales, los datos iniciales deben transformarse en logaritmos en base 10. Esta transformación presenta numerosas ventajas estadísticas (normalización de las distribuciones, igualación de las varianzas, etc.) y permite comparar las diferencias relativas más que las absolutas (Dujardin *et al.*, 2002). Se han utilizado las siguientes medidas de los adultos de *Fasciola* sp. para el estudio: BL, BW, BP, OS max, OS min, VS max, VS min, A-VS, VS-Vit, Vit-P, PhL, PhW y TL, donde al menos se ha tenido en cuenta una dimensión de los caracteres morfológicos más importantes (Afshan *et al.*, 2014; Ashrafi *et al.*, 2015; Ahasan *et al.*, 2016).

3.2.3.5. Determinación cuantitativa de huevos del parásito en heces: técnica Kato-Katz

Todas las infestaciones se han monitorizado con el seguimiento de la emisión de huevos del Trematodo por las heces de los ovinos con la técnica Kato-Katz. La técnica Kato-Katz se emplea para la búsqueda, hallazgo y recuento de huevos de helmintos en heces, además resulta muy útil y práctica para llevar a cabo un rápido diagnóstico de parasitosis producidas por Digénidos, Cestodos y Nematodos. Además, es utilizada rutinariamente no sólo para diagnosticar, sino también para cuantificar la carga parasitaria en la Fascioliasis humana (Villegas *et al.*, 2012; Valero *et al.*, 2012a, b). Para la realización de esta técnica se han seguido las recomendaciones de la OMS (Ash *et al.*, 1994) usando el kit helm-Test® (AK test, AK Industria e Comércio Ltda, Belo Horizonte, Brasil).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el examen se precisa de: una placa de plástico cuadrangular con un orificio central que admite un volumen de heces de 41,7 mg (o sea 1/24 g); un tamiz de nailon con tamaño de luz de entre 200 y 300 μm ; una espátula o cuchara de una casa comercial; un portaobjetos y un papel de celofán empapado en líquido colorante (García-Bodelón, 2009).

El líquido colorante del papel de celofán está compuesto por: solución al 50% en agua destilada de solución glicerina/verde malaquita (composición de la solución de glicerina/verde malaquita: 100 ml de agua destilada + 10 ml de glicerina + 1 ml de solución verde malaquita al 3%). En esta solución se introduce el papel celofán en tiras de tamaño determinado (2x2 cm), las cuales tras 24 horas podrán ser utilizadas al estar bien impregnadas de la misma (Pérez-Crespo, 2013).

Para la realización de la técnica procederemos como sigue (Ordóñez, 2009):

1. Depositamos una muestra de heces en un trozo de papel satinado (el papel no debe absorber la humedad de las heces, por ejemplo, la hoja de una revista).
2. Colocamos la malla sobre las heces y presionamos suavemente. De esta forma dejamos en el filtro las partículas grandes que interfieren en una óptima visualización microscópica de los huevos de *Fasciola sp.*
3. Con la ayuda de una espátula se toma el filtrado y se deposita en un molde situado sobre un portaobjetos. El portaobjetos se etiqueta previamente con los datos del hospedador definitivo utilizado y la especie de *Fasciola sp.* con la que estamos trabajando.

4. A continuación, se enrasa la muestra con ayuda de la espátula hasta saturar el orificio. Posteriormente retiramos la placa con delicadeza, obteniendo un flan de 41,7 mg de heces.
5. Finalmente se coloca sobre la muestra un papel de celofán embebido en líquido colorante de verde malaquita (3%). Con la ayuda de otro portaobjetos se ejerce una presión uniforme sobre la muestra hasta que esta queda expandida de manera homogénea.

Conviene esperar como mínimo 30 minutos para realizar la primera observación al microscopio, aunque se recomienda una espera de unas 24 horas para optimizar la visualización de los huevos. Gracias a su alto contenido en glicerina, es posible mantener estas preparaciones durante varios meses sin deterioro (García-Bodelón, 2009).

Para la observación microscópica de la preparación, se realiza un barrido completo del portaobjetos y se anota el número total de huevos de *Fasciola sp.* que aparecen en la misma. Teniendo en cuenta que la cantidad de heces analizadas es de 1/24 g y que el dato que nos interesa es el de huevos por gramo de heces (hgh), debemos finalmente multiplicar el resultado por 24 (Pérez-Crespo, 2013).

3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medias de los marcadores bioquímicos analizados (Alb, ALT, Amy, AP, AST, Ca, T-Cho, Cl, Cre, CRP, GGT, Glu, P, T-Bil, T-Pro, Trigly, Ure), niveles de IgG, carga parasitaria y el logaritmo neperiano de la superficie corporal del Trematodo ((ln(BA)), se compararon con el test no paramétrico de Mann–

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Whitney (U). Asimismo, se calcularon las correlaciones bivariantes (correlación de Pearson) entre los datos biométricos, niveles de IgG, carga parasitaria y ln(BA). El programa utilizado fue el SPSS vs 22. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS PARASITOLÓGICOS

PARASITOLOGICAL RESULTS

4. PARASITOLOGICAL RESULTS

4.1. ANIMAL INFECTION

Experimental monitoring confirmed that all animals given metacercariae developed infection. The results of the experimental infection are shown in Table 1. As known, the disease is divided into two phases, i.e. (i) first when flukes specifically target the liver causing pathology and necrotic lesions, which result from the parasite's migration through the liver parenchyma, and (ii) the subsequent damage caused when flukes enter the bile ducts. Therefore, it is necessary to ascertain the time point when adults move from the liver parenchyma and enter the bile ducts. Antibodies, coproantigens and fluke eggs were detected at different weeks p.i. in all infected sheep. The time point when coproantigen detection begins reveals the penetration into the bile ducts (ductular phase). This was concretely at 9 weeks p.i. when all the sheep infected with *F. hepatica* began to present coproantigens in faeces (variability according to individual sheep between 6 and 9 weeks), and at 11 weeks p.i. when all the sheep infected with *F. gigantica* began to do so similarly (7-11 weeks). Following these results, and for comparative purposes, the time course of infection was divided in two groups, the liver parenchymal phase including data between 2 and 8 weeks p.i., and the biliary phase including data between 12 and 24 weeks p.i.

At 14 weeks p.i. all the sheep infected with *F. hepatica* started to present eggs in faeces (variability according to individual sheep between 10 and 14 weeks), whereas those infected with *F. gigantica* did it so at 16 weeks

4. PARASITOLOGICAL RESULTS

p.i. (11-16 weeks). The percentage (%) of parasite recovery, defined as the mean percentage of infecting metacercariae recovered as adult flukes, was uniform within the average of 25.41% in both experimental groups B and C (Table 1). The average, standard deviation (SD) and range of number of flukes/sheep on the day of necropsy are shown in Table 1. No significant differences were detected when comparing the fluke burden ($U = 0.62$, $p > 0.05$) and the % of parasite recovery ($U = 1$, $p > 0.05$), i.e. the results showed that Guirra sheep have a similar resistance to *F. hepatica* and *F. gigantica*. The parasite biomass obtained in the two infected groups is indicated in Table 1, showing a larger value in *F. gigantica* flukes than in *F. hepatica* ($U = 0.001$, $p < 0.05$). Summing up, experimental infection presented a comparable burden in the *F. hepatica* and *F. gigantica* groups but a greater parasite biomass in the *F. gigantica* infected group.

Sheep Group	N	Infective Dose	Fluke burden ^a		% of parasite recovery ^b		Body area (mm ²)	
			(min-max)	Average± SD	(min-max)	Average± SD	(min-max)	Average± SD
A (Control)	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B (<i>Fasciola hepatica</i>)	5	200	(33-66)	50.83±13.67	(16.5-33)	25.41±6.83	(68.08-227.10)	129.77±35.76 ^c
C (<i>Fasciola gigantica</i>)	5	200	(17-70)	47.16±25.46	(8.5-35)	25.41±12.73	(156.60-305.35)	219.64±28.67 ^c

Table 1. Experimental design and parasitological results obtained.

NA: not applicable. ^a number of flukes per sheep; ^b number of flukes obtained/number of metacercariae inoculated; ^c significant using U Mann-Whitney (p<0.05).

4.2. MOLECULAR CHARACTERIZATION AND MORPHOMETRIC MEASUREMENTS

The characteristics of nucleotide length and composition of each one of the complete sequences of the two rDNA spacers and two mtDNA genes, as well as those of the two mtDNA proteins, are noted in Table 2.

Regarding nuclear rDNA, the *F. hepatica* strain presented a ITS-2 with no nucleotide difference when compared with the same spacer of typical *F. hepatica* from many countries of different continents, such as Spain, Bolivia, Egypt, Niger, Iran, Japan, Korea, Vietnam, and Australia, and thus corresponds to haplotype code FhITS2-H1. Similarly did the ITS-1 when compared with typical *F. hepatica* from Spain, France, Ireland, Bolivia, Peru, Uruguay, Argentina, Chile, Venezuela, Ecuador, Mexico, Egypt, Iran, Japan, Korea, Vietnam, and Australia, which corresponds to haplotype code FhITS1-HA. The whole intergenic region including ITS-1, 5.8S and ITS-2 was 951 bp long, with a 50.78% GC content in the combined haplotype CH1A.

The *F. gigantica* strain presented an ITS-2 with no nucleotide difference when compared with typical *F. gigantica* from many countries of different continents, such as Burkina Faso, Kenya, Iran and Tajikistan, and thus corresponds to haplotype code FgITS2-H1. Also, similarly did the ITS-1 when compared to typical *F. gigantica* from Burkina Faso, Kenya, Zambia, Iran, Vietnam, Indonesia, Thailand, Japan and Korea, which corresponds to haplotype code FgITS1-HA. The whole intergenic region including ITS-1, 5.8S and ITS-2 was 950 bp long, with a 50.30% GC content in the combined haplotype CH1A.

The comparison of the rDNA spacers of the two fasciolid strains used in the present experimental study showed 5 nucleotide differences in the ITS-2 and other 5 nucleotide substitutions in ITS-1, exactly those known to differentiate both *Fasciola* species.

With regard to mtDNA, the *F. hepatica* strain presented a *cox1* sequence and COX1 protein which fit within the variability of this gene of typical *F. hepatica* from many countries of different continents. Similarly did the *nad1* sequence and NAD1 protein when compared to their variability in typical *F. hepatica* throughout.

The *F. gigantica* strain showed a *cox1* sequence showing a genetic distance of only 0.85-1.30% (13-20 nucleotide differences) when compared to pure *F. gigantica* from Burkina Faso, Niger, Nigeria and Senegal, which at the corresponding COX1 protein level is translated in genetic distance of only 0.39-0.58% (2-3 amino acid differences). The *nad1* sequence showed a genetic distance of only 1.10-1.53% (10-14 nucleotide differences) when compared to pure *F. gigantica* from Burkina Faso, Niger, Nigeria and Senegal, which at the corresponding COX1 protein level is translated in a genetic distance of only 1.00-2.00% (3-6 amino acid differences).

The comparison of the two mtDNA genes in these strains of *F. hepatica* and *F. gigantica* furnished the following genetic differences: 8.22% bp in the *cox1* gene, 4.31% aa in the COX1 protein, 9.08% bp in the *nad1* gene, and 7.33% aa in the NAD1 protein. This agrees with the difference percentage range known to exist between both *Fasciola* species for the aforementioned two mtDNA genes.

4. PARASITOLOGICAL RESULTS

The morphometric values of *F. hepatica* and *F. gigantica* experimental materials are shown in Table 3, and the results obtained after the processes of coloration, differentiation, dehydration and mounted in Canada balsam are shown in Fig.4. and Fig.5. The size of liver fluke adults was studied by multivariate analyses. A scatter plot of the first two principal components (PC) is shown in Fig.6. The first common principal component (CP1) of the two strain populations can be interpreted as a measure of overall size. The results show that *F. hepatica* specimens have a smaller global size than *F. gigantica* specimens.

Marker genotype	<i>F. hepatica</i>		<i>F. gigantica</i>	
	Nucleotide length	Composition	Nucleotide length	Composition
rDNA ITS-2	364 bp	48.3% GC	363 bp	47.9% GC
rDNA ITS-1	432 bp	51.8% GC	432 bp	51.2% GC
mtDNA cox1	1533 bp	62.7% AT	1533 bp	63.8% AT
mtDNA nad1	903 bp	65.3% AT	903 bp	63.8% AT
	Amino acid length	Start/stop codons	Amino acid length	Start/stop codons
mtDNA COX1	510 aa	ATG/TAG	510 aa	ATT/TAG
mtDNA NAD1	300 aa	GTG/TAG	300 aa	GTG/TAG

Table 2. Results of the genotypic characterisation of the *F. hepatica* and *F. gigantica* strains used in the long-term experimental infection of Guirra breed sheep. mtDNA cox1: nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA nad1: amino acid sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA nad1: nucleotide sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA. mtDNA NAD1: amino acid sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA. rDNA ITS-1: nucleotide sequence of the first internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA. rDNA ITS-2: nucleotide sequence of the second internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA.

	<i>F. hepatica</i>		<i>F. gigantica</i>	
	Extreme values (n=127)	Mean±SD	Extreme values (n=127)	Mean±SD
Morphometric values				
Body length	12.4–26.6 mm	18.5±3.3 mm	24.4–40.5 mm	31.5±3.0 mm
Body width	6.8–12.7 mm	10.1±1.1 mm	8.3–12.0 mm	9.9±0.8 mm
Body area	68.0–227.1 mm ²	129.7±35.7 mm ²	156.6–305.3 mm ²	219.6±28.7 mm ²
Body perimeter	33.2–66.0 mm	47.9±7.2 mm	57.9–105.2 mm	74.4±6.9 mm

Table 3. Results of phenotypic characterisation of the *F. hepatica* and *F. gigantica* strains used in the long-term experimental infection of Guirra breed sheep. Morphometric values of *F. hepatica* and *F. gigantica* experimental materials.



Fig.4. *F. hepatica* specimen obtained from experimentally infected Guirra sheep.

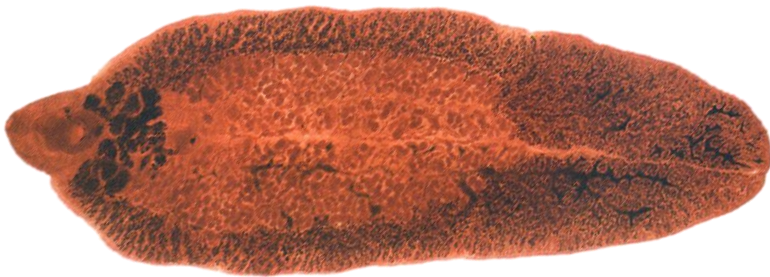


Fig.5. *F. gigantica* specimen obtained from experimentally infected Guirra sheep.

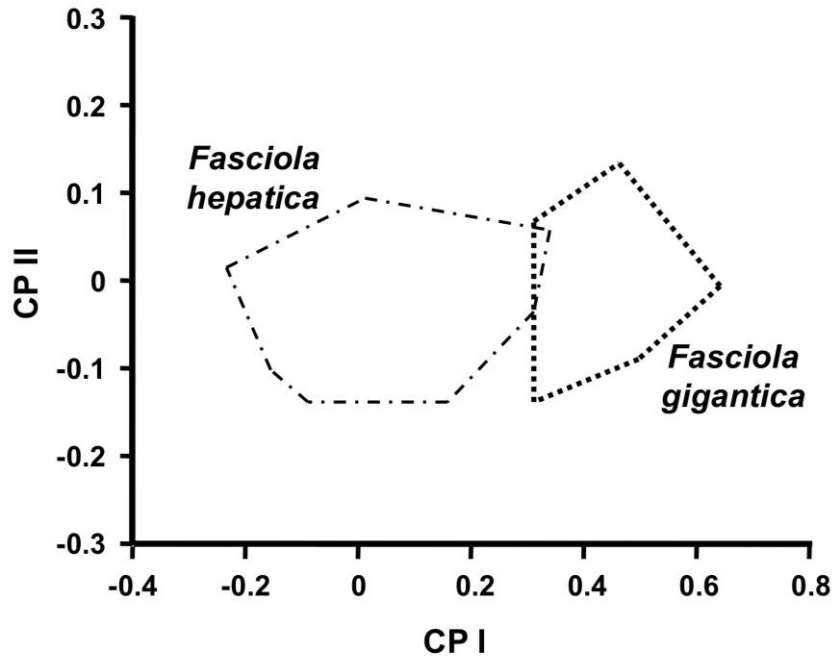


Fig.6. Factor map corresponding to *F. hepatica* and *F. gigantica* specimens from experimentally infected Guirra sheep. Samples are projected onto the first (PCI, 59%) and second (PCII, 17%) principal components. Each group is represented by its perimeter.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS BIOQUÍMICOS

BIOCHEMICAL RESULTS

5. BIOCHEMICAL RESULTS

5.1. BIOCHEMICAL PARAMETERS AND TIME

The time course (day 0 and afterwards at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 weeks p.i.) of the values of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), calcium (Ca), chloride (Cl), phosphore (P), creatinine (Cre), urea (Ure), albumin (Alb), total proteins (T-Pro), glucose (Glu), amylase (Amy), total cholesterol (T-Cho), triglycerides (Trigly) and C-reactive protein (CRP) is represented in Figures 7-14, including the liver parenchymal phase (2-8 weeks p.i.) and the biliary phase (12-24 weeks p.i.) of the disease. For each biweekly dataset, a comparative analysis was performed for each biochemical parameter in the *F. hepatica* group vs the control group, the *F. gigantica* group vs control and the *F. hepatica* group vs the *F. gigantica* group.

About liver markers, the results showed that the *F. hepatica* and *F. gigantica* challenged groups displayed significant higher values of the following markers compared to the control group, the Fig.7. shows: A) AST levels increased in the *F. hepatica* group vs control at 12 weeks p.i. only, but in the *F. gigantica* group vs control this increase was at 12, 14 and 16 weeks p.i. ($p < 0.05$), B) ALT levels increased in the *F. gigantica* group vs the control group at 18 weeks p.i. only. The Fig.8. shows: A) GGT levels increased at 10, 12 and 14 weeks p.i. in the *F. hepatica* group vs control, whereas at 10, 12, 14, 16 and 18 weeks p.i. in the *F. gigantica* group vs control ($p < 0.05$); B) AP

5. BIOCHEMICAL RESULTS

levels increased at 4 weeks p.i. in the *F. gigantea* group vs control ($p < 0.05$).

No differences were detected in total bilirubin.

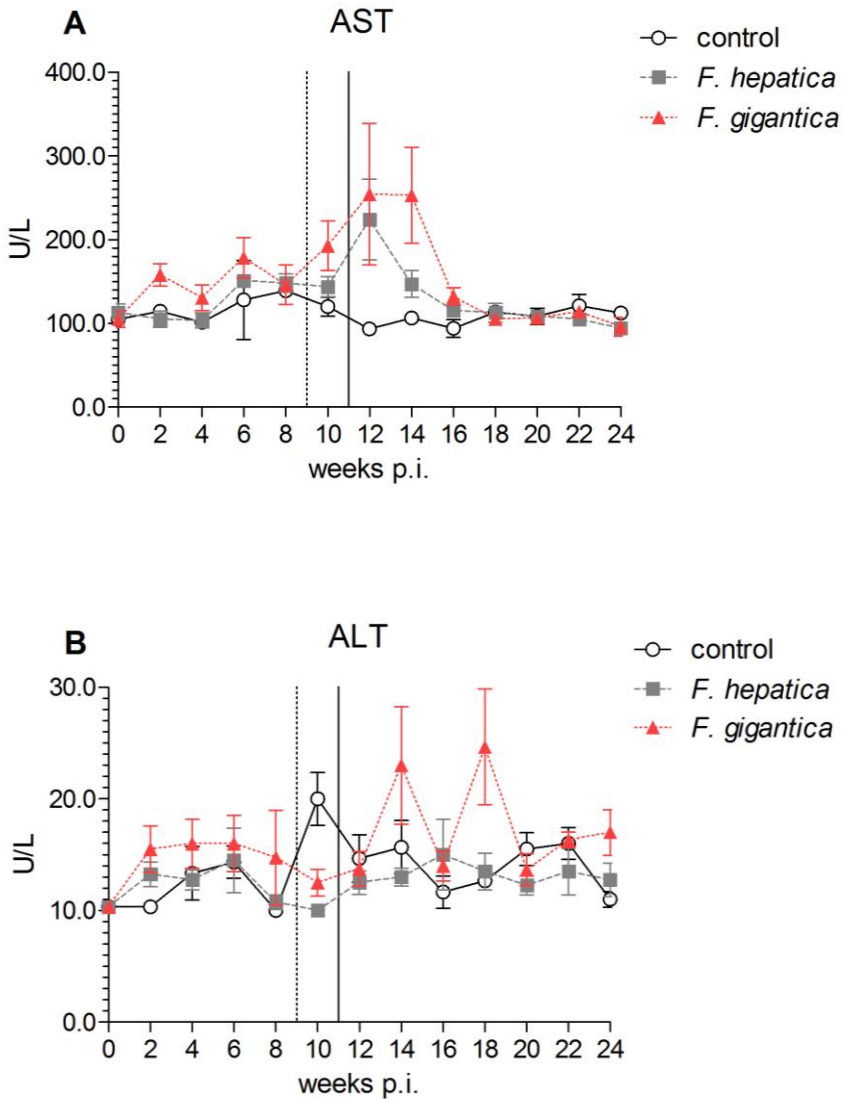


Fig.7. Liver marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) aspartate aminotransferase (AST) (in international units per litre IU/L); (B) alanine aminotransferase (ALT) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

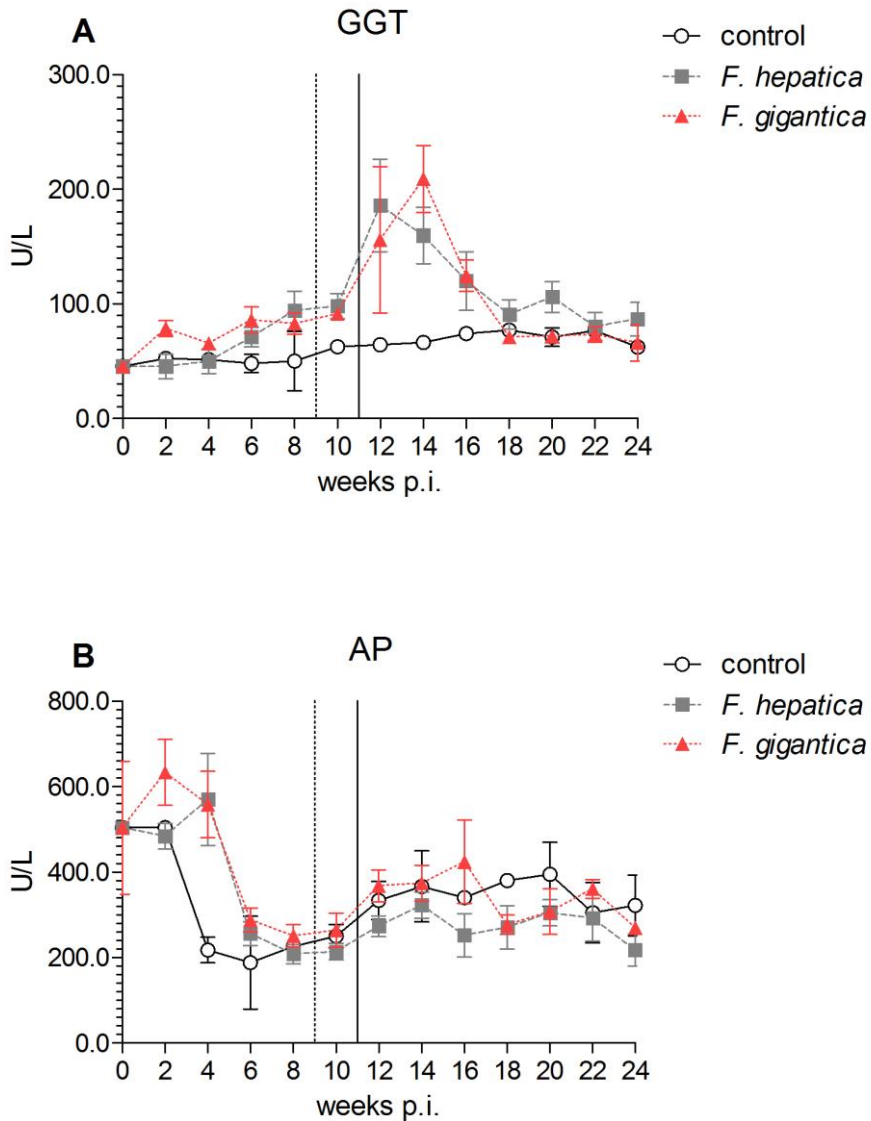


Fig.8. Liver marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) gamma glutamyl transferase (GGT) (IU/L); (B) alkaline phosphatase (AP) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

Concerning serum electrolytes (Fig.9.a.-9.b.), higher levels of Ca were detected at 6 weeks p.i. in the *F. hepatica* group and from 6 to 8 weeks p.i. in the *F. gigantica* group ($p < 0.05$), and higher levels of P at 4 weeks p.i. in the *F. gigantica* group ($p < 0.05$), thereafter tending to decrease when compared to the control group. Lower levels of Cl were detected at 4, 10, 12 and 16 weeks p.i. in the *F. gigantica* group ($p < 0.05$). A positive correlation between Ca vs Cl levels ($p < 0.05$) was detected.

