



TESIS DOCTORAL

**“SEROPREVALENCIA DE *Fasciola hepatica* EN
GANADO OVINO Y CAPRINO EN GALICIA Y
ANÁLISIS DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE
RIESGO”**

Ana Pérez Creo

DEPARTAMENTO DE PATOLOXÍA ANIMAL

FACULTADE DE VETERINARIA

LUGO

2015



DÑA. M^a PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

DÑA. ROSARIO PANADERO FONTÁN, Profesora Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

D. PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ, Profesor Interino del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

DÑA. CEFERINO MANUEL LÓPEZ SÁNDEZ, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**SEROPREVALENCIA DE *Fasciola hepatica* EN GANADO OVINO Y CAPRINO EN GALICIA Y ANÁLISIS DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO**” presentada por Dña. ANA PÉREZ CREO para optar al Título de Doctora en Veterinaria,

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorando, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 25 de septiembre de 2015



FINANCIACIÓN:

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de los proyectos de investigación:

Consolidación e estructuración de unidades de investigación competitivas (GPC) (2012-PG243). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (17/06/2012-30/11/2014). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia: Redes (R2014/005). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Investigador responsable: Rosario Panadero Fontán.

PUBLICACIONES:

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A. Artículos de investigación:

PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; BÉJAR, J.P.; MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; UBEIRA, F.M.; MORRONDO, P. (2015). *Fasciola hepatica* in goats from north-western Spain: Risk factor analysis using a capture ELISA. *The Veterinary Journal*, DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.07.033.

PÉREZ-CREO, A.; LÓPEZ, C.; DÍAZ, P.; VIÑA, M.; MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; UBEIRA, F.M.; MORRONDO, P. (2015). *Fasciola hepatica* in sheep from north-western Spain: Risk factor analysis using a capture ELISA. *Veterinary Parasitology*, (enviado para su publicación).

C. Contribuciones a Congresos:

PEREZ-CREO, A.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ-SERNANDEZ, V.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; UBEIRA, F.M. **Seroprevalence of *Fasciola hepatica* in galician sheep by using a capture ELISA.** Congreso de la



Sociedad Española de Parasitología; Gran Canaria, 17-20 Septiembre 2013.
(Comunicación oral)

LÓPEZ, C.M.; PANADERO, R.; DÍAZ, P.; **PÉREZ, A.**; CABANELAS, E.; DÍEZ-BAÑOS,P.; MORRONDO, P. **The goat as a risk factor for parasitic infections in ovine flocks.** Congreso de la Sociedad Española de Parasitología; Gran Canaria, 17-20 Septiembre 2013. (Comunicación oral)

PÉREZ, A.; DÍAZ,P.; LÓPEZ,C.; MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V.; PANADERO, R.; UBEIRA, F.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. **Assessment of some potential risk factors for *Fasciola hepatica* infection in goats by using a capture ELISA.** WWVIII Congreso Nacional SOIPA; Roma 24-27 Junio 2014. (Comunicación oral).







A mi hermano Sabi



AGRADECIMIENTOS

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

A mis directores, a los que profeso una gran admiración, gracias por tratarme siempre con un inmenso cariño y por su preocupación en que adquiriera el mayor conocimiento posible a lo largo de estos cinco años. A la Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo, por su preocupación y dedicación en todo momento. A la Profa. Dra. Rosario Panadero por su inmensa paciencia y su brillante visión de la investigación. Al Prof. Dr. Pablo Díaz por siempre estar dispuesto a echar una mano, por los buenos consejos y su apoyo incondicional. Al Prof. Dr. Ceferino López por aportar sus interminables conocimientos matemáticos e informáticos y por su siempre buen humor.

Al Catedrático de la unidad de Parasitología y Enfermedades parasitarias, el Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por poner a mi disposición todos los medios necesarios del laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias; así como por ser una fuente incansable de conocimientos. Gracias por su inestimable ayuda y consejos.

Al Prof. Dr. Gonzalo Fernández por su preocupación continua por que estemos bien y por su inmensa experiencia en el campo de la Veterinaria y la investigación. Es un honor trabajar todos los días a su lado.

Al Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la USC, Prof. Dr. Florencio Martínez Ubeira, por cedernos amablemente las microplacas sensibilizadas con las que se ha trabajado en este estudio y a Victoria Martínez-Sernández por enseñarme los entresijos de la técnica. Gracias a los dos por responder a todas nuestras dudas con tanta amabilidad durante la elaboración del mismo.

A los Profesores Doctores Rita Sánchez-Andrade, Adolfo Paz Silva y María Sol Arias por su ayuda, siempre que la he necesitado, su compañerismo y por los ratos compartidos a lo largo de estos años.

A Fabián, José Ángel Malagón y Silvia por ser un amor de niños y unos inmejorables compañeros de laboratorio con los que tengo pasado muy buenos momentos.

A los compañeros que ya “han volado del nido” Andreu, Rosalía, Noelia, Iago, Cristiana, Isa, Pato, Luis, Vicente porque cada uno me aportó algo que me hizo mejorar en el terreno personal y profesional.



A mis tres grandes tesoros en el departamento: Eva, Esther y Pablo Béjar, os merecéis una página de agradecimientos cada uno. A Esther por sus achuchones en mis días grises y su alegría andaluza. A Eviña porque es mi luz y mi ángel de la guarda. A Pablito por su forma de ser encantadora y estar dispuesto a ayudar aunque esté saturado.

A mis otros tesoros escaleras arriba, a Alberto Prieto y José. Porque no puedo tener unos mejores compañeros de trabajo y aventuras en INVESAGA. A Alberto por ser un compañero diez al que admiro por su perfecto e incansable trabajo. A José por sus grandes conocimientos matemáticos e informáticos y por ayudarme siempre con una inmensa paciencia.

A Ana, Miguel y Yolanda los veterinarios de la ADS de ACIVO que hicieron posible este estudio; porque es un placer trabajar con ellos y porque siempre están dispuestos a responder a mis incansables preguntas sobre el mundo de los pequeños rumiantes.

A Andrea, Marta y Laura que hacen que haber estudiado la carrera de mis sueños y haber trabajado en lo que me gusta, sea doblemente satisfactorio ya que si no hubiera sido así, no las habría conocido. Gracias por estar siempre ahí, sois tres pilares fundamentales en mi vida.

A mis padres, Sabino y Gloria, porque nunca podré agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí. Por estar siempre a mi lado, por decirme “tí podes” y por vuestra eterna paciencia. Gracias por escucharme hablar de ELISAS, sueros, anticuerpos... como una cotorra; por los consejos, por los achuchones y los besos... me siento muy afortunada de teneros como padres.

A Alberto, por tener un máster en amor, comprensión y paciencia. Por todo el apoyo que recibo todos los días, sin ningún reproche y tener una capacidad innata de hacerme reír cuando llego a casa con el nubarrón encima de mi cabeza. Esta Tesis es de los dos.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS.....	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. GANADERÍA OVINA Y CAPRINA EN ESPAÑA	13
3.1.1. Censo y producción de ovino.....	15
3.1.2. Censo y producción de caprino	19
3.2. FASCIOSIS	23
3.2.1. Ciclo biológico.....	24
3.2.2. Factores epidemiológicos que influyen en la infección por <i>F. hepatica</i>.	29
3.2.2.1. Factores extrínsecos.....	30
3.2.2.2. Factores intrínsecos	35
3.2.3. Diagnóstico de las infecciones por <i>F. hepatica</i>.....	42
3.2.3.1. Técnicas directas.....	42
3.2.3.2. Técnicas indirectas.....	47
3.2.4. Fasciolosis en pequeños rumiantes	52
3.2.4.1. Cuadro clínico y pérdidas económicas	53
3.2.4.2. Prevalencia de parasitación	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS EXPLOTACIONES.....	63
4.1.1. Zona de estudio.....	65
4.1.2. Manejo de las explotaciones	67
4.2. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	68
4.2.1. Registro de datos de los animales y de las explotaciones	70
4.2.2. Procesado de las muestras	70
4.2.2.1. Equipos, materiales y reactivos empleados en el test ELISA.....	71



4.2.2.2. Procedimiento del ensayo	72
4.2.2.3. Expresión e interpretación de los resultados obtenidos.....	74
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	74
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
5.1. SEROPREVALENCIA INDIVIDUAL Y POR REBAÑO DE <i>Fasciola hepatica</i> EN GANADO OVINO Y CAPRINO DE GALICIA	81
5.2. DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS FACTORES DE RIESGO EN LA SEROPREVALENCIA POR <i>F. hepatica</i>	87
5.2.1. En ganado ovino	87
5.2.2. En el ganado caprino.....	100
5.3. MEDIDAS A ADOPTAR PARA REDUCIR LAS INFECCIONES POR <i>F. hepatica</i> EN GANADO OVINO Y CAPRINO DE GALICIA	113
6. CONCLUSIONES	119
7. RESUMEN	123
8. BIBLIOGRAFÍA	131





INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

En Galicia, la ganadería constituye el pilar fundamental de la actividad agraria, siendo la explotación del ganado vacuno de actitud lechera el más importante, representando el 39% de la producción española (MAGRAMA, 2013). No obstante, el elevado precio de los cereales, debido a su empleo como biocombustibles, junto con el descenso del precio de la leche ha causado una importante disminución del número de explotaciones de vacuno de leche en Galicia. Este hecho, unido a que las nuevas orientaciones de la Política Agraria Común (PAC) desincentivan la producción intensiva de alimentos, la desaparición de las cuotas lácteas y el apoyo a medidas agroambientales que sean más respetuosas con el entorno natural, ha ocasionado que muchos ganaderos se hayan decantado por la explotación de ganado ovino y caprino como una alternativa válida a la cría de ganado vacuno lechero.

En las últimas décadas, se ha considerado la contribución de los pequeños rumiantes en la gestión eficaz de la superficie agraria de Galicia; en este sentido se desarrolló un Convenio Silvopastoril en los años 2007-2009 en el que intervinieron la Consellería do Medio Rural y la Asociación de Defensa Sanitaria de Ovino y Caprino de Galicia “ACIVO”, que tuvo como objetivos fundamentales:

- Poner en valor la producción agroganadera y forestal, así como del territorio, contribuyendo a fijar y mantener la población del medio rural, al tiempo que se compatibilizaba la explotación de la ganadería extensiva y de la fauna silvestre.
- Ordenar el territorio a través de la gestión de la superficie infrautilizada, incrementando la extensión de los pastos de las explotaciones.
- Utilizar el ganado ovino y caprino para controlar la biomasa y, de esta forma, prevenir los incendios, al tiempo que, se revaloriza la producción ganadera y forestal.

En la actualidad en España existe un importante nicho de mercado para la comercialización de la carne de cordero y cabrito; sin embargo, a pesar de que en Galicia se dispone de importantes zonas de pasto y de suficiente cantidad de forraje para la explotación de estos pequeños rumiantes, solo se produce el 30% de la carne de cordero que se consume.

Para fortalecer la producción de carne de ovino y caprino en Galicia, al tiempo que se aumenta su competitividad en el mercado español, se debe disponer de unas explotaciones con un correcto estado sanitario que permita optimizar su rendimiento. En este sentido resulta imprescindible determinar cuáles son las principales infecciones parasitarias que afectan a los pequeños rumiantes en esta Comunidad Autónoma, para así poder instaurar las correspondientes pautas de control y, de esta forma, reducir las importantes pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, que ocasionan las parasitosis. No obstante, el adecuado desarrollo y posterior aplicación de programas estratégicos de control se basa en la elaboración previa de estudios epidemiológicos de los procesos parasitarios que afectan a los animales de una determinada zona (González-Lanza *et al.*, 1993; Jithendran y Bhat, 1999; Dimander *et al.*, 2003). De hecho, se ha constatado que la aplicación de tratamientos antihelmínticos incorrectos y sin base epidemiológica, además de resultar poco eficaces y muy costosos, provoca problemas de resistencias antihelmínticas (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2006a; Díez-Baños *et al.*, 2008; Torres-Acosta *et al.*, 2012; Papapoulos *et al.*, 2012; Geurden *et al.*, 2014; Martínez-Valladares *et al.*, 2015).

En Galicia, debido a que existen las condiciones climáticas y edáficas que favorecen el desarrollo del ciclo biológico de *Fasciola hepatica*, las infecciones por este trematodo hepático son frecuentes en los animales, especialmente en los rumiantes. Nuestro grupo de Investigación en Sanidad Animal en Galicia (INVESAGA), en estudios previos, ha comprobado que existe una elevada prevalencia de infección en el ganado vacuno (Morrondo *et al.*, 1994, 1997, 2003; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000, 2002; Díaz, 2006; Arias *et al.*, 2011); asimismo, en estos trabajos se analizó la influencia de diversos factores intrínsecos (edad, sexo, raza) y extrínsecos (condiciones edafoclimáticas, tipo de manejo, etc.). Sin embargo, los estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado ovino y caprino son escasos en esta comunidad (Paz-Silva *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 2008).

Con el avance de las técnicas de inmunodiagnóstico se han puesto a punto nuevas técnicas serológicas como el ELISA MM3-SERO, que utiliza antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica* y que según Muiño *et al.* (2011) tiene una especificidad y sensibilidad del 100% y 99%, respectivamente. Este test de inmunodiagnóstico ha demostrado ser de gran utilidad para determinar, en encuestas seroepidemiológicas, la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado vacuno (Mezo *et al.*, 2004).







OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Tomando como base lo expuesto anteriormente, nos planteamos un estudio cuyos principales **OBJETIVOS** fueron:

1°. Comprobar la utilidad de la técnica de inmunodiagnóstico ELISA MM3-SERO para realizar encuestas seroepidemiológicas en ganado ovino y caprino infectado de forma natural por *F. hepatica*.

2°. Establecer la seroprevalencia de infección por este trematodo en ganado ovino y caprino explotado en régimen extensivo y semiextensivo de Galicia.

3°. Determinar la influencia de diferentes factores de riesgo, tanto intrínsecos (edad, sexo y raza) como extrínsecos (condiciones edafoclimáticas de la zona, tipo de manejo y tamaño de los rebaños) sobre la seroprevalencia por este trematodo hepático.

4°. Proponer medidas de control específicas frente a *F. hepatica*, en las explotaciones de ovino y caprino en Galicia, al considerar los principales factores de riesgo identificados.





REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. GANADERÍA OVINA Y CAPRINA EN ESPAÑA

La cría de pequeños rumiantes ha estado siempre ligada al territorio español. La rusticidad de estas especies hace que se consideren como las más indicadas para el aprovechamiento de los recursos existentes en áreas fundamentalmente de secano, contribuyendo de forma importante a la economía del país (Sánchez Belda y Sánchez Tujillano, 1986).

La excelente calidad y cantidad de la lana que producían las ovejas españolas junto con la gran expansión ganadera en los reinos de Castilla y León, les permitió dominar el mercado internacional en los siglos XI y XII, lo que se tradujo en un importante impulso del sector en nuestro país que en esos momentos atravesaba una situación delicada. Por ello, el ganado ovino recibió numerosos privilegios como la creación del “Honrado Concejo de la Mesta” en 1273 por Alfonso X El Sabio.



Figura 3.1. Vayreda, J. “Paisatge amb ramat de bens (Paisaje con un rebaño de ovejas)” Óleo sobre lienzo, c. 1881. Colección Carmen Thyssen-Bornemisza en depósito en el Museo Thyssen-Bornemisza, Madrid.

Extraído de www.pinterest.com

En la época en la que el ganado ovino tenía un importante protagonismo en la economía nacional, el caprino tenía un papel más modesto. No obstante, el clima y la orografía de España, junto con la capacidad de las cabras para aprovechar los pastos de menor calidad, hicieron que la explotación de este ganado fuese una importante fuente de recursos para las familias (Gallego, 1993).

La situación privilegiada del ganado ovino decae a finales del S. XV, debido a que los agricultores presionan a los ganaderos roturando los pastos e invadiendo las cañadas. Así, mientras que en Europa se empezaba a definir el modelo mixto agrícola-ganadero, en España se consolidaba el desmantelamiento del sector ganadero (Doménech y Barco, 1994), obligando a instaurar un sistema de explotación extensivo que alejaba a los ovinos de las tierras más productivas. En consecuencia, se obstaculizó el desarrollo tecnológico del sector ovino justo en el momento en el que se tenía que haber favorecido la producción de carne o de leche y, por tanto, la explotación del ganado ovino quedó relegada a granjas familiares poco tecnificadas.

A mediados del siglo XX la producción de pequeños rumiantes queda relegada al olvido debido al incremento de la explotación de otras especies cárnicas, como el porcino y las aves, más tecnificadas y desligadas totalmente de la tierra. Además, fue el ganado caprino el que experimentó mayor regresión, debido a la falsa idea de que producía graves daños a las zonas forestales españolas (Romagosa, 1975).

En la actualidad, en España, la explotación de ganado ovino y caprino es esencial para mantener la actividad agraria en zonas con limitaciones agroclimáticas, debido a la gran adaptación de estos animales, en especial de los de razas autóctonas, al medio en el que viven. La explotación de estos rumiantes en régimen extensivo o semiextensivo hace que esta sea una ganadería sostenible. Además, el manejo tradicional de los rebaños favorece la presencia humana en zonas rurales poco favorecidas y, en consecuencia, frena el despoblamiento del medio rural y ayuda a la conservación del medio, puesto que se mantiene el entorno en buenas condiciones agroambientales.

Galicia tuvo en el pasado una relevante importancia en la explotación de pequeños rumiantes; a mediados del siglo XIX tenía un censo aproximado de dos millones de efectivos, de los que el 75% correspondían al ganado ovino. En la tercera década del siglo XX el censo se había reducido a la mitad, aunque se mantuvo la proporción de ambas especies. No obstante, Bouhier (1979) sugiere que estos censos no son fiables, debido fundamentalmente a que los ganaderos no declaraban el número real de animales que tenían en su explotación. El verdadero inicio de una drástica reducción del censo se llevó a cabo con el comienzo de las repoblaciones forestales masivas en los años 50.

3.1.1. Censo y producción de ovino

En el año 1970 había en España unos 17.000.000 efectivos que, debido a la incorporación de España a la Comunidad Económica Europea (CEE), aumentaron en más de 3 millones, siendo el censo en 1986 de 20.310.000 de cabezas. Posiblemente parte de este incremento se debió a que dentro del marco de la Política Agraria Común (PAC) se concedieron primas por la explotación de ganado lanar. En el año 2013, según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014), en España estaban censadas más de 16 millones de cabezas, lo que le confiere una importante relevancia dentro de la actual Unión Europea (UE), ya que es el segundo país con mayor censo ovino, representando el 20% del total comunitario, únicamente superado por el Reino Unido (Figura 3.2).

Respecto a la estructura y número de las explotaciones, se aprecia un ligero descenso en los últimos años, puesto que había 122.694 en el 2007 y en el 2013 estaban censadas 111.787. Sin embargo, según el MAGRAMA, la cifra provisional de explotaciones a 1 de enero del 2014 (Datos SITRAN; Sistema Integral de Trazabilidad Animal) era de 114.902, lo que implica que desde enero del 2013 se ha registrado un aumento del 0,38% y, por lo tanto, se está deteniendo la tendencia de reducción registrada en los últimos años, siendo las explotaciones de producción mixta las que más se han incrementado (3,6%).

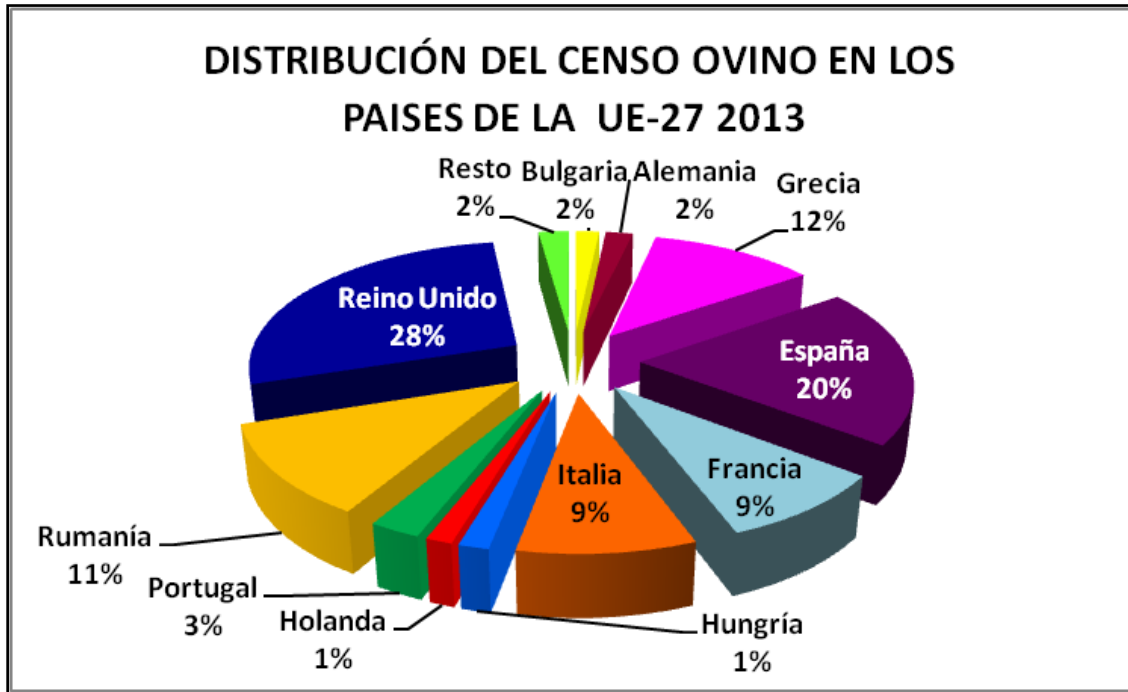


Figura 3.2. Distribución del censo ovino en los países de la UE (MAGRAMA, 2014)

En los últimos años ha aumentado la producción de leche, en especial la de oveja (9,7% en el período 2011-2012), debido al incremento de la fabricación de quesos y de otros productos derivados de la leche. Castilla y León es la Comunidad con mayor producción (366.537.000 de litros), lo que supone el 66,3% del total español. Por el contrario, la carne de ovino experimentó, a principios del año 2000, el máximo de producción registrándose posteriormente, un descenso continuado hasta nuestros días.

Dentro de España existen diferencias notables (Figura 3.3) en la extensión y localización de las explotaciones ovinas, siendo Extremadura la comunidad con mayor censo (21%), seguida de Castilla y León (19%), Castilla la Mancha (15%) y Andalucía (13,3%).

En Galicia, el ganado ovino no tiene la misma importancia que en otras regiones del país. En el año 2013 estaban censadas 204.492 cabezas, distribuidas en 23.619 rebaños (Consellería do Medio Rural, 2014), lo que representa el 1,2% del censo nacional (Figura 3.3).

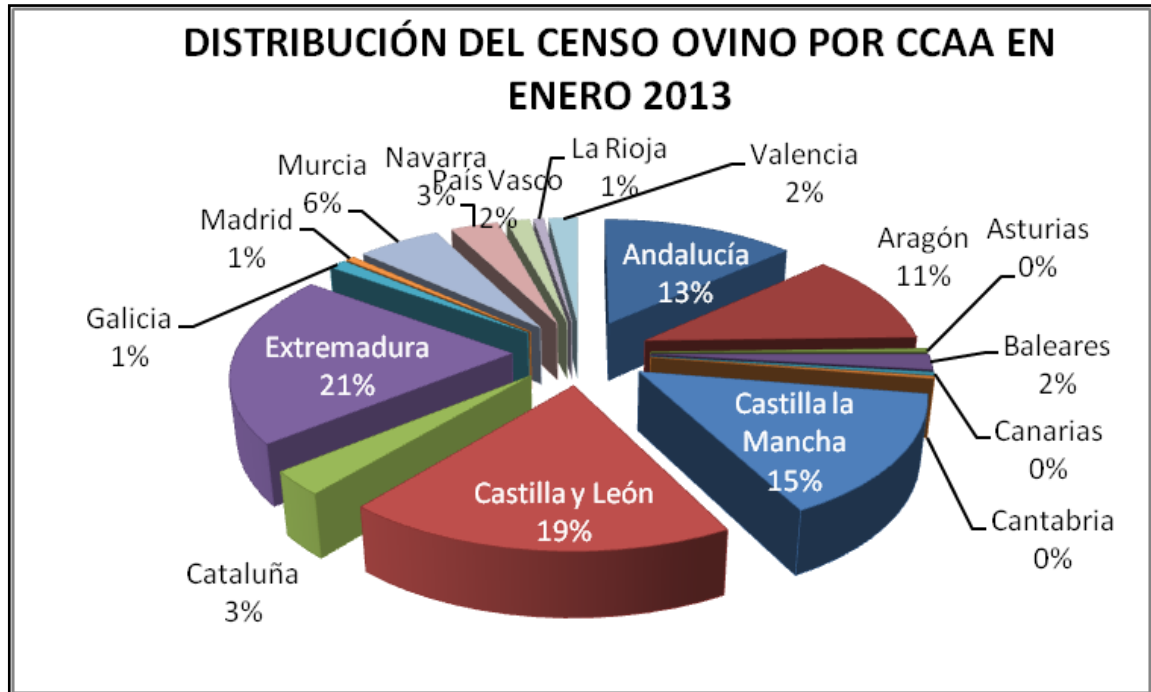


Figura 3.3. Distribución del censo ovino en España (MAGRAMA, 2014)

Entre los diversos motivos que han incidido sobre el bajo censo de ganado ovino en Galicia, cabe señalar el abandono progresivo del aprovechamiento del monte y la repoblación forestal claramente opuesta a los intereses ganaderos. En este contexto, extensas áreas ocupadas en otro tiempo por el ganado ovino dejaron de utilizarse para este fin. Además, las tierras más productivas se han destinado a la producción de ganado vacuno de leche y de carne.

En la actualidad los principales rebaños se localizan en las provincias de Ourense y Lugo, en las que está censado el 68% de la ganadería ovina gallega (Tabla 3.1). En Galicia, el ganado ovino se explota fundamentalmente para producir carne; no obstante, solo representa el 0,1% de la producción total de carne en nuestra Comunidad. La Consellería do Medio Rural (2013) estima que se producen 350 toneladas de carne de cordero, si bien esta cifra podría ser superior si se tiene en cuenta que un importante número de ovinos se sacrifican en matanzas domiciliarias.

Tabla 3.1. Análisis provincial del censo de ovinos (MAGRAMA, 2014)

Provincia	Corderos	Sementales	Hembras	% ovino respecto al total español	% ovino respecto al total gallego
A Coruña	1.081	2.914	29.493	0,24%	17,4%%
Lugo	1.931	3.334	51.484	0,43%	29,4%
Ourense	5310	3.396	68.471	0,53%	38,6%
Pontevedra	497	1.678	25.433	0,2%	14,6%
GALICIA	8.819	11.022	174.881	1,4%	
ESPAÑA	2.777.241	399.192	13.162.940		

La mayoría de los rebaños gallegos son de pequeño tamaño y tan solo el 1% de las explotaciones tienen más de 100 cabezas, siendo la media de 263 animales por rebaño (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Estructura productiva por tamaño de explotación (Consellería do Medio Rural, 2014).

Cabezas Explotación		<10	10 a 49	50 a 99	100 a 249	> 249	TOTALES
A Coruña	Explot.	5.899	817	28	8	7	6.759
	Cabezas	21.575	13.247	1.737	1.226	2.760	40.545
Lugo	Explot.	5.579	1.534	151	68	16	7.348
	Cabezas	22.540	28.475	10.521	10.153	5.267	76.956
Ourense	Explot.	2.252	1.305	184	150	51	3.942
	Cabezas	10.856	25.422	12.608	23.901	19.901	92.688
Pontevedra	Explot.	5.473	724	36	24	-	6.257
	Cabezas	19.183	11.597	2.356	3.623	-	36.759
Galicia	Explot.	19.203	4.380	399	250	74	24.306
	Cabezas	74.154	78.741	27.222	38.903	27.928	246.948

* Explot.: número de explotaciones

Los propietarios de los rebaños más grandes, en general, están integrados en la Asociación de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) de ovino y caprino de Galicia ACIVO, la única que cuenta con un equipo de veterinarios especializados y responsable de llevar a cabo los distintos programas sanitarios en los pequeños rumiantes gallegos.

Asimismo, como se refleja en la Tabla 3.3, es frecuente observar la presencia de cabras conviviendo en un contacto más o menos estrecho con las ovejas.

Tabla 3.3. Tipos de rebaños en Galicia (Consellería do Medio Rural, 2014).

EXPLOTACIONES	Nº DE OVEJAS	Nº DE CABRAS
Solo ovejas	154.059	-
Solo cabras	-	22.224
Mixtas	47.728	22.937
TOTALES	201.787	45.161

3.1.2. Censo y producción de caprino

En España la explotación de las cabras ha estado vinculada a las áreas más desfavorecidas, como las zonas de montaña y las áreas agrícolas en las que había terrenos de baldío y restos de cultivos.

Según el MAGRAMA (2014), son los países mediterráneos (Grecia, España, Italia, Francia) los que tienen el 75% de la cabaña caprina censada en la UE, siendo Grecia (35%) y España (21%) los que tienen mayor número de cabras (Figura 3.4).

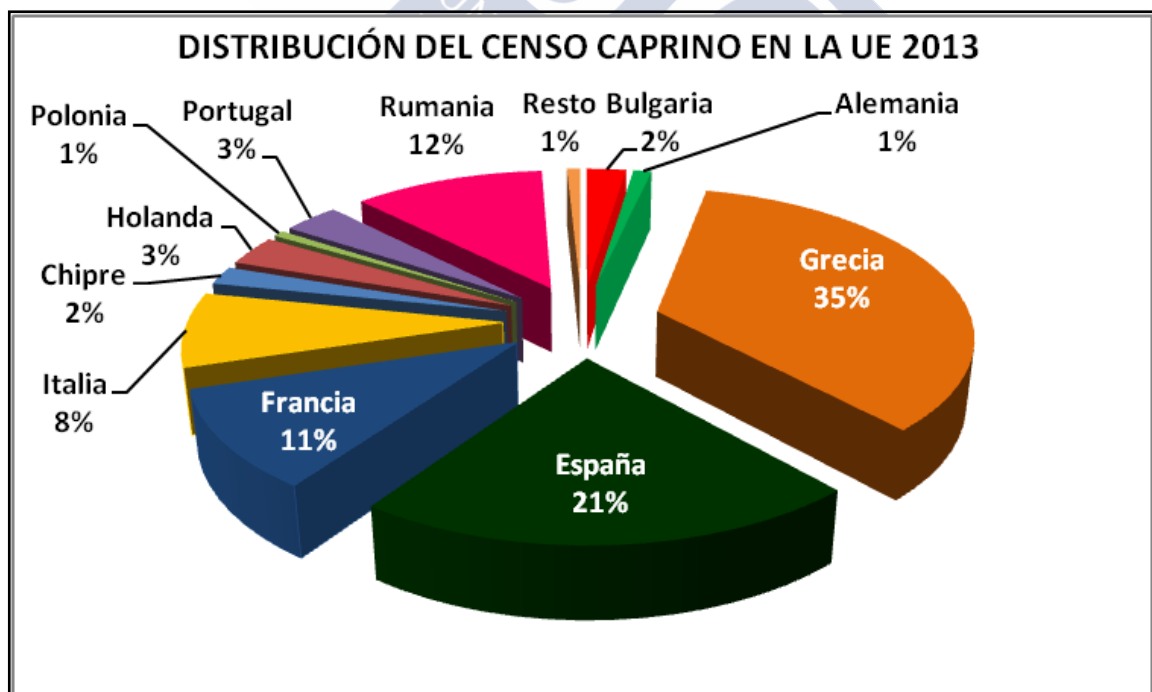


Figura 3.4. Censo caprino en la UE (MAGRAMA, 2014).

En los últimos años la explotación del ganado caprino en España se ha profesionalizado, aunque sigue siendo bastante heterogénea respecto a los sistemas de explotación, razas utilizadas y nivel de formación de los ganaderos. La mayoría de las cabras se explotan para producción leche que se utiliza, básicamente, en la elaboración de quesos. En la actualidad, la producción de leche de cabra en nuestro país es de 330.500 toneladas anuales (MAGRAMA, 2014), lo que nos permite competir con Francia y Holanda en la producción de quesos frescos y maduros. Por el contrario, la producción de carne se considera, en general, un producto secundario hasta el punto que desde el año 2000 se ha reducido drásticamente el número de explotaciones de caprino de carne.

En cuanto al régimen de manejo, las razas de caprino de alta producción lechera y, por tanto, con altas exigencias nutritivas, se crían en intensivo o en semiextensivo en áreas topográficas poco accidentadas y con elevada disponibilidad forrajera; sin embargo, las razas de menor producción lechera se mantienen en pastoreo extensivo o semiextensivo en zonas de montaña o de cultivos marginales, en los que aprovechan los subproductos agrícolas.

En España el número de cabras y de explotaciones ha experimentado un notable ascenso en los últimos años (MAGRAMA, 2014), siendo Andalucía (28%), Castilla la Mancha (15%) y Canarias (11%) las comunidades autónomas que tienen mayor censo de ganado caprino (Figura 3.5).

En Galicia, los rebaños de cabras siempre han estado ligados a zonas de montaña, donde hace años se explotaban en “*veceiras*” (rebaños comunitarios), normalmente de forma conjunta con ganado ovino. Este pequeño rumiante resulta óptimo para el aprovechamiento de los recursos naturales de nuestra Comunidad, debido a su rusticidad y adaptación a la orografía y climatología de las montañas gallegas. En la actualidad este sector se está profesionalizando, y cada vez son más las explotaciones en las que se cría exclusivamente ganado caprino. El tamaño de estas ganaderías es variable, siendo frecuente los rebaños con menos de 100 animales, aunque excepcionalmente hay explotaciones con más de 400 cabezas.

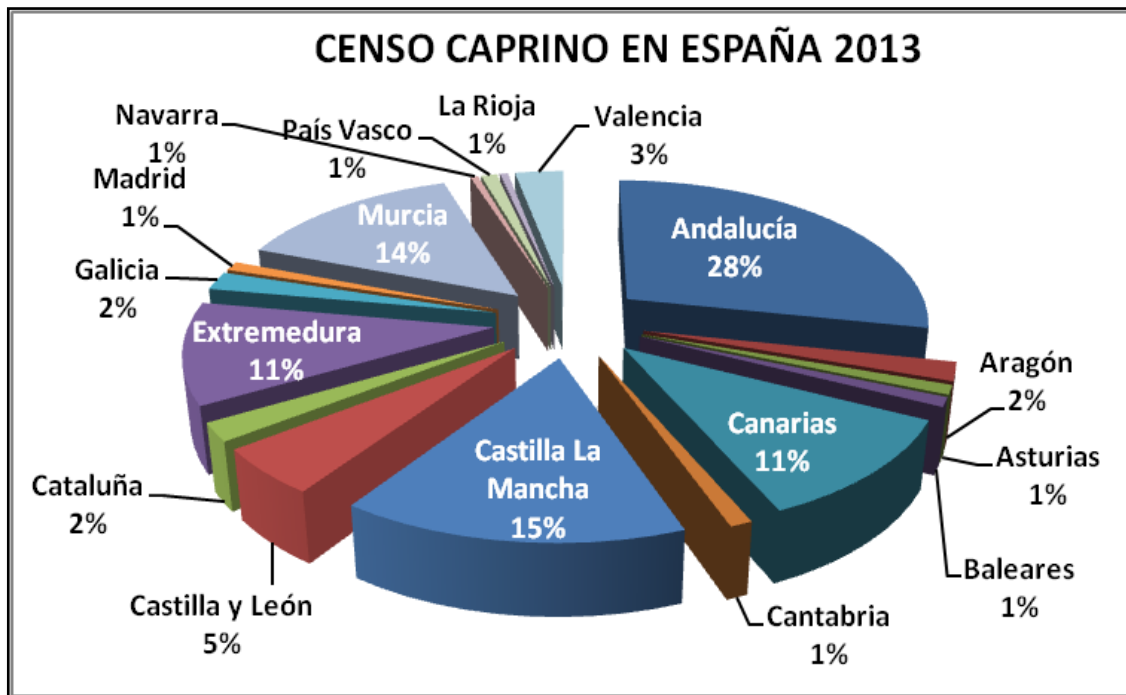


Figura 3.5. Distribución del censo caprino en España (MAGRAMA, 2014).

La “*Cabra Galega*” es la única raza autóctona originaria de Galicia. Su importancia radica en su excepcional rusticidad y en su capacidad de adaptación a las zonas con pastos en los que difícilmente se podrían mantener otros animales. Su ancestro es la especie *Capra aegagrus* que, dentro del denominado tronco pirenaico, en España dio lugar a un importante número de razas que se dispersaron por las zonas montañosas, especialmente en el norte de la península. No obstante, determinados caracteres étnicos de la raza, como son los cuernos tipo Aegagrus en las hembras y los cuernos tipo Prisca en los machos, pueden haber derivado de un tronco distinto. La adaptación que experimentó la raza a las condiciones orográficas y climatológicas gallegas le otorgó las cualidades y características que observamos hoy en día.

Dentro de las características morfológicas de la raza Cabra Galega podemos destacar su perfil recto o subcóncavo, eumétrico, sublongilíneo y el gran dimorfismo sexual. En lo concerniente a la capa, presenta diferentes tonalidades que van del color caoba al rojizo y, a veces, se pueden observar pelos largos y abundantes en las distintas regiones del tercio anterior y posterior, o distribuidos por todo el cuerpo. Los cuernos se sitúan en arco hacia atrás y se caracterizan, como ya comentamos anteriormente, por ser de tipo Aegagrus en las hembras y frecuentemente de tipo Prisca en los machos (Figura 3.6).



Figura 3.6. Rebaño de Cabra Galega.