Regarding protein metabolism, the *F. hepatica* and *F. gigantica* challenged groups presented significantly lower levels of creatinine compared to the control group ($p < 0.05$), i.e. creatinine levels decreased in 4 and 8 weeks p.i. in the *F. hepatica* group and in 4 weeks p.i. in the *F. gigantica* group. Urea did not show any significant differences between infected animals vs controls (Fig.10.).

Regarding plasma proteins, the *F. hepatica* and *F. gigantica* challenged groups presented significantly higher levels of the following markers compared to the control group. The Fig.11. shows: A) albumin levels increased at 6 weeks p.i. and decreased from 20 until 24 weeks p.i. in both infected groups; B) total protein levels increased at 6 and 12 weeks and decreased at 20 weeks p.i. in *F. hepatica*, whereas increased at 6 and 14 weeks p.i. and decreased at 18 until 22 weeks p.i. in the *F. gigantica* group.

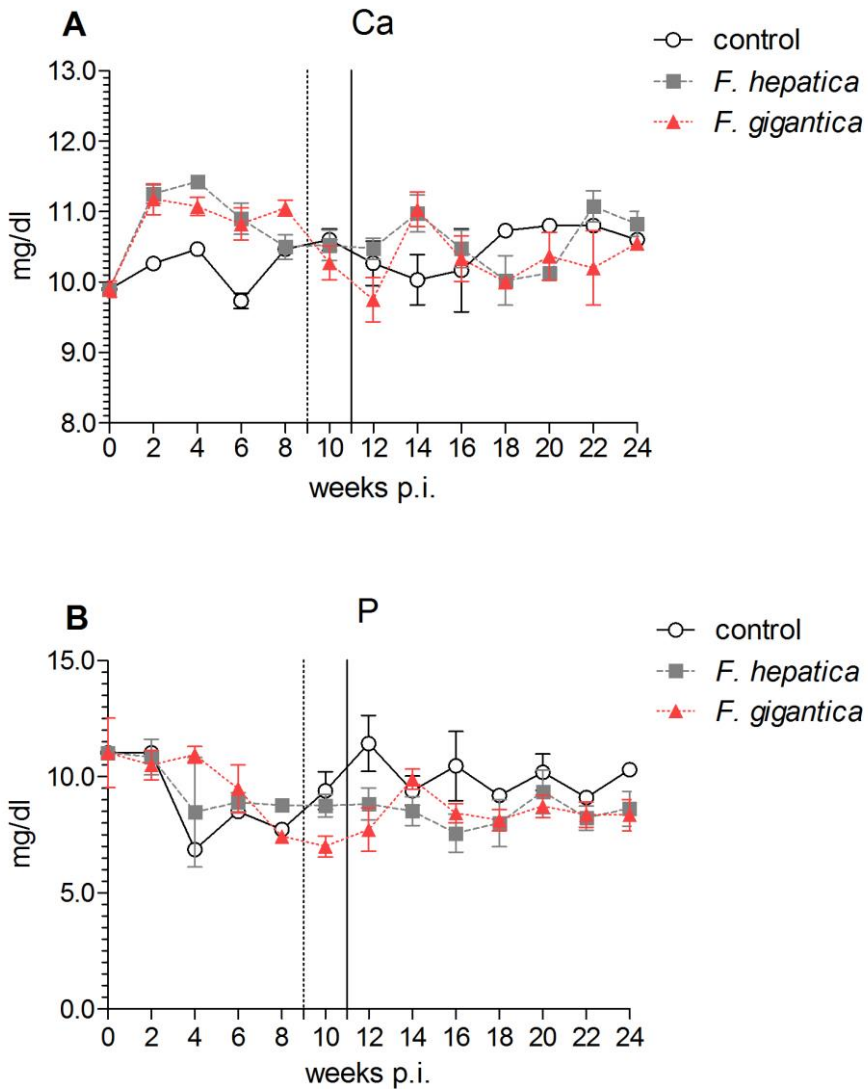


Fig.9.a. Serum electrolyte and inflammation marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantea* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) calcium (Ca) (mg/dl); (B) phosphore (P) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantea* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

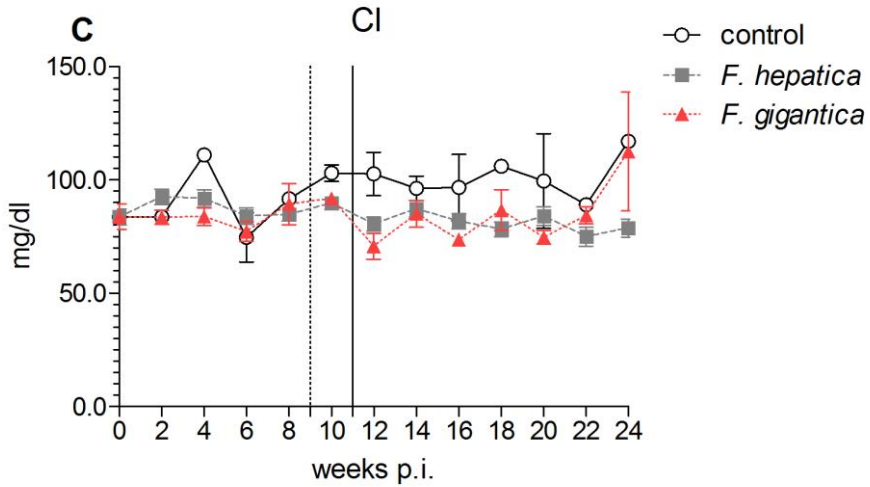


Fig.9.b. Serum electrolyte marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantea* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (C) chloride (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantea* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

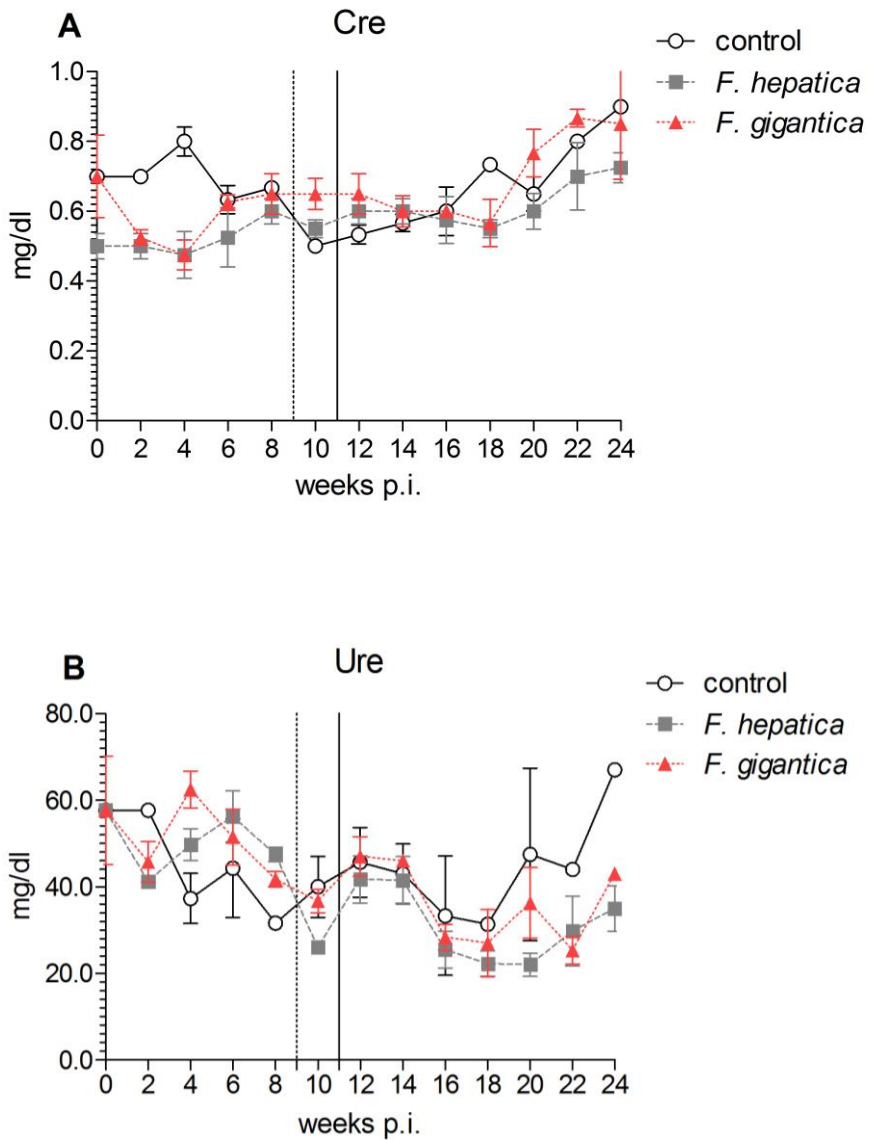


Fig.10. Protein metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) creatinine (Cre) (mg/dl); (B) urea (Ure) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

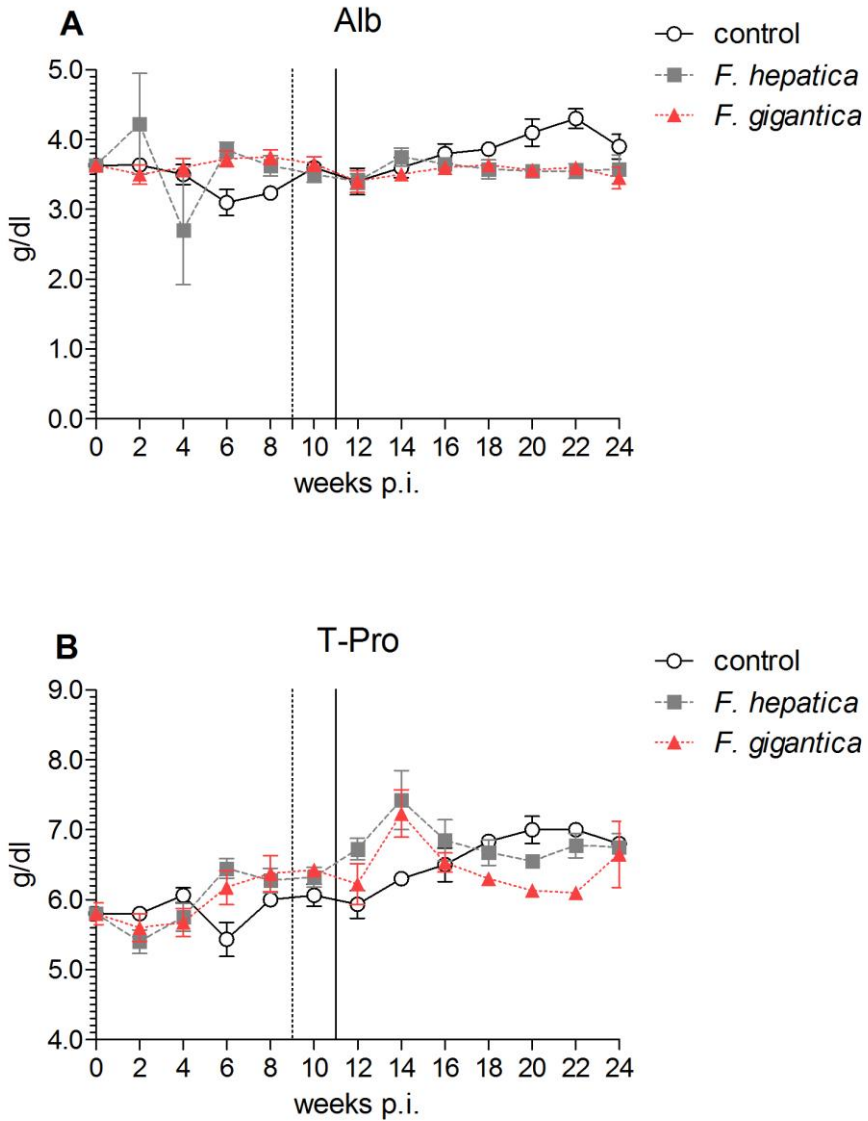


Fig.11. Protein metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantea* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) albumin (Alb) (g/dl); (B) total proteins (T-Pro) (g/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantea* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

Regarding the carbohydrate metabolism (Fig.12.), both the *F. hepatica* and *F. gigantica* challenged groups did not show significant differences in glucose levels but the *F. hepatica* group displayed lower levels in amylase compared to the control at 24 weeks p.i. About the lipid metabolism (Fig.13.), the *F. gigantica* challenged group presented higher total cholesterol levels compared to the control group from 20 until 24 weeks p.i. ($p < 0.05$). Triglycerides appeared significantly decreased at 12 weeks p.i. in the *F. gigantica* infected group. A positive correlation between total cholesterol vs triglyceride levels and total cholesterol vs GPT levels ($p < 0.05$) was found.

Finally, both the *F. hepatica* and *F. gigantica* challenged group presented significantly higher levels of CRP compared to the control group at 6, 12 and 14 weeks p.i. (Fig.14.).

The relationships of the biochemical parameters, serum antibodies, coproantigen and egg shedding vs time in the sheep experimentally infected by the two fasciolid species are summarised in Table 4.

Considering the set of the biochemical parameters throughout the liver parenchymal phase (2 to 8 weeks p.i.), the bivariate correlation between the biochemical parameters of each sheep and time was carried out. A significant positive correlation between GGT, total protein and IgG levels vs time (2 to 8 weeks p.i) was detected. However, between ALT, AP, amylase and P vs time (2 to 8 weeks p.i) it proved to be a significant negative correlation. In the acute phase in the *F. hepatica* infected group, the average of creatinine decreased significantly when compared to controls ($p < 0.05$), whereas the average of Ca and P increased significantly when compared to

the control ($p < 0.05$). In the acute phase in the *F. gigantica* infected group, creatinine average decreased significantly when compared to the control group ($p < 0.05$), whereas the average of GGT, AST, AP, albumin and CRP increased significantly compared to the control group ($p < 0.05$).

Considering the set of the biochemical parameters corresponding to the biliary phase (12 to 24 weeks p.i), the bivariant correlation between the biochemical parameters of each sheep and time was also carried out. A significant positive correlation between creatinine, total cholesterol, triglycerides and Ca vs time was detected. However, between AST, GGT, glucose and CRP vs time it proved to be a significant negative correlation. In the biliary phase in the *F. hepatica* infected group, the average of GGT ($U = 102.5$; $p < 0.05$) and CRP ($U = 192$; $p < 0.05$) increased significantly when compared to the control group, whereas the average of albumin ($U = 145$; $p < 0.005$), AP ($U = 126$; $p < 0.05$), Ure ($U = 154.5$; $p < 0.05$), Cl ($U = 85.5$; $p < 0.005$) and P ($U = 133.5$; $p < 0.05$), decreased significantly. In the biliary phase in the *F. gigantica* infected group, the average of AST ($U = 114$; $p < 0.05$), GGT ($U = 113.5$; $p < 0.05$), total cholesterol ($U = 95$; $p < 0.05$) and CRP ($U = 136$; $p < 0.05$) increased significantly when compared to controls, whereas the average of albumin ($U = 94$; $p < 0.05$), Cl ($U = 68$; $p < 0.05$) and P ($U = 84$; $p < 0.05$) decreased significantly.

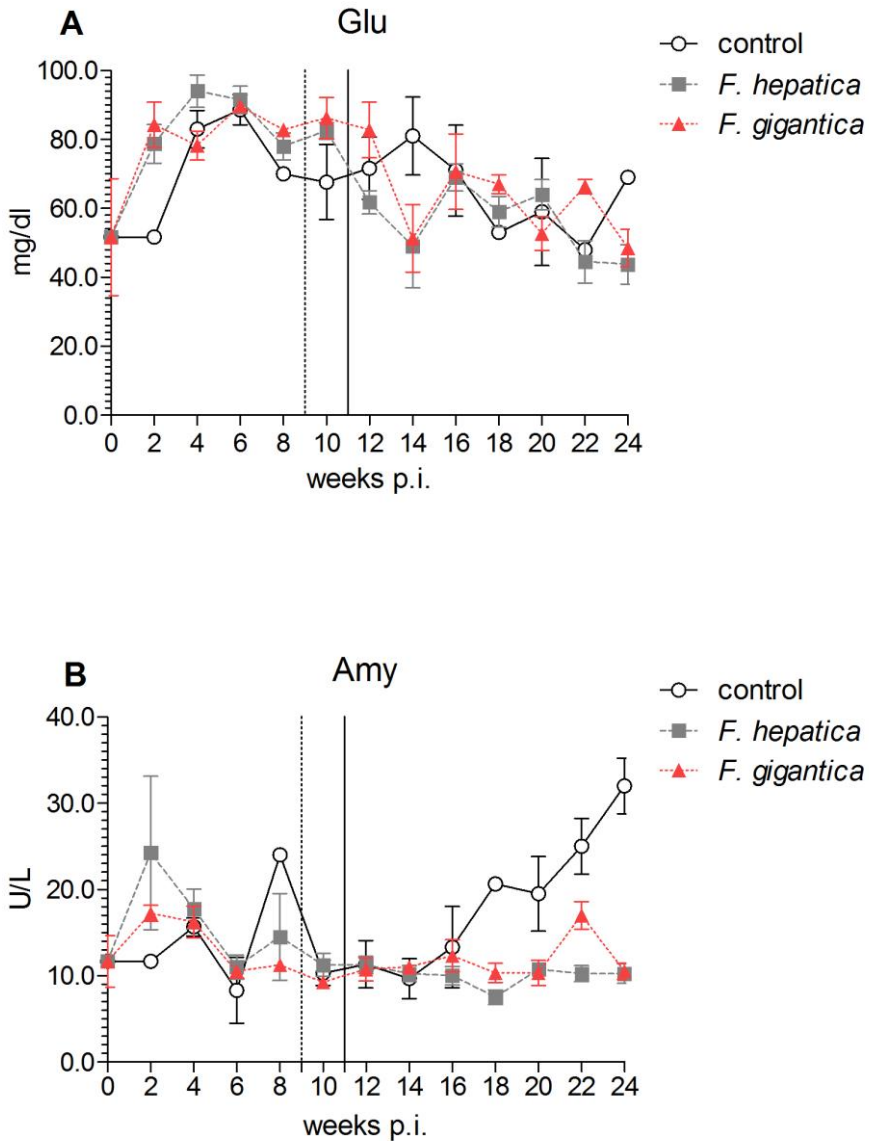


Fig.12. Carbohydrate metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantea* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) glucose (Glu) (mg/dL); (B) amylase (Amy) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantea* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

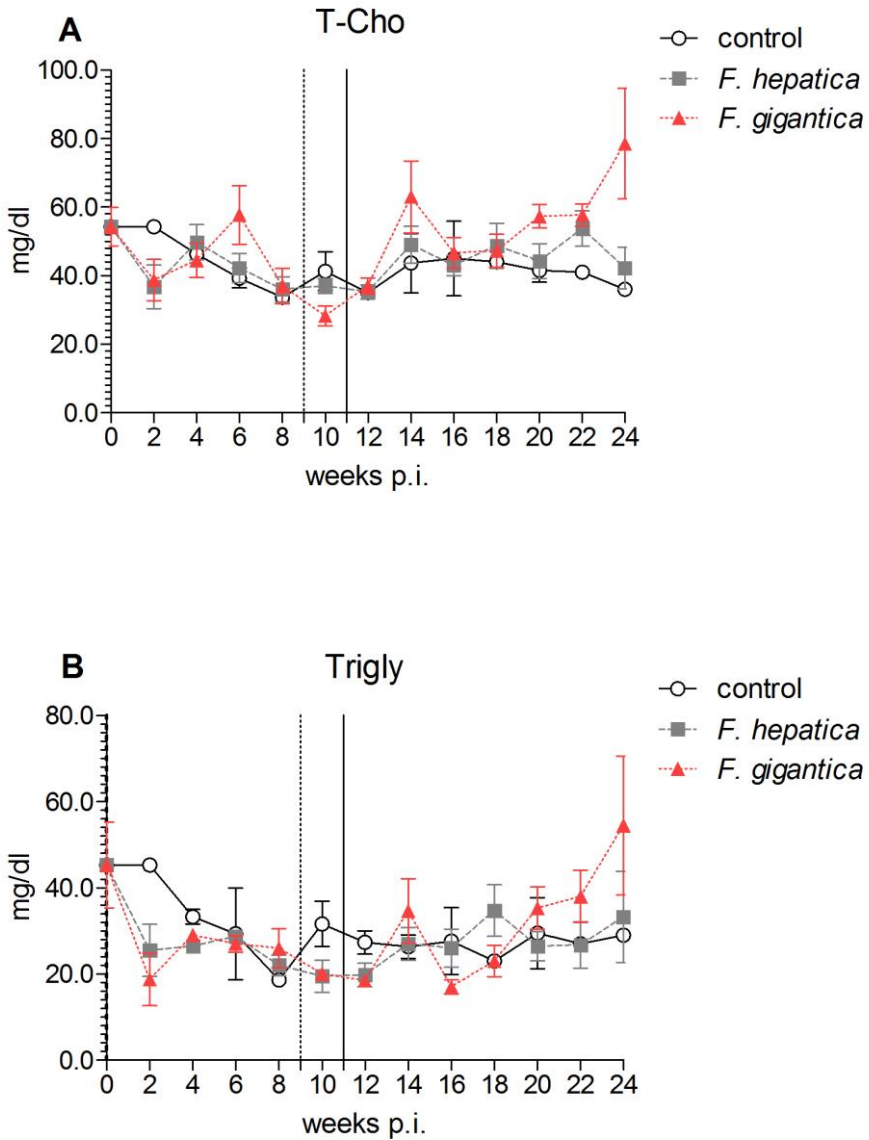


Fig.13. Lipid metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) total cholesterol (T-Cho) (mg/d); (B) triglycerides (Trigly) (mg/dl). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

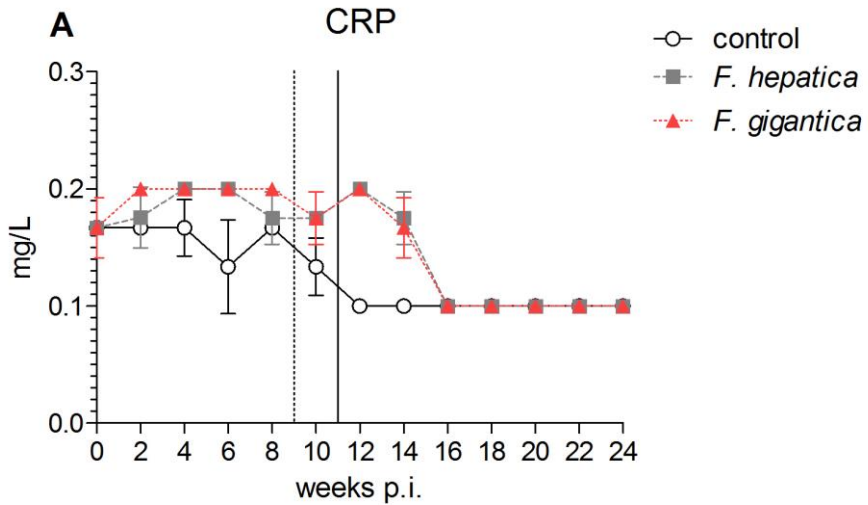


Fig.14. Inflammation marker values (arithmetic mean \pm SE) in *F. hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) C-reactive protein (CRP) (mg/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post-infection.

5.2. BIOCHEMICAL PARAMETERS COMPARISON BETWEEN *FASCIOLA* INFECTED GROUPS

Regarding only the complete parenchymal phase (2-8 weeks p.i.), when comparing the *F. hepatica* infected group with the *F. gigantica* infected one, only AST showed significantly higher values in *F. gigantica* than in *F. hepatica* ($p < 0.05$). CRP did also show evident higher values in *F. gigantica* than in *F. hepatica*, although close but not reaching significance.

Considering only the complete biliary phase (12 to 24 weeks p.i.), when comparing the liver damage produced by the two liver fluke species, ALT ($U = 212.5$; $p < 0.05$) and AP ($U = 135.5$; $p < 0.05$) were significantly higher in the *F. gigantica* group vs the *F. hepatica* group. Regarding inflammation, CRP ($U = 255$; $p < 0.05$) was also significantly higher in the *F. gigantica* group when compared to the *F. hepatica* group. About lipid biomarkers, total cholesterol ($U = 135.5$; $p < 0.05$) was significantly higher in the *F. gigantica* group vs the *F. hepatica* group too. And finally concerning protein biomarkers, total protein and IgG levels were significantly lower in the *F. gigantica* infected group when compared to the *F. hepatica* infected group.

5.3. BIOCHEMICAL PARAMETERS VS BURDEN AND PARASITE BIOMASS

Considering both *F. hepatica* and *F. gigantica* groups together, for the dataset corresponding to the liver parenchymal phase (2-8 weeks p.i.), a significant positive correlation between GGT, AP, albumin, and IgG levels vs

fluke burden was detected ($p < 0,05$), whereas when analysing creatinine vs fluke burden it was a significant negative correlation ($p < 0,05$). Compared to the parasitic biomass, a significant positive correlation appeared with GGT, AP, Ca, albumin, and IgG levels ($p < 0.05$), but the correlation was significantly negative with creatinine ($p < 0.05$).

Also, considering both *F. hepatica* and *F. gigantica* groups together, for the dataset corresponding to the biliary phase (12 to 24 weeks p.i.), biochemical levels were correlated with the burden and parasitic biomass too. A significant positive correlation between GGT and IgG levels vs fluke burden was detected ($p < 0.005$), and similarly between GGT, total cholesterol and IgG levels vs parasite biomass ($p < 0.05$).

5.4. BIOCHEMICAL PARAMETERS AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE

Considering both *F. hepatica* and *F. gigantica* groups together, for the dataset corresponding to the liver parenchymal phase (2-8 weeks p.i.), biochemical levels were correlated with the IgG levels. A significant positive correlation between GGT and total protein vs IgG levels was detected ($p < 0.05$). However, the correlation between AP and amylase vs IgG levels was significantly negative ($p < 0.05$). For the dataset corresponding to the biliary phase (12 to 24 weeks p.i), biochemical levels were also correlated with the IgG levels. A significant positive correlation between GGT and CRP vs IgG levels was detected ($p < 0.05$), whereas the correlation between Cl and amylase vs IgG levels appeared to be significantly negative ($p < 0.05$).

Regarding the entire *F. hepatica* group (2-24 weeks p.i.), biochemical levels were correlated with IgG levels too. A significant positive correlation between ALT, GGT and AP vs IgG levels was detected ($p < 0.05$), but the correlation appeared to be significantly negative between Cl, P, total proteins and amylase vs IgG levels ($p < 0.05$).

About the entire *F. gigantica* group (2-24 weeks p.i.), when correlating the biochemical levels with the IgG levels, a significant positive correlation between GGT vs IgG levels was detected ($p < 0.05$), whereas the correlation between Cl and amylase vs IgG levels proved to be significantly negative ($p < 0.05$).

Biochemical parameter	Abbreviation	Measurement units	Fasciolid species vs control	Invasive or acute phase (weeks)						Biliary or chronic phase (weeks)					
				2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Phosphore	P	mmol/dl	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	=	=	=	(-)	(-)	=	=	=	=	(-)
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	=	(-)	(-)	=	=	=	=	=	=	(-)
Creatinine	Cre	mg/dl	<i>F. hepatica</i>	(-)	(-)	=	(+)	=	(-)	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	(-)	(-)	=	(+)	(+)	=	(-)	=	=	=	=	=
Urea	Ure	mg/dl	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	(-)
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	=	(+)	(+)	=	=	=	=	=	=	(-)
Albumin	Alb	g/dl	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	=	(+)	=	(-)	=	=	=	=	=	(-)
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	=	(+)	(+)	=	=	=	=	=	=	(-)
Total proteins	T-Pro	g/dL	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	=	(+)	=	(-)	=	(+)	=	(-)	(-)	=
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	=	(+)	(+)	=	=	=	=	=	=	(-)
Glucose	Glu	mg/dl	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	(-)	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	(-)	=	=	=
Amylase	Amy	U/L	<i>F. hepatica</i>	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	(-)	(-)
			<i>F. gigantica</i>	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	(-)

Table 4.b. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *F. hepatica* and *F. gigantica*. Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non-significant increase of the biochemical parameter value; -: significant decrease of the biochemical parameter value; (-): non-significant decrease of the biochemical parameter value.

Biochemical parameter	Abbreviation	Measurement units	Fasciolid species vs control	Invasive or acute phase (weeks)					Biliary or chronic phase (weeks)						
				2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Total cholesterol	T-Cho	mg/dl	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	(+)	(+)	(+)
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Triglycerides	Trigly	mg/dl	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	(-)	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	(-)	=	=	=	=	=	=
C-reactive protein	CRP	mg/L	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			<i>F. gigantica</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Serum antibodies	IgG / MM3-Sero	OD	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Coproantigens	MM3-Copro	OD	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Egg shedding	Eggs in faeces	epg	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

Table 4.c. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *F. hepatica* and *F. gigantica*. Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non-significant increase of the biochemical parameter value; -: significant decrease of the biochemical parameter value; (-): non-significant decrease of the biochemical parameter value.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

DISCUSSION

6. DISCUSSION

6.1. INFECTION BY *FASCIOLA* SPECIES

The Fascioliasis infection in different hosts is determined, in part, by biochemical differences between species of *Fasciola* but also host-dependent factors play a pivotal role in disease progression or resolution. *F. hepatica* and *F. gigantica* actively modulate the host immune response which may lead to host-dependent parasite survival and may explain host specificity (Keegan & Trudgett, 1992; Mulcahy *et al.*, 1999; Meeusen & Piedrafita, 2003; Piedrafita *et al.*, 2004).

Studies with rats and sheep with *F. hepatica* and *F. gigantica* have been carried out, and there is a strong suggestion that the two *Fasciola* species differ dramatically in their ability to infect these animals. Broadly, *F. hepatica* will establish a primary infection in rats and sheep, whereas rats and sheep show resistance to *F. gigantica* (Spithill *et al.*, 1999). If rats are first primed with a sensitizing infection of *F. gigantica*, the challenge infection is almost completely rejected (Itagaki *et al.*, 1994), and the same has also been observed in Indonesian Thin Tail (ITT) sheep (Spithill *et al.*, 1999). These findings suggest that *F. gigantica* is more susceptible to kill by host responses than *F. hepatica* (Piedrafita *et al.*, 2004).

Some sheep breeds are resistant to *F. gigantica* infection, while others are not. For instance, as already commented, high resistance to *F. gigantica* infection has been observed in Indonesian Thin Tail (ITT) sheep

(Wiedosari & Copeman, 1990). ITT sheep express resistance to *F. gigantica* within the prepatent period of a primary infection and acquire a higher level of resistance after exposure (Roberts *et al.*, 1997a, b). In addition, numerous studies have shown that sheep do not acquire resistance to a secondary *F. hepatica* infection (Raadsma *et al.*, 2007).

6.2. BEHAVIOUR AND PATHOGENESIS

The pathogenesis of *Fasciola* species in different definitive host species was already reviewed and concluded that there are broad similarities, but there is considerable variation between these species too (Sinclair, 1967). Furthermore, it has also been reported that *F. gigantica* is more pathogenic and causes more production losses than *F. hepatica*, in the cattle (Phiri *et al.*, 2007).

The behaviour and pathogenesis of *Fasciola* species in the same host mainly differs in the time taken to reach the bile ducts and subsequently development in sheep takes 7–10 weeks post infection for *F. hepatica* versus 12–16 weeks for *F. gigantica* (Dawes & Hughes 1964; Boray 1969), and other reason is the different size of both. *Fasciola* sp. infections can lead to chronic or acute disease within human and ruminant hosts (cattle, buffalo, and sheep), and chronic infections - the result of a small intake of parasites over a long period of time - are the most common form of liver fluke infection in sheep (Piedrafita *et al.*, 2004).

As mentioned at the beginning of this thesis, during the prepatent period of the Fascioliasis infection (from the ingestion of metacercariae to the first appearance of eggs in faeces), the immature larvae migrate through the liver parenchyma after crossing the gut wall and a previous migration through the abdominal cavity (Mas-Coma *et al.*, 2014c), a period along which the immature fluke develops mainly as a tissue feeder (Dawes & Hughes, 1970). With the growth of the parasite, its feeding activity progressively increases and depending on the number of larvae ingested the hepatic cell mass may be reduced so that a normal hepatic function cannot be maintained. This will result in various metabolic disturbances. Liver function tests and enzymes will reveal a reduced hepatic function. The nature of the enzyme changes can be considered as markers of the different stages of *F. hepatica* infection (Rowlands & Clampitt, 1979; Gajewska *et al.*, 2005).

6.3. HEPATIC FUNCTION AND BIOCHEMICAL PARAMETRES

The following section describes some biochemical alterations produced in the liver due to the presence of the flukes.

Experimental studies on the pathological process of Fascioliasis in rats have shown that the early chronic period involves a series of physiopathological alterations, including increased bile flow, choleresis, and a hyperplastic response of the biliary epithelium (Foster, 1981; López *et al.*, 1993; Valero *et al.*, 2003). When choleresis is produced, stagnant bile accumulates in and around the hepatocytes, causing disturbances in many metabolic pathways (Ouviña *et al.*, 1995). When bile is stagnant in the liver,

two enzymes, GGT and AP, increase. The GGT activity is associated with hepato-biliary and pancreatic disorders (Braun *et al.*, 1983). With emphasis on the presence of damage in the biliary epithelium (Bulgin *et al.*, 1984; Galtier *et al.*, 1986;) and cholestasis (Braun *et al.*, 1983). Another enzyme, the AST, provide information of the parenchymal phase (Kozat & Denizhan, 2010). Hypertransaminasemia or normal levels of AST and ALT in human Fascioliasis have been described in both the parenchymal or biliary phases (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999; Jha *et al.*, 2013).

Fascioliasis in calves can cause loss of appetite. Therefore, animals decrease food intake which leads to a shortage of serum minerals (Carlson, 2002). Serum minerals are involved in various fundamental physiological processes including the maintenance of a normal osmotic equilibrium, i.e. the maintenance of a normal water balance. Calcium ions are necessary for muscle contraction and transmission of nerve impulses, and increase in sodium ions may be a result of dehydration due to diarrhoea (Coles, 1986). Additionally, *F. hepatica* in sheep reduces animal's food intake, which may lead to a reduction in the efficient use of key energy resources. This means a reduction in fertility, growth rate, and wool production (Blood *et al.*, 1989).

The liver is considered to be the main storage site for glycogen in vertebrate animals, and migrating flukes may potentially reduce the glycogen reservoir, which then contributes to the destruction of hepatocytes as well as severe liver pathology, which may potentially reduce liver glycogen reservoirs (Simesen & Nansen, 1974; Phiri *et al.*, 2007). In livestock, the rationale is that the potential interruption or disruption of the carbohydrate metabolism may at least in part be responsible for the serious impairment of

animal productivity and growth, a characteristic manifestation of fascioliasis in ruminants. Furthermore, a reduction in available liver glycogen leads to a reduction in serum glucose levels and a corresponding increased mobilization of free fatty acids (Phiri *et al.*, 2007).

The liver plays a vital role in the metabolism of lipids and plasma lipoproteins. The lipid metabolism is of great complexity, having an integrative as well as regulatory function in most anabolic and catabolic processes of lipids in the organism. It produces bile, which is essential for efficient intestinal fat absorption. Additionally, the liver is not only the major producer of plasma lipoproteins, but also the major site of clearance for these molecules (Canbay *et al.*, 2007). The liver thus has a central metabolic function in various aspects of the lipid and lipoprotein metabolism such as uptake, oxidation, and metabolic conversion of free fatty acids, synthesis of cholesterol and phospholipids, and formation and secretion of specific lipoproteins (Bauchart *et al.*, 1996). Also, the liver plays a dominant role in the homeostasis of serum cholesterol levels. An increase in cholesterol levels is associated with an obstructive lesion of the bile duct and defective fat digestion due to liver damage (Coles, 1986).

6.4. SPECIFIC DIAGNOSIS

The extrapolation of the egg size in livestock has always been used for human diagnosis, the borderlines allowing differentiation between the two species were traditionally considered to be 150 µm in length and 90 µm width (lower values representing *F. hepatica* and higher values *F. gigantica*).

However, it has been experimentally shown that the final host species (cattle, sheep, pig and donkey) decisively influences the size of the *F. hepatica* eggs even within the same endemic area (Valero *et al.*, 2001). Additionally, the existence of intermediate forms (specimens showing morphological characteristics of the two species resulting from cross-breeding) (Mas-Coma *et al.*, 2009b) aggravate the problem. Such intermediate forms and hybrids infect humans in areas where the two fasciolids overlap, namely in Africa (Periago *et al.*, 2008) and Asia (Ashrafi *et al.*, 2006b; Afshan *et al.*, 2013).

According to Mas-Coma *et al.* (2009), regarding these areas, the fasciolid species coexist in epidemiological situations with a local or zonal overlap. Local overlap is common in places where climatic characteristics throughout the year enable the coexistence of *Galba* and *Radix* species in the same locality. This allows transmission and consequent infection of livestock and humans living sedentarily in the locality by both *F. hepatica* and *F. gigantica* in these areas. Zonal overlap is common in areas with different altitudes, in this case, definitive hosts become co-infected by both fasciolids when moving from low-lands to neighbouring highlands and *vice versa* (animals because of interzonal transhumance, transportation and trade, and humans when moving around for various reasons). In these areas of zonal overlap, the intermediate forms between *F. hepatica* and *F. gigantica* concerning both adult size and egg size are found, which may give rise to situations in which the fasciolid species cannot or may be difficult to establish. Moreover, although nuclear ribosomal DNA markers seem to parallel fasciolid species characteristics, in specific cases adult and egg sizes may not fit the molecular results (Mas-Coma *et al.*, 2009b, 2014d).

6.5. MORBIDITY MARKERS

As already commented, some sheep breeds are resistant to *F. gigantica* infection. The Guirra breed shows a susceptibility to *F. gigantica* similar to that *F. hepatica* (Spithill *et al.*, 1999). This is the first time that a physiopathogenicity long-term standardised study leads to a significant comparative analysis of the serum biochemical parameters throughout both the acute and chronic phases. And in terms of susceptibility, there are no significant differences in the amount of fasciolids of both species collected. Contrary to what happens in the experiments of Spithill (1999) or Zhang (2005) which report a greater susceptibility to *F. hepatica* than to *F. gigantica*.

6.5.1. LIVER DAMAGE

In the *F. hepatica*/sheep model, abnormal increases of AST have been reported at 3–4 weeks p.i (Sykes *et al.*, 1980; Kozat & Denizhan, 2010), AST activity was found to return to normal values, or significantly elevated even 14 weeks p.i. (Ferre *et al.*, 1995). In large domestic animals, ALT is not remarkably elevated in liver injury (Tennant, 1997). If the number of metacercariae ingested is small (150 metacercariae of *F. hepatica*), ALT and AST levels may show insignificant variations (Mekroud *et al.*, 2007).

In *F. hepatica* infected sheep, GGT provides information on the penetration of young flukes into the bile ducts (Mekroud *et al.*, 2007). Our results confirm that *F. gigantica* migration takes longer, which translates into

a delay in the liver damage biomarker modifications. These results agree with studies showing that a GGT increase provides sensitive indications of liver injury. GGT is the best marker, while AST is less sensitive (Sykes *et al.*, 1980; Kozat & Denizhan, 2010; Anderson *et al.*, 1977). In our study, GGT depended on the disease phase, decreasing in the long-term. Other investigations with *F. hepatica* infected sheep obtained similar data (Ferre *et al.*, 1997), suggesting either that adult flukes in bile ducts may not be as harmful as younger flukes or that flukes were being eliminated from the ducts (Ferre *et al.*, 1995). GGT may remain elevated even at 18 weeks p.i. (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

We found no bilirubinaemia. Bilirubinaemia has only been reported occasionally in both the parenchymal and biliary stage (Ferre *et al.*, 1995; Behm *et al.*, 1999). In cholestatic patients, serum bilirubin was slightly elevated, although higher levels have been reported (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999). A biliary colic is usually followed by a higher level of serum bilirubin as well as dark bilirubin-positive urine.

In our study, a positive correlation of GGT vs fluke burden and vs parasitic biomass was found and the increased AP became an indicator of cholestasis. In absence of hyperbilirubinaemia, it is indicative of an infiltrative tumoral, cystic, or granulomatose liver lesion, focally affecting the liver excretory function, or of primary biliary cirrhosis. Furthermore, AP showed a negative correlation with time, revealing protein deficiency.

As already commented, hipertransaminasemia or normal AST and ALT has been described in human Fascioliasis (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999). Similar to our results, AP has been described elevated in the

parenchymal phase. In 37 patients infected with *F. hepatica* (Mas-Coma *et al.*, 2001) presented anicteric cholestasis (AP and GGT between two and threefold the normal level) and 11 showed cytolysis (AST and ALT between two- and fivefold the normal level) (Dauchy *et al.*, 2007). In other patients, AST and ALT were 2–3 times the upper limit, while GGT was 4–6 times greater. Total bilirubin and direct bilirubin were 3–7 times and 10–15 times above the upper limit, respectively (Gulsen *et al.*, 2006). In cholestatic patients, AST, ALT, GGT and AP were statistically higher than in non-cholestatic patients (El-Shazly *et al.*, 2008).

6.5.2. SERUM ELECTROLYTES

Our results showed hypercalcemia and hypophosphatemia in the acute phase and hypocalcemia, hypochloremia and hypophosphatemia in the chronic phase.

Previous studies described glomerulopathy in buffaloes, probably mediated by immune-complex deposits (Marques *et al.*, 2004). In cattle and sheep, assays showed circulating immune complex values elevated at 6–8 weeks p.i., coinciding with increased *Fasciola* specific circulating antibodies (Langley & Hillyer, 1989). Furthermore, a seric phosphorus decrease in *F. hepatica* infected calves may be attributed to the decrease in appetite and food intake. Similar to our results in the chronic phase, mean values of sodium and calcium were significantly lower in infected deer (Vengust *et al.*, 2003). Calcium and phosphorus reduction is in agreement with previous work (Enigk *et al.*, 1972). In goats infected with 300 *F. gigantica*

metacercariae, serum potassium, chlorine and bicarbonate did not show any significant differences, but lower sodium and calcium levels were found (Mbuh & Mbwaye, 2005).

6.5.3. PROTEIN METABOLISM

Our results showed a decrease of Ure and Cre in the chronic phase. Although several studies observed no effect on Ure (Sykes *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1977) in *F. hepatica*-infected sheep a lower Ure has been described (Matanovic *et al.*, 2007). Decreased Cre has also been described (Matanovic *et al.*, 2007). Ure was found to be increased in *F. gigantica*-infected goats over 15 weeks p.i. (Mbuh & Mbwaye, 2005).

6.5.4. PLASMA PROTEINS

In *F. gigantica*-infected humans, slight and high albuminuria have been described during the migratory and terminal phases, respectively (Stemmermann, 1953). In sheep and calves, hypoalbuminaemia occurs due to reduced Alb synthesis (Anderson *et al.*, 1977; Vengust *et al.*, 2003). Our results showed a progressive loss of Alb when flukes start blood feeding, agreeing with previous data (Anderson *et al.*, 1977; Behm & Sangster, 1990). Nevertheless, lower Alb levels become significant from 20 weeks p.i. in both *Fasciola*-infected groups. Hypoalbuminaemia is commonly found during subacute and chronic fascioliasis in sheep (Sykes *et al.*, 1980) and cattle

(Anderson *et al.*, 1977). In humans, serum globulin was frequently elevated in the obstructive phase, while Alb decreased (Chen & Mott, 1990).