Se calcula que en el siglo XVIII había 600.000 ejemplares, mientras que en la actualidad su censo es de 50.000. Este drástico descenso se produjo, entre otras razones, porque hasta hace poco esta raza no estaba reconocida y no había ninguna asociación de criadores preocupada por su conservación. Además, con objeto de evitar problemas de consanguinidad se importaron sementales de otras razas autóctonas de otras Comunidades Españolas y de Portugal. Cuando en el año 2010 se iniciaron los programas de recuperación de esta raza autóctona, y debido a que en Galicia estos animales siempre estuvieron ligados a zonas montañosas, se encontraron ejemplares de cabra galega en los Ancares lucenses y en la Baixa Limia en Ourense. En el último censo realizado en 2012, el número de animales había aumentado considerablemente, debido a que se había incrementado el número de criadores que apostaban por esta raza (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Censo de ejemplares adultos de raza cabra galega en el libro genealógico (BOAGA, 2012)

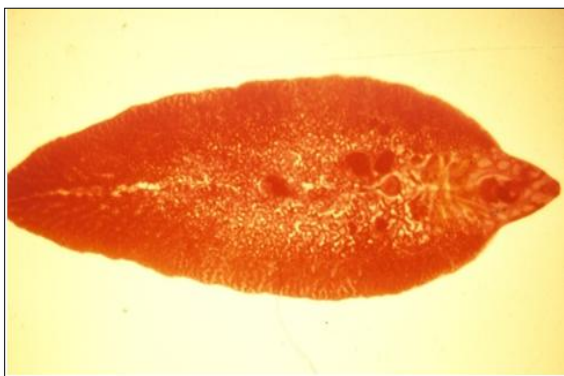
	GANADERÍAS	MACHOS	HEMBRAS	TOTAL DE EJEMPLARES
A CORUÑA	6	6	42	48
LUGO	18	32	237	269
OURENSE	21	25	163	189
PONTEVEDRA	9	5	29	34

El principal objetivo de la explotación de cabra galega es la producción de carne de cabrito. Estos se crían de dos formas; en extensivo, donde las crías salen al monte desde el primer día de vida y únicamente se alimentan con leche materna, o en semiextensivo, siendo también alimentados por sus madres, pero cuando las condiciones climatológicas son adversas se estabulan y su alimentación se suplementa con cereales.

3.2. FASCIOSIS

Esta enfermedad está causada por parásitos trematodos Digenea que pertenecen al género *Fasciola*, y cuya difusión geográfica es cosmopolita, puesto que su distribución es prácticamente mundial. Se han descrito varias especies dentro del género *Fasciola*, pero sólo se reconocen como válidas desde el punto de vista taxonómico a *Fasciola hepatica*, Linneo (1758) y *Fasciola gigantica*, Cobbold (1855). La primera predomina en zonas de climas templados, en tanto que la segunda se encuentra con mayor prevalencia en regiones tropicales o subtropicales, sin excluir su presencia en otras regiones.

F. hepatica parasita a numerosas especies de mamíferos, si bien se consideran hospedadores más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres. Así pues, en España se ha encontrado parasitando ovejas, cabras, vacas, gamos, ciervos, corzos, asnos, caballos, cerdos, jabalíes, conejos, liebres y también al hombre (Rojo y Ferre, 1999; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).



Los ejemplares adultos de *F. hepatica* tienen forma lanceolada y su tamaño oscila entre 2,5-5,0 y 0,4-1,3 cm; en el polo anterior se aprecia un cono cefálico bien diferenciado, que finaliza en una ventosa oral, fácilmente visible y muy cercana a otra ventosa ventral o acetábulo más grande.

El tegumento varía de color blanco a marrón y posee una cutícula gruesa, de 10 a 17 μm , provista de pequeñas espinas triangulares y orientadas hacia atrás. Bajo el tegumento se dispone la musculatura subcuticular lisa y estratificada, formada por tres capas que se sustentan sobre el mesénquima sincitial. Esta cubierta corporal es muy activa y, aparte de mantener la integridad del parásito, interviene en funciones de absorción–secreción y por tanto, en la nutrición. El aparato digestivo comienza en la boca, se continúa con una faringe musculosa, el esófago es corto y se comunica con dos ciegos ramificados y extendidos hasta la porción posterior; carece de ano, de modo que elimina los productos de excreción a través del estoma. El sistema nervioso está formado por un par de ganglios cerebroides interconectados, situados por debajo de la ventosa oral, y de esta estructura parten pares de cordones longitudinales ventrales, dorsales y laterales. El aparato excretor protonefridial está constituido por células en llama, comunicadas con los tubillos colectores que se abren a su vez hasta la vesícula excretora. Una característica propia de *Fasciola* es ser hermafrodita, lo que facilita enormemente el elevado potencial reproductor de este trematodo. El aparato genital masculino ocupa la parte media del cuerpo; está formado por dos testículos ramificados, que desembocan en la bolsa del cirro situada al lado del acetábulo; el poro genital se ubica en el borde acetabular anterior, sobre la línea media. El aparato genital femenino consta de un ovario muy ramificado situado al lado derecho del cuerpo, por delante de los testículos. El útero es corto y sinuoso, y está situado en el tercio anterior del trematodo; casi siempre se halla lleno de huevos característicos ovoides y operculados y que primero pasan a la bilis y después se eliminan con las heces sin embrionar.

3.2.1. Ciclo biológico

F. hepatica tiene un ciclo biológico indirecto, en el que participa un caracol anfibio como hospedador intermediario, que en nuestra latitud es *Galba truncatula*. Este parásito completa su ciclo en diversos hospedadores definitivos como los rumiantes, équidos, suidos, lagomorfos, roedores e incluso en el hombre.

Se ha comprobado que existen diferencias en la resistencia o sensibilidad a esta parasitosis dependiendo de la especie animal. El cerdo, el jabalí, el perro y el gato, oponen una rápida respuesta contra el parásito limitando mucho su desarrollo. En cambio los equinos,

el hombre, los bovinos y ovinos reaccionan en forma tardía, permitiendo su desarrollo. Asimismo destacan los dos últimos hospedadores indicados como los más receptivos (Díez-Baños, 2011).

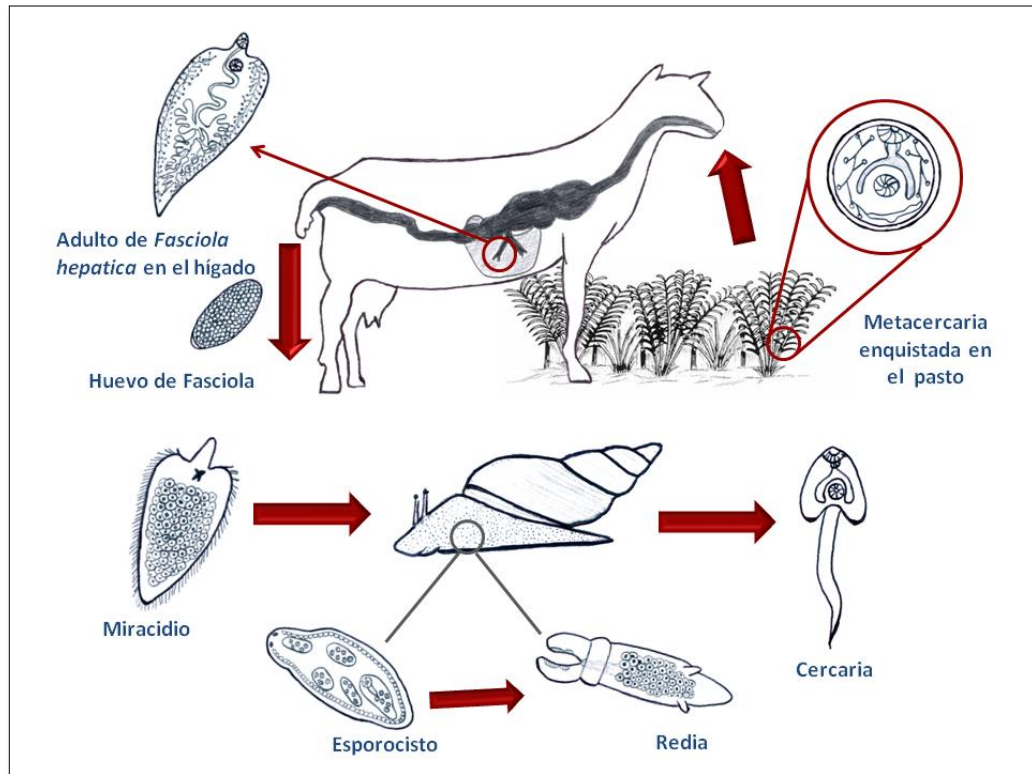


Figura 3.7. Ciclo biológico de *F. hepatica*

Como se puede observar en la Figura 3.7, *F. hepatica* posee un ciclo muy complejo en el que hay dos fases, la endógena que se desarrolla en el hospedador definitivo y la exógena que comprende tanto las fases de vida libre como las que se desarrollan en el hospedador intermediario.



La fase endógena se inicia cuando el hospedador definitivo ingiere las metacercarias que están enquistadas en la hierba. La infección de los animales tiene lugar durante el pastoreo, aunque también es posible que ocurra en estabulación, mediante el agua de bebida o al administrar henos o ensilados mal realizados.

Después de la ingestión aproximadamente el 40% se instauran en el hígado, siendo el resto eliminadas con las heces o perdidas en la migración intraorgánica (Rojo-Vázquez *et al.*, 2003).

El desenquistamiento de las metacercarias se produce en dos fases; la primera tiene lugar en el rumen y la segunda en el intestino delgado. Tras el desenquistamiento, las jóvenes duelas atraviesan la pared intestinal, pasan a la cavidad peritoneal y desde allí alcanzan el hígado. Durante algo menos de dos meses el parásito migra por el parénquima hepático, causando lesiones a su paso (Figura 3.8.a) y asentándose definitivamente en los conductos biliares a partir de los 40 días post-infección (pi), aproximadamente, donde alcanzan la madurez sexual (Figura 3.8.b). Los primeros huevos se observan en las heces de los hospedadores a los 55-60 días de la ingestión de las metacercarias (Rojo y Ferre, 1999).

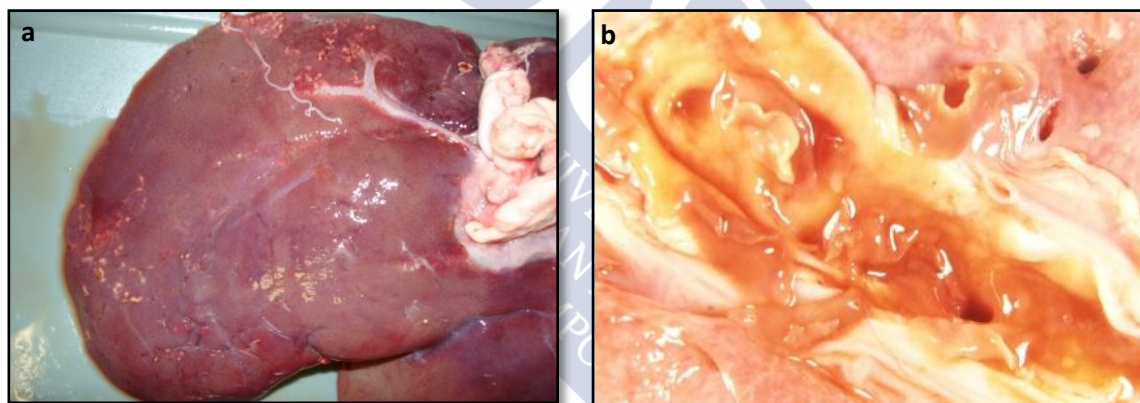


Figura 3.8. Hígado de ovino con lesiones producidas por la migración de las fases juveniles de *F. hepatica* (a) y adultos en conductos biliares (b)

El potencial biótico de *F. hepatica* es muy alto, comprobándose que un adulto puede producir más de 20.000 huevos al día, aunque este número depende tanto del hospedador como del parásito; por ejemplo, se ha observado que la excreción de huevos se reduce a medida que aumenta el número de trematodos maduros residentes en los canalículos biliares. Otro factor que afecta a la fertilidad es la actividad de la vesícula biliar, que a su vez depende de la ingesta y de la dieta del animal. De esta manera, un animal parasitado puede presentar una eliminación que oscile entre 2 y 3 millones de huevos por día. Además existe una

variación estacional en la eliminación de huevos al medio, observándose mayor excreción en otoño y primavera, aunque en infecciones crónicas los animales eliminan huevos durante todo el año (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

La **fase exógena** del ciclo se inicia cuando los huevos se eliminan sin embrionar junto con las heces del hospedador. Los huevos de *F. hepatica* son de color amarillo-marrón claro,



de forma ovoide y simétrica. Miden de 130-155 μm de largo por 70-90 μm de ancho. El desarrollo de los mismos continúa si en el medio existen unas condiciones térmicas (10-30°C) y de humedad adecuada, que les permitan estar recubiertos de una fina película de agua.

En condiciones termohigrométricas idóneas, en el interior del huevo se desarrolla una



larva denominada miracidio, cuya eclosión depende de la luz. Este sale a través del opérculo del huevo y se desplaza activamente ayudado por los cilios que rodean su cuerpo.

La vida del miracidio es muy corta y debe encontrar, antes de 24 horas, a su principal hospedador intermediario que, en nuestras latitudes, es *Galba (Lymnaea) truncatula*. Este caracol vive en lugares encharcados, entre el lodo, por lo que también se le denomina “caracol enano del cieno”.

Se caracteriza por ser de pequeño tamaño (6-10 mm), que carece de opérculo y posee una concha que presenta 5 vueltas hacia la izquierda, terminando en forma truncada. El potencial biótico



de estos moluscos es muy elevado, ya que un solo ejemplar, si las condiciones ambientales son favorables, puede generar hasta 25.000 descendientes en tres meses; además, la presencia de efluentes, abrevaderos para el ganado o canales de riego permiten su supervivencia en épocas secas y calurosas.

Cuando el miracidio se adhiere a la superficie del caracol segrega una enzima citolítica que rompe el epitelio, permitiéndole penetrar dentro del mismo.



Posteriormente los miracidios pierden los cilios y se transforman en esporocistos jóvenes que se caracterizan por carecer de tubo digestivo, tener forma de saco y un tamaño de 150 a 500 μm . Éstos se transforman en redias que se alimentan de los tejidos del hepatopáncreas del caracol y a los quince días ya se encuentran claramente diferenciadas de las masas germinales de células del esporocisto. Si las condiciones son desfavorables puede formarse una segunda generación de redias, aunque lo normal es que la primera generación dé lugar a las cercarias (Figura 3.9.a). Una vez que han alcanzado la

madurez necesaria, las cercarias abandonan la redia por el poro de nacimiento de ésta y posteriormente salen del caracol. Estas cercarias comienzan a emitirse de forma pasiva a los 45-55 días de la infección de los moluscos. Este hecho está influido por factores dependientes del ambiente y del caracol, destacando la temperatura, cuyo óptimo oscila entre los 9 y los 26°C, y el estrés al que se ve sometido el molusco (Manga, 1999).

Las cercarias, cuando salen del caracol, nadan impulsadas por su cola y se dirigen a la vegetación, donde se enquistan transformándose en metacercarias hasta que un hospedador definitivo las ingiera y así poder continuar su ciclo biológico.

Las metacercarias (Figura 3.9.b) son formas de resistencia del parásito que le permiten resistir condiciones adversas durante meses, aunque se caracterizan por ser muy sensibles a las altas temperaturas y desecación (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

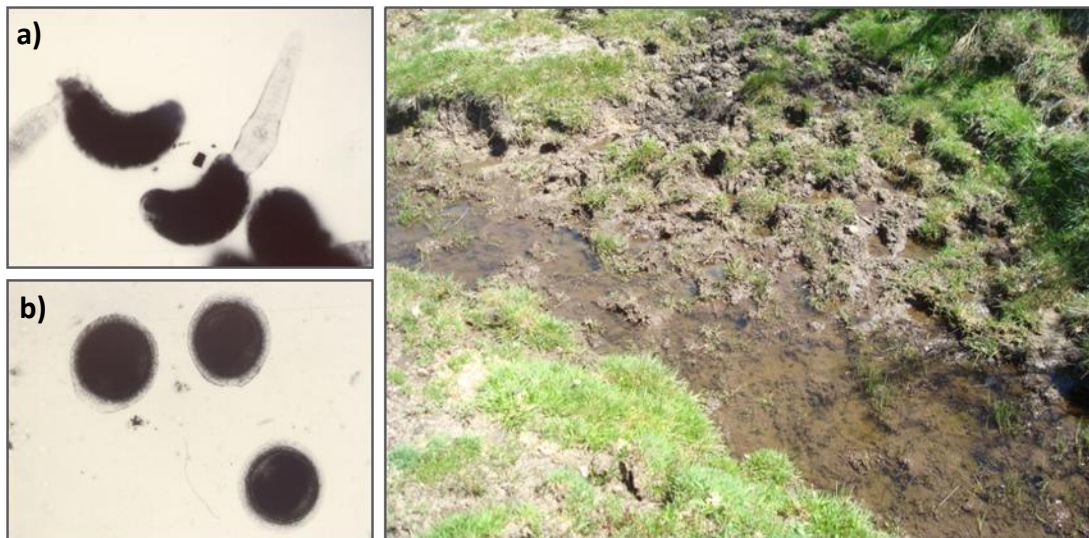


Figura 3.9. Abrevadero natural donde se dan las condiciones idóneas para que exista una gran concentración de cercarias (a) y metacercarias (b) de *F. hepatica*

Según Mas-Coma *et al.* (2005) existen metacercarias llamadas “flotantes”, que no se fijan a ningún sustrato, sino que se mantienen flotando en la superficie del agua; éstas poseen una gran importancia epidemiológica y permiten explicar algunos casos de infección tras ingerir agua de fuentes o canales contaminados.

3.2.2. Factores epidemiológicos que influyen en la infección por *F. hepatica*.

Entre los **factores extrínsecos** que intervienen en el ciclo de *F. hepatica* se incluyen las condiciones climáticas y edáficas, que influyen sobre la supervivencia de las fases libres (huevos, miracidios y metacercarias), al igual que favorecen la presencia del hospedador intermediario (*G. truncatula*) y el manejo de pastos y animales.

Entre los **factores intrínsecos** o derivados del hospedador se encuentran la raza, sexo, edad y la respuesta inmune del hospedador.

3.2.2.1. Factores extrínsecos

A. Condiciones edafoclimáticas

Como se ha señalado anteriormente, en las infecciones por *F. hepatica* tienen una gran importancia las condiciones que haya en el medio, fundamentalmente la temperatura y, sobre todo, la humedad y/o las precipitaciones, que permiten la supervivencia de los huevos en el exterior y propician la presencia de hospedadores intermediarios.

Los parámetros climáticos que más influyen sobre la **supervivencia y desarrollo de los huevos** en el medio ambiente son la temperatura y la humedad. Diversos autores (Luzón *et al.*, 1991, 1992; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012) señalan que para que los huevos prosigan su desarrollo deben ser liberados de las heces, ya que si quedan incluidos en éstas, no evolucionan aunque la temperatura y humedad sean óptimas. Sin embargo, en el seno de las heces los huevos pueden permanecer viables desde unas semanas hasta varios meses, dependiendo del grado de humedad que tenga la materia fecal.

Se ha observado que en condiciones de campo los huevos de *F. hepatica* permanecen viables durante bastante tiempo con temperaturas bajas e incluso soportan el invierno si las temperaturas mínimas no son extremas (Luzón *et al.*, 1991, 1992; Rojo y Ferre, 1999); posteriormente, durante la primavera y si las condiciones ambientales son favorables, continuarán su desarrollo. No obstante Luzón *et al.* (1991, 1992), señalan sobre el desarrollo del huevo que, además de la temperatura, debe existir una humedad mínima constante que permita a éste estar rodeado de una película de agua, ya que la desecación destruye los huevos. Las temperaturas inferiores a 0° y superiores a 30°C limitarán las posibilidades de desarrollo de los huevos excretados durante los meses de otoño y primer tercio estival en relación con aquellos que hayan sido eliminados en zonas encharcadas.

Otros factores que influyen sobre el desarrollo de los huevos son el pH y la tensión de oxígeno. Si ésta última es elevada, se favorece la viabilidad de los huevos y la eclosión del miracidio. Asimismo, se ha comprobado que el pH entre 4,2 y 9 permite la evolución del huevo, siendo los suelos ácidos muy favorables (Rojo y Ferre, 1999).