Our results showed lower T-Pro from 20–24 weeks p.i. In cattle, increases of T-Pro and serum globulin were observed (Anderson *et al.*, 1977; Eckert *et al.*, 1977). In agreement with our results, and contrary to previous research, a T-Pro decrease was detected in deer (Vengust *et al.*, 2003), probably related to chronicity.

6.5.5. CARBOHYDRATE METABOLISM

In livestock Fascioliasis, disruption of the carbohydrate metabolism causes a serious impairment of animal productivity and growth.

In our study, both infected groups did not show differences in Glu. Liver glycogen reduction leads to serum Glu reduction and increased free fatty acid mobilization (Phiri *et al.*, 2007). Decreased Glu has been reported in sheep at 6–22 weeks p.i. (Phiri *et al.*, 2007).

In our experiment, both infected groups displayed lower Amy at 20–24 weeks p.i. In humans, Amy may be within normal limits, or elevated caused by pancreatitis (Kaya *et al.*, 2011). It has been suggested that eggs cause obstruction at the papillae leading to pancreatitis, and hence pancreatitis risk becomes proportional to worm load (Maroy *et al.*, 1987). In a human infection causing acute pancreatitis complicated by biliary sepsis, AST, ALT, T-Bil, direct bilirubin, AP, serum Amy and lipase were increased (Badalov *et al.*, 2009).

6.5.6. HEPATIC METABOLISM OF LIPIDS

In our study, T-Cho was higher from 20 weeks p.i. onwards. The liver plays a dominant role in the homeostasis of serum cholesterol. A cholesterol increase is associated with an obstructive lesion of the bile duct and defective fat digestion. Previous studies indicated time-course dependent increased or decreased lipid and lipoprotein fractions in sheep. At day 0 pre-treatment and 28 post-treatment, cholesterol, Trigly, and high, low and very low density lipoprotein (HDL, LDL, VLDL) values were lower (Kozat & Denizhan, 2010). In goats infected with 300 *F. gigantica* metacercariae, T-Cho and Trigly increased throughout 15 weeks (Mbuh & Mbwaye, 2005). Nevertheless, another study in sheep infected with 200 metacercariae reported no changes in Ure, Cre and cholesterol over 14 weeks p.i. (Jemli *et al.*, 1993).

In Egyptian patients, Trigly and VLDL increased, while T-Cho, HDL cholesterol and LDL cholesterol decreased (Osman *et al.*, 1995). In chronicity studies, triglyceride levels were higher and T-Cho lower in cholestatic than in non-cholestatic patients (El-Shazly *et al.*, 2008).

6.5.7. INFLAMMATION

In our experiment, higher time-course dependent CRP was detected 4–14 weeks p.i. The inflammatory reaction in duct walls results in increasing fibrosis, particularly in cattle. The main difference between cattle and sheep Fascioliasis is the pronounced formation of fibrotic tissue in the liver and bile-duct walls in cattle.

Likewise, in humans, flukes digest hepatic tissue and cause extensive parenchymal destruction with haemorrhages and inflammation. Inflammation, hyperplasia and hypertrophy of the bile duct epithelia may induce periductal fibrosis (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma *et al.*, 1999). Higher CRP has been described in the acute phase of human Fascioliasis (Dauchy *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

The present research aims at making a comparative study of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in Guirra sheep. As we have discussed above, and from the experimental point of view, this is the first time that a physiopathogenicity study comparing *F. hepatica* and *F. gigantica* is made, standardised in the same host animal model, which has allowed the acquisition of significant results. In other experiments, it has been seen that the Guirra sheep bred is susceptible to *F. hepatica* and *F. gigantica* infection. Therefore, this suggests that the Guirra sheep is an appropriate host animal model for comparative studies. Moreover, this is the longest experimental study performed to date, specifically 24 weeks, which allows a chronological long-term analysis of the oscillations of biochemical parameters.

The conclusions obtained from our work are listed below.

1. With regard to *Fasciola* species, our experiment highlights several relevant aspects.

- Using an experimental model of primo-infection and *F. gigantica* and *F. hepatica* standard specimens, *F. gigantica* is more pathogenic than *F. hepatica*, contrary to previous literature referring to the higher pathogenicity of *F. hepatica*. According to our study, this is due, in part, to the bigger size of *F. gigantica*.

7. CONCLUSIONS

- The pathogenecity markers analyzed in Fascioliasis show dynamics depending on the phases of the disease (acute and chronic) and the *Fasciola* species, affecting the entire host systems analyzed along time.
- In the same model, *F. gigantica* shows a delayed development of 1-2 weeks, which, in turn, delays the beginning of egg laying and, therefore, the beginning of the biliary or chronic phase of the disease. As observed in our experiment, this entails biochemical marker profile modifications in both, the acute and the chronic period.
- The results of this experiment help to shed more light on the physiopathogenicity of *F. gigantica* allowing a first extrapolation to the human host, both in the acute and chronic phases of the disease.

2. With the present study, it is possible to encourage physicians and health officers in *F. gigantica* human endemic areas of Africa and Asia to publish case reports of patients infected by *F. gigantica* following the anamnesis, and with fluke adult or egg size measurements (obtained by any invasive method). All these aspects are important to progressively increase physiopathogenic details, to be able, at some point, to design a complete biochemical marker scheme for *F. gigantica* infection in humans. This scheme could help physicians to diagnose their patients, mainly in cases in which no eggs appear, due to the very low burden, or low or inconstant shedding. We must remember that the precocity of the diagnosis and subsequent quick appropriate treatment is crucial in fascioliasis to avoid future disease complications and sequelae.

3. Regarding diagnosis, there are overlap areas where intermediate forms between *F. hepatica* and *F. gigantica* are found, giving rise to

situations in which the fasciolid species cannot be established or only with difficulties. The results of the present study indicate that, regarding the higher physiopathogenicity, fluke size and total fluke biomass of *F. gigantica* are the main parameters to be considered, instead of the very similar genetic characteristics of the two fasciolid species. Hence, knowing the size of eggs shed by patients or the size of adults found in patients by surgery is important. And, it must be kept in mind that neither serological nor coproantigen diagnostic techniques are able to differentiate between the two fasciolid species.

Considering the results obtained in our studies, using an experimental model including primo-infection and standard specimens of *F. hepatica* and *F. gigantica*, the analysis of the comparison of analytical markers in the case of more complex experimental models reflecting different scenarios in human endemic areas remains a field to be studied.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAPHY

A

1. Abdel-Rahman (S.), O'Reilly (K.L.) & Malone (J.B.), 1998.- Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 533-537.
2. Acosta-Ferreira (W.), Vercelli-Retta (J.) & Falconi (L.M.), 1979.- *Fasciola hepatica* human infection. Histopathological study of sixteen cases. *Virchows Archiv-An International Journal of Pathology*, 383: 319-327.
3. Afshan (K.), Valero (M.A.), Qayyum (M.), Peixoto (R.V.), Magraner (A.) & Mas-Coma (S.), 2013.- Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab, Pakistan. *Journal of Helminthology*, 88: 417-426.
4. Afshan (K.), Fortes-Lima (C.A.), Artigas (P.), Valero (A.M.), Qayyum (M.) & Mas-Coma (S.), 2014.- Impact of climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and seasonality of human and animal fascioliasis in Pakistan. *Geospatial Health*, 8: 317-334.
5. Aguirre Errasti (C.), Merino Angulo (J.), Flores Torres (M.) & De los Ríos (A.), 1981.- Unusual forms of *Fasciola hepatica* infestation. Report two cases. *Medicina Clinica (Barcelona)*, 76: 125-128.
6. Ahasan (S.A.), Valero (M.A.), Chowdhury (E.H.), Islam (M.T.), Islam (M.R.), Hussain Mondal (M.M.), Peixoto (R.V.), Berinde (L.), Panova (M.) & Mas-Coma (S.), 2016.- CIAS detection of *Fasciola hepatica*/*F. gigantica* intermediate forms in bovines from Bangladesh. *Acta Parasitologica*, 61: 267-277.

8. BIBLIOGRAPHY

7. Ai (L.), Chen (M.), Alasaad (S.), Elsheikha (H.), Li (J.), Li (H.), Lin (R.), Zou (F.), Zhu (X.), 2011.- Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches. *Parasites & Vectors*, 4: 101.
8. Al-Habbib (W.M.S.), 1974.- The effect of constant and changing temperatures on the development of the larval stages of *Fasciola hepatica* L. PhD Thesis. University of Dublin, 191 pp.
9. Alcaíno (H.) & Apt (W.) 1989.- Algunos antecedentes sobre la fasciolosis animal y humana. *Monografías Medicina Veterinaria*, 11: 14-29.
10. Almazán (C.), Ávila (G.), Quiroz (H.), Ibarra (F.), & Ochoa (P.), 2001.- Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigen in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 97: 101-112.
11. Alonso (N.E.V.), De la Barca (N.D.C.) & Morales (O.Q.), 2013.- Fasciolosis hepatica. Presentación de un paciente. *Acta Médica del Centro*, 7: 69-73.
12. Anderson (P.H.), Berrett (S.), Brush (P.J.), Hebert (C.N), Parfitt (J.W.) & Patterson (D.S.), 1977.- Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Veterinary Record*, 15: 43-45.
13. ANGUIRRA, 2009.- Asociación Nacional de Criadores de Raza Guirra, Enguera, Valencia, Spain, 2009. Disponible en: <http://www.anguirra.com/> [accessed 27 August 2015]
14. Apt (W.), Aguilera (X.), Vega (F.), Miranda (C.), Zulantay (I.), Pérez (C.), Gabor (M.) & Apt (P.), 1995.- Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazol: drug efficacy and serologic response. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52: 532-535.

15. Arias (M.), Dapena (D.), Lema (M.) & Noya (M.), 1986.- Fascioliasis ectópica múltiple: descripción de un caso con afección pulmonar, meningoencefálica y orbitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 4: 250-251.
16. Arjona (R.), Riancho (J.A.), Aguado (J.M.), Salesa (R.) & González-Macias (J.) 1995.- Fascioliasis in developed countries: a review of classic and aberrant forms of disease. *Medecine (Baltimore)*, 74: 13-23.
17. Ashrafi (K.) & Mas-Coma (S.), 2014.- *Fasciola gigantica* transmission in the zoonotic fascioliasis endemic lowlands of Guilan, Iran: Experimental assessment. *Veterinary Parasitology*, 205: 96-106.
18. Ashrafi (K.), Valero (M.A.), Massoud (J.), Sobhani (A.R.), Soleymani-Mohammadi (S.), Conde (P.), Khoubbane (M.), Bargues (M.D.) & Mas-Coma (S.), 2006a.- Plant-borne human contamination by fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 295-302.
19. Ashrafi (K.), Valero (M.A.), Panova (M.), Periago (M.V.), Massoud (J.), & Mas-Coma (S.), 2006b.- Phenotypic analysis of adults of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran. *Parasitology International*, 55: 249-260.
20. Ashrafi (K.), Valero (M.A.), Qayyum (M.), Peixoto (R.V), Maagraner (A.) & Mas-Coma (S.), 2013.- Phenotypes of intermediate forms of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in buffaloes from Central Punjab. *Journal of Helminthology*, 88: 417-426.
21. Ashrafi (K.), Bargues (M.D.), O'Neill (S.) & Mas-Coma (S.), 2014.- Fascioliasis, a worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12: 636-649.

22. Ashrafi (K.), Valero (M.A.), Peixoto (R.V.), Artigas (P.), Panova (M.) & Mas-Coma (S.), 2015.- Distribution of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in the endemic area of Guilan, Iran: relationship between zonal overlap and phenotypic traits. *Infection, Genetics and Evolution*, 31: 95-109.
23. Audousset (J.C.), Rondeleau (D.), Dreyfuss (G.) & Vareille-Morel (C.), 1989.- Les émissions cercariennes de *Fasciola hepatica* L. chez le mollusque *Lymnaea truncatula* Müller. A propos de quelques observations chronobiologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7: 217-224.

B

24. Badalov (N.L.), Anklesaria (A.), Torok (A.), Wall (I.M.), Braha (J.), Li (J.), Iswara (K.) & Tenner (S.), 2009.- *Fasciola hepatica* causing acute pancreatitis complicated by biliary sepsis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 70: 386-387.
25. Bargues (M.D.), 1986.- Contribución al conocimiento de la evolución de los Digénidos de la familia Brachylamidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda: Brachylamidae) a nivel de Molusco Gasterópodo primer hospedador intermediario. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 968 pp.
26. Bargues (M.D.), Funatsu (I.R.), Oviedo (J.A.) & Mas-Coma (S.), 1996.- The human host, a viable definitive host for *Fasciola hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. *Parasitologia*, 38: 252.
27. Bargues (M.D.), Vigo (M.), Horak (P.), Dvorak (J.), Patzner (R.A.), Pointier (J.P.), Jackiewicz (M.), Meier-Brook (C.) & Mas-Coma (S.), 2001.- European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate

- hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 1: 85-107.
28. Bargues (M.D.), Artigas (P.), Mera y Sierra (R.L.), Pointier (J.P.) & Mas-Coma (S.), 2007.- Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix*, and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101: 621-641.
29. Bargues (M.D.), Artigas (P.), Khoubbane (M.), Flores (R.), Gloër (P.), Rojas-García (R.), Ashrafi (K.), Falkner (G.) & Mas-Coma (S.), 2011.- *Lymnaea schirazensis*, an overlooked snail distorting Fascioliasis data: genotype, phenotype, Ecology, worldwide spread, susceptibility, applicability. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6: e24567.
30. Bargues (M.D.), Gayo (V.), Sanchís (J.), Artigas (P.), Khoubbane (M.), Birriel (S.) & Mas-Coma (S.), 2017.- DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11: e0005352.
31. Bauchart (D.), Gruffat (D.) & Durand (D.), 1996.- Lipid absorption and hepatic metabolism in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society Journal*, 55: 39-47.
32. Beaver (P.C), Jung (R.C.) & Cupp (E.W.), 1986.- Parasitología Clínica. Salvat Editores, Barcelona, 427 pp.
33. Behm (C.A.) & Sangster (N.C.), 1999.- Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton (J.P.) (editor), Fasciolosis. Wallingford, Oxon CAB International Publishing, 185-224 pp.

8. BIBLIOGRAPHY

34. Blood (D.C.), Radostits (O.M.), Arundel (J.H.) & Gay (C.C.), 1989.- Diseases caused by helminth parasites. In: Tindall (B.) (editor), *Veterinary medicine*. 7th ed, London; Toronto, 1016-1028 pp.
35. Boch (J.) & Supperer (R.), 1982.- *Parasitología en Medicina Veterinaria*. Editorial hemisferio Sur, S.A., Buenos Aires, 627 pp.
36. Boissier (J.), Mome (H.), Mitta (G.), Bargues (M.D.), Molyneux (D.) & Mas-Coma (S.), 2015.- Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infectious Diseases*, 15: 757-758.
37. Boray (J.C.), 1969.- Experimental fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology*, 8: 95-210.
38. Boray (J.C.), 1981.- Fasciolosis and other trematode infections. I. Recent advances in research on *Fasciola* and other trematodes of animals. In: Slusarsky (W.) (editor), *Review of Advances in Parasitology*. PWN- Polish Scientific Publishers, Warszawa, 317-339 pp.
39. Boray (J.C.), 1982.- Fasciolosis. Handbook series in zoonoses. C.R.C. Press, Inc. (Hiller & Hopla editors), Florida, 77-88 pp.
40. Borchet (A.), 1981.- *Parasitología veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza, 745 pp.
41. Bookstein (F.L.), 1989.- Size and shape: a comment on semantics. *Systematic Zoology Journal RG Impact & Description*, 38: 173-180.
42. Bouix-Busson (D.), Rondelaud (D.) & Combes (C.), 1985a.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Étude des lésions de la glande digestive et du rein chez les jeunes mollusques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 571-585.

43. Bouix-Busson (D.), Rondelaud (D.) & Combes (C.), 1985b.- L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. Étude comparative des lésions présentées par la gonade et la glande de l'albumine chez les jeunes mollusques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 587-599.
44. Bouix-Busson (D.), Rondelaud (D.) & Combes (C.), 1985c.- *Fasciola hepatica* L.: étude des facteurs influençant la durée de la période prépatente chez *Lymnaea glabra* Müller. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 5-10.
45. Bourée (P.) & Thiebault (M.), 1993.- Fasciolose à *Fasciola hepatica* en Basse Normandie de 1980 à 1990. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 11: 79-84.
46. Braun (J.P.), Benard (P.), Burgat (V.) & Rico (A.G.), 1983.- Gamma glutamyl transferase in domestic animals. *Veterinary Research Communications*, 6: 77-90.
47. Bulgin (M.S.), Anderson (B.C.), Hall (R.F.) & Lang (B.Z.), 1984.- Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in cattle with induced fascioliasis. *Research in Veterinary Science*, 37: 167-171.
48. Busson (P.), Busson (D.), Rondeleaud (D.) & Pestre-Alexandre (M.), 1982.- Données expérimentales sur l'infestation des jeunes de cinq espèces de Limnées par *Fasciola hepatica* L. *Annales De Parasitologie Humaine et Comparee*, 57: 555-563.

C

49. Campbell (A.J.), Sheers (M.), Moore (R.J.), Edwards (S.R.) & Montague (P.E.), 1981.- Proline biosynthesis by *Fasciola hepatica* at

8. BIBLIOGRAPHY

- different developmental stages in vivo and vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3: 91-101.
50. Canbay (A.), Bechmann (L.) & Gerken (G.), 2007.- Lipid metabolism in the liver. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 45: 35-41.
51. Carlson (S.P.), 2002.- Clinical chemistry tests. In: Smith (B.P.) (editor). Large Animal Internal Medicine. 3rd Edition, St. Louis, USA: Mosby Co., 385 pp.
52. Carrada-Bravo (T.) & Martínez (J.R.E.), 2005.- Fasciolosis. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 52: 83-96.
53. Carrique-Mas (J.J.) & Bryant (J.E), 2013.- A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam. *EcoHealth*, 10: 465-489.
54. Castellanos (Z.A.) & Landoni (N.A.), 1981.- La Familia Lymnaeidae Rafinesque, 1815 en la Argentina. En: Ringuelet (R.A.) (Editor), Fauna de agua dulce de la Argentina. Profadu, Conicet, Buenos Aires, Argentina, 55-81 pp.
55. Chang (E.C.), Choi (H.L.), Park (Y.W.), Kong (Y.) & Cho (S.Y.), 1991.- Subcutaneous fascioliasis: a case report. *Korean Journal Parasitology*, 29: 403-405.
56. Chapman (R.W.), 1999.- Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Annals of Oncology*, 10: 308-311.
57. Chen (M.G.) & Mott (K.E.), 1990.- Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin Journal*, 87: 1-38.
58. Chen (J.X.), Chen (M.X.), Ai (L.), Xu (X.N.), Jiao (J.M.), Zhu (T.J.), Su (H.Y.), Zang (W.), Luo (J.J.), Guo (Y.H.), Lv (S.) & Zhou (X.N.), 2013.- An

outbreak of human Fascioliasis gigantica in Southwest China. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8: e71520.

59. Chitchang (S.), Mitarnum (W.) & Ratananikom (N.), 1982.- *Fasciola hepatica* in human pancreas, a case report. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 65: 345-349.
60. Cho (S.Y.), Yang (H.N.), Kong (Y.), Kim (J.C.), Shin (K.W.) & Koo (B.S.), 1994.- Intraocular fascioliasis: a case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 349-353.
61. Cohen (M.E.), Slezak (L.), Wells (C.K.), Andersen (D.K.) & Topazian (M.), 2001.- Prediction of bile conduct stones and complications in gallstone pancreatitis using early laboratory trends. *American Journal of Gastroenterology*, 96: 3305-3311.
62. Coles (E.H.), 1986.- *Veterinary Clinical Pathology*. 4th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 17-19 pp.
63. Cordero del Campillo (M.), Rojo (F.), Sánchez (C.), Hernández (S.), Navarrete (J.) & Diaz (P.), 1999.- *Parasitología Veterinaria*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana, 935 pp.
64. Couraud (L.), Raynal (J.), Meunier (J.M.), Champeil (A.) & Vergnolle (M.), 1975.- Un cas de distomatose pulmonaire autochtone. *Revue des Maladies Respiratoires*, 3: 579-588.
65. Curtale (F.), Hassanein (Y.), Barduagni (P.), Yousef (M.), Wakeel (A.), Hallaj (Z.) & Mas-Coma (S.), 2007.- Human fascioliasis infection: gender difference within school-age children from endemic areas of the Nile Delta, Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 155-60.

D

66. Dalimi (A.) & Jabarvand (M.), 2005.- *Fasciola hepatica* in the human eye. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99: 798-800.
67. Dauchy (F.A.), Vincendeau (P.) & Lifermann (F.), 2006.- Eight cases of fascioliasis: clinical and microbiological features. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36: 42-46.
68. Dauchy (F.A.), Laharie (D.), Neau (D.), Lifermann (F.), Dupon (M.) & Malvy (D.), 2007.- Distomatose à *Fasciola hepatica*: étude rétrospective sur 23 ans au CHU de Bordeaux. *Presse Médicale*, 36: 1545-1549.
69. Dawes (B.), 1960a.- Penetration of the liver fluke, *Fasciola hepatica* into the snail *Lymnaea truncatula*. *Nature*, 185: 51-52.
70. Dawes (B.), 1960b.- The penetration of *Fasciola hepatica* into *Lymnaea truncatula* and of *Fasciola gigantica* into *Lymnaea auricularia*. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 9-10.
71. Dawes (B.) & Hugues (D.L.), 1964.- Fasciolosis: the invasive stages in mammals. *Advances in Parasitology*, 15: 97-168.
72. Dawes (B.) & Hugues (D.L.), 1970.- Fasciolosis: the invasive stages in mammals. *Advances in Parasitology*, 8: 259-274.
73. Dixon (K.E.), 1964.- Excystement of metacercariae of *Fasciola hepatica* L. in vitro. *Nature*, 202: 1240-1241.
74. Dixon (K.E.), 1965.- The structure of the cyst wall of the metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 55: 215-226.

75. Dixon (K.E.), 1968.- Encystment of the cercaria of *Fasciola hepatica*. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 14: 689-701.
76. Donnelly (B.) & Hederman (W.P.), 1977.- Liver fluke in the common bile duct. *Irish Medical Journal*, 70: 507-509.
77. Dreyfuss (G.) & Rondelaud (D.), 1994.- Comparative study of cercarial shedding by *Lymnaea tormentosa* Pfeiffer, infected with either *Fasciola gigantica* Cobbold or *F. hepatica* Linne. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 12: 43-54.
78. Dujardin (J.P.) & Le Pont (F.), 2004.- Geographical variation of metric properties within the neotropical sandflies. *Infection, Genetics and Evolution*, 4: 353-359.
79. Dujardin (J.P.), Schofield (C.J.) & Panzera (F.), 2002.- Les vecteurs de la maladie de Chagas. Reserches taxonomiques, biologiques et génétiques. Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles (Belgique), 189 pp.
80. Dumenigo (B.E.), Espino (A.M.) & Finlay (C.M.), 1996.- Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle feces by a monoclonal antibodybased sandwich immunoassay. *Research in Veterinary Science*, 60: 278-279.
81. Dung (B.T.), Doanh (P.N.), The (D.T.), Loan (H.T.), Losson (B.) & Caron (Y.), 2013.- Morphological and molecular characterization of Lymnaeid Snails and their potential role in transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. *Korean Journal of Parasitology*, 51: 657-662.

E

82. Eckert (J.), Keller (H.), Hosli (J.) & Hess (U.), 1977.- Subacute Fasciolyse beim Rind. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*, 119: 135-148.
83. El-Shazly (A.M.), El-Desoky (I.) & El-Feky (A.), 1991.- A case of ectopic fascioliasis in a farmer from Mansoura City, Dakahlia, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 21: 333-335.
84. El-Shazly (A.M.), Azab (M.S.), El-Beshbishi (S.N), Sakr (T.I), El-Fayoumy (K.N.), El-Ghareeb (A.S.), Hafez (A.O.) & El Sherbini (E.T.), 2008.- Biochemical parameters in chronic fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 38: 977-990.
85. Enigk (K.) & Hildebrandt (J.), 1964.- Zur Lebensdauer der Metacercarien von *Fasciola hepatica* im Heu. *Tierärztliche Rundschau*, 19: 592-599.
86. Enigk (K.), Feder (H.), Dey-Hazra (A.) & Weingärtner (E.), 1972.- Mineral content of blood plasma, erythrocytes and liver during the prepatent period of fascioliasis in cattle. *Zentralbl Veterinarmed*, 19: 238-257.
87. Espino (A.M.), Díaz (A.), Pérez (A.) & Finlay (C.M.), 1998.- Dynamics of antigenemia and coproantigens during a human *Fasciola hepatica* outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2723-2726.

F

88. Facey (R.) & Marsden (P.), 1960.- Fasciolosis in man: an outbreak in Hampshire. *British Medical Journal*, 2: 619-625.
89. Fairweather (I.), Threadgold (L.T.) & Hanna (R.E.), 1999.- Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. In: Dalton (J.P.) (editor), Fasciolosis. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 47-111 pp.
90. Fentie (T.), Erqou (S.), Gedefaw (M.) & Desta (A.), 2013.- Epidemiology of human fascioliasis and intestinal parasitosis among schoolchildren in Lake Tana Basin, northwest Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107: 480-486.
91. Ferre (I.), López (P.) & Gonzalo-Orden (M.), 1995.- The effects of subclinical fasciolosis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitology Research*, 81: 127-131.
92. 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. *Veterinary Parasitology*, 68: 261-267.
93. Foster (J.R.), 1981.- A study of the initiation of biliary hyperplasia in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 83: 253-258.

G

94. Gajewska (A.), Smaga-Kozłowska (K.) & Wisniewski (M.), 2005.- Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica*. *Wiadomości Parazytologiczne*, 1: 115-123.

8. BIBLIOGRAPHY

95. Galtier (P.), Larrieu (G.), Tufenkji (A.E.) & Franc (M.), 1986.- Incidence of experimental fascioliasis on the activity of drug-metabolizing enzymes in lamb liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 14: 137-141.
96. García (R.), Arrese (J.E.), Ugarte (G.) & Piérard (G.E.), 2004.- The clinical case of the month. Cutaneous fascioliasis. *Revue Médicale de Liège*, 59: 552-554.
97. García-Bodelón (M.A.), 2009.- Estudio de la patología y la respuesta inmunológica de la fasciolosis crónica avanzada en el modelo experimental murino Wistar. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 217 pp.
98. García-Rodríguez (J.A.), Martín-Sánchez (A.M.), Fernández-Gerostarzu (J.M.) & García-Luís (E.J.), 1985.- Fascioliasis in Spain: a review of the literatura and personal observations. *European Journal of Epidemiology*, 1: 121-126.
99. Gil-Benito (A.), 1994.- La fascioliasis humana en la isla de Córcega. Tesis Doctoral. Facultat de Medicina y Odontologia, Universitat de València, 326 pp.
100. Gil-Benito (A.), Ciolkovitch (A.), Mas-Coma (S.) & Quilici (M.), 1991.- Enquête sur la distomatose à *Fasciola hepatica* en Corse. *Méditerranée Médicale (Marseille)*, 403: 21-25.
101. Gironés (N.), Valero (M.A.), García-Bodelón (M.A.), Chico-Calero (I.), Punzón (C.), Fresno (M.) & Mas-Coma (S.), 2007.- Immune supression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, 195: 1504-1512.
102. Gulsen (M.T.), Savas (M.C.), Koruk (M.), Kadayifci (A.) & Demirci (F.), 2006.-Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *Netherlands Journal of Medicine*, 64: 17-19.

H

- 103.** Hardman (E.W.), Jones (R.L.H.) & Davies (A.H.), 1970.- Fascioliasis: a large outbreak. *British Medical Journal*, 3: 502-505.
- 104.** Haro (I.), 2004.- Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad. In: Becerril Flores (M.A.) & Romero Cabello (R.) (editores), Fasciolosis. México, Mc Graw-Hill Interamer, 157-163 pp.
- 105.** Haro (I.), 2016.- Fasciolosis. In: Becerril Flores (M.A.) (editor), Parasitología médica. México, Mc Graw-Hill Interamer, 209-215 pp.
- 106.** Haseeb (A.N.), El Shazly (A.M.), Arafa (M.A.) & Morsy (A.T.), 2002.- A review on Fascioliasis in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32: 317-354.
- 107.** Hillyer (G.V.) & Apt (W.), 1997.- Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitology Today*, 13: 87-88.
- 108.** Hope Cawdery (M.J.), Gettinby (G.) & Grainger (J.N.R.), 1978.- Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. In: Weather and Parasitic Animal Disease. *World Meteorological Organisation Technical*, 159: 21-38.
- 109.** Hosamirudsari (H.) & Roudsari (Y.J), 2015.- *Fasciola hepatica* an Unusual Cause of Chronic Cholecystitis. *International Journal of Infection*, 2: e23108.
- 110.** Hung (N.M.) & Dung (D.T.), 2011.- Controlling helminthiasis period 2006-2010 and study in next period 2011-2015 in Vietnam. *Bulletin of the National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology*, 2: 7-15.

- 111.** Ibarra (F.), Vera (Y.), Munguía (J.), 2011.- Epidemiología de la fasciolosis animal y humana. En: Quiroz (R.), Figueroa (C.), Ibarra (V.) & López (A.) (editores). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Capítulo 9. México, DF: AMPAVE, 137-172 pp.
- 112.** Irving (J.A.), Spithill (T.W.), Pike (R.N.), Whisstock (J.C.) & Smooker (P.), 2003.- The evolution of enzyme specificity in *Fasciola* spp. *Journal of Molecular Evolution*, 57: 1-15.
- 113.** Irwin (W.B.) & Threadgold (L.T.), 1972.- Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. X. Egg formation. *Experimental Parasitology*, 31: 321-331.
- 114.** Itagaki (T.) & Tsutsumi (K.I.), 1998.- Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationship between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *International Journal for Parasitology*, 28: 777-781.
- 115.** Itagaki (T.), Sakamoto (T.), Tsutsumi (Y.) & Itagaki (H.), 1994.- Infectivity of three species of *Fasciola* to Wistar rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 977-979.
- 116.** Isseroff (H.), Tunis (M.) & Read (C.P.), 1972.- Changes in amino acids of bile in *Fasciola hepatica* infections. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 41: 157-163.
- 117.** Isseroff (H.), Sawma (J.T.) & Reino (D.), 1977.- Fasciolosis: role of proline in bile duct hyperplasia. *Science*, 198: 1157-1159.

J

- 118.** Janssens (P.G), Fain (A.), Limbos (P.), De Muynck (A.), Biemans (R.), Van Meirvenne (N.) & De Mulder (P.), 1968.- Trois cas de distomatose hépatique à *Fasciola gigantica* contractés en Afrique centrale. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 48: 637-650.
- 119.** Jemli (M.H.), Braun (J.P.), Dorchies (P.), Romdhane (M.N.) & Kilani (M.), 1993.- Exploration biochimique et hématologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 169: 241-249.
- 120.** Jennings (F.W.), 1976.- The anaemias of parasitic infections. In: Soulsby (E.J.) (editor), *Pathophysiology of Parasitic Infection*. Academic Press, Nueva York, 41-67 pp.
- 121.** Jha (A.K.), Goenka (M.K.), Goenka (U.) & Chakrabarti (A.), 2013.- Hepatobiliary fascioliasis in non-endemic zones: a surprise diagnosis. *Arab Journal of Gastroenterology*, 14: 29-30.

K

- 122.** Kaya (M.), Beştaş (R.) & Çetin (S.), 2011.- Clinical presentation and management of *Fasciola hepatica* infection: single-center experience. *World Journal of Gastroenterology*, 17: 4899-4904.
- 123.** Keegan (P.S.) & Trudgett (A.), 1992.- *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. *Parasite Immunology*, 14: 657-669.

8. BIBLIOGRAPHY

124. Khorsandi (H.O.), 1977.- Obstructive jaundice due to *Fasciola hepatica*. Report of two cases. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 70: 626-628.
125. Khoubbanne (M.), 2002.- Fascioliasis humana y animal en Egipto e Irán. Caracterización biológica y molecular de las especies parásitas implicadas y de sus moluscos hospedadores intermediarios. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 332 pp.
126. Kim (Y.T.), Byun (J.S.), Kim (J.), Jang (Y.H.), Lee (W.J.), Ryu (J.K.), Kim (S.W.), Yoon (Y.B.) & Kim (C.Y.), 2003.- Factors predicting concurrent cholangiocarcinomas associated with hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology*, 50: 8-12.
127. Klingenberg (C.P.), 1996.- Multivariate allometry. In: Marcus (L.F.), Corti (M.), Loy (A.), Naylor (G.J.) & Slice (D.) (editors), *Advances in Morphometrics. Proceedings of the 1993 NATO-ASI on Morphometrics*, NATO ASI, Ser. A, Life Sciences. Plenum Publishers, New York, 23-49 pp.
128. Kozat (S.) & Denizhan (V.), 2010.- Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 96: 657-659.
129. Krauth (S.J.), Musard (C.), Traorec (S.I.), Zinsstaga (J.), Achic (L.Y.), N'Goranc (E.K.) & Utzinger (J.), 2015.- Access to, and use of, water by populations living in a schistosomiasis and fascioliasis co-endemic area of northern Côte d'Ivoire. *Acta Tropica*, 149: 179-185 pp.
130. Kucharz (E.J), 2011.- *The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH and Co., 430 pp.

L

131. Langley (R.J.) & Hillyer (J.V.), 1989.- Detection of circulating parasite antigen in murine fascioliasis by two-site enzyme-linked immunosorbent assays. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 472-478.
132. Lapage (G.), 1968.- Some parasitic trematode in farm animals. In: Lapage (G.) (editor), *Veterinary Parasitology*. Oliver and Boyd publishers, Edinburg and London, 329-345 pp.
133. Larkin (M.), Blackshields (G.), Brown (N.), Chenna (R.), McGettigan (P.A.), McWilliam (H.), Valentin (F.), Wallace (I.M.), Wilm (A.), Lopez (R.), Thompson (J.D.), Gibson (T.J.) & Higgins (D.G.), 2007.- Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
134. 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. *Veterinary Parasitology*, 77: 103-114.
135. López (P.), Tuñón (M.J.), González (P.), Díez (N.), Bravo (A.M.) & González-Gallego (J.), 1993.- Ductular proliferation and hepatic secretory function in experimental fascioliasis. *Experimental Parasitology*, 77: 36-42.
136. López (M.O.), Pimentel (A.A.), Cruz (O.J.), López (A.M.), López (M.C.), López (M.E.) & López (S.M.), 2006.- Fasciolosis hepática diagnosticada en fase de estado. *Revista de Gastroenterología de México*, 71: 59-62.

M

137. Makay (O.), Gurcu (B.), Caliskan (C.), Nart (D.), Tuncyurek (M.) & Korkut (M.), 2007.- Ectopic fascioliasis mimicking a colon tumor. *World Journal of Gastroenterology*, 13: 2633-2635.
138. Mangos (P.) & Menzies (S.), 1973.- Human fascioliasis in Australia. *Medical Journal of Australia*, 1: 295-306.
139. Mango (A.), Mango (C.) & Esamal (D.), 1972.- A preliminary note on the susceptibility, prepatency and recovery of *Fasciola gigantica* in small laboratory animals. *Journal of Helminthology*, 46: 381-386.
140. MAPAMA, 2017.- Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente. Disponible en:
<http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/ovino/guirra/>
141. Marcilla (A.), Bargues (M.D.) & Mas-Coma (S.), 2002.- A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 327-333.
142. Maroy (B.), Moullot (P.), Daloubeix (H.) & Mathey (J.C.), 1987.- Pancreatite aigue compliquant une distomatose biliaire a *Fasciola hepatica* chez un patient porteur d'un diverticule choledocien. *Annals of Gastroenterology & Hepatology (Paris)*, 23: 67-70.
143. Marques (S.M), Scroferneker (M.L.) & Edelweiss (M.I.), 2004.- Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 123: 83-91.

- 144.** Martínez (R.S.), Domenech (I.C.), Millán (J.C.) & Pino (A.S.), 2012.- Fascioliasis, clinical-epidemiological review and diagnosis. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 50: 1.
- 145.** Mas-Coma (S.), 2004.- Human fascioliasis. In: Cotruvo (J.A.), Dufour (A.), Rees (G.), Bartram (J.), Carr (R.), Cliver (D.O.), Craun (G.F.), Fayer (R.) & Gannon (V.P.J.) (editors), World Health Organization (WHO), Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. IWA Publishing, London, UK, 305-322 pp.
- 146.** Mas-Coma (S.) & Bargues (M.D.), 1997.- Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, 57: 145-218.
- 147.** Mas-Coma (S.) & Bargues (M.D.), 2009.- Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*, 110: 112-136.
- 148.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.) & Esteban (J.G.), 1999.- Human Fasciolosis. In: Dalton (J.P.) (editor), Fasciolosis. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 411-434 pp.
- 149.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.), Marty (A.M.) & Neafie (R.C.), 2000.- Hepatic trematodiasis. In: Meyers (W.M.), Neafie (R.C), Marty (A.M.) & Wear (D.J) (editors), Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1. Helminthiasis, Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington DC, 69-92 pp.
- 150.** Mas-Coma (S.), Funatsu (I.R.) & Bargues (M.D.), 2001.- *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123: 115-127.
- 151.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.), Valero (M.A.) & Fuentes (M.V.), 2003.- Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the

8. BIBLIOGRAPHY

- very high altitude. In: Combes (C.) & Jourdane (J.) (editors), *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites*, vol. 2. Perpignan University Press, Perpignan, 81-123 pp.
- 152.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.) & Valero (M.A.), 2005.-Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1255-1278.
- 153.** Mas-Coma (S.), Valero (M.A.) & Bargues (M.D.), 2008.- Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 27: 443-457.
- 154.** Mas-Coma (S.), Valero (M.A.) & Bargues (M.D.), 2009a.- Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163: 264-280.
- 155.** Mas-Coma (S.), Valero (M.A.) & Bargues (M.D.), 2009b.- *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 69: 41-146.
- 156.** Mas-Coma (S.), Valero (M.A.) & Bargues (M.D.), 2014a.- Fascioliasis. In: Toledo (R.) & Fried (B.) (editors), *Digenetic Trematodes*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer-Verlag New York, 77-114 pp.
- 157.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.) & Valero (M.D.), 2014b.- Fascioliasis. In: Fabrizio (B.) (editor), *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer-Verlag Wien, Viena, 93-122 pp.
- 158.** Mas-Coma (S.), Agramunt (V.H.) & Valero (M.A.), 2014c.- Neurological and ocular fascioliasis in humans. *Advances in Parasitology*, 84: 27-149.

- 159.** Mas-Coma (S.), Bargues (M.D.) & Valero (M.A.), 2014d.- Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: Update for the present global scenario. *Parasitology*, 141: 1918-1946.
- 160.** Matanovic (K.), Severin (K.), Martinkovic (F.), Simpraga (M.), Janicki (Z.) & Barisic (J.), 2007.- Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 101: 1657-1661.
- 161.** Mbuh (J.V.) & Mbwaye (J.), 2005.- Serological changes in goats experimentally infected with *Fasciola gigantica* in Buea subdivision of S.W.P. Cameroon. *Veterinary Parasitology*, 13: 255-259.
- 162.** Meeusen (E.N.) & Piedrafita (D.), 2003.- Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *International Journal Parasitology*, 33: 1285–1290.
- 163.** Mekroud (A.), Chauvin (A.) & Rondelaud (D.), 2007.- Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fasciolosis in experimentally-infected sheep. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158: 437-441.
- 164.** 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). *Journal of Parasitology*, 90: 845-852.
- 165.** Mezo (M.), González-Warleta (M.) & Ubeira (F.M.), 2007.- The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *Journal of Parasitology*, 93: 65-72.
- 166.** Modavi (S.) & Isseroff (H.), 1984.- *Fasciola hepatica*: collagen deposition and other histopathology in the rat host's bile duct caused by the parasite and by proline infusion. *Experimental Parasitology*, 58: 239-244.

- 167.** Moretti (G.), Broustet (A.) & Amouretti (M.), 1971.- A propos d'un épanchement pleural relevant et résumant une distomatose à *Fasciola hepatica*. *Bordeaux Médicale*, 4: 1181-1187.
- 168.** Mulcahy (G.), Joyce (P.) & Dalton (J.P.), 1999.- Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In: Dalton (J.P.) (editor), Fasciolosis. CAB International Publishing, Wallingford, UK, 341-375 pp.

N

- 169.** Nyindo (M.) & Lukambagire (A.H.), 2015.- Fascioliasis: An Ongoing Zoonotic Trematode Infection. *BioMed Research International*, 8 pp.

O

- 170.** Olaechea (F. V.), 2004.- *Fasciola hepatica*. *Red de helmintología para América Latina y el Caribe*. Disponible en: <http://elygomez.aprenderapensar.net/files/2016/04/trematodes-y-cestodes.pdf>
- 171.** Olsen (O.W.), 1974.- Longevity of metacercariae of *Fasciola hepatica* on pastures in the upper coastal region of Texas and its relationship to liver fluke control. *Journal of Parasitology*, 33: 113-131.
- 172.** Olsen (O.W.), 1977.- *Parasitología Animal*. 3ª ed. Barcelona, Aedos, 719 pp.
- 173.** Ordóñez (D.), 2009.- Fasciolosis crónica avanzada: análisis del desarrollo del parásito adulto y de la oviposición en el modelo experimental Wistar. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 253 pp.

174. Osman (M.M.), Helmy (M.) & Megehed (M.A.), 1995.- Studies of human fascioliasis in Egypt: some serum lipid parameters before and after treatment. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 25: 769-772.
175. Ouviaña (C.B.), Pavese (A.), Lemberg (A.) & Bengochea (L.A.), 1995.- Liver microsomal phospholipid fatty acids behavior and its relationship to bilirubin UDP gluconyltransferase activity in bile duct ligated rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 103: 442-444.
176. Oviedo (J.A.), 1992.- Contribución al estudio del ciclo biológico de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1785 (Trematoda, Fasciolidae) a nivel de molusco hospedador intermediario en la isla de Córcega (Francia). Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 335 pp.
177. Ozkan (A.U.) & Genç (S.), 1979.- A case of subcutaneous fascioliasis (the first case in Turkey). *Ankara Universitesi Tıp Fakültesi Mecmuasi*, 32: 405-409.

P

178. Panova (M.M.), 2002.- Análisis morfométrico de los estadios de adulto y huevo de especies de *Fasciola* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 241 pp.
179. Pantelouris (E.), 1965.- The common liver fluke *Fasciola hepatica* L. Pergamon Press, Oxford, 259 pp.
180. Park (C.I.), Kim (H.), Ro (J.Y.), & Gutiérrez (Y.), 1984.- Human ectopic fascioliasis in the cecum. *American Journal of Surgical Pathology*, 8: 73-77.

8. BIBLIOGRAPHY

- 181.** Peixoto (R.V), 2016.- Fenotipaje de individus del género *Fasciola* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) de áreas endémicas con características epidemiológicas heterogéneas. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 146 pp.
- 182.** Pérez-Crespo (I.), 2013.- Strategic studies for the fight against human Fascioliasis worldwide. PhD Thesis. Faculty of Pharmacy, University of Valencia, 209 pp.
- 183.** Periago (M.V.), Valero (M.A.), Panova (M.) & Mas-Coma (S.), 2006.- Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitology Research*, 99: 368-378.
- 184.** Periago (M.V.), Valero (M.A.), El Sayed (M.), Ashrafi (K.), El Wakeel (A.), Mohamed (M.Y.), Desquesnes (M.), Curtale (F.) & Mas-Coma (S.), 2008.- First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 51-58.
- 185.** Phalee (A.), Wongsawad (C.), Rojanapaibul (A.) & Chai (J.), 2015.- Experimental Life History and Biological Characteristics of *Fasciola gigantica* (Digenea: Fasciolidae). *The Korean Journal of Parasitology*, 53: 59-64.
- 186.** Phiri (I.K.), Phiri (A.M.) & Harrison (L.J.), 2007.- The serum glucose and beta-hydroxybutyrate levels in sheep with experimental *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection. *Veterinary Parasitology*, 143: 287-293.
- 187.** Piedrafita (D.), Raadsma (H.), Prowse (R.) & Spithill (T.W.), 2004.- Immunology of the host parasite relationship in Fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Canadian Journal of Zoology*, 82: 233-250.

188. Prepelitchi (L.) & Wisnivesky-Colli (C.), 2013.- *Fasciola hepatica*: epidemiología y control en la región noreste de Argentina. In: Salomón (O.) & Rumi (A.) (editores), Moluscos de interés sanitario en la Argentina. Puerto Iguazu: INMeT, 54-83 pp.
189. Prociv (P.), Walker (J.C.) & Whitby (M.), 1992.- Human ectopic fascioliasis in Australia: first case reports. *Medical Journal of Australia*, 156: 349-351.

Q

190. Quiroz (H.), 1995.- Impacto económico, epidemiología, control y prevención de *Fasciola hepatica* en la ganadería. En: XII Congreso Latino Americano de Parasitología. Santiago De Chile, 20 pp.
191. Quiroz (H.), 2005.- Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores, México, 875 pp.