La temperatura también resulta esencial para el **desarrollo de los miracidios** dentro de los huevos, de modo que la velocidad con que embrionan los huevos hasta formar el miracidio depende de este parámetro (Díez-Baños, 2011). Además, la eclosión del miracidio depende de la luz, siendo la idónea una banda de 650 nm, que estimula la producción de una enzima proteolítica fotoactiva que debilita la unión del opérculo con la cubierta del huevo. A 26 °C se completa el proceso en 12 días, aunque en condiciones naturales se requieren varias semanas (hasta 2 meses) cuando la temperatura oscila entre 10-12 °C. La vida del miracidio depende de sus reservas energéticas, debiendo encontrar un molusco hospedador adecuado antes de 24 horas. En la búsqueda del hospedador intermediario están implicados estímulos quimiotácticos e intervienen la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la composición iónica, la salinidad y la turbidez del agua, entre otros factores (Rojo y Ferre, 1999).

Asimismo, la presencia y abundancia de los **moluscos hospedadores intermediarios** (*G. truncatula*) dependen de la temperatura y de la humedad. Morrondo *et al.* (1994) observaron que con humedad suficiente y temperaturas por encima de los 10°C los caracoles siguen activos, mientras que se entierran si la humedad baja en exceso. Además, estos mismos autores comprobaron que en el noroeste de España las temperaturas suaves y las precipitaciones elevadas favorecen la proliferación de los hospedadores intermediarios y el aumento de la contaminación del pasto por metacercarias. Por ello, los hospedadores definitivos pueden infectarse durante todo el año, lo que coincide con las observaciones de González-Lanza *et al.* (1989) en León.

En este sentido, diversos autores (Díez-Baños *et al.*, 1989 b,c; Rojo y Ferre, 1999; Abrous *et al.*, 1999; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2003; Otranto y Traversa, 2003; Arias *et al.*, 2011) han señalado que las infecciones por *Fasciola* son enzoóticas en áreas donde haya elevadas precipitaciones anuales y terrenos mal drenados, ya que constituyen el hábitat idóneo para *G. truncatula*. No obstante, también se ha comprobado que en la prevalencia de infección por *F. hepatica*, más que de las condiciones climáticas registradas ese año, influyen las del año anterior (Rojo-Vázquez *et al.*, 1989; González-Lanza *et al.*, 1989; Manga *et al.*, 1991; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2011).

Respecto a la **supervivencia de las metacercarias** se ha comprobado que se mantienen viables durante períodos prolongados, siempre que la humedad sea superior al 70%. Sin embargo, la desecación y la acción directa de la luz solar son muy perjudiciales (Rojo-Vázquez *et al.*, 1989, 2012; Rojo y Ferre, 1999). En este sentido, en la provincia de León, Manga *et al.* (1991) obtuvieron el máximo de metacercarias en la hierba entre septiembre y diciembre, por lo que consideran este periodo como el de mayor riesgo para la infección de los hospedadores definitivos. Sin embargo, en su opinión los animales podrían infectarse durante todo el año, porque los moluscos se mostraban activos durante todo el año y albergaban redias con cercarias maduras en mayor o menor cuantía. No obstante, en lugares más áridos, como en la provincia de Madrid, Luzon *et al.* (1991) señalaron que la existencia de metacercarias en los pastos en el otoño está condicionada por la pluviosidad de septiembre y por las temperaturas habidas en octubre y noviembre, situándose la época de mayor riesgo de infección para los hospedadores definitivos entre noviembre y febrero/marzo.

Respecto a la influencia de las **características orográficas**, en la bibliografía consultada se han encontrado resultados dispares y, en general, siempre están asociados a las condiciones ambientales de la zona. Además, la mayoría están referidos a datos de prevalencia de infección de *F. hepatica* en distintas especies de rumiantes domésticos, especialmente en ganado vacuno.

Empleando técnicas inmunoenzimáticas (ELISA directo e indirecto), diversos autores (Marín, 1992; Morrondo *et al.*, 1997; Paz *et al.*, 1998; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995, 2001a, 2002) observaron en vacuno explotado en Galicia mayores seroprevalencias en zonas de montaña, con bajas temperaturas y elevadas precipitaciones, que en animales que pastaban en zonas de costa, donde había menor altitud y temperaturas más elevadas. Además, Paz *et al.* (1998) concluyeron que la seroprevalencia de las infecciones por *F. hepatica* estaba directamente relacionada con la altitud y humedad de las áreas donde pastaban los animales. Morrondo *et al.* (1997) comprobaron que la seroprevalencia y la temperatura estaban inversamente relacionadas; por el contrario, había una relación directa con la humedad y la altitud de la zona, probablemente debido a que en las zonas húmedas y con temperaturas más bajas la densidad del hospedador intermediario *G. truncatula* era mayor y, por tanto, también lo sería el número de metacercarias a disposición de los hospedadores definitivos. Por el

contrario, en ganado de raza Rubia Gallega, Arias *et al.* (2004) comprobaron que la seroprevalencia más elevada correspondía a vacas explotadas en zonas del centro de la provincia de Lugo con altitudes de 350-500 m y precipitaciones inferiores a 1200 mm.

En **ganado caprino y ovino**, Martínez-Cruz *et al.* (1995) obtuvieron mayor seroprevalencia (3,5%) en cabras que pastaban en áreas de montaña (Sierra Morena) que las que lo hacían en zonas más llanas situadas en la rivera del Guadalquivir (0,36%). Por el contrario, Ferre *et al.* (1995), en ovejas de la Provincia de León, no observaron diferencias entre los animales muestreados en las cuatro regiones naturales (Montaña, Bierzo, Tierras de León y Tierras Bajas). Asimismo, Panceira (2012) en ovinos explotados en diversas localidades de Galicia, comprobó que no existían diferencias significativas respecto al porcentaje de ovinos que eliminaban huevos de *F. hepatica*. Sin embargo, en países del Norte de Europa (Noruega), mediante necropsia y análisis coprológicos realizados en cabras y ovejas, se encontraron mayores prevalencias en los animales que pastaban en la costa, donde el invierno es más corto y suave que en otras zonas del país (Domke *et al.*, 2013).

En resumen, y de acuerdo con los diferentes autores antes citados, la epidemiología de las infecciones por *F. hepatica* depende básicamente de las condiciones meteorológicas de la zona de estudio y que, tras primaveras y veranos muy lluviosos, los brotes de fasciolosis se manifiestan en otoño.

B. Manejo de los pastos y de los animales

En ganado vacuno de Francia, Rondelaud y Mage (1991) señalaron que existían distintos periodos de riesgo para la infección de los animales por *F. hepatica*, que a su vez dependían de la climatología y de la **abundancia de los pastos**. Al inicio de la primavera, el riesgo de infección era bajo, ya que los animales disponían de pastos abundantes y no estaban forzados a aprovechar las zonas húmedas y residuales, que son las que entrañan más peligro. Por el contrario, al inicio del verano las praderas están bastante agostadas y el ganado se ve obligado a pastar en las zonas húmedas, donde hay más hierba pero también está más contaminada con metacercarias. No obstante, el periodo de mayor riesgo es el otoño, porque

los hospedadores intermediarios, tras un período de estivación, reinician su actividad con las primeras lluvias otoñales y liberan numerosas cercarias.

Diversos autores (Uriarte *et al.*, 1985; Luzón *et al.*, 1997; Otranto y Traversa, 2003) han señalado que en ganado ovino la prevalencia de infección por *F. hepatica* era superior cuando pastaban en terrenos de regadío que cuando lo hacían en pastos de secano. Además, Otranto y Traversa (2003) han señalado que en los últimos 50 años el hombre ha realizado cambios en el medio, mediante la construcción de presas, diversos sistemas de irrigación, etc., de modo que ha transformado lugares secos en húmedos, contribuyendo notablemente a la expansión geográfica de la fasciolosis.

Respecto al **régimen de explotación y al número de animales que integran los rebaños**, la mayoría de los estudios se han realizado en ganado vacuno. Sánchez-Andrade *et al.* (2001a) obtuvieron mayores seroprevalencias de infección por *F. hepatica* en animales en pastoreo extensivo o semi-extensivo, debido a que estos sistemas de explotación favorecen la ingestión de metacercarias. Díez-Baños *et al.* (1989a) y Morrondo *et al.* (1994), en vacuno de raza frisona de Galicia, comprobaron que los porcentajes de infección por *F. hepatica*, así como los recuentos de huevos en heces, eran más elevados en granjas de mediano tamaño, de carácter familiar, que en las explotaciones más grandes, probablemente debido, en este último caso, a un mejor manejo de los animales.

Como señalábamos anteriormente, en Galicia es frecuente que haya rebaños mixtos de ovejas y cabras. No obstante, son escasas las referencias bibliográficas relativas a la posible influencia de este hecho en la prevalencia de infección por *F. hepatica*.

López *et al.* (2011), en estudios realizados en Galicia, demostraron que el hecho de que existan cabras en los rebaños de ovejas constituye un factor de riesgo en las infecciones por nematodos Protostrongylidae. Posteriormente, López *et al.* (2013) comprobaron que la convivencia de ovejas y cabras también constituía un factor de riesgo para la primeras en relación a las infecciones por *Eimeria*, *Dictyocaulus filaria* y nematodos gastrointestinales, aunque no lo era para las infecciones por *Moniezia*, *F. hepatica*, *Paramphistomum* o *Dicrocoelium dendriticum*. Por el contrario Cabanelas *et al.* (2014) observaron que la

presencia de ovejas en los rebaños de cabras constituye un factor de riesgo en las infecciones por *Toxoplasma gondii*.

3.2.2.2. Factores intrínsecos

A. Raza

En ganado vacuno, Sánchez-Andrade *et al.* (1995) y Morrondo *et al.* (1997) señalaron que las razas autóctonas, como la Rubia Gallega, presentaban seroprevalencias significativamente inferiores que otras razas, debido probablemente a que, en zonas endémicas como el noroeste de España, las razas autóctonas se han adaptado al contacto continuo con *F. hepatica*. Posteriormente, Sánchez-Andrade *et al.* (2000, 2002) comprobaron que en los bovinos procedentes de cruces la seroprevalencia era superior a la hallada en razas más seleccionadas como la Frisona o la Parda Alpina.

En un estudio realizado en pequeños rumiantes de Pakistán, Afshan *et al.* (2013) observaron que en las razas autóctonas de cabras (Local Hairy o Beetal) y de ovejas (Salt Range) la prevalencia de infección de *F. hepatica* era menor que en los cruces. Preston y Allomby (1979), al igual que Roberts *et al.* (1997 a, b), señalan que las diferencias en la prevalencia por diversos helmintos en distintas razas de ovejas podrían tener una base genética, relacionada con genes de dominancia incompleta, al encontrar diferencias entre razas de ovejas sometidas a iguales condiciones de manejo.

B. Sexo

La mayoría de los autores (Pal y Qayyum, 1992; Valcárcel y García Romero *et al.*, 1999; Phiri *et al.*, 2005 a, b; Khan *et al.*, 2009) coinciden en señalar que el sexo de los animales influye sobre la prevalencia de infección por diversos endoparásitos, ya que el estrés al que se ven sometidas las hembras durante la gestación y el parto produce un descenso del estado inmunitario. En este sentido, en ganado vacuno de Zambia y Pakistán, diferentes autores (Phiri *et al.*, 2005 a, b; Khan *et al.*, 2009, 2010) comprobaron que, aunque el manejo de los machos y de las hembras fuera similar, estas últimas presentaban mayor prevalencia e intensidad de infección.

C. Edad

En ganado vacuno la mayoría de los autores (González-Lanza *et al.*, 1989; Waruiru *et al.*, 1993; Morrondo *et al.*, 1994, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 2002) observaron una correlación positiva entre la edad y la prevalencia de infección por *F. hepatica*, debido a que los animales más jóvenes, al haber permanecido menor tiempo en los pastos, habían tenido menos oportunidades de infectarse que los de mayor edad.

En **ganado ovino** también se ha observado esta correlación positiva entre la edad y la prevalencia. Ferre *et al.* (1991), en ovejas de la provincia de Segovia, observaron que los animales que habían pastado sólo una temporada no eliminaban huevos de *F. hepatica* mientras que un pequeño porcentaje (0,9%) de los que lo habían hecho durante 2 o más temporadas sí lo hacían. Asimismo, Vázquez *et al.* (2008) y Paineira (2012) señalaron que la prevalencia de infección por *F. hepatica* era superior en los animales de mayor edad, aunque estas diferencias no fueron significativas. En ovejas y cabras explotadas en México, Munguía *et al.* (2007) observaron mayores porcentajes de seroprevalencia en los animales mayores de 6 años (46,6%) que en los menores de 5 (34,6%).

Gebeyehu *et al.* (2013), mediante ELISA indirecto, no detectaron ningún animal seropositivo en cabras menores de 2 años, siendo la seroprevalencia de 1,6% en animales mayores de esta edad. Afshan *et al.* (2013) en Pakistán, mediante ELISA y coprología, observaron que las ovejas mayores de dos años presentaban mayores prevalencias de infección por *F. hepatica* que las de menor edad.

Por el contrario, Khan *et al.* (2010) en ovejas y cabras explotadas en Pakistán, no observaron diferencias significativas entre los animales jóvenes (< de 6 meses) y los adultos (> de 6 meses).

D. Respuesta inmunitaria

Al igual que otros helmintos, *F. hepatica* puede sobrevivir en su hospedador durante períodos de tiempo relativamente largos. Por tanto, estos parásitos necesitan disponer de ciertos mecanismos que les permitan evadir el sistema inmune del hospedador. Mientras que en otros helmintos se produce la “inmunidad concomitante”, que se caracteriza por la producción de antioxidantes o estrategias de evasión inmunitaria, como la secreción de enzimas divisorias de anticuerpos y/o agentes antiinflamatorios, *F. hepatica* no desencadena este tipo de defensa en el hospedador (Mulcahy *et al.*, 1999). Esta resistencia frente a los efectos del sistema inmune se debe, en parte, a la localización de los adultos en los conductos biliares, ya que esta localización es poco accesible al sistema inmunitario. Los antígenos y huevos liberados por los adultos alcanzan el intestino con los ácidos biliares, lo que limita la estimulación del sistema inmunitario y la inmunopatología del proceso. Además, *F. hepatica* durante su desarrollo y migración en el hospedador definitivo sufre un importante cambio en la superficie tegumentaria, que constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador (Hanna y Jura, 1977; Bennett, 1978; Hanna, 1980b). Algunos estudios mediante inmunoelectroforesis (Bennett *et al.*, 1982) han puesto de manifiesto la existencia de antígenos específicos para cada fase del desarrollo, aunque otros permanecen intactos desde la fase de metacercaria hasta adulto y sirven para el diagnóstico temprano de la infección.

Como ya se ha apuntado, la migración del trematodo hacia los conductos biliares se acompaña de una serie de cambios morfológicos y fisiológicos. Algunas de las variaciones más importantes son las alteraciones del glucocálix y del tegumento externo, compuesto por un sincitio anucleado y cuyas células basales y apicales están unidas mediante túbulos (Threadgold, 1963; Bennett y Threadgold, 1975; Hanna, 1980b). En el tegumento del parásito se han identificado unos gránulos secretores que pasan del tipo T0, característicos de la adolescencia, a gránulos T1 y T2 típicos de las formas inmaduras y maduras, respectivamente. Durante la migración hacia el parénquima hepático los gránulos T0 se transforman en células tipo 1, que comienzan a secretar los T1. El tipo celular 2, que se observa en los adultos de *F. hepatica*, surge de diferentes células embrionarias parenquimatosas al cabo de 2-3 días p.i., pero no libera sus gránulos hasta que el parásito no penetra en los conductos biliares (Bennett y Threadgold, 1975). Según Hanna (1980b) los gránulos T0 y T1 son antigénicamente diferentes a los de tipo T2 de los adultos.

Acompañando a los cambios en la composición del glucocálix exterior, durante el proceso de maduración, se produce un cambio en la membrana, puesto que el trematodo se despoja de su viejo glucocálix y lo reemplaza por una cubierta producida por la primera capa de células tegumentarias. Este rápido recambio se observa en las formas inmaduras durante la migración y se ha propuesto como un mecanismo de protección frente a la reacción inmunitaria del hospedador (Bennett *et al.*; 1982; Hanna, 1980b; Duffus y Franks, 1980 y 1981). Una vez que el parásito alcanza el estadio adulto, el paso de T1 a T2 en la composición del glucocálix se acompaña de una disminución en el ritmo de recambio de la membrana, lo cual podría estar relacionado con la localización de los adultos en los conductos biliares (Hanna, 1979, 1980a). Estas estructuras fisiológicamente diferentes poseen componentes antigénicos comunes muy relacionados con los antígenos de excreción-secreción, que en cada estadio el parásito libera al medio en el que se encuentra (Bennett y Threadgold, 1975).

En la década de los 80 se desarrollaron hibridomas productores de anticuerpos monoclonales altamente reactivos a células tegumentarias del parásito adulto (Hanna y Trudgett, 1983). Con posterioridad se demostró que las sustancias secretadas eran antígenos de excreción-secreción que poseen comunidad antigénica con el mismo tipo de productos del parásito adulto. Tras el análisis por inmunodifusión en gel de antígenos excretados por los diferentes estadios de *F. hepatica* se encontró que los antígenos, que forman líneas de precipitación alrededor de las formas inmaduras, eran también producidos por los adultos (Sandeman y Howell, 1981).

El aparato digestivo del trematodo también experimenta cambios durante la maduración y migración. Inicialmente las células del tracto intestinal aparentan tener una función exclusivamente excretora y son morfológicamente diferentes de las de los adultos; de hecho, las células de las formas inmaduras presentan microvellosidades pequeñas e irregulares en comparación con las más numerosas, de forma regular y mayor tamaño de las formas adultas (Bennett, 1978). Las células intestinales poseen numerosos aparatos de Golgi, aunque no son evidentes en los parásitos recién desenquistados. Las secreciones de las formas inmaduras son, principalmente, sustancias hidrolíticas que facilitan el desenquistamiento y las migraciones dentro del hospedador. Una vez que *F. hepatica* llega a la cavidad abdominal, aproximadamente 24 horas p.i., las células cecales muestran cierta actividad de absorción; sin

embargo, hasta que no alcanzan el parénquima hepático, dichas células son diferentes morfológicamente a las observadas en los adultos (Bennett and Threadgold, 1975).

Igualmente destacan los cambios sufridos en el aparato reproductor durante el proceso de maduración (Dawes, 1962). Las gónadas masculinas son las primeras en desarrollarse de forma gradual desde el primer día de la infección hasta la maduración definitiva del parásito. Por el contrario, el desarrollo de las gónadas femeninas no comienza hasta los 8 días p.i. y, coincidiendo con el asentamiento en los conductos biliares, se observan varios centenares de huevos en el útero para su posterior salida al exterior con las heces.

Todo lo expuesto da una idea de la inmensa variabilidad antigénica demostrada por *F. hepatica* desde su entrada en el hospedador definitivo hasta su asentamiento en los conductos biliares. La necesidad de confirmar precozmente la infección ha propiciado la realización de numerosos estudios encaminados a determinar qué antígenos son los más apropiados para el diagnóstico y a identificar aquellos comunes a todos los estadios.