R

192. Raadsma (H.W.), Kingsford (N.M.), Spithill (T.W.) & Piedrafita (D.), 2007.- Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* in Merino sheep: II. Development of a predictive index for *Fasciola gigantica* worm burden. *Veterinary Parasitology*, 154: 250-261.
193. Ramalingam (K.), 1973a.- Chemical nature of the egg shell in helminths II. Mode of stabilization of egg shells of monogenetic trematodes. *Experimental Parasitology*, 34: 115-122.
194. Ramalingam (K.), 1973b.- The chemical nature off the egg-shell of helminths. Absence of quinone tanning in the egg-shell of the liver

- fluke *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 3: 67-75.
- 195.** Remigio (E.A.) & Blair (D.), 1997.- Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata: Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 1540-1545.
- 196.** Roberts (E.W.), 1950.- Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the fields and under controlled conditions in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 44: 187-206.
- 197.** Roberts (J.A.), Estuningsih (E.), Widjayanti (S.), Wiedosari (E.), Partoutomo (S.) & Spithill (T.W.), 1997a.- Resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 68: 69-78.
- 198.** Roberts (J.A.), Estuningsih (E.), Wiedosari (E.) & Spithill (T.W.), 1997b.- Acquisition of resistance against *Fasciola gigantica* by Indonesian thin tail sheep. *Veterinary Parasitology*, 73: 215-224.
- 199.** Robles-Peréz (D.), 2015.- Nuevas técnicas para el estudio de cepas ovinas de *Fasciola hepatica* con diferente origen y grado de resistencia a fármacos antihelmínticos. Tesis Doctoral. Universidad de León, España, 181 pp.
- 200.** Rodríguez-Acosta (R.), Torrado-Cruz (L.), Rivero-Fernández (T.) & Xavier-Morey (F.), 2000.- La fasciolosis hepática humana en Camaguey. 1999. *Archivo Médico de Camagüey*, 4.
- 201.** Rohlf (F.J.) & Marcus (L.F.), 1993.- A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 129-132.

- 202.** Rojo-Vázquez (F.A.), 1991.- Epizootiología de la Fasciolosis en España. En: Mas-Coma (S.), Esteban (J.G.), Bargues (M.D.), Valero (M.A.) & Galán- Puchades (M.T.) (editores), *Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (ICASEP I)*. J. Aguilar S.L., Valencia, 245-246 pp.
- 203.** Rojo-Vázquez (F.A.), Meana (A.), Valcárcel (F.) & Martínez-Valladares (M.), 2012.- Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 189: 15-38.
- 204.** Rondelaud (D.) & Barthe (D.), 1978a.- Arguments et propositions pour une nouvelle interprétation de l'évolution de *Fasciola hepatica* L. dans *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller. *Annales De Parasitologie Humaine et Comparee*, 532: 201-213.
- 205.** Rondelaud (D.) & Barthe (D.), 1978b.- Histological study of the development of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*, *L. glabra* and *L. palustris* infested at hatching. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 172: 1194-1200.
- 206.** Rondelaud (D.) & Barthe (D.), 1987a.- *Fasciola hepatica* L.: étude de la productivité d'un sporocyste en fonction de la taille de *Lymnaea truncatula* Müller. *Parasitology Research*, 74: 155-160.
- 207.** Rondelaud (D.) & Barthe (D.), 1987b.- *Fasciola hepatica* L.: étude du développement des rédies chez quatre espèces de limnées. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 5: 99-104.
- 208.** Rowan (W.), 1956.- The mode of hatching of the egg of *Fasciola hepatica*. II. Colloidal nature of the viscous cushion. *Experimental Parasitology*, 6: 131-142.
- 209.** Rowcliffe (S.A.) & Ollerenshaw (C.B), 1960.- Observations on the bionomics of the egg of *Fasciola hepatica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 54: 172-181.

210. Rowlands (D.T.) & Clampitt (R.B.), 1979.- Plasma enzyme levels in ruminants infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 5: 155-175.
211. Ruggieri (F.), Correa (A.J.E.) & Martínez (E.), 1967.- Cerebral distomiasis; case report. *Journal of Neurosurgery*, 27: 268-273.

S

212. Sato (S.), Kawaguchi (H.), Nitta (T.) & Honda (H.), 1975.- A case of heterotopic parasitism by *Fasciola* in the abdomen. *Japanese Journal of Parasitology*, 24: 39-40.
213. Simesen (M.G.) & Nansen (P.), 1974.- Serum γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) and aspartate aminotransferase (AspAT) activities in adult cattle with chronic *Fasciola hepatica* infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 15: 239-243.
214. Sinclair (K.B.), 1967.- The anaemia in fascioliasis: experiments with 51 chromium-labelled red cells. *Veterinary Record*, 80: 363.
215. Sissay (M.M.), Uggla (A.) & Waller (P.J.), 2007.- Prevalence and seasonal incidence of nematode parasites and fluke infections of sheep and goats in eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 39: 521-531.
216. Smithers (S.R.), 1982.- Fascioliasis and other trematode infections. In: Cohen (S.) & Warren (K.S.) (editors), *Immunology of Parasitic Infections*, 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 608-621 pp.
217. Soulsby (E.J.L.), 1965.- *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology*, Vol. 1 Helminths. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 530-576 pp.

- 218.** Spithill (T.W.), Smooker (P.M.) & Copeman (D.B.), 1999.- *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton (J.P.) (editor), *Fasciolosis*. Oxon, CABI Publishing, UK, 465-525 pp.
- 219.** Stemmermann (G.N.), 1953.- Human infestation with *Fasciola gigantica*. *American Journal of Pathology*, 29: 731-759.
- 220.** Sykes (A.R.), Coop (R.L.) & Rushton (B.), 1980.- Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Research in Veterinary Science*, 28: 63-70.

T

- 221.** Tamura (K.), Stecher (G.), Peterson (D.), Filipski (A.) & Kumar (S.), 2013.- MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- 222.** Taylor (E.L.), 1965.- La fasciolosis y el distoma hepático. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Estudio Agropecuario nº 64, Roma, 264 pp.
- 223.** Tennant (C.B.), 1997.- Hepatic function. In: Kaneko (J.J.), Harvey (J.W.), Bruss (L.M.) (editors), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed, San Diego, Academic Press, 327-352 pp.
- 224.** Todd (J.R.) & Ross (J.G.), 1966.- Origin of haemoglobin in the fecal contents of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, 19: 151-154.
- 225.** Totev (T.) & Georgiev (E.), 1979.- Fascioliasis, a cause of mechanical jaundice. *Khirurgiya (Sofiya)*, 32: 357-358.

U

226. Urquhart (G.) & Armour (J.), 2001.- Parasitología veterinaria. Zaragoza, Acribia, 355 pp.

V

227. Vajrasthira (S.) & Sunthornsiri (V.), 1979.- Fascioliasis from the skin. *Thailand Medical Journal*, 7: 48.
228. Valero (M.A.), 1986.- Revisión sistemática de la familia Brachylaimidae Joeux et Foley, 1930 (Trematoda: Digenea: Brachylaimoidea) con aportaciones al conocimiento de la variabilidad intraespecífica de los adultos de sus especies representantes. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 980 pp.
229. Valero (M.A.) & Mas-Coma (S.), 1985.- Consideraciones metodológicas sobre la aplicación de técnicas estadísticas en Parasitología. En: IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, España, 155 pp.
230. Valero (M.A.) & Mas-Coma (S.), 2000.- Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitologica*, 47: 17-22.
231. Valero (M.A.), De Renzi (M.) & Mas-Coma (S.), 1987.- Propuesta de una metodología para el estudio de las trayectorias ontogénicas de los Digénidos adultos de la familia Brachylaimidae Joeux et Foley, 1930. En: V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, España, 21-22 pp.

- 232.** Valero (M.A.), Marcos (M.D.) & Mas-Coma (S.), 1996.- A mathematical model for the ontogeny of *Fasciola hepatica* in the definitive host. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 125-128.
- 233.** Valero (M.A.), Panova (M.) & Mas-Coma (S.), 2001.- Development differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian Highland and European lowlands. *Parasitology Research*, 87: 337-342.
- 234.** Valero (M.A.), Panova (M.), Comes (A.M.), Fons (R.) & Mas-Coma (S.), 2002.- Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *Journal of Parasitology*, 88: 308-313.
- 235.** Valero (M.A.), Santana (M.), Morales (M.), Hernández (J.L.) & Mas-Coma (S.), 2003.- Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, 188: 787-793.
- 236.** Valero (M.A.), Panova (M.) & Mas-Coma (S.), 2005.- Phenotypic analysis of adults and eggs of *Fasciola hepatica* by computer image analysis system. *Journal of Helminthology*, 79: 217-225.
- 237.** Valero (M.A.), Navarro (M.), García-Bodelón (M.A.), Marcilla (A.), Morales (M.), Hernández (J.L.), Mengual (P.) & Mas-Coma (S.), 2006.- High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 100: 17-23.
- 238.** Valero (M.A.), Gironés (N.), García-Bodelón (M.A.), Periago (M.V.), Chico-Calero (I.), Khoubbane (M.), Fresno (M.) & Mas-Coma (S.), 2008.- Anaemia in advanced chronic fasciolosis. *Acta Tropica*, 108: 35-43.
- 239.** Valero (M.A.), Pérez- Crespo (I.), Periago (M.V.), Khoubbbane (M.) & Mas-Coma (S.), 2009a.- Fluke egg characteristics for the diagnosis of

- human and animal Fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*, 111: 150-159.
- 240.** Valero (M.A.), Ubeira (F.M.), Khoubbane (M.), Artigas (P.), Muiño (L.), Mezo (M.), Pérez-Crespo (I.), Periago (M.V.) & Mas-Coma (S.), 2009b.- MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Veterinary Parasitology*, 159: 77-81.
- 241.** Valero (M.A.), Panova (M.), Pérez-Crespo (I.), Khoubbane (M.) & Mas-Coma (S.), 2011.- Correlation between egg-shedding and uterus development in *Fasciola hepatica* human and animal isolates: applied implications. *Veterinary Parasitology*, 183: 79-86.
- 242.** Valero (M.A.), Periago (M.V.), Pérez-Crespo (I.), Angles (R.), Villegas (F.), Aguirre (C.), Strauss (W.), Espinoza (J.R.), Herrera (P.), Terashima (A.), Tamayo (H.), Engels (D.), Gabrielli (A.F.) & Mas-Coma (S.), 2012a.- Field evaluation of a coproantigen detection test for fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of Andean countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1812.
- 243.** Valero (M.A.), Pérez-Crespo (I.), Khoubbane (M.), Artigas (P.), Panova (M.), Ortiz (P.), Maço (V.), Espinoza (J.R.) & Mas-Coma (S.), 2012b.- *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 403-410.
- 244.** Valero (M.A.), Bargues (M.D), Khoubbane (M.), Artigas (P.), Quesada (C.), Berinde (L.), Ubeira (F.M.), Mezo (M.), Hernández (J.L.), Agramunt (V.H.) & Mas-Coma (S.), 2016.- Higher physiopathogenicity by *Fasciola gigantica* than by the genetically close *F. hepatica*: experimental long-term follow-up of biochemical markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110: 55-66.

245. Valero (M.A.), Pérez-Crespo (I.), Chillón-Marinas (C.), Khoubbane (M.), Quesada (C.), Reguera-Gómez (M.), Mas-Coma (S.), Fresno (M.) & Gironés (N.), 2017.- *Fasciola hepatica* reinfection potentiates a mixed Th1/Th2/Th17/Treg response and correlates with the clinical phenotypes of anemia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12: e0173456.
246. Vareille-Morel (C.), Dreyfuss (G.) & Rondelaud (D.), 1993.- Premières données sur la dispersion et le devenir des metacercaires flottantes de *Fasciola hepatica* L. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 11: 63-69.
247. Vengust (G.), Klinkon (M.), Bidovec (A.) & Vengust (A.), 2003.- *Fasciola hepatica*: Effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Parasitology*, 112: 51-61.
248. Villegas (F.), Angles (R.), Barrientos (R.), Barrios (G.), Valero (M.A.), Hamed (K.), Grueninger (H.), Ault (S.K.), Montesor (A.), Engels (D.), Mas-Coma (S.) & Gabrielli (A.F.), 2012.- Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1720.

W

249. Wei (D.X.), 1984.- *Fasciola* and fascioliasis. In: Wu (Z.J.), Mao (S.P.) & Wang (J.W.) (editors), Chinese Medical Encyclopedia, Parasitology and Parasitic Diseases. Shanghai Publishing House for Sciences and Technology, China, 67-68 pp.
250. Wharton (D.A.), 1983.- The production and functional morphology of helminth egg-shells. *Parasitology*, 86: 85-97.

8. BIBLIOGRAPHY

251. Wiedosari (E.) & Copeman (D.B.), 1990.- High resistance to experimental infection with *Fasciola gigantica* in Javanese thin tailed sheep. *Veterinary Parasitology*, 37: 101-111.
252. Wilson (R.A.), 1968.- The hatching mechanism of the egg of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 58: 79-89.
253. Wong (R.K.), Peura (D.A.), Mutter (M.L.), Heit (H.A.), Birns (M.T.) & Johnson (L.F.), 1985.- Hemobilia and liver flukes in a patient from Thailand. *Gastroenterology*, 88: 1958-1963.
254. Wyckoff (J.H.) & Bradley (R.E.), 1985.- Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis. *American Journal of Veterinary Research*, 46: 1015-1019.

X

255. Xuan (L.T.), Hung (N.T.) & Waikagul (J.), 2005.- Cutaneous fascioliasis: a case report in Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 508-509.

Y

256. Yalav (O.), Yagmur (Ö.), Ulkü (A.), Akcam (A.T.) & Sönmez (H.), 2012.- A rare cause of obstructive jaundice: *Fasciola hepatica* mimicking cholangiocarcinoma. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 23: 604-607.
257. Yamaguti (S.), Bieber (D.), Ringold (G.) & Mansour (T.), 1958.- The Digenic Trematodes of Vertebrates. Parts 1 and 2. Systema Helminthum. Volume I. Interscience Publisher, NY, 1575 pp.

258. Ying (M.), Xiaosu (H.) & Wang (B.), 2007.- A case of ectopic parasitism: *Fasciola hepatica* larvae burrow through a human brain and mimic cerebral aneurysm. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 1051-1052.

Z

259. Zafra (R.), Pérez-Ecija (R.A.), Buffoni (L.), Moreno (P.), Bautista (M.J.), Martínez-Moreno (A.), Mulcahy (G.), Dalton (J.P.) & Pérez (J.), 2013a.- Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1 and infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*, 148: 373-384.
260. Zafra (R.), Pérez-Ecija (R.A.), Buffoni (L.), Pacheco (I.L.), Martínez-Moreno (A.), LaCourse (E.J), Perally (S.), Brophy (P.M) & Pérez (J.), 2013b.- Early hepatic and peritoneal changes and immune response in goats vaccinated with a recombinant glutathione transferase sigma class and challenged with *Fasciola hepatica*. *Research in Veterinary Science*, 94: 602-609.
261. Zali (M.R.), Ghaziani (T.), Shahraz (S.), Hekmatdoost (A.) & Radmehr (A.), 2004.- Liver, spleen, pancreas and kidney involvement by human fascioliasis: imaging findings. *BMC Gastroenterology*, 4: 15.
262. Zhou (L.), Luo (L.), You (C.), Wang (B.), Xu (J.), Liao (L.), Hui (X.) & Cai (B.), 2008.- Multiple brain hemorrhages and hematomas associated with ectopic fascioliasis in brain and eye. *Surgical Neurology*, 69: 516-521.
263. Zumaquero-Ríos (J.L.), Sarracent-Pérez (J.), Rojas-García (R.), Rojas-Rivero (L.), Martínez-Tovilla (Y.), Valero (M.A.) & Mas-Coma (S.), 2013.- Fascioliasis and intestinal parasitoses affecting schoolchildren

8. BIBLIOGRAPHY

in Atlixco, Puebla State, Mexico: Epidemiology and treatment with nitazoxanide. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7: e2553.

ANEXO

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

PUBLICATIONS RELATED TO DOCTORAL THESIS



Higher physiopathogenicity by *Fasciola gigantica* than by the genetically close *F. hepatica*: experimental long-term follow-up of biochemical markers

M. Adela Valero^a, M. Dolores Bargaes^a, Messaoud Khoubbane^a, Patricio Artigas^a, Carla Quesada^a, Lavinia Berinde^{a,b}, Florencio M. Ubeira^c, Mercedes Mezo^d, Jose L. Hernandez^e, Veronica H. Agramunt^a and Santiago Mas-Coma^{a,*}

^aDepartamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain; ^bDepartment of Microbiology, University of Medicine and Pharmacy “Juliu Hatieganu”, 6 Louis Pasteur street, Cluj-Napoca 400394, Romania; ^cLaboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15784 Santiago de Compostela, Spain; ^dLaboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Instituto Galego da Calidade Alimentaria-Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, km 7, 15318 Abegondo, A Coruña, Spain; ^eLaboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Calle Glorieta del Ejército No. 1, 28047 Madrid, Spain

*Corresponding author: Tel: +34 96 3544298; Fax: +34 96 3544769; E mail: S.Mas.Coma@uv.es

Received 24 September 2015; revised 24 November 2015; accepted 30 November 2015

Background: Fascioliasis is caused by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. The latter, always considered secondary in human infection, nowadays appears increasingly involved in Africa and Asia. Unfortunately, little is known about its pathogenicity, mainly due to difficulties in assessing the moment a patient first becomes infected and the differential diagnosis with *F. hepatica*.

Methods: A long-term, 24-week, experimental study comparing *F. hepatica* and *F. gigantica* was made for the first time in the same animal model host, Guirra sheep. Serum biochemical parameters of liver damage, serum electrolytes, protein metabolism, plasma proteins, carbohydrate metabolism, hepatic lipid metabolism and inflammation were analysed on a biweekly basis as morbidity indicators. Serum anti-*Fasciola* IgG, coproantigen and egg shedding were simultaneously followed up.

Results: rDNA and mtDNA sequencing and the morphometric study by computer image analysis system (CIAS) showed that fasciolids used fitted standard species characteristics. Results demonstrated that *F. gigantica* is more pathogenic, given its bigger size and biomass but not due to genetic differences which are few. *Fasciola gigantica* shows a delayed development of 1–2 weeks regarding both the biliary phase and the beginning of egg shedding, with respective consequences for biochemical modifications in the acute and chronic periods.

Conclusions: The higher *F. gigantica* pathogenicity contrasts with previous studies which only reflected the faster development of *F. hepatica* observed in short-term experiments.

Keywords: Biochemical parameters, Disease phases, *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, Physiopathogenicity, Sheep

Introduction

Trematodiasis have been emphasised in the WHO Roadmap for Neglected Tropical Diseases 2015–2020.¹ Fascioliasis merits particular consideration due to its global distribution in livestock and the estimation of up to 1.7 million people infected worldwide.² The increasing importance of human fascioliasis is also related to its pathogenicity and immunity. This disease is pronouncedly complicated, including difficulties in diagnosis,³ its great morbidity and immunological impact on children in long-term infection particularly in human fascioliasis endemic areas.^{4–7} The clinical complexity of the symptoms and syndromes, giving rise to severe sequelae and even death, add concern to its high morbidity.⁸

In humans, the pathogenesis of fascioliasis appears to be similar to that reported in animals. Four clinical periods may be distinguished^{8–10}: incubation phase of a few days to several months (from the ingestion of metacercariae to the appearance of the first symptoms); invasive or acute phase of 2–4 months (fluke migration up to the bile ducts); latent phase of days or years (maturation of the parasites and starting of oviposition); biliary, chronic or obstructive phase, which may develop after months to years of infection. Patients are almost always diagnosed in the second or the fourth period.

In *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*, the spacers of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) suggest a level of only intraspecific variability. The five differing positions in ITS-2 and ITS-1 are minimal

differences typical of crossbreeding organisms.² Thus, fasciolid species differentiation is mainly based on adult morphology, egg size, definitive host susceptibility, snail vector specificity, and geographical distribution.²

Allometric and morphometric characteristics differ according to the definitive host species, humans included. However, differences in the distance between the ventral sucker and the posterior end of the body, body roundness, and body length/body width ratio, may help when distinguishing *F. hepatica* from *F. gigantica* in the same host species.¹¹ In bovines for instance, typical *F. hepatica* of Europe may reach a maximum body length of 29.00 mm and maximum body area of 261.71 mm², whereas typical *F. gigantica* of Burkina Faso reach 52.30 mm and 482.91 mm², respectively.¹¹ In Egypt, these maximum values reach 28.71 mm and 303.96 mm² for *F. hepatica* and 48.71 mm and 475.95 mm² for *F. gigantica*, with intermediate forms showing a size in-between.¹²

Susceptibility, pathology and host preferences suggest that the original definitive host of *F. hepatica* may be found in Eurasian ovicaprines, whereas that of *F. gigantica* in east African bovids.²

Until quite recently, *F. hepatica* was considered the causal agent of human fascioliasis, whereas *F. gigantica* was only secondarily involved in sporadic or rare cases.¹³ However, the increasing number of human reports together with the description of human endemic areas of Africa and Asia where *F. gigantica* is present, leads to the need to reconsider the potential capacity of this species to give rise to serious public health problems.

Contrary to the disease caused by *F. hepatica*, our present knowledge on the characteristics of human infection by *F. gigantica* poses many questions concerning various aspects of diagnosis and pathogenicity.

In diagnosis, the differentiation between *F. hepatica* and *F. gigantica* poses many problems related to their genotypic and phenotypic closeness. Several techniques usually applied for fascioliasis diagnosis in humans are useless for their differentiation, such as all immunological tests, serological or coproantigen detection tests,³ and the many different non-invasive image techniques.⁸ Only the techniques enabling fluke recovery from the patient and/or eggs from faecal samples, duodenal contents or bile, allow differential diagnosis.

Insufficient knowledge about human pathogenicity by *F. gigantica* when compared to *F. hepatica* is due to problems in differential diagnosis and the reduced number of patients with verified *F. gigantica* infection having been studied. Moreover, in humans infected by *F. gigantica* there is no knowledge about the length of the invasive or acute phase until the beginning of the biliary or chronic phase, nor about the length of the latter. Additionally, nothing is known about human susceptibility to *F. gigantica*, e.g., whether all *F. gigantica* strains are able to produce and shed eggs in human stools.

In human endemic areas, where infection is known to occur early in infancy, 5 to 15-year-old children may already be in the advanced chronic stage, and massive infections (400–8000 eggs per gram of faeces) are usual.¹⁴ Studies on the pathogenicity by such large flukes as *F. gigantica* during this obstructive disease period are needed. Unfortunately, quantitative diagnostic studies on patients infected by *F. gigantica* are lacking.

We performed a long-term experiment including the invasive and biliary phases of the infection by both fasciolid species in an animal model. Follow up analyses focused on biochemical

markers of liver damage, protein synthesis capacity, participation of the metabolism of exogenous substances such as carbohydrates and fats, kidney function and inflammation. The aim of this study is to shed more light on the physiopathogenicity of *F. gigantica* compared to *F. hepatica* to explain the variability of the clinical markers throughout the disease phases in humans.

Materials and methods

Fasciolid strains and animal infection

Metacercariae of *F. hepatica* and *F. gigantica* were experimentally obtained following standard procedures. The *F. hepatica* strain used was from Białystok, Poland, and the *F. gigantica* strain from Osimi-Giza, Egypt.

Fasciola gigantica does not develop a complete infection in rodents,¹⁵ therefore, the Guirra sheep breed, whose susceptibility to both fasciolid species had already been assessed,¹⁶ was used for the experiments.

Fasciola infection is extremely harmful to sheep and a long-term experiment was planned therefore the software Ene 3.0 (Servei d'Estadística Aplicada, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Valles, Spain, distributed by GlaxoSmithKline) was used to establish the minimum number of animals needed to obtain statistically significant results, in accordance with the present ethical rules for experiments with mammal animal models.

A total of 22 4–5 week old sheep were maintained in a sheep-fold and randomly divided into three groups. Group A (12 sheep) served as control. Group B (5) and group C (5) were infected per os with 200 metacercariae of *F. hepatica* and *F. gigantica*, respectively. This design allowed a statistical significance of $p=0.05$ for a power value of 80%.

Feed and water were provided ad libitum. Animal ethic guidelines regarding animal care strictly followed the institution's guidelines based on Directive 2010/63/EU. The experiment was conducted over a 6 month period, with chronological sampling according to standard procedures.

At 6 months post-infection, all sheep were euthanised over a 3 day period through intravenous injection with pentobarbitone. All livers, bile ducts and gall bladders were examined for the presence of parasites. The bile ducts were cut open and flukes collected.

DNA sequencing and morphometric measurement techniques

Fasciolid specimens fixed in 70% ethanol were used for DNA extraction. Procedure steps were performed according to previously outlined methods.¹⁷ ITS-2 and ITS-1 of rDNA and *cox1* and *nad1* of mitochondrial DNA (mtDNA) were PCR amplified for each specimen, using primers previously described and PCR products purified according to the manufacturer's protocol.

Sequencing was performed on both strands by the dideoxy chain-termination method, using PCR primers. Sequences were aligned using CLUSTALW2, in MEGA 6.0.6 using default settings. The haplotype (H) terminology used follows the standard nomenclature proposed for fasciolids.²

Body length, body width, body area and body perimeter measurements were obtained. Body area was used to characterise the parasite biomass per host by the mean of the body areas of the individual flukes found in each sheep. Standardised

measurements were made according to previously proposed methods.^{11,12} Measurements were made by a computer image analysis system (CIAS) with specialised software (ImagePro® Plus, version 4.5 for Windows, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).^{11,12} Morphological variation was quantified by geometrical morphometrics using multivariate analysis. Size-free canonical discriminant analysis was used on the covariance matrix of log-transformed measurements to assess morphometric variation between samples. Analyses were carried out using BAC v.2 software (Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France). This technique consists of removing the effect of within-group ontogenetic variation, regressing each character separately on the within-group first principal component, which is a multivariate estimate of size.¹⁸

Faeces and blood sampling and ELISA procedures

Faecal samples were obtained on a weekly basis, one sample at the time of the challenge and between 1 to 12 weeks post-infection (p.i.), and later every 2 weeks (12–24 weeks p.i.). Four Kato-Katz slides per sample/week were applied until the first egg was detected (Helm-Test1, AK test, AK Industria e Comércio Ltda, Belo Horizonte, Brazil). Coproantigen detection in faecal samples was carried out using the MM3-COPRO ELISA test.¹⁶

Whole blood was collected every two weeks until week 24 p.i. The presence of specific anti-*Fasciola* IgG antibodies (IgG) in serum was determined using the MM3-SERO capture ELISA.¹⁶

Biochemical analyses

The development of fascioliasis was monitored by determination of biochemical parameters selected to characterise the following: liver damage: aspartate aminotransferase (AST, or glutamic oxaloacetic transaminase [GOT], in international units per litre IU/L), alanine aminotransferase (ALT, or glutamate-pyruvate transaminase [GPT], IU/L), gamma glutamyl transferase (or γ -glutamyl transpeptidase GGT, IU/L), total bilirubin (T-Bil, mg/dL), alkaline phosphatase (AP, IU/L); serum electrolytes: calcium (Ca, mg/dL), chloride (Cl, mmol/L), phosphorus (P, mg/dL); protein metabolism: creatinine (Cre, mg/dL), urea (Ure, mg/dL); plasma proteins: albumin (Alb, g/dL), total protein (T-Pro, g/dL);

carbohydrate metabolism: glucose (Glu, mg/dL), amylase (Amy, IU/L); hepatic lipid metabolism: total cholesterol (T-Cho, mg/dL), triglycerides (Trigly, mg/dL); inflammation: C-reactive protein (CRP, mg/L).

All parameters were measured in serum by means of an automated standard enzymatic colourimetric method (BM/Hitachi 917-rack).

Biochemical data, IgG levels, fluke burden, and ln(BA) were compared by the non-parametric Mann-Whitney test (U). Bivariate correlations (Pearson's correlation) were calculated for biochemical data, IgG level, fluke burden, and ln(BA). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Parasitological aspects

All animals given metacercariae developed infection (Table 1). From 9 weeks p.i., all *F. hepatica* infected sheep presented coproantigens in faeces (variability according to individual sheep between 6 and 9 weeks), and from 11 weeks p.i. in sheep with *F. gigantica* (7–11 weeks). Therefore, the time course of infection was divided in two groups, the liver parenchymal phase including weeks 2–8 p.i., and the biliary phase with weeks 12–24 p.i.

From 14 weeks p.i., all *F. hepatica*-infected sheep presented eggs in faeces (10–14 weeks), whereas those with *F. gigantica* did so from 16 weeks p.i. (11–16 weeks). Parasite recovery (mean percentage of infecting metacercariae recovered as adult flukes) was uniform within the average of 25.4% in both groups B and C (Table 1). No significant differences were detected when comparing fluke burden ($U = 0.62$) and % of parasite recovery ($U = 1$), i.e. Guirra sheep have a similar susceptibility to *F. hepatica* and *F. gigantica*. The parasite biomass showed a significantly larger value in *F. gigantica* flukes than in *F. hepatica* ($U = 0.001$), despite the similar burden in both groups.

Molecular and morphometric characterisation of the fasciolid strains

Sequence characteristics are noted in Table 2. *Fasciola hepatica* ITS-2 corresponded to haplotype code FhITS2-H1, with no nucleotide difference when compared with typical *F. hepatica* from

Table 1. Experimental design and parasitological results obtained.

Sheep group	n	Infective dose	Fluke burden ^a (min-max) Average \pm SD	% of parasite recovery ^b (min-max) Average \pm SD	Body area (mm ²) (min-max) Average \pm SD
A (Control)	12	NA	NA	NA	NA
B (<i>Fasciola hepatica</i>)	5	200	(33–66) 50.83 \pm 13.67	(16.5–33) 25.41 \pm 6.83	(68.08–227.10) 129.77 \pm 35.76 ^c
C (<i>Fasciola gigantica</i>)	5	200	(17–70) 47.16 \pm 25.46	(8.5–35) 25.41 \pm 12.73	(156.60–305.35) 219.64 \pm 28.67 ^c

NA: not applicable.

^a number of flukes per sheep; ^b number of flukes obtained/number of metacercariae inoculated; ^c significant using U Mann Whitney ($p < 0.05$).

numerous countries of different continents.² Similarly, ITS-1 corresponded to FhITS1-HA.²

Fasciola gigantica ITS-2 proved to be FgITS2-H1, with no nucleotide difference regarding typical *F. gigantica*²; similarly, ITS-1 corresponded to FgITS1-HA.²

Fasciolid strain comparison showed five nucleotide differences in ITS-2 and five more in ITS-1, exactly those known to differentiate both *Fasciola* species.²

With regard to mtDNA, *F. hepatica* presented a *cox1* sequence and COX1 protein fitting the variability of typical *F. hepatica*²; similarly, the *nad1* sequence and NAD1 protein.²

In *F. gigantica*, *cox1* showed a genetic distance of only 0.85–1.30% (13–20 nucleotide differences) when compared to pure *F. gigantica*,² with a genetic distance of only 0.39–0.58% in the COX1 protein (2–3 amino acid differences). The *nad1* sequence showed a genetic distance of only 1.10–1.53% (10–14 nucleotide differences) when compared to pure *F. gigantica*,² with a genetic distance of only 1.00–2.00% in NAD1 protein (3–6 amino acid differences).

The fasciolid strain mtDNA comparison furnished the following differences: 8.22% bp in *cox1* gene, 4.31% aa in COX1 protein, 9.08% bp in *nad1* gene, and 7.33% aa in NAD1 protein. This agrees with the difference percentage range known to exist between both *Fasciola* species.²

The morphometric values of *F. hepatica* and *F. gigantica* experimental materials are shown in Table 2. A scatter plot of the first two principal components is shown in Figure 1. The first common principal component of the two strain populations can be interpreted as a measure of overall size. The results show that *F. hepatica* specimens have a smaller global size than *F. gigantica* specimens.

Biochemical parameters

Biochemical parameters and time

The time course of the biochemical parameter values is represented for liver markers (Figure 2), serum electrolytes (Figure 3), protein metabolism and plasma proteins (Figure 4) and carbohydrate and lipid metabolisms (Figure 5).

A comparative analysis was performed for each biochemical parameter in the *F. hepatica* group vs the control group and the *F. gigantica* group vs control. The significant and non-significant increases or decreases of the values, together with the evolution of serum antibodies, coproantigen and egg shedding, vs time are summarised in Table 3. A positive correlation was detected between Ca and Cl, T-Cho and Trigly, and T-Cho and ALT.

In the liver parenchymal phase, a significant positive correlation of GGT, T-Pro and IgG levels vs time was detected, whereas in ALT, AP, amylase and P vs time it was a significant negative correlation. In *F. hepatica*, the average of Cre decreased significantly, whereas that of Ca and P increased significantly. In *F. gigantica*, Cre average decreased significantly, whereas that of GGT, AST, AP, Alb and CRP increased significantly.

In the biliary phase, a significant positive correlation of Cre, T-Cho, Trigly and Ca vs time was detected, whereas in AST, GGT, Glu and CRP vs time it was a significant negative correlation. In *F. hepatica*, the average of GGT and CRP increased significantly, whereas that of Alb, AP, Ure, Cl and P, decreased significantly. In *F. gigantica*, the average of AST, GGT, T-Cho and CRP increased significantly, whereas that of Alb, Cl and P decreased significantly.

Biochemical parameter comparison between *Fasciola* infected groups

In the parenchymal phase, only AST showed significantly higher values in *F. gigantica* than in *F. hepatica*. CRP also showed higher values in *F. gigantica* than in *F. hepatica*, although close but not reaching significance.

In the biliary phase, ALT, AP, CRP and T-Cho were significantly higher and T-Pro and IgG were significantly lower in *F. gigantica* than in *F. hepatica*.

Biochemical parameters vs burden and parasite biomass

Considering the *F. hepatica* and *F. gigantica* groups together, in the parenchymal phase, a significantly positive correlation of GGT, AP, Alb, and IgG vs fluke burden was detected, whereas Cre vs fluke burden showed a significantly negative correlation. Compared to the parasitic biomass, a significantly positive correlation appeared with GGT, AP, Ca, Alb, and IgG, but the correlation was significantly negative with Cre.

In the biliary phase, a significantly positive correlation of GGT and IgG vs fluke burden was detected, and similarly in GGT, T-Cho and IgG vs parasite biomass.

Biochemical parameters and immunological response

Considering the *F. hepatica* and *F. gigantica* groups together, in the parenchymal phase, a significantly positive correlation of GGT and T-Pro vs IgG was detected. The correlation of AP and Amy vs IgG was significantly negative. In the biliary phase, a significantly positive correlation of GGT and CRP vs IgG was detected, whereas the correlation in Cl and Amy vs IgG was significantly negative.

Regarding the *F. hepatica* group (2–24 weeks p.i.), a significantly positive correlation of ALT, GGT and AP vs IgG was detected, but the correlation appeared to be significantly negative in Cl, P, T-Pro and Amy vs IgG.

Concerning the *F. gigantica* group (2–24 weeks p.i.), a significantly positive correlation of GGT vs IgG was detected, whereas the correlation in Cl and Amy vs IgG proved to be significantly negative.

Discussion

Some sheep breeds are resistant to *F. gigantica* infection, while others are not.¹⁵ The Guirra breed shows a susceptibility to *F. gigantica* similar to that of *F. hepatica*. This is the first time that a physiopathogenicity long-term standardised study permits a significant comparative analysis of the serum biochemical parameter values throughout both the acute and chronic phase.

In our experiment, young juvenile flukes were found in the hepatic parenchyma for up to 9 weeks in *F. hepatica* and for up to 11 weeks in *F. gigantica*. This fits previous knowledge on the prepatent period of *F. hepatica*,^{9,10} and what is expected of *F. gigantica*. Knowledge on the *F. gigantica* prepatent period in humans is lacking, but a 3.5–4.5 month period may be inferred from similar data obtained in animals and the prepatent period of *F. hepatica* in humans. The only case report providing useful information suggests a prepatent period of around 4 months from the onset of symptoms.¹³

Table 2. Results of the genotypic and phenotypic characterisation of the *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* strains used in the long term experimental infection of Guirra breed sheep

Marker	<i>Fasciola hepatica</i>		<i>Fasciola gigantica</i>	
	Genotype		Genotype	
	Nucleotide length	Composition	Nucleotide length	Composition
rDNA ITS 2	364 bp	48.3% GC	363 bp	47.9% GC
rDNA ITS 1	432 bp	51.8% GC	432 bp	51.2% GC
mtDNA <i>cox1</i>	1533 bp	62.7% AT	1533 bp	63.8% AT
mtDNA <i>nod1</i>	903 bp	65.3% AT	903 bp	63.8% AT
mtDNA <i>COX1</i>	Amino acid length 510 aa	Start/stop codons ATG/TAG	Amino acid length 510 aa	Start/stop codons ATG/TAG
mtDNA <i>NAD1</i>	300 aa	GTG/TAG	300 aa	GTG/TAG
	Phenotype		Phenotype	
	Extreme values (n=127)	Mean±SD	Extreme values (n=100)	Mean±SD
Body length	12.4–26.6 mm	18.5±3.3 mm	24.4–40.5 mm	31.5±3.0 mm
Body width	6.8–12.7 mm	10.1±1.1 mm	8.3–12.0 mm	9.9±0.8 mm
Body area	68.0–227.1 mm ²	129.7±35.7 mm ²	156.6–305.3 mm ²	219.6±28.7 mm ²
Body perimeter	33.2–66.0 mm	47.9±7.2 mm	57.9–105.2 mm	74.4±6.9 mm

mtDNA *cox1*: nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA.
 mtDNA *COX1*: amino acid sequence of the cytochrome c oxidase subunit I of the mitochondrial DNA.
 mtDNA *nod1*: nucleotide sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA.
 mtDNA *NAD1*: amino acid sequence of the NADH dehydrogenase subunit I of the mitochondrial DNA.
 rDNA ITS 1: nucleotide sequence of the first internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA.
 rDNA ITS 2: nucleotide sequence of the second internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA.

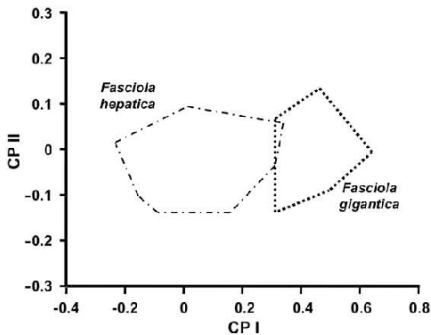


Figure 1. Factor map corresponding to *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* specimens from experimentally infected Guirra sheep. Samples are projected onto the first (PC I, 59%) and second (PC II, 17%) principal components. Each group is represented by its perimeter.

Liver damage

In the *F. hepatica*/sheep model, abnormal increases of AST have been reported at 3–4 weeks p.i.^{19–21} AST activity was found to return to normal values, or significantly elevated even 14 weeks p.i.²⁰ In large domestic animals, ALT is not remarkably elevated in liver injury.²² If the number of metacercariae ingested is small (150 metacercariae of *F. hepatica*), ALT and AST levels may show insignificant variations.²³

In *F. hepatica* infected sheep, GGT provides information on the penetration of young flukes into the bile ducts.²⁰ Our results confirm that *F. gigantica* migration takes longer, which translates into a delay in the liver damage biomarker modifications. These results agree with studies showing that a GGT increase provides sensitive indications of liver injury. GGT is the best marker, while AST is less sensitive.^{19,21,24} In our study, GGT depended on the disease phase, decreasing in the long-term. Other investigations with *F. hepatica* infected sheep obtained similar data,²⁵ suggesting either that adult flukes in bile ducts may not be as harmful as younger flukes or that flukes were being eliminated from the ducts.²⁵ GGT may remain elevated even at 18 weeks p.i.²⁶

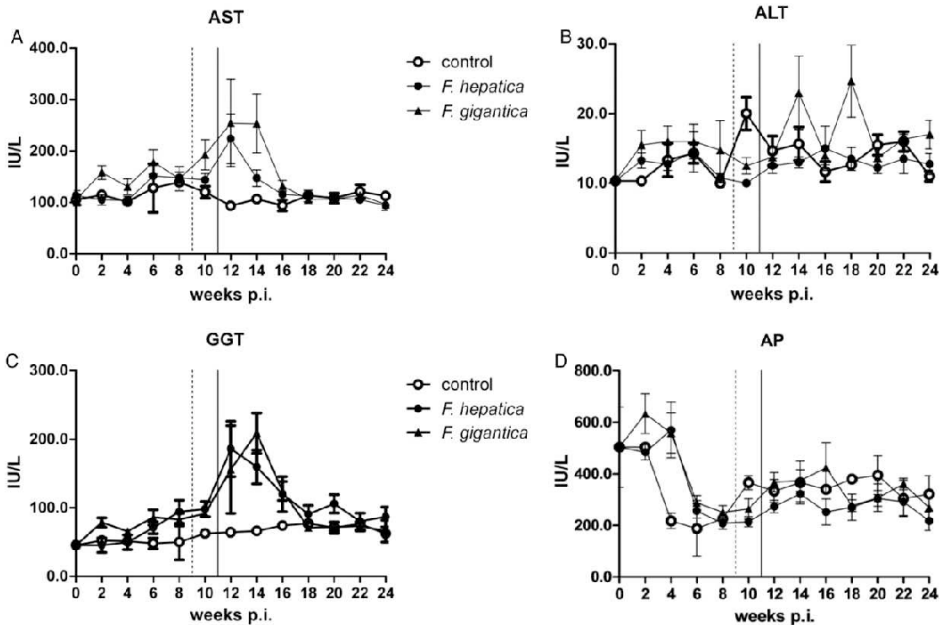


Figure 2. Liver marker values (arithmetic mean \pm SE) in *Fasciola hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) aspartate aminotransferase (AST) (in international units per litre IU/L); (B) alanine aminotransferase (ALT) (IU/L); (C) gamma glutamyl transferase (GGT) (IU/L); (D) alkaline phosphatase (AP) (IU/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post infection.

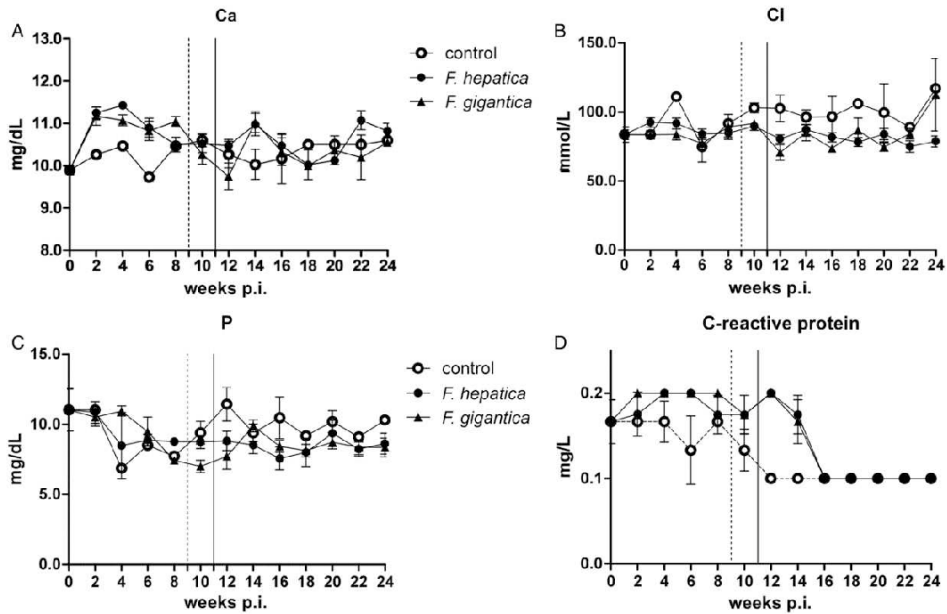


Figure 3. Serum electrolyte and inflammation marker values (arithmetic mean \pm SE) in *Fasciola hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) calcium (Ca) (mg/dL); (B) chloride (Cl) (mmol/L); (C) phosphorus (P) (mg/dL); (D) C reactive protein (CRP) (mg/L). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post infection.

We found no bilirubinaemia. Bilirubinaemia has only been reported occasionally in both the parenchymal and biliary stage.^{20,27} In cholestatic patients, serum bilirubin was slightly elevated, although higher levels have been reported.^{9,10} A biliary colic is usually followed by a higher level of serum bilirubin as well as dark bilirubin-positive urine.

In rats the early chronic period involves increased bile flow, cholerisis, and a hyperplastic response of the biliary epithelium.^{4,28} In our study, a positive correlation of GGT vs fluke burden and vs parasitic biomass was found and the increased AP became an indicator of cholestasis. In absence of hyperbilirubinaemia, it is indicative of an infiltrative tumoral, cystic, or granulomatose liver lesion, focally affecting the liver excretory function, or of primary biliary cirrhosis. Furthermore, AP showed a negative correlation with time, revealing protein deficiency.

Hypertransaminasemia or normal AST and ALT in human fascioliasis has been described in both the parenchymal or biliary phase.^{9,10} Similar to our results, AP has been described elevated in the parenchymal phase. In 37 patients infected with *F. hepatica*, 17 presented anicteric cholestasis (AP and GGT between two- and threefold the normal level) and 11 showed cytotoxicity (AST and ALT between two- and fivefold the normal level).²⁹ In other patients, AST and ALT were 2–3 times the upper limit, while GGT was 4–6

times greater. Total bilirubin and direct bilirubin were 3–7 times and 10–15 times above the upper limit, respectively.³⁰ In cholestatic patients, AST, ALT, GGT and AP were statistically higher than in non-cholestatic patients.³¹

Serum electrolytes

Our results showed hypercalcemia and hypophosphatemia in the acute phase and hypocalcemia, hypochloremia and hypophosphatemia in the chronic phase.