En la década de los setenta, se utilizaron antígenos obtenidos de los huevos para comprobar si estos eran capaces de producir resistencia a la infección por *F. hepatica* en ratas (Ericksen y Flagstad, 1974; Rajasekariah y Howell, 1978). Esta idea fue descartada a principios de la década siguiente (Burden y Hammet, 1980), ya que poseen poca capacidad inmunógena. Posteriormente se utilizaron antígenos obtenidos de adolescarias obtenidas de ovinos infectados con este trematodo; se comprobó mediante difusión en gel que estos antígenos eran secretados tanto por las formas inmaduras como por las maduras, fundamentalmente en la carboxicolesterasa, acetilcolinesterasa y fosfatasa alcalina (Sandeman y Howel, 1981; Hughes *et al.*, 1981).

Los antígenos de excreción-secreción parecen tener un papel importante en la formación de anticuerpos, tanto por su especificidad como por su utilidad diagnóstica (Sandeman y Howel, 1981; Pfister *et al.*, 1984; Espino *et al.*, 1987; Mezo *et al.*, 1998, 2003; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000, 2001 a, b, 2002; Paz Silva *et al.*, 1998, 2002, 2003, 2005; Arias *et al.*, 2007, 2009, 2010, 2012, 2013).

La utilidad protectora de los antígenos de excreción-secreción fue estudiada por diferentes autores (Rajasekariah *et al.* 1979; Haroun *et al.*, 1980). Además, la importancia de los productos metabólicos en la inmunidad se ha puesto de manifiesto en estudios de inmunización de animales de experimentación, resultando en la inducción de elevados niveles de protección (Lang y Hall, 1977; Rajasekariah *et al.*, 1979; Haroun *et al.*, 1980) que se ve incrementada con la adición de diferentes coadyuvantes (López-Abán *et al.*, 2007, 2008, 2012).

Numerosos autores (Oldham, 1983; Poitou *et al.*, 1992; Chauvin *et al.*, 1995; Bossaert *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005) han observado un aumento de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) frente a la respuesta a productos de excreción-secreción de *F. hepatica* (PESFh) desde la primera s.p.i., con una cinética bifásica con picos a la 1-2 s.p.i. y a la 4 s.p.i., después de la cual la proliferación decrece.

Zhang *et al.* (2005) han subrayado que la producción de IFN- γ en ovejas infectadas experimentalmente se incrementa en la semana 1^a p.i., mientras que, la de IL-10 es muy potente desde los primeros días p.i. La continua producción de IL-10 durante la infección sugiere una respuesta inmune tipo Th0 en la fase temprana de la infección, seguida de una respuesta Th2, lo que bloquearía la activación de los macrófagos y, por tanto, dificultaría una correcta eliminación de las fases juveniles.

Por otro lado, el recuento de eosinófilos aumenta desde la 2^a semana p.i., con un incremento bifásico que se corresponde con la migración de las fases juveniles y posteriormente con la llegada de los adultos a los conductos biliares (Chauvin *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005). Además, diversos autores (Chauvin *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1999 y Zhang *et al.*, 2005; Pleasance *et al.*, 2011) remarcan que esta respuesta es una de las claves de la resistencia del hospedador frente al trematodo.

En ratas infectadas con *F. hepatica* se relacionaron los altos niveles de eosinófilos con un incremento de las IgE (Pfister *et al.*, 1983; Poitou *et al.*, 1993), lo que respalda la hipótesis de Capron *et al.* (1987) quienes comprobaron que, en animales infectados por *Schistosoma*, las IgE o las IgG anafilácticas se asocian a un incremento de eosinófilos. Del mismo modo, en

la esquistosomiosis humana, las IgM son capaces de bloquear la acción de los eosinófilos, observándose además que los niveles de IgM son más altos en las personas sensibles a la enfermedad que en las resistentes a esta. Por tanto, en la infección por *F. hepatica* los altos niveles de IgM contra los PESFh pueden modular también la citotoxicidad anticuerpo-dependiente, aunque las ovejas sean capaces de desarrollar una alta respuesta eosinofílica (Capron *et al.*, 1987; Pérez *et al.*, 2002).

Chauvin *et al.* (1995), empleando Western blot, observaron a las 2 s.p.i. altos niveles de IgM con un comportamiento bifásico. El primer pico se correspondió con la respuesta de estas inmunoglobulinas frente a proteínas de más alto peso molecular y la segunda respuesta frente a proteínas no específicas. Las IgM alcanzan un máximo a las 3 semanas p.i. y descienden sistemáticamente desde la 6ª semana p.i. Las IgG muestran el pico máximo hacia las 4-5 semanas p.i., permaneciendo elevadas bastante tiempo, siendo las IgG1 las dominantes sobre las IgM, IgG2 e IgA en los animales infectados de forma aguda y crónica por la enfermedad.

En **cabras** hay pocos estudios relativos a la respuesta inmune frente a *F. hepatica* y como hemos dicho anteriormente la enfermedad se presenta habitualmente de forma crónica (Martínez-Moreno *et al.*, 1997), aunque Leathers *et al.* (1982) han observado casos de alta mortalidad.

Levieux y Levieux (1994), Martínez *et al.* (1996) y Martínez-Moreno *et al.* (1997) han señalado que existe una respuesta inmune humoral de IgG específicas frente a PESFh entre la 2ª y 4ª s.p.i., que alcanza el máximo entre la 9ª y la 13ª s.p.i. Martínez-Moreno (1997) puntualizó que no existe una correlación significativa entre el título de IgG y el recuento de fasciolas en la necropsia, siendo el patrón igual en las primoinfecciones y en las reinfecciones, lo que sugiere una baja actividad protectora.

Zafra *et al.* (2013) en un estudio en el que se evaluaba la producción de linfocitos T (CD4, CD8 y WC1), no observaron cambios en la proporción de estos linfocitos entre cabras inmunizadas y no inmunizadas frente a glutatión S-transferasa (GST) y catepsina L-1 de *F. hepatica*; únicamente detectaron un descenso de los linfocitos CD4 a la 5ª s.p.i., que

correlacionaron con la fase de la migración del parásito por el parénquima hepático donde se produce una marcada infiltración linfocitaria de CD4 y CD8.

Según Martínez-Moreno *et al.* (1997), la escasa respuesta de las cabras frente a *F. hepatica*, puede deberse a la evasión del parásito del sistema inmune protector por diversos mecanismos, entre los que se encuentra el desarrollo más rápido de las fasciolas en las segundas infecciones, la ausencia de respuesta de memoria de las IgG, el déficit de especificidad de la respuesta de linfocitos y la modulación de la respuesta no específica.

3.2.3. Diagnóstico de las infecciones por *F. hepatica*.

Para realizar un correcto diagnóstico se debe tener en cuenta, los factores epidemiológicos que influyen en su presentación, el cuadro clínico y los resultados obtenidos mediante diferentes métodos directos o indirectos.

3.2.3.1. Técnicas directas

Los métodos más utilizados para el diagnóstico directo de las infecciones por *F. hepatica* son el examen coprológico y el *postmortem*, aunque en los últimos años se han puesto a punto técnicas para detectar antígenos (ELISA) en heces, sangre e incluso en leche en los animales infectados.

A. Análisis coprológicos

Según el manual de técnicas de Laboratorio Central Veterinario de Weybridge (M.A.F.F., 1986) la presencia de huevos de parásitos en las heces demuestra que el animal se halla infectado de forma activa. No obstante, las muestras de heces se deben tomar directamente del recto, para evitar la contaminación con nematodos de vida libre, hongos, etc.

Para conocer el número de huevos por gramo de heces (hpg), cada muestra se analiza, por duplicado, mediante las técnicas de sedimentación (Rojo-Vázquez *et al.*, 1997). En un principio se consideró que existía una relación constante entre el número de huevos excretados en las heces y el número de vermes presentes en el animal. Sin embargo, se demostró que estos recuentos no guardaban relación directa con el grado de parasitación (Euzeby, 1982).

Además, cualquiera que sea el método de análisis empleado, el recuento se hace sobre una cantidad muy pequeña de heces, que suponemos representativa de toda la materia fecal excretada en un periodo determinado de tiempo (Kloosterman, 1971). Asimismo, la cantidad de huevos eliminados cada día puede variar debido a la propia idiosincrasia del animal (edad, intensidad de parasitación, estado inmunitario, etc.) y del parásito (intervalos cíclicos de producción de huevos, uso de antihelmínticos, etc.).

Según diferentes autores (Michel, 1968; Kloosterman, 1971; M.A.F.F., 1986), los principales errores son la propia muestra fecal, la submuestra escogida de la materia fecal disponible y a la técnica empleada *per se*. Además, se debe tener en cuenta la consistencia de las heces, siendo aconsejable emplear un factor de corrección que varía entre 1 y 4, aplicándose el mayor en caso de heces líquidas.

La coprología es una técnica que se utiliza habitualmente para el diagnóstico de la fasciolosis. Entre sus ventajas destaca su especificidad, si bien uno de sus mayores inconvenientes es que los huevos se observan en heces 10-12 semanas después de la infección, es decir cuando las fasciolas han alcanzado a su madurez sexual y ya se han producido gran parte de las lesiones hepáticas en el animal (Rodríguez-Pérez y Hillyer, 1995; Rojo y Ferre, 1999; Rojo-Vázquez *et al.*, 2003). Un examen coprológico negativo carece de valor predictivo, ya que este puede ser negativo por múltiples causas y, sin embargo, el animal estar parasitado. Serían precisos al menos 3 exámenes coprológicos sobre muestras recogidas en días alternos para descartar la infección del animal. Debido a las variaciones considerables en la eliminación diaria de huevos de *F. hepatica* en el ganado ovino (Düwell y Reisenleiter, 1984), recomiendan la recogida de muestras a partir del mediodía, y siempre a la misma hora.

La técnica más utilizada es la **sedimentación**, aunque uno de sus mayores inconvenientes es su baja sensibilidad (30-70%), pero diversos autores (Conceição *et al.*, 2002; Rapsch *et al.*, 2006 y Charlier *et al.*, 2008) indican que esta aumenta con el volumen de heces que se analiza y que la repetición del test o la utilización de más de 30 g de heces puede incrementar la sensibilidad aproximadamente un 90% (Rapsch *et al.*, 2006). Con menor frecuencia se emplea la técnica de flotación, utilizando soluciones de gran densidad como

sulfato de zinc ($\rho= 1,18$) o iodomercurato de potasio ($\rho= 1,44$); sin embargo, estas soluciones deforman los huevos notablemente, dificultando su correcta identificación (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

B. Necropsia

En el examen *post-mortem* se puede observar, incluso en fases tempranas de la infección, el daño hepático (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012). En la fasciolosis aguda el diagnóstico más certero se obtiene tras la realización de la necropsia de algún animal infectado. Según Rojo y Ferre (1999) las espinas cuticulares y las ventosas de las fases inmaduras y adultas de *F. hepatica* provocan una intensa irritación de las células epiteliales del hospedador, modificando su estructura y provocando una intensa reacción inflamatoria.

En la migración de los parásitos, se observan numerosas fasciolas en diferentes estadios de maduración que, durante su desplazamiento a través del parénquima hepático, ocasionan hemorragias, fibrosis hepática focal, necrosis y una acusada hepatomegalia (Murray y Rushton, 1975). A medida que las formas juveniles maduran y van aumentando de tamaño, también lo hace la respuesta inflamatoria (Behm y Sangster, 1999).

En la fasciolosis crónica se observa fibrosis hepática como resultado de la reorganización de los trayectos migratorios originados por las fasciolas juveniles y colangitis hiperplásica por la presencia de los vermes adultos en los conductos biliares y en la vesícula. La fibrosis hepática se puede observar en todo el hígado, aunque es más frecuente en el lóbulo ventral, por ser éste el lugar preferente de entrada de las fasciolas (Rojo-Vázquez *et al.*, 2012).

Las infecciones repetidas con pequeñas dosis de metacercarias son las más frecuentes. En este tipo de infecciones tanto las formas juveniles como las adultas producen lesiones. Pérez *et al.* (2002, 2005) estudiaron el efecto de la primoinfección y de la reinfección en corderos, comprobando que los daños hepáticos (cirrosis, fibrosis portal, hiperplasia de los conductos biliares) eran más intensos en los re infectados.

En cabras infectadas y re infectadas experimentalmente con *F. hepatica*, Martínez-Moreno *et al.* (1999) observaron que en las fases tempranas de la primoinfección, en el hígado

se observaban trayectos blanquecinos causados por la migración del trematodo en la superficie y en el parénquima hepático, mientras que en el hígado de las cabras re infectadas las lesiones eran más marcadas, apreciándose destrucción de la arquitectura del tejido hepático que comprometía el funcionamiento del hígado.

El número de ejemplares de *F. hepatica* recuperados tras la necropsia de corderos infectados con metacercarias varía en los diferentes estudios. Ramajo *et al.* (2001) en corderos infectados con 100 metacercarias, recuperaron entre un 51% y un 29% de adultos a las 9 s.p.i. y 14 s.p.i., respectivamente. Sin embargo, Lomba (2005) obtuvo cifras medias superiores al 27% en corderos infectados, utilizando la misma dosis infectante del estudio anterior.

Chauvin *et al.* (1995) observaron en ganado ovino que la proporción de adultos de *F. hepatica* obtenidos entre la primo y re infección es similar, aunque señalaron el que las fasciolas migraban más rápidamente hacia los conductos biliares en las re infecciones. Asimismo, Martínez-Fernández *et al.* (2004) también obtuvieron un número similar ($74,7 \pm 16,2$ adultos) cuando re infectaron corderos con 200 metacercarias. Por el contrario, Pérez *et al.* (2002), en ovejas primoinfectadas y re infectadas con 175 metacercarias, obtuvieron una media superior en las re infectadas ($88,71 \pm 27,8$) que en las primoinfectadas.

C. ELISA-doble

Uno de los principales problemas a resolver en la lucha frente a esta trematodosis ha sido el diagnóstico precoz de la fasciolosis, ya que para evitar la acción patógena del parásito y realizar el tratamiento en las primeras fases de la migración hay que detectar su presencia en el hospedador al principio de la infección.

Numerosos parásitos liberan al torrente sanguíneo o al lumen intestinal sustancias antigénicas que están constituidas por productos metabólicos y/o componentes somáticos, de modo que mediante la detección de antígenos circulantes en heces o en diferentes fluidos corporales (sangre, leche y secreciones nasales) se pueden diagnosticar precozmente las infecciones activas ocasionadas por estos parásitos (Hillyer, 1993). Además su detección es más precoz que la de los anticuerpos (Langley y Hillyer, 1989; Espino y Finlay, 1994;

Rodríguez-Pérez y Hillyer, 1995; Espino *et al.*, 1997; Abdel-Rahman *et al.*, 1998; Mansour *et al.*, 1998; Hegab y Hassan, 2003; Mezo *et al.*, 2004).

El ELISA sándwich o doble (ELISA-d) se basó inicialmente en el empleo de dos anticuerpos policlonales (IgG), obtenidos de conejos inmunizados con un antígeno del parásito (Rodríguez-Pérez y Hillyer, 1995; Sánchez-Andrade *et al.*, 2000; Paz-Silva *et al.*, 2002, 2003); asimismo, mediante un proceso más complejo, se desarrollaron los anticuerpos monoclonales (Duménigo *et al.*, 1996; Espino *et al.*, 1997) que detectan antígenos de *F. hepatica* en suero a partir de la primera s.p.i. (Almazán *et al.*, 2001).

Paz-Silva *et al.* (2002) re infectaron dos grupos de ratas en periodos diferentes de la infección y, mediante un ELISA-d con IgG policlonal, comprobaron que en los animales re infectados en la fase aguda, los coproantígenos se detectaban antes que en las re infectadas en fase crónica, concluyendo que el periodo en el que se re infectan los animales modifica la cinética de coproantígenos.

Rodríguez-Pérez y Hillyer (1995) en ovejas infectadas experimentalmente detectaron, mediante ELISA-d e IgG policlonal anti-*F. hepatica*, antígenos circulantes del trematodo entre la 2ª y 6ª semana p.i., obteniendo las cifras más elevadas a la 8ª s.p.i. Asimismo, en infecciones experimentales de ovinos, nuestro grupo de investigación (Paz-Silva *et al.*, 1999, 2003; Morrondo *et al.*, 2000, 2005; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2004) demostraron la validez de un ELISA-d basado en el uso de anticuerpos policlonales para el diagnóstico de infecciones activas de *F. hepatica*, al tiempo que comprobaron su utilidad para evaluar los tratamientos antihelmínticos.

Duménigo *et al.* (1996) desarrollaron un ELISA-d utilizando un anticuerpo monoclonal (ES78) para detectar coproantígenos de *F. hepatica* en heces de ganado vacuno. Posteriormente Duménigo *et al.* (2000), utilizaron esta misma prueba para la detección de antígenos en suero y en heces de ovejas infectadas experimentalmente. Al comparar los resultados obtenidos con la detección de antígenos y de anticuerpos observaron que a la 1ª s.p.i., todos los animales habían desarrollado anticuerpos anti-*Fasciola*, mientras que los

primeros antígenos séricos y coproantígenos se detectaron a partir de la 3ª s.p.i. e incluso en algunos animales no llegaron a detectarse.

Espino *et al.* (1997) pusieron a punto un ELISA-d empleando un anticuerpo monoclonal, y en suero de ratas infectadas de forma experimental observaron antígenos circulantes entre la 1ª y la 3ª s.p.i., lo que coincidía con la migración de las fasciolas por el parénquima hepático.

Mezo *et al.* (2004) desarrollaron un ELISA-d basado en el empleo de un anticuerpo monoclonal (MM3), obtenido por inmunización de ratones con una fracción purificada de antígenos de excreción/secreción (ESAs) de *F. hepatica* de 7 a 40 KDa. La sensibilidad de este ELISA sándwich o de doble anticuerpo fue del 100% y 28,5% en ovejas y en vacas, respectivamente, que albergaban un único trematodo en el hígado, aumentando este porcentaje hasta el 100% en vacas infectadas con 2 fasciolas. Por consiguiente, estos autores consideraron que la concentración de coproantígenos se correlaciona positivamente con la carga parasitaria y negativamente con el tiempo transcurrido entre la infección y la detección del coproantígeno. Además, en este mismo estudio, se comprobó la utilidad del ELISA-d (MM3) en la monitorización de la eficacia de los tratamientos antiparasitarios, ya que en ovinos a los que se les había administrado triclabendazol dejaron de detectarse coproantígenos entre la 1ª y la 3ª semana post-tratamiento (s.p.t.), mientras que en las ovejas no tratadas se siguieron detectando coproantígenos durante todo el estudio. Valero *et al.* (2009), empleando este mismo test, detectaron antígenos en heces de ovejas a las 4 s.p.i., alcanzando los niveles más elevados a las 12 s.p.i.

3.2.3.2. Técnicas indirectas

Hasta hace algunos años las pruebas indirectas para detectar infecciones por *F. hepatica* se basaban fundamentalmente en la determinación de la actividad de algunas enzimas séricas, como la glutamato deshidrogenasa (GLDH) o la γ -glutamyl-transferasa (γ -GT) (Barnouin *et al.*, 1981; Díaz *et al.*, 1998; Mezo *et al.*, 1994; Ferre *et al.*, 1997). También se empleó la técnica e inmuno-electro-transferencia (EITB) o western-blotting. En la

actualidad se utiliza fundamentalmente la técnica inmunoenzimática ELISA, debido a su menor complejidad de realización.

A. Inmunoelectrotransferencia

La inmunoelectrotransferencia (EITB) también denominada Western-blotting o “immunoblotting” consiste en la separación de los diferentes componentes polipéptidos de los antígenos de *F. hepatica* mediante electroforesis y la evaluación de su posible antigenicidad a través de un revelado similar al que se realiza en el ELISA indirecto, pero en este caso el soporte es una membrana de nitrocelulosa.

Se han llevado a cabo diversos estudios mediante esta técnica en animales de laboratorio infectados de forma experimental con metacercarias. En ratas, Poitou *et al.* (1992), utilizando un antígeno de excreción/secreción para evaluar la respuesta IgG, comprobaron que en la 2ª s.p.i. se reconocían péptidos de peso molecular bajo (30-20 kDa) y a partir de la 3ª s.p.i. los de peso molecular alto (94 kDa) e intermedio (67-43 kDa).

Díez *et al.* (1997), estudiaron los principales componentes del antígeno de excreción-secreción de *F. hepatica* (FhES), empleando sueros de ratas infectadas experimentalmente, comprobando que se detectaban 31 fracciones con pesos moleculares de 11 a 136 kDa. Además, Paz-Silva (1997) y Sánchez-Andrade *et al.* (1997) estudiaron la respuesta inmunitaria en un lote de ratas primoinfectadas y en otros 2 grupos re infectadas a las 4 y 11 s.p.i., respectivamente; señalaron que a partir de la 1ª s.p.i. se detectaban IgG y que durante las 5 s.p.i. en el antígeno de ES se reconocían fracciones de alto peso molecular (190 kDa) y, a partir de la 7ª s.p.i. además de estas fracciones proteicas se detectaban un mayor número de bandas, con pesos moleculares de menos de 35 kDa y de 37, 43, 52, 75-80, 126, 155 y 170 kDa. A partir de la semana 11ª p.i. no se observó un aumento en el reconocimiento de bandas, excepto en el grupo de ratas re infectadas, en el que se detectaron bandas de 98 y 118 kDa.

Esta técnica también se ha utilizado para el diagnóstico de la fasciolosis en animales de renta. Santiago y Hillyer (1998), utilizando sueros de ganado ovino y vacuno infectado con *F. hepatica*, reconocieron en el antígeno somático del trematodo un grupo de proteínas de 38-

30 kDa y otros péptidos de 25-20 kDa a las 4 s. p. i. En los bovinos se obtuvo un reconocimiento difuso de bandas de 69, 64 y 56 kDa, que no habían sido visualizadas previamente con los sueros de los ovinos. Después de reinfectar estos animales no apreciaron cambios significativos en el reconocimiento de los diferentes péptidos hallados en el antígeno somático de *F. hepatica*.

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

En ovejas infectadas de forma experimental, Ferre (1994) comprobó que a partir de la semana 6ª p.i. las bandas reconocidas con mayor intensidad tenían un peso molecular de 30-14 y < 14 kDa. Además, en las semanas 8, 14 y 16 p.i., y coincidiendo con la respuesta máxima obtenida por ELISA, detectó péptidos de 25 y 19 kDa. También en ovejas infectadas con *F. hepatica*, Chauvin *et al.* (1995) apreciaron un reconocimiento secuencial de proteínas de alto a bajo peso molecular, sugiriendo la liberación de productos de excreción/secreción por parte de las fasciolas juveniles durante su migración por el parénquima hepático.

Díaz *et al.* (2007a), en ganado ovino infectado de forma natural por *F. hepatica*, detectaron polipéptidos de 93, 85, 64, 51, 45 y 30 KDa, comprobando que el de 30 KDa era útil para valorar la eficacia de los tratamientos a la segunda semana de su administración.

B. ELISA indirecto

Es una de las técnicas más utilizadas debido a su rapidez, simplicidad, sensibilidad, especificidad y bajo costo (Muñoz *et al.*, 1986). Algunas de estas ventajas, como la sensibilidad y especificidad, dependen de las características del antígeno empleado, ya que la concentración y calidad de este son factores cruciales que determinarán la sensibilidad del ensayo (Coltori, 1986; Vargas *et al.*, 1995). Como se ha comentado anteriormente, las fracciones antigénicas somáticas y de excreción-secreción de *F. hepatica* inducen en los animales con infección aguda y crónica la producción de inmunoglobulinas IgE e IgG, especialmente de la subclase IgG1 (Clery *et al.*, 1996; Bossaert *et al.*, 2000). Por tanto, son

diversos los estudios que indican la aptitud de estas técnicas para el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* respecto a los métodos tradicionales (Vargas *et al.*, 2001).

La técnica más utilizada es el ELISA indirecto (ELISA-i) con antígenos somáticos o de excreción-secreción del parásito (Price *et al.*, 1993). Con la mejora de los métodos de purificación antigénica se ha incrementado la sensibilidad y especificidad de la prueba, tanto a nivel individual como de rebaño.

A lo largo de los años, muchos investigadores han diseñado métodos para el diagnóstico de la fasciolosis mediante ELISA-i utilizando diferentes fracciones antigénicas (Espino *et al.*, 1987; Rivera Marrero *et al.*, 1988; Itagaki *et al.*, 1995; Ortiz *et al.*, 2000; Salimi-Bejestani *et al.*, 2005). Los antígenos más utilizados para identificar la infección por *F. hepatica* son los de excreción-secreción (ES), debido a que el extracto antigénico se puede obtener de forma económica y sencilla (Hillyer, 1986, 1993). El empleo de estos antígenos en un ELISA-i permite un diagnóstico precoz de la infección, pues se detectan IgG1 a partir de la 2ª s.p.i. (Bossart *et al.*, 2000). Además, según Hillyer (1993) el test tiene mayor sensibilidad cuando se utilizan estos extractos proteicos que cuando se emplean los antígenos somáticos del parásito.

Los antígenos de superficie también se han utilizado para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis, debido a que incrementan la especificidad significativamente, aunque el proceso de obtención es más complicado (Levieux *et al.*, 1992).

También se han desarrollado antígenos recombinantes a partir de genes de *F. hepatica* que codifican para antígenos específicos, cuya expresión en un sistema heterólogo permite su obtención en cantidad suficiente, a la vez que aumenta la especificidad y sensibilidad de la prueba, permitiendo además la comparación entre los resultados de diferentes grupos de investigación (Cornelissen *et al.*, 2001). En este sentido, diversos estudios se centraron en el uso de las catepsinas recombinantes purificadas como agentes antigénicos (O'Neill *et al.*, 1999; Cornelissen *et al.*, 2001; Neyra *et al.*, 2002; Espinoza *et al.*, 2005; Sriveny *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio a partir de una biblioteca de ADNc de *F. hepatica* se obtuvieron 3 clones que codifican para la expresión de proteínas de 16, 12,3 y 2,9 kDa, comprobando que, en ovejas infectadas experimentalmente con metacercarias de este trematodo, la proteína expresada por el clon de 2,9 kDa permitía detectar anticuerpos a la 2ª s.p.i. por ELISA-i (Paz-Silva *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2006). Asimismo, Arias *et al.* (2007) comprobaron que el ELISA-i, utilizando la proteína recombinante de 2,9 kDa también detectaba precozmente los anticuerpos anti *F. hepatica* en ovinos infectados naturalmente. Posteriormente, se comprobó que esta proteína también era útil para valorar la eficacia de los tratamientos (albendazol y netobimin) tanto en ganado ovino como vacuno infectados naturalmente (Arias *et al.* 2009).

Con objeto de mejorar la sensibilidad y especificidad de los antígenos de ES, Mezo *et al.* (2003) fraccionaron un antígeno FhES por FPLC y obtuvieron 4 picos; en el I y en el II se detectaron péptidos cuyo peso molecular osciló entre 7 y 208 kDa, el pico III se correspondió con péptidos de 131 a 153 kDa y el IV con péptidos de menos de 40 kDa. Estas fracciones proteicas se valoraron frente a sueros de ovinos infectados naturalmente, comprobando que los picos III y IV mostraban una buena discriminación entre animales infectados y no infectados, obteniendo una especificidad del 100%. Además, al realizar el ELISA-i con los péptidos del pico IV (7-40 kDa), detectaron animales infectados, incluso con 10 metacercarias, desde la 3ª-5ª s.p.i. hasta el final del estudio (14 spi).

Posteriormente, estos mismos autores (Mezo *et al.*, 2007) desarrollaron un ELISA-i (MM3 SERO ELISA) basado en el uso del anticuerpo monoclonal MM3 que captura parte de los antígenos presentes en el pico IV y de esta forma poder detectar los anticuerpos (IgG) específicos frente a los epítomos reconocidos por el MabMM3. Este ELISA presentó una especificidad del 100% en suero de ovino, incluso en corderos infectados con *Dicrocoelium dendriticum* (trematodo que posee antígenos con una gran reactividad cruzada con *F. hepatica*). La sensibilidad de esta técnica es también elevada, siendo capaz de detectar anticuerpos a las 3 s.p.i. en animales que albergaban 1 o 2 ejemplares de *F. hepatica* y a las 4 s.p.i. en animales con más de 2 tremados.

Muño *et al.* (2011) realizaron una caracterización molecular e inmunológica de la fracción IV y observaron que el MabMM3 reacciona con un epítipo localizado en las catepsinas L1 y L2, señalando que, probablemente también lo esté en la L5 que representa el 5% de las catepsinas producidas por los trematodos adultos.

Dixit *et al.* (2008) constataron que, este grupo de proteínas se caracterizan por ser altamente antigénicas y por tanto pueden ser útiles para el inmunodiagnóstico de las infecciones por *F. hepatica* tanto en humanos (Rokni *et al.*, 2002; Intapan *et al.*, 2005) como en animales (Cornelissen *et al.*, 2001; Sriveny *et al.*, 2006), así como para el desarrollo de vacunas (Mulcahy y Dalton, 2001; Golden *et al.*, 2010).

Con el fin de abaratar los costes de diagnóstico y causar la menor molestia y estrés durante el muestreo de los animales, en los últimos años se han aplicado los ELISA-i para determinar la prevalencia de *F. hepatica* en tanques de leche. Estos ELISA se caracterizan por presentar una gran sensibilidad y especificidad en los diagnósticos individuales y también en el diagnóstico en tanque, aunque se necesita un número mínimo de animales positivos para que los resultados sean fiables (Mezo *et al.*, 2010; Duscher *et al.*, 2011). En este sentido, Reichel *et al.* (2005) indicaron que prevalencia mínima intrarrebaño debería ser del 60%. Posteriormente otros autores (Salimi-Bejestani *et al.*, 2005; Mezo *et al.*, 2010; Duscher *et al.*, 2011) señalaron que era suficiente con que la prevalencia intrarrebaño fuese del 15 al 20%. No obstante, Duscher *et al.* (2011) comprobaron que los resultados del análisis en tanque de leche pueden variar dependiendo de la fase de la infección, ya que ésta cursa normalmente con un descenso de la producción de leche y, por tanto, puede haber niveles más bajos de anticuerpos en el tanque, dificultando la detección de las infecciones por *F. hepatica* mediante este test.

3.2.4. Fasciolosis en pequeños rumiantes

Esta enfermedad es una de las infecciones parasitarias más frecuente y de mayor trascendencia económica en los rumiantes, en especial en los lugares en los que las condiciones edáficas y climáticas favorecen el desarrollo del ciclo de *F. hepatica*, como sucede en Galicia.

3.2.4.1. Cuadro clínico y pérdidas económicas

Las pérdidas causadas por la fasciolosis son considerables, especialmente en ganado ovino cuando cursa de forma aguda.

A. Cuadro clínico

En el ganado ovino la fasciolosis puede cursar de forma aguda, subaguda y crónica. Estos 3 tipos de presentaciones se relacionan con la época del año, la disponibilidad de metacercarias en los pastos y el número de estas que ingieren los animales (Rojo y Ferre, 1999).

La fasciolosis aguda se origina cuando hay un gran número de adolescarias migrando por el parénquima hepático o porque ya se han establecido un elevado número de adultos en los conductos biliares. La sintomatología, cuando se presenta, se caracteriza por debilidad, palidez de las mucosas, hepatomegalia palpable, dolor abdominal y ascitis. El curso de la enfermedad es rápido y los animales pueden morir entre las 2 y 8 s.p.i. Los animales afectados presentan un cuadro de anemia hemorrágica aguda de tipo normocítico y normocrómico, pudiendo producirse muertes repentinas ocasionadas por la enorme pérdida de sangre y por fallo de la función hepática. También se observa marcada eosinofilia, elevada actividad plasmática de la aspartato aminotransferasa, hiperglobulinemia y, en los casos terminales, los animales muestran un valor hematocrito de 7 a 10%. Además, la migración de las adolescarias a través del parénquima hepático pueden propiciar las infecciones por *Clostridium oedematiens* (Rojo y Ferre, 1999).

La forma subaguda se presenta a finales de otoño e inicio de la estación invernal, cuando los animales ingieren un número elevado de metacercarias durante un período de tiempo suficientemente largo como para no provocar un proceso agudo (Behm y Sangster, 1999). Se observa pérdida de peso 1-2 semanas antes de la aparición de los síntomas y algunos animales pueden mostrar edema submandibular (papo) y ascitis. Este tipo de fasciolosis cursa con anemia hipocrómica y macrocítica, y el valor del hematocrito es inferior al 25%. Las modificaciones de los valores sanguíneos se acompañan con alteraciones de las proteínas séricas, observándose una hiperproteinemia como consecuencia del incremento de

inmunoglobulinas en respuesta a los antígenos parasitarios. Posteriormente se produce hipoproteinemia, debido a la disminución de los valores plasmáticos de albúmina. Los ovinos, generalmente, sobreviven 1 o 2 semanas desde la aparición de los síntomas.

El ganado ovino y en menor grado el caprino, en ocasiones, pueden superar la fasciolosis aguda y la subaguda y dar lugar a la forma crónica (Reddington *et al.*, 1986; Rojo y Ferre, 1999), aunque normalmente este tipo de presentación de la enfermedad se produce tras la ingesta diaria de un pequeño número de metacercarias en los pastos en los que los rumiantes permanecen durante largos períodos de tiempo (Rojo y Ferre, 1999). En los animales afectados se observa una marcada colangitis e hiperplasia del epitelio biliar, además de fibrosis de los conductos biliares (Behm y Sangster, 1999; Marcos *et al.*, 2008). Como en la fasciolosis subaguda, la anemia es hipocrómica y macrocítica; pudiendo llegar el valor hematocrito a 11-19%. Los animales enfermos pueden sobrevivir durante varias semanas e incluso años, aunque no hayan recibido el correspondiente tratamiento (Rojo y Ferre, 1999). Como ya se ha mencionado anteriormente, la fasciolosis crónica es la forma más habitual de aparición en las cabras. En infecciones experimentales se ha comprobado que la primoinfección provoca una fasciolosis subclínica crónica, al tiempo que no se establece una respuesta inmunitaria protectora, puesto que en las reinfecciones se establecen un número similar de adultos que en las primoinfecciones (Martínez *et al.*, 1996 y Martínez-Moreno *et al.*, 1997).

B. Pérdidas económicas

Como se indicó previamente la forma aguda de la fasciolosis puede ocasionar una importante mortalidad, especialmente en el ganado ovino. No obstante, es en la forma crónica cuando se producen tanto la mayoría de las pérdidas directas (decomiso de hígados) como indirectas (pérdida de peso, descenso en la producción de lana y leche y alteración de los índices de fertilidad). Aunque es muy difícil de cuantificar las pérdidas económicas ocasionadas por la fasciolosis, Torgerson y Claxton (1999) señalan pérdidas de billones de dólares, incluso cuando la intensidad de parasitación es moderada.

Las pérdidas indirectas están relacionadas con el descenso de energía metabolizable que, junto con la disminución del apetito y la reducción de la retención de nitrógeno,

repercuten negativamente sobre la ganancia de peso y posteriormente sobre la producción de carne, lana y leche, así como sobre la fertilidad de los animales (Hope Cawdery, 1984).

En relación con la **pérdida de peso**, Coop y Sykes (1977) observaron que esta era del 26%, 22% y 33% en animales que albergaban 87, 157 y 233 ejemplares adultos de *F. hepatica*, respectivamente. López-Abán *et al.* (2007) comprobaron en corderos infectados con 100 metacercarias que la reducción de la ganancia de peso era aproximadamente del 70% respecto al grupo no infectado.

Asimismo, en ovinos infectados por *Fasciola* se han señalado porcentajes de la reducción de la **producción de lana** del 13,6 al 40% (Roseby, 1970; Edwards *et al.*, 1976; Torgerson y Claxton, 1999).

También se han observado **pérdidas en la producción de leche**, aunque según Hope Cawdery y Conway (1972) depende de la intensidad de parasitación y de si el animal puede compensarla con una mayor ingestión de alimentos. Además, Sinclair (1972) asoció las menores tasas de crecimiento observadas en los corderos con la reducción de la producción de leche en las madres infectadas con *F. hepatica*.

En relación con la **reducción de los índices de fertilidad**, Crossland *et al* (1977) observaron un aumento del 9% en la fecundidad de ovejas que pastaban en zonas en las que había programas de control de esta infección parasitaria. Asimismo, Hope (1984) observó un descenso en el número de nacimientos en granjas en las que las ovejas estaban parasitadas por este trematodo hepático.

3.2.4.2. Prevalencia de parasitación

Como se señaló en el apartado de diagnóstico, las técnicas más utilizadas para la determinación de la prevalencia de infección por *Fasciola*, son los análisis coprológicos, la necropsia y el inmunodiagnóstico.

A. Análisis coprológico

Es la técnica que se utiliza de manera rutinaria en el diagnóstico de la fasciolosis, principalmente por su rapidez, sencillez y alta especificidad. Según Afshan *et al.* (2013), en general, la prevalencia de infección es significativamente superior en las ovejas (28,43%) que en las cabras (5,01%). Estos autores señalaron que estas diferencias se pueden atribuir a los diferentes comportamientos de las ovejas y cabras a la hora de pastar, ya que las ovejas pastan cerca de zonas húmedas, mientras que las cabras tienen tendencia al ramoneo en zonas más secas. En este sentido, Gorski *et al.* (2004) señalaron prevalencias de infección del 10,9% en ganado ovino y, por el contrario, no detectaron cabras que eliminasen huevos de *F. hepatica*.

Asimismo, en ambas especies de rumiantes la prevalencia de infección varía mucho dependiendo del país en el que se hayan realizado los estudios. En Méjico (Estado de Sonora), Munguía-Xóchihua *et al.* (2007) señalaron prevalencias de infección del 8,7% y 23,4% en ovino y del 21,8 y 27,4% en cabras. En Pakistán, Gadahi *et al.* (2009) observaron que el 4,44% de las ovejas y el 0,66% de las cabras eliminaban huevos de *F. hepatica*. Asimismo, en este país, Khan *et al.* (2010) obtuvieron una prevalencia del 7,02% en ovejas y del 7,58% en las cabras. Posteriormente, Lashari y Tasawar (2011) observó que el 21,41% de los ovinos eliminaban huevos de este trematodo.

En los diferentes países europeos la prevalencia de infección también varía considerablemente de unos a otros. En Gran Bretaña, y Yugoslavia, Ollerenshaw (1959), Savin *et al.* (1978), respectivamente, señalaron prevalencias del 80-85% en ganado ovino. En Italia, concretamente en el sur de los Apeninos, Cringoli *et al.* (2002) comprobaron que en el 4,1% de las explotaciones de ganado ovino había algún animal que eliminase huevos de *F. hepatica*.

En **España** también se han observado diferencias en la prevalencia de infección en el ganado ovino según pastaran en unas zonas u en otras, siendo más elevadas en el Norte que en el Centro y Sur de la Península. Así, García y Juste (1987), en el País Vasco, observaron que el 62,9% de las ovejas eliminaban huevos de *F. hepatica*, mientras que estas prevalencias resultaron inferiores en León (14,7%; 12%; 9,3%), Segovia (0,5%), Salamanca (9,3%),

Cáceres (3,3%) y Granada (9,7%) según diferentes autores (Manga *et al.*, 1990; Ferre *et al.*, 1995; Díez-Baños *et al.*, 2006; Ferre *et al.*, 1991; Simón y Ramajo, 1985; Reina *et al.*, 1987 y Peinado *et al.*, 1989, respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de explotaciones en las que había algún animal que eliminase huevos de este trematodo resultó más elevado tanto en Galicia (78,1%) como en Castilla y León (59,3%) (Díez-Baños *et al.*, 1989; Martínez-Valladares *et al.* 2013, respectivamente).

En Galicia, Vázquez *et al.* (2008) y Cienfuegos *et al.* (2009b) señalaron que entre el 6 y el 9,5% de las ovejas eliminaban huevos de *F. hepatica*, mientras que Cienfuegos *et al.* (2009 a) y Béjar (2011) en un estudio en cabras en la misma zona no hallaron animales infectados.

B. Necropsia

En Noruega, Domke *et al.* (2013) realizaron necropsias y coprologías de ovejas y cabras infectadas por *F. hepatica*; mediante necropsia comprobaron que el 18,8% de las ovejas procedentes de la costa estaban infectadas, lo que atribuyen a que en la costa noruega puede sobrevivir mejor el parásito debido a que en la misma el invierno es menos largo y frío que otras zonas del país. En Yugoslavia, Savin *et al.* (1978) observaron que el 60-80% de los ovinos albergaban ejemplares de *F. hepatica* en el hígado.

Ayadi *et al.* (1993), en un estudio realizado en el oasis de Tozeur (Túnez), constataron que la prevalencia determinada por coprología y por serología (25% y 44%, respectivamente) era muy superior a la observada en el examen *post mortem* (1,6%). Esta baja prevalencia de infección detectada en hígados de ovino fue atribuida a que los animales sacrificados eran muy jóvenes y por tanto con menos posibilidades de ingerir metacercarias. En el mismo trabajo también estudiaron en qué medida afectaba la fasciolosis a otras especies, señalando que el ganado caprino estaba menos infectado que el ovino.

En Irán, Ansari-Lari y Moazzeni (2006) observaron que en los años 1999-2000 el 3,2% del ganado ovino y el 2,6% del caprino albergaban adultos de *F. hepatica* y que esta prevalencia se reducía en los años 2003-2004 (0,6 y 0,2% en ovejas y cabras,

respectivamente) probablemente debido a que en los últimos años hubo mayor sequía y a que los ganaderos habían comenzado a aplicar diversas medidas de control.

En otros países se han señalado prevalencias más bajas; 7% en Brasil (Ueno *et al.*, 1982), 6% en Turquía (Handemir, 1997) y 7% en Gran Bretaña (Froyd, 1975).

En **España** se han observado cifras similares; Simón y Ramajo (1985) y Tarazona *et al.* (1985) observaron que el 9,3% y el 4,4% de los ovinos sacrificados en Salamanca y en Castilla-La Mancha albergaban adultos de *F. hepatica*.

C. ELISA-indirecto

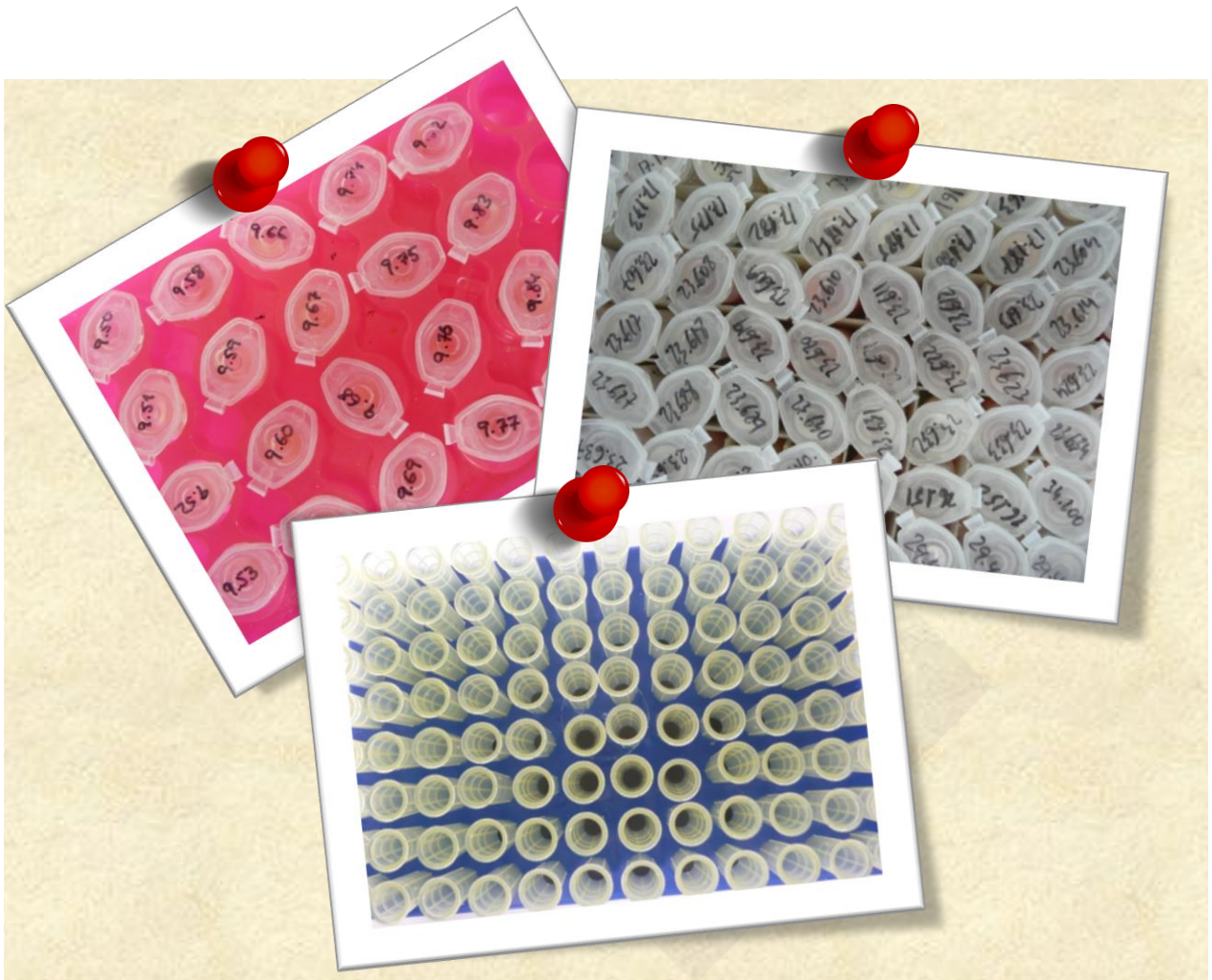
Hillyer *et al.* (1996) estudiaron la seroprevalencia de infección en ganado ovino y bovino en una zona endémica de fasciolosis en el altiplano boliviano; comprobando que ésta era superior en ovejas (89%) que en vacas (57%). Además, cuando compararon en estas 2 especies de rumiantes la sensibilidad del ELISA-i respecto a la coprología observaron que la sensibilidad era del 100% en el ganado ovino y del 82% en el vacuno. Munguía-Xóchihua *et al.* (2007) hallaron una seroprevalencia del 40,4-45,6% en cabras y del 26,3%-32,3% en ovejas en una zona semidesértica del noroeste de Méjico. Afshan *et al.* (2013) detectaron mediante ELISA-i una seroprevalencia de infección netamente superior en las ovejas (39,2%) que en las cabras (4,1%) en ganado ovino y caprino en pastoreo en una zona subtropical de Pakistán.

En **España**, Ferre *et al.* (1995) en ovinos de la provincia de León, detectaron mediante ELISA-i y antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica*, una seroprevalencia de infección individual del 44,2% y del 77,6% al considerar las explotaciones. Concluyendo que el ELISA-i es útil para detectar infecciones por este trematodo en el ganado ovino, ya que la sensibilidad y la especificidad de la técnica es del 95% y 99%, respectivamente. Luzón *et al.* (1997) mediante ELISA-i y un antígeno de ES, obtenido de la fracción del tegumento de 20 kDa conocida como f₂, comprobaron que la seroprevalencia era más elevada en ovinos que pastaban en zonas de regadío (58%-35%) que los que lo hacían en cultivos de cereales de secano (9%).

En ovejas en pastoreo en Galicia, Paz-Silva *et al.* (2003) determinaron la prevalencia de infección por *F. hepatica* mediante coprología, ELISA-sandwich y ELISA-i. El 30,4% de los animales eliminaban huevos de este trematodo y en un porcentaje similar se detectaron antígenos circulantes (39,1%), siendo superior la seroprevalencia detectada con ELISA-i (56%).







MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS EXPLOTACIONES

Para la realización de este estudio se recogieron un total de 1.666 muestras de sangre de cabras y ovejas pertenecientes a 98 granjas localizadas en la Comunidad gallega y que se explotaban en régimen extensivo o semi-extensivo.

Aunque un elevado porcentaje de las granjas gallegas de ovino y caprino son de pequeño tamaño y de carácter familiar, orientadas al autoconsumo, todas las explotaciones muestreadas ($n= 98$) pertenecían a la Asociación de Defensa Sanitaria de Ovino y Caprino de Galicia “ACIVO”, que engloba rebaños tanto semiprofesionales como profesionales que tiene, por lo general, más de 100 cabezas. Esta ADSG cuenta, además, con un equipo de veterinarios especializados responsables de llevar a cabo distintos programas sanitarios. Todas las cabras de raza “Cabra Galega” estaban inscritas en el libro genealógico gestionado por la Asociación de Gandeiros da Raza Cabra Galega (CAPRIGA). El muestreo se realizó de forma que los rebaños incluidos finalmente en el estudio representaran a todas las zonas agroganaderas de Galicia.

Una característica diferencial de las granjas de nuestra Comunidad Autónoma es la presencia de un importante número de rebaños mixtos ($n= 2.756$ sobre un total de 24.306), integrados por cabras y ovejas; estas explotaciones suponen el 23,6% de las granjas de ganado ovino y el 50,8% de las de caprino (Consellería do Medio Rural, 2013). De este modo, se muestrearon 51 rebaños donde solo había ovejas, 13 rebaños compuestos únicamente por cabras y 34 rebaños en los que convivían ambas especies de pequeños rumiantes.

La mayoría del ganado ovino y caprino explotado en Galicia es el producto del cruce de diferentes razas; no obstante, en el presente trabajo, únicamente se recogieron muestras de la raza pura, la “Cabra Galega”, que es la raza autóctona de caprino originaria en Galicia.

Con objeto de analizar la presencia de animales seropositivos a *F. hepatica*, en cada rebaño se recogieron muestras de sangre de un porcentaje representativo de la población. Para calcular el número de muestras necesarias para realizar el presente estudio, con una potencia del 97% y un intervalo de confianza del 95%, se empleó la función `n.for.survey` del paquete `epicalc` en el programa estadístico R (Chongsuvivatwong, 2012) y se tuvo en cuenta que, según el Anuario de Estadística Agraria del año 2006 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), la población de ovinos de Galicia era de 276.302 cabezas.

En un estudio previo realizado en ganado ovino explotado en pastoreo semiextensivo en Galicia se comprobó, mediante ELISA-indirecto y antígeno de secreción/secreción, que la seroprevalencia de *F. hepatica* era del 56% (Paz-Silva *et al.*, 2003); la sensibilidad y especificidad de este ELISA fue del 92% y 94%, respectivamente. Teniendo en cuenta que el MM3-sero ELISA presenta mayores valores de sensibilidad y especificidad (Mezo *et al.*, 2007), para el cálculo del tamaño de la muestra se tuvo en cuenta una prevalencia estimada del 50%; por lo que el número mínimo de muestras que se deberían recoger era de 1063. El número medio de ovejas muestreadas por granja fue de $14,4 \pm 7,6$, con un rango que osciló entre los 4 y los 42 animales.

Para estimar el número necesario de muestras de cabras, y considerando la ausencia de datos de seroprevalencia en ganado caprino de Galicia, se tuvieron en cuenta los valores señalados previamente en ganado vacuno (Sánchez-Andrade *et al.*, 1995) y ovino (Ferre *et al.*, 1995; Paz-Silva *et al.*, 2003) del noroeste de España. Así, y considerando que la prevalencia por *F. hepatica* en cabras es mucho menor que en ovejas (Afshan *et al.*, 2013), se estimó que la seroprevalencia en ganado caprino sería del 15%. Empleando las mismas condiciones que en el ganado ovino, y considerando un tamaño de muestra de 52.899 animales (MAGRAMA, 2006), el número mínimo de muestras de cabras que se debían recoger era de 539. Finalmente, se tomaron 603 muestras de sangre de cabras pertenecientes a 46 granjas; el número medio de animales muestreados por granja fue de $12,8 \pm 17,4$, con un rango que osciló entre 1 y 101 cabras/rebaño.

Tabla 4.1. Media aritmética del número de animales y el tamaño medio de las granjas muestreadas

	Número de animales muestreados/granja ($\bar{x} \pm D.E.$)	Tamaño medio de la granja (\bar{x})
GRANJAS DE OVEJAS	14,3 \pm 7,6	195 (rango 50-1231)
GRANJAS MIXTAS	14,0 \pm 19,9	177 (rango 30-718)
GRANJAS DE CABRAS	8,8 \pm 8,9	188 (rango 2-520)

Para evitar posibles interferencias con anticuerpos calostrales, todos los animales muestreados eran mayores de seis meses.

4.1.1. Zona de estudio

Galicia está situada en el Noroeste de España y posee una superficie total de 29.574 km². Su latitud está comprendida entre 43° 47' N (Estaca de Bares) y 41° 49' N (frontera con Portugal en el Parque del Xurés) y su longitud, entre 6° 42' O (límite entre Ourense y Zamora) y 9° 18' O (Cabo Touriñán). Además, Galicia limita al Norte con el Mar Cantábrico, al Sur con Portugal, al Este con las provincias de León, Zamora y Asturias y al Oeste con el Océano Atlántico.

La geografía gallega se caracteriza por el contraste entre el relieve costero y el del interior, existiendo una marcada diferencia entre las elevadas llanuras septentrionales y las sierras y depresiones meridionales. La orografía del interior de Galicia se caracteriza la presencia por montañas bajas y romas, con multitud de ríos en el interior. Las principales cadenas montañosas de Galicia son las sierras de O Xistral (norte de Lugo), Os Ancares (frontera con León y Asturias), O Courel (frontera con León), O Eixo (frontera entre Ourense y Zamora); a 2.124 metros se encuentra Pena Trevinca, el pico más alto de Galicia), Macizo de Manzaneda (centro de la provincia de Ourense), O Faro (frontera entre Lugo y Pontevedra), Cova da Serpe (frontera Lugo y A Coruña), Montemaior (provincia de A Coruña), Montes do Testeiro (entre Pontevedra y Ourense), A Peneda, y las de O Xurés y O Larouco (frontera entre Ourense y Portugal).

A Galicia, por su situación en el noroeste de la Península Ibérica, le corresponde un clima oceánico que, según Rodríguez Rajo *et al.* (2003), se caracteriza por ligeras variaciones

de temperatura, siendo la temperatura media anual de 14,3° C y las medias de las temperaturas máximas y mínimas de 20,0° C y 9,6° C, respectivamente. Las precipitaciones anuales (1584 mm) son abundantes aunque irregulares, registrándose los valores más elevados en los meses de invierno y los más bajos en verano (Meteogalicia, 2007). No obstante, dentro de esta Comunidad existen variaciones edafoclimáticas ostensibles que permiten definir varias zonas (Carballeira *et al.*, 1983). Para facilitar la exposición de los resultados, así como su interpretación, el área de estudio se dividió en dos zonas: Costa-Centro y Montaña (Fig. 4.1).

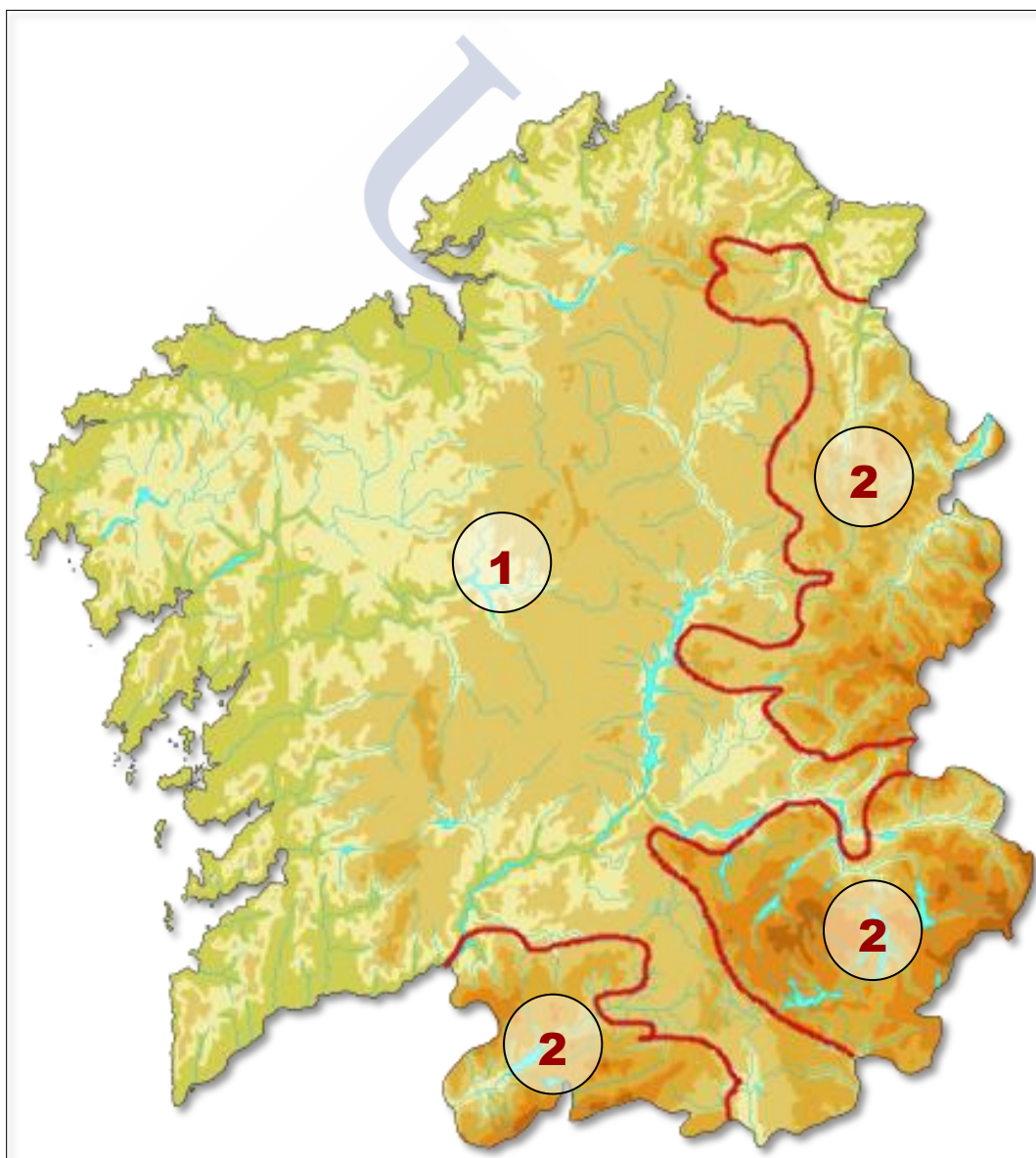


Figura 4.1. Zonas (1= Costa-Centro, 2= Montaña) en las que se divide Galicia según las principales condiciones edafoclimáticas.

La **zona de la costa-centro** comprende los municipios costeros de las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra y la meseta central. La altura media se sitúa entre 0 y 650 metros a nivel del mar; la pendiente es moderada en las zonas costeras, y más suave en las áreas del centro. El **clima es marítimo-templado**, caracterizado por una temperatura media anual de 13°C, precipitaciones anuales inferiores a los 1500 mm y déficit hídrico moderado (-100 mm).

La **zona de montaña** está formada por las principales cadenas montañosas de Galicia (O Xistral, Ancares, O Courel, O Eixo, Manzaneda, O Faro, Cova da Serpe, Montemaior y O Xurés). La altitud oscila entre 650 y 1500 m, con pendientes muy acusadas. El **clima es pirenaico** y se caracteriza por bajas temperaturas (10°C de media anual), elevadas precipitaciones (>1500 mm) y ausencia de déficit hídrico (0 a -50 mm).

4.1.2. Manejo de las explotaciones

Las diferencias edafoclimáticas que existen en Galicia condicionan de manera notable el manejo de los animales y de las explotaciones de ganado ovino y caprino. La gran mayoría de las granjas en nuestra comunidad (86,7%) presentan un manejo del ganado en semiextensivo con diferencias en el tamaño de los pastos y densidad de animales en los mismos según la zona climática.

En la zona Costa-Centro los animales pastan en pequeños prados localizados cerca del establo durante las horas de luz y se estabulan al anochecer. Por el contrario, los animales explotados en la Montaña pastan en prados de gran tamaño debido a que el forraje es menos abundante que en otras áreas y, aunque las condiciones climáticas sean adecuadas, los animales se estabulan siempre al anochecer para defenderlos de sus depredadores; asimismo, se estabulan cuando las condiciones meteorológicas son adversas para la alimentación y supervivencia del ganado, ya que en estas latitudes suele nevar copiosamente varios meses al año.

También hay un número reducido de granjas (13,3%) que manejan sus animales en régimen totalmente extensivo; en este caso, se trata de zonas que se caracterizan por la fertilidad de sus suelos y, por tanto, tienen parcelas donde se producen grandes cantidades de

pasto. Estas diferencias de manejo nos van a condicionar la densidad de animales en los pastos y el riesgo de infección de los animales.

El manejo de la cría del ovino y del caprino, cuando se encuentra en la misma explotación, es el típico de rebaños semiextensivos de carne, de modo que los corderos/cabritos permanecen estabulados con sus madres en grupos de 5-10 animales durante 3-7 días tras el parto. Posteriormente se integran dentro del rebaño con los adultos o, por el contrario, se mantienen sin salir al pasto, en un redil separado del resto de animales hasta que son destetados a los 2-3 meses de edad. Todos los animales son amamantados por sus madres y cuando las crías se mantienen en un grupo independiente de los adultos, se les permite el contacto con su madre una o dos veces al día para que se alimenten.

En todas las explotaciones se administraban tratamientos antihelmínticos, dirigidos fundamentalmente al control de las infecciones por nematodos gastrointestinales. Así, en la mayoría de los rebaños gallegos con orientación productiva se aplica, de forma rutinaria, un fármaco antiparasitario a los animales, al menos una vez al año y generalmente en otoño, empleando bencimidazoles y, en menor medida, lactonas macrocíclicas e imidazotiazoles (Pedreira *et al.*, 2006). Por ello, en la desparasitación de estos animales no siempre se emplean fármacos con actividad fasciolicida. Cabe destacar que ningún ganadero de los incluidos en el estudio había llevado a cabo, al menos de manera consciente, alguna medida de manejo de animales o pastos orientado hacia la prevención y/o control de las infecciones por el trematodo.

4.2. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

La toma de muestras se realizó entre los años 2007 y 2011. La sangre se extrajo mediante punción en la vena yugular empleando tubos estériles al vacío Vacutainer® CAT (Becton and Dickinson, Nueva Jersey, EE.UU.) de 10 ml, sin anticoagulante. La localización de las granjas muestreadas se señala en la Figura 4.2.

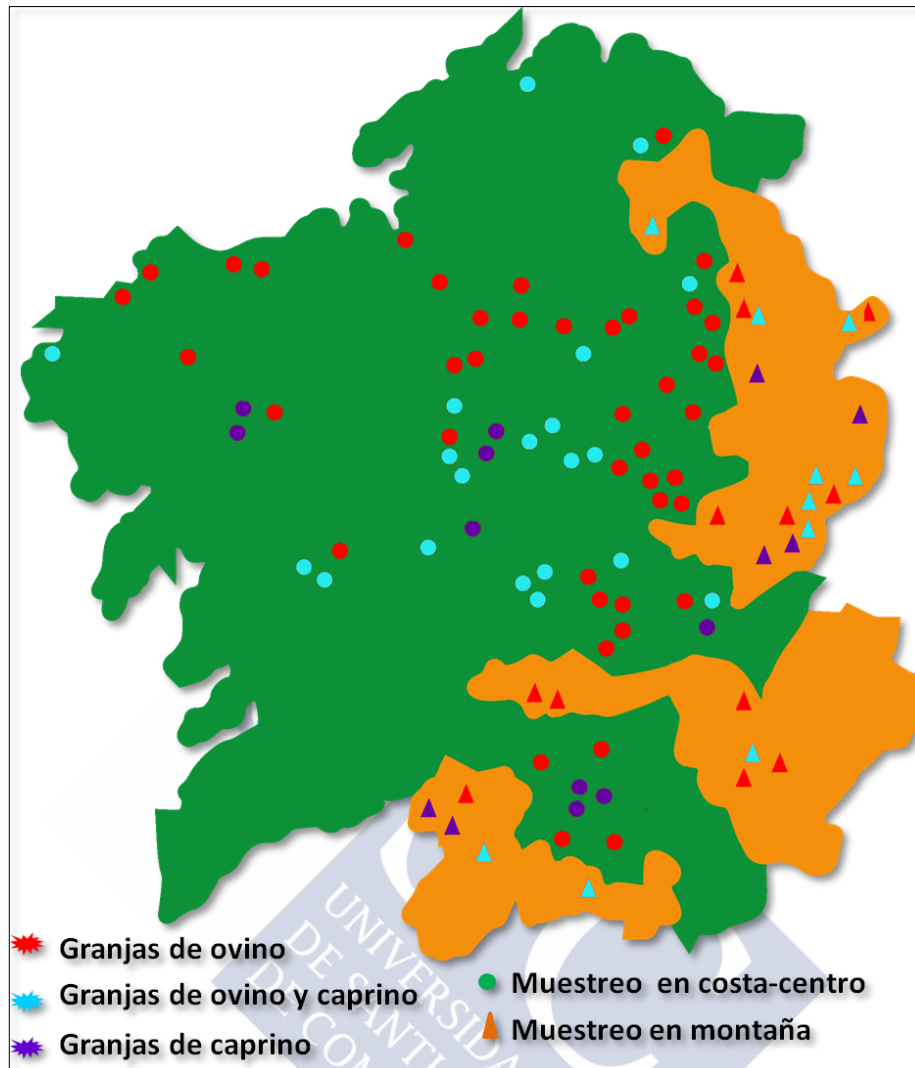


Figura 4.2. Distribución de las granjas muestreadas en las dos zonas edafoclimáticas: costa-centro y montaña

Al tiempo que se extraía la sangre a los animales, se registró para cada uno de ellos su número de identificación oficial, así como la especie, género y número asignado por el laboratorio. Las muestras se anotaron de forma consecutiva y siempre constaba el número de referencia de la explotación de origen.

Una vez obtenidas, las muestras sanguíneas se trasladaron al laboratorio de Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo donde, para favorecer la retracción del coágulo y el posterior desuerado, se mantuvieron 24 horas en refrigeración. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 10 minutos en una centrífuga modelo Mixtasel (P SELECTA®, España) y el suero se congeló a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo.

4.2.1. Registro de datos de los animales y de las explotaciones

En cada una de las granjas se realizó una encuesta epidemiológica al propietario, donde se recogieron datos acerca del titular de la granja, código de explotación agraria, localización de la misma, tipo y orientación productiva, censo de animales, proximidad a otras explotaciones y presencia o ausencia de otras especies de pequeños rumiantes. También se tomaron datos relativos a la realización de desparasitaciones y, en su caso, de los productos empleados; también se anotó si se había detectado algún problema de etiología infecciosa o parasitaria en los últimos años.

A través de las hojas de calificación sanitaria de la explotación, se verificó el censo y se obtuvo la edad de los individuos expresada en meses, tomando como referencia su fecha de nacimiento y la fecha del muestreo.

4.2.2. Procesado de las muestras

Para determinar la presencia de anticuerpos frente a *F. hepatica*, las muestras de suero se analizaron mediante ELISA MM3-SERO, basado en el empleo del anticuerpo monoclonal MM3 (Figura 4.3).

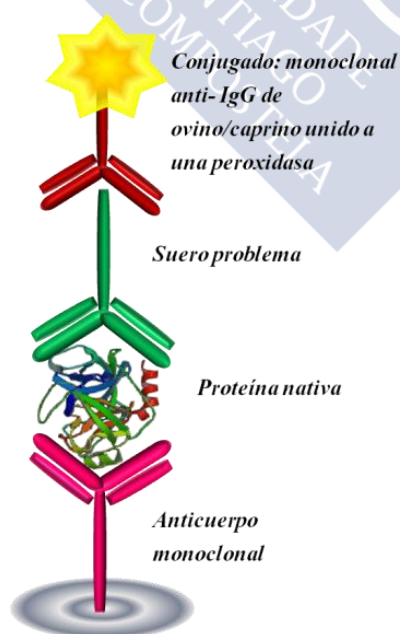


Figura 4.3. Componentes presentes en la reacción de un suero positivo en el ELISA MM3-SERO empleado en nuestro estudio

Este test emplea antígenos de excreción-secreción (AESs) del trematodo presentes en un solo epítipo conformacional presente en el pico IV tras un fraccionamiento FPLC (Mezo *et al.*, 2004). Estas fracciones proteicas, identificadas posteriormente por Muíño *et al.* (2011) como catepsinas L1 y L2, presentan un 100% de especificidad, incluso en corderos infectados con *Dicrocoelium dendriticum*, y una sensibilidad elevada, siendo esta técnica capaz de detectar anticuerpos a las 3 semanas post-infección (s.p.i.) en animales que albergaban 1 o 2 ejemplares de *F. hepatica* y a las 4 s.p.i. en animales con más de 2 tremados. Además, el ELISA MM3-SERO detecta como positivas muestras de suero de animales con una baja dosis de infección incluso en diluciones de 1:12.500 (Mezo *et al.*, 2007).

4.2.2.1. Equipos, materiales y reactivos empleados en el test ELISA

Para la realización del test ELISA se emplearon los materiales y equipos citados a continuación (Figura 4.4):

1. Espectrofotómetro modelo 680 de Bio Rad (Microplate Reader Model 680, Bio Rad, Hercules, California, EE.UU.)
2. Agitador de tubos ZX3 (Advanced Vortex Mixer ZX3, Velp Scientiphica, Usmate, Milán, Italia)
3. Micropipetas de precisión, simples y multicanal (Eppendorf Research plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
4. Puntas de pipetas desechables
5. Agua destilada
6. Estufa de incubación RAYPA (Mod. IRE-160)
7. Microplacas sensibilizadas (cedidas por el Dr. Martínez Ubeira)
8. Solución de lavado PBS-Tween (0,2%) (PBS-T)
9. Tampón de dilución PBS-T/leche desnatada (1%) (PTL) para las muestras y el conjugado
10. Monoclonal sheep-goat IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich Química SA; EEUU)
11. Solución de revelado Ortofenilendiamina Dihidroclorito (OPD) (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich Química SA; Madrid, España).
12. Solución de parada (H₂SO₄, solución 3 N)



Figura 4.4. Esquema del procesamiento de las muestras sanguíneas

4.2.2.2. Procedimiento del ensayo

Los sueros y el inmunoconjugado se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su descongelación. Como testigo positivo (T+) se utilizó suero de un animal que previamente se había identificado como positivo mediante coprología y ELISA MM3. Cada suero problema se añadió tanto a los pocillos pares, que presentan un complejo antigénico de *F. hepatica* unido al anticuerpo monoclonal MM3, como se indica en la Figura 4.5, como a los impares, que poseen sólo el MM3, y que se emplean como testigo negativo.

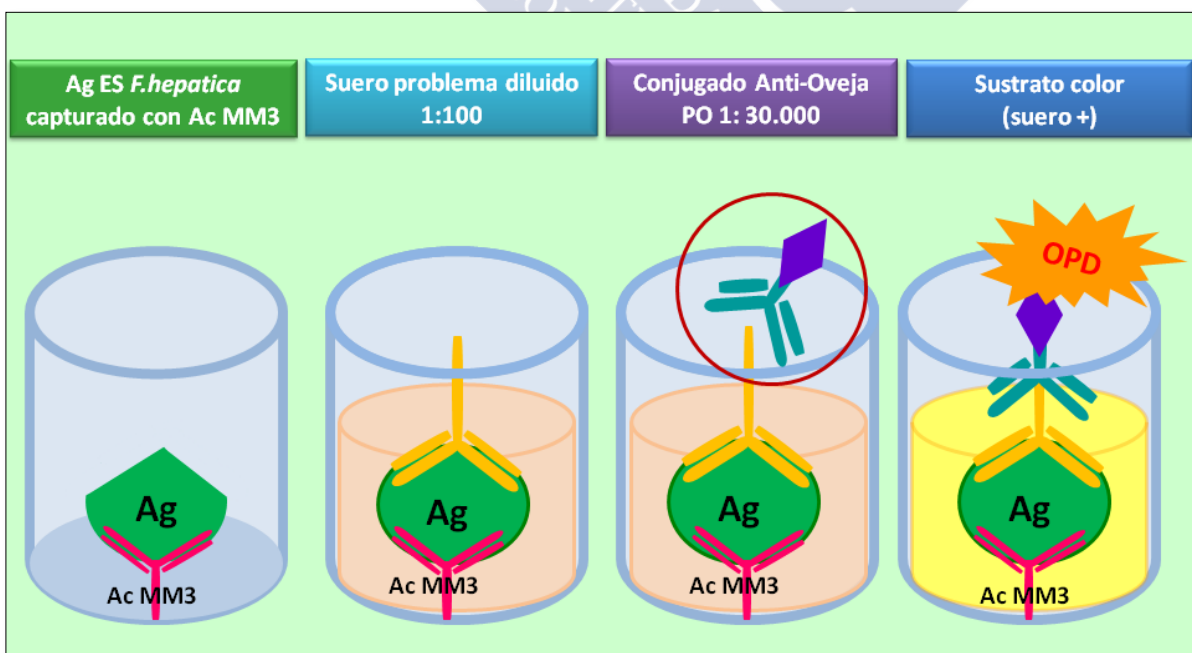


Figura 4.5. Reacción antígeno-anticuerpo en los pocillos positivos al ELISA MM3

El protocolo del ELISA fue el siguiente:

- A) Dilución del suero testigo positivo y los sueros problema en una proporción 1/100 en PTL 0,2%
- B) Adición de 100 µl de los sueros diluidos a la placa por duplicado (Figura 4.6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T+	T-		-		-		-		-		-
B	P ₁ +	P ₁ -		-		-		-		-		-
C	P ₂ +	P ₃ -		-		-		-		-		-
D		-		-		-		-		-
E		-		-		-		-		-		-
F		-		-		-		-		-		-
G		-		-		-		-		-		-
H		-		-		-		-		-		-

Figura 4.6. Distribución de los sueros testigo (T) y problema (P) en la placa de microtitulación (las columnas de color blanco son Ag+ y las de color azul son Ag-

- C) Primera incubación en cámara húmeda a 37°C, 2 horas
- D) Primer lavado: vaciado de placas y 5 lavados con 200 µl de PBS-T por pocillo
- E) Adición del conjugado: 100 µl de solución peroxidasa-conjugado diluido 1:30.000 en PTL por pocillo
- F) Segunda incubación en cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C.
- G) Segundo lavado: vaciado de placas y 5 lavados de PBS-T por pocillo
- H) Revelado: Adición de 200 µl de solución de revelado (OPD) por pocillo
- I) Tercera incubación: a temperatura ambiente durante 20 minutos al abrigo de la luz
- J) Parada de reacción: 25 µl de la solución de parada (H₂SO₄ 3N) por pocillo
- K) Lectura de las densidades ópticas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

4.2.2.3. Expresión e interpretación de los resultados obtenidos

Los sueros tanto de ovino como de caprino se clasificaron como positivos o negativos según el valor de densidad óptica (DO) obtenido tras restar la DO del pocillo sin antigenar a la DO del pocillo antigenado.

En ganado ovino, se empleó el punto de corte obtenido por Mezo *et al.* (2007) para este mismo protocolo. Este valor se había calculado en base a los valores de DO de 91 animales negativos, siendo este cifra de 0,074 [= media (0,010) + 4 DE (0,016)].

El punto de corte utilizado para los sueros de caprino fue el mismo que en el ovino [0,074= media (0,0084)+ 4 DE (0,0164)] aunque en este caso se calculó en base a los valores de DO obtenidos de los sueros de 47 cabras de un año de edad que nunca habían tenido contacto con *F. hepatica*.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y su análisis estadístico se realizó mediante los programas SPSS versión 18.0, SPSS Answer Tree, versión 3.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y el paquete estadístico R (R v.3.1.1; R Development Core Team, 2014).

En el análisis de los posibles factores de riesgo asociados a la detección de animales seropositivos se empleó la seropositividad individual de los animales como variable dependiente. Las variables independientes o valores predictivos empleados se seleccionaron en base al posible impacto que los diferentes tipos de manejo pudieran ejercer sobre la seroprevalencia de *F. hepatica*, y se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Variables independientes empleadas en el estudio de los factores de riesgo asociados con la seropositividad frente a *F. hepatica* en rebaños de pequeños rumiantes en el noroeste de España.

Factores de riesgo		Número de ovejas	Número de cabras
Edad	< 13 meses	158	64
	13-48 meses	390	123
	> 48 meses	515	425
Sexo	Hembras	1010	570
	Machos	53	33
Raza	Cruce	-	420
	Cabra Galega	-	183
Tamaño del rebaño	< 96	216	169
	96-194	344	153
	> 194	503	281
Área climática	Centro-Costa	897	439
	Montaña	166	164
Sistema de manejo	Extensivo	125	63
	Semiextensivo	938	540
Presencia de ovejas	Al menos una oveja	-	482
	Rebaño puro de cabras	-	121
Presencia de cabras	Al menos una cabra	331	-
	Rebaño puro de ovejas	732	-
TOTAL		1063	603

El estudio de la asociación entre los factores de riesgo y la seroprevalencia se realizó en tres pasos:

En primer lugar, se realizó un análisis univariante; para ello se empleó el test de Chi-cuadrado, que identifica