Previous studies described glomerulopathy in buffaloes, probably mediated by immune-complex deposits.³² In cattle and sheep, assays showed circulating immune complex values elevated at 6–8 weeks p.i., coinciding with increased *Fasciola* specific circulating antibodies.³³ Furthermore, a seric phosphorus decrease in *F. hepatica* infected calves may be attributed to the decrease in appetite and food intake. Similar to our results in the chronic phase, mean values of sodium and Ca were significantly lower in infected deer.³⁴ Calcium and phosphorus reduction is in agreement with previous work.³⁵ In goats infected with 300 *F. gigantica* metacercariae, serum potassium, chlorine and bicarbonate did not show any significant differences, but lower sodium and Ca levels were found.³⁶

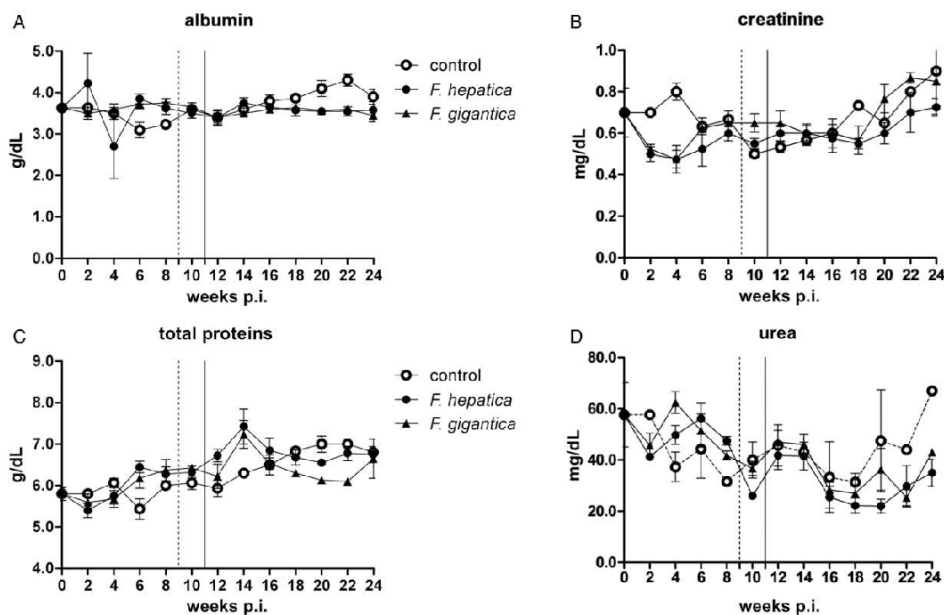


Figure 4. Protein metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *Fasciola hepatica* infected (n=5), *F. gigantica* infected (n=5) and uninfected control (n=12) Guirra sheep. (A) albumin (Alb) (g/dL); (B) creatinine (Cre) (mg/dL); (C) total proteins (T-Pro) (g/dL); (D) urea (Ure) (mg/dL). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post infection.

Protein metabolism

Our results showed a decrease of Ure and Cre in the chronic phase. Although several studies observed no effect on Ure,^{19,24} in *F. hepatica*-infected sheep a lower Ure has been described.³⁷ Decreased Cre has also been described.³⁷ Ure was found to be increased in *F. gigantica*-infected goats over 15 weeks p.i.³⁶

Plasma proteins

In *F. gigantica*-infected humans, slight and high albuminuria have been described during the migratory and terminal phases, respectively.³⁸ In sheep and calves, hypoalbuminaemia occurs due to reduced Alb synthesis.^{24,34} Our results showed a progressive loss of Alb when flukes start blood feeding, agreeing with previous data.^{24,27} Nevertheless, lower Alb levels become significant from 20 weeks p.i. in both *Fasciola*-infected groups. Hypoalbuminaemia is commonly found during subacute and chronic fascioliasis in sheep,¹⁹ and cattle.²⁴ In humans, serum globulin was frequently elevated in the obstructive phase, while Alb decreased.⁹

Our results showed lower T-Pro from 20–24 weeks p.i. In cattle, increases of T-Pro and serum globulin were observed.^{24,39} In agreement with our results, and contrary to previous research, a T-Pro decrease was detected in deer,³⁴ probably related to chronicity.

Carbohydrate metabolism

In livestock fascioliasis, disruption of the carbohydrate metabolism causes a serious impairment of animal productivity and growth.

In our study, both infected groups did not show differences in Glu. Liver glycogen reduction leads to serum Glu reduction and increased free fatty acid mobilization.⁴⁰ Decreased Glu has been reported in sheep at 6–22 weeks p.i.⁴⁰

In our experiment, both infected groups displayed lower Amy at 20–24 weeks p.i. In humans, Amy may be within normal limits, or elevated caused by pancreatitis.⁴¹ It has been suggested that eggs cause obstruction at the papillae leading to pancreatitis, and hence pancreatitis risk becomes proportional to worm load.⁴² In a human infection causing acute pancreatitis complicated by biliary sepsis, AST, ALT, T-Bil, direct bilirubin, AP, serum Amy and lipase were increased.⁴³

Hepatic metabolism of lipids

In our study, T-Chol was higher from 20 weeks p.i. onwards. The liver plays a dominant role in the homeostasis of serum cholesterol. A cholesterol increase is associated with an obstructive lesion of the bile duct and defective fat digestion. Previous studies indicated time-course dependent increased or decreased lipid and lipoprotein fractions in sheep. At day 0 pre-treatment and 28 post-

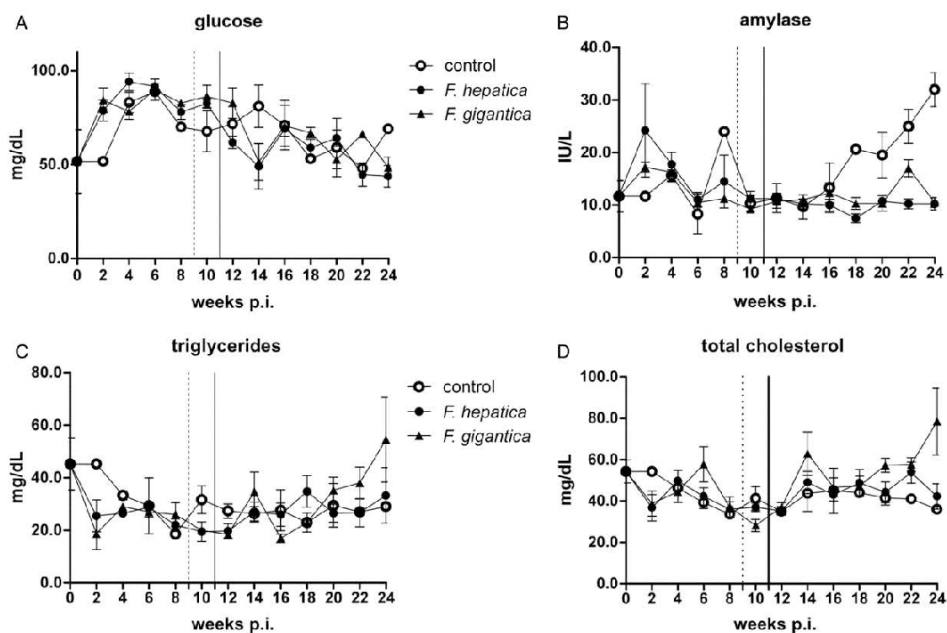


Figure 5. Carbohydrate and lipid metabolism marker values (arithmetic mean \pm SE) in *Fasciola hepatica* infected ($n=5$), *F. gigantica* infected ($n=5$) and uninfected control ($n=12$) Guirra sheep. (A) glucose (Glu) (mg/dL); (B) amylase (Amy) (IU/L); (C) triglycerides (Trigly) (mg/dL); (D) total cholesterol (T Cho) (mg/dL). Broken and solid vertical lines refer to the moment from which all sheep presented coproantigens in faeces in *F. hepatica* (9 weeks) and *F. gigantica* (11 weeks), respectively. p.i.: post infection.

treatment, cholesterol, Trigly, and high, low and very low density lipoprotein (HDL, LDL, VLDL) values were lower.²¹ In goats infected with 300 *F. gigantica* metacercariae, T-Chol and Trigly increased throughout 15 weeks.³⁶ Nevertheless, another study in sheep infected with 200 metacercariae reported no changes in Ure, Cre and cholesterol over 14 weeks p.i.⁴⁴

In Egyptian patients, Trigly and VLDL increased, while T-Chol, HDL cholesterol and LDL cholesterol decreased.⁴⁵ In chronicity studies, triglyceride levels were higher and T-Chol lower in cholestatic than in non-cholestatic patients.³¹

Inflammation

In our experiment, higher time-course dependent CRP was detected 4–14 weeks p.i. The inflammatory reaction in duct walls results in increasing fibrosis, particularly in cattle. The main difference between cattle and sheep fascioliasis is the pronounced formation of fibrotic tissue in the liver and bile-duct walls in cattle.

Likewise, in humans, flukes digest hepatic tissue and cause extensive parenchymal destruction with haemorrhages and inflammation. Inflammation, hyperplasia and hypertrophy of the bile duct epithelia may induce periductal fibrosis.^{9,10} Higher CRP has been described in the acute phase of human fascioliasis.⁴⁶

Limitations

Variations concerning higher/lower biochemical parameter values, but also an earlier beginning, later disappearance or longer persistence of modified values, may depend on fluke burden, host species and race, diet, and also coinfections with other pathogens. Significant parameter differences linked to fluke strains within the same *Fasciola* species have never been described. Hybrids of a size in-between that of the pure species may cause intermediate biochemical marker modifications.

Conclusions

Results demonstrate that *F. gigantica* is more pathogenic than *F. hepatica*, which is related to the bigger size of *F. gigantica*, mostly to its biomass, instead of genetic differences. *Fasciola gigantica* shows a delayed development of 1–2 weeks, which in its turn delays the beginning of egg shedding and therefore the start of the chronic phase, with consequences in biochemical marker profile modifications in both the acute and chronic period.

The higher *F. gigantica* pathogenicity contrasts with previous studies indicating greater damage to the liver parenchyma,^{47,48} and bile duct in *F. hepatica* infection.^{49,50} However, these results

Table 3. Results of biochemical parameters in serum obtained from Guirra breed sheep infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in a long term experiment of up to 24 weeks

Biochemical parameter	Abbreviation	Measurement units	Fasciolid species vs control	Invasive or acute phase (weeks)					Biliary or chronic phase (weeks)						
				2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Aspartate aminotransferase	AST (GOT)	IU/L	<i>F. hepatica</i>	=	=	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	=	=	=	=
Alanine aminotransferase	ALT (GPT)	IU/L	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	(+)	+	+	=	+	
γ glutamyl transferase	GGT	IU/L	<i>F. hepatica</i>	=	=	(+)	(+)	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
			<i>F. gigantica</i>	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
Total bilirubin	T Bil	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Alkaline phosphatase	AP	IU/L	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	(+)	=	()	()	=	()	()	()	=	()
			<i>F. gigantica</i>	(+)	+	(+)	=	()	=	=	=	()	()	=	()
Calcium	Ca	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	(+)	(+)	+	(+)	=	=	=	=	()	()	()	=
			<i>F. gigantica</i>	(+)	(+)	+	+	=	=	=	=	()	()	()	=
Chloride	Cl	mmol/L	<i>F. hepatica</i>	=	()	=	=	()	()	()	()	()	()	()	()
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	()	()	()	()	()
Phosphore	P	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	=	=	=	()	()	()	=	=	=	()
			<i>F. gigantica</i>	=	+	(+)	=	()	()	=	=	=	=	=	()
Creatinine	Cre	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	()	()	=	=	=	(+)	=	=	=	()	=	=
			<i>F. gigantica</i>	()	=	=	=	(+)	(+)	=	=	=	()	=	=
Urea	Ure	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	(+)	=	=	=	=	=	=	()	()	()
			<i>F. gigantica</i>	=	(+)	(+)	=	=	=	=	=	=	=	()	()
Albumin	Alb	g/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	+	(+)	=	=	=	=	=	()	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	+	(+)	=	=	=	=	=	=	()	=
Total proteins	T Pro	g/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	+	(+)	=	=	=	=	=	()	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	+	(+)	=	=	=	=	=	=	()	=
Glucose	Glu	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Amylase	Amy	IU/L	<i>F. hepatica</i>	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	()	()	()
			<i>F. gigantica</i>	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	()	()
Total cholesterol	T Cho	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	(+)	(+)
			<i>F. gigantica</i>	=	=	(+)	=	=	=	=	=	=	=	=	+
Triglycerides	Trigly	mg/dL	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
C reactive protein	CRP	mg/L	<i>F. hepatica</i>	=	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+
			<i>F. gigantica</i>	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Serum antibodies	IgG/MM3 Sero	OD	<i>F. hepatica</i>	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			<i>F. gigantica</i>	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coproantigens	MM3 Copro	OD	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+
Egg shedding	Eggs in faeces	epg	<i>F. hepatica</i>	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+
			<i>F. gigantica</i>	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+

Biochemical parameters ordered according to analytical groupings: liver damage (AST, ALT, GGT, T Bil, AP), serum electrolytes (Ca, Cl, P), protein metabolism (Cre, Ure), plasma proteins (Alb, T Pro), carbohydrate metabolism (Glu, Amy), hepatic lipid metabolism (T Cho, Trigly) and inflammation (CRP). Significance analysis by comparing with control group: =: no significant modification of the biochemical parameter value; +: significant increase of the biochemical parameter value; (+): non significant increase of the biochemical parameter value; : significant decrease of the biochemical parameter value; () : non significant decrease of the biochemical parameter value.

Downloaded from <http://srmb.oxfordjournals.org/> by guest on January 6, 2016

were obtained in short-term experiments and indeed only reflected the faster development of *F. hepatica*. In earlier studies suggesting that *F. gigantica* is more pathogenic, this was assumed based on the lower number of parasites needed to kill sheep and the larger fluke size in mature infections.³¹

Authors' contributions: MAV and SMC conceived the study; MAV, MDB and SMC designed the study protocol; MDB and MK carried out the metacercariae obtention; MDB and PA carried out the molecular analyses; FMU and MM prepared and furnished the immunoassay materials; MK, PA, CQ and LB carried out the parasitological analyses; JLH and VHA carried out the biochemical analyses and their interpretation; MAV and SMC drafted the manuscript; MDB, FMU and MM critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. MAV and SMC are guarantors of the paper.

Acknowledgements: The authors would like to thank Dr I. Perez Crespo for his technical assistance. The English stylistic help by Mr R. Wilk (Valencia, Spain) is greatly acknowledged. Technical support for DNA sequencing provided by the Servicio Central de Secuenciación para la Investigación Experimental (SCSIE) of the Universidad de Valencia (Dr A. Martínez).

Funding: This work was supported by Projects Nos. SAF2006-09278, SAF2010-20805 and AGL2011-30563 C03 from the Ministry of Economy and Competitiveness, Madrid, Spain; by the Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales-RICET (Project No. RD12/0018/0013 of the VI PN de I+D+I 2008-2011, ISCIII Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa RETICS), Ministry of Health and Consumption, Madrid; and by Project No. 2012/042 of the PROMETEO Program, Generalitat Valenciana, Valencia, Spain. Seven month scholarship stay of L. Berinde in the Valencia Department supported by Erasmus Programme, EC, Brussels. This study is part of the worldwide initiative of WHO (Geneva, Switzerland) against human fascioliasis.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Permission for animal research was obtained from the Ethics Animal Research Committee of Polytechnic University of Valencia [P2-13-07-09].

References

- Boissier J, Mone H, Mitta G et al. Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis* 2015;15:757-8.
- Mas Coma S, Valero MA, Bargues MD. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 2009;69:41-146.
- Mas Coma S, Bargues MD, Valero MA. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: Update for the present global scenario. *Parasitology* 2014;141(Special Issue):1918-46.
- Valero MA, Santana M, Morales M et al. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J Infect Dis* 2003;188:787-93.
- Valero MA, Navarro M, García Bodelon MA et al. High risk of bacteribilia in advanced experimental chronic fascioliasis. *Acta Trop* 2006;100:17-23.
- Valero MA, Girones N, García Bodelon MA et al. Anaemia in advanced chronic fascioliasis. *Acta Trop* 2008;108:35-43.
- Girones N, Valero MA, García Bodelon MA et al. Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J Infect Dis* 2007;195:1504-12.
- Mas Coma S, Agramunt VH, Valero MA. Neurological and ocular fascioliasis in humans. *Adv Parasitol* 2014;84:27-149.
- Chen MG, Mott KE. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop Dis Bull* 1990;87:R1-38.
- Mas Coma S, Bargues MD, Esteban JG. Human fascioliasis. In: Dalton JP (editor). *Fascioliasis*. Wallingford, Oxon: CAB International Publishing; 1999, p. 411-34.
- Periago MV, Valero MA, Panova M et al. Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitol Res* 2006;99:368-78.
- Periago MV, Valero MA, El Sayed M et al. First phenotypic description of *Fasciola hepatica/Fasciola* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect Genet Evol* 2008;8:51-8.
- Janssens PG, Fain A, Limbos P et al. Trois cas de distomatose hépatique à *Fasciola gigantica* contractés en Afrique centrale. *Ann Soc Belge Med Trop* 1968;4:8:637-50.
- Valero MA, Periago MV, Perez Crespo I et al. Field evaluation of a coproantigen detection test for fascioliasis diagnosis and surveillance in human hyperendemic areas of Andean countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1812.
- Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB. *Fasciola* gigantica: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (editor). *Fascioliasis*. Oxon: CABI Publishing; 1999, p. 465-525.
- Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M et al. MMS ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet Parasitol* 2009;159:77-81.
- Mas Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 2001;123:S115-27.
- Valero MA, Perez Crespo I, Khoubbane M et al. *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infect Genet Evol* 2012;12:403-10.
- Sykes AR, Coop RL, Rushton B. Chronic subclinical fascioliasis in sheep: effects on food intake, food utilisation and blood constituents. *Res Vet Sci* 1980;28:63-70.
- Ferre I, López P, Gonzalo Orden M. The effects of subclinical fascioliasis on hepatic secretory function in sheep. *Parasitol Res* 1995;81:127-31.
- Kozat S, Denizhan V. Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 2010;96:657-9.
- Tennant CB. Hepatic function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss LM (editors). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press; 1997, p. 327-52.
- Mekroud A, Chauvin A, Rondelaud D. Variations of biological indicators as highly presumptive markers for fascioliasis in experimentally infected sheep. *Revue Méd Vet* 2007;158:437-41.
- Anderson PH, Berrett S, Brush PJ et al. Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet Rec* 1977;100:43-5.
- Ferre I, Ortega Mora LM, Rojo Vázquez FA. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet Parasitol* 1997;68:261-7.
- Rojo Vázquez FA, Meana A, Volcárcel F, Martínez Valladares M. Update on trematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 2012;189:15-38.

- 27 Behm CA, Sangster NC. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: Dalton JP (editor). Fasciolosis. Wallingford, Oxon: CAB International Publishing; 1999, p. 185-224.
- 28 Foster JR. A study of the initiation of biliary hyperplasia in rats infected with *Fasciola hepatica*. Parasitology 1981;83:253-8.
- 29 Dauchy FA, Laharie D, Neau D et al. Distomatose à *Fasciola hepatica*: étude rétrospective sur 23 ans au CHU de Bordeaux. Presse Med 2007;36:1545-9.
- 30 Gulsen MT, Savas MC, Koruk M et al. Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. Neth J Med 2006;64:17-9.
- 31 El Shazly AM, Azab MS, El Beshbishi SN et al. Biochemical parameters in chronic fascioliasis. J Egypt Soc Parasitol 2008;38:977-90.
- 32 Marques SM, Scroferneker ML, Edelweiss MI. Glomerulonephritis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) naturally infected by *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 2004;123:83-91.
- 33 Langley RJ, Hillier GV. Detection of circulating immune complexes by the enzyme linked immunosorbent assay in sera from cattle infected with *Fasciola hepatica*. J Parasitol 1989;75 690-5.
- 34 Vengust G, Klinton M, Bidovec A et al. *Fasciola hepatica*: Effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). Vet Parasitol 2003;112:51-61.
- 35 Enigk K, Feder H, Dey Hazra A et al. Mineral content of blood plasma, erythrocytes and liver during the prepatent period of fascioliasis in cattle. Zentralbl Veterinarmed 1972;19:238-57.
- 36 Mbuh JV, Mbaye J. Serological changes in goats experimentally infected with *Fasciola gigantica* in Buea sub division of S.W.P. Cameroon. Vet Parasitol 2005;13:255-9.
- 37 Matanovic K, Severin K, Martinkovic F et al. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitol Res 2007;101:1657-61.
- 38 Stemmermann GN. Human infestation with *Fasciola gigantica*. Am J Pathol 1953;29:731-59.
- 39 Eckert J, Keller H, Hosli J et al. Subacute Fasciolose beim Rind. Schweiz Arch Tierheilkd 1977;119:135-48.
- 40 Phiri JK, Phiri AM, Harrison LJ. The serum glucose and beta hydroxybutyrate levels in sheep with experimental *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection. Vet Parasitol 2007;143: 287-93.
- 41 Kaya M, Beştaş R, Çetin S. Clinical presentation and management of *Fasciola hepatica* infection: single center experience. World J Gastroenterol 2011;17:4899-904.
- 42 Maroy B, Moullot P, Dalaubeix H et al. Pancreatite aigue compliquant une distomatose biliaire a *Fasciola hepatica* chez un patient porteur d'un diverticule choledocien. Ann Gastroenterol Hepatol (Paris) 1987;23:67-70.
- 43 Badalov NI, Ankleşaria A, Torak A et al. *Fasciola hepatica* causing acute pancreatitis complicated by biliary sepsis. Gastrointest Endosc 2009;70:386-7.
- 44 Jemli MH, Braun JP, Dorchie P et al. Exploration biochimique et hématologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. Rec Med Vet 1993;169:241-9.
- 45 Osman MM, Helmy M, Megehed MA. Studies of human fascioliasis in Egypt: some serum lipid parameters before and after treatment. J Egypt Soc Parasitol 1995;25:769-72.
- 46 Dauchy FA, Vincendeau P, Lifermann F. Eight cases of fascioliasis: clinical and microbiological features. Med Mal Infect 2006;36:42-6.
- 47 Boyd JW. The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats-normal serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. Res Vet Sci 1962;3:419-33.
- 48 Meeusen E, Lee CS, Rickard MD et al. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. Parasite Immunol 1995;17:35-45.
- 49 Chauvin A, Bouvet G, Boulard C. Humoral and cellular immune response to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. Int J Parasitol 1995;25:1227-41.
- 50 Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta et al. 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 2007;143: 275-86.
- 51 Roberts JA, Estuningsih E, Widjayanti S et al. Resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. Vet Parasitol 1997;68:69-78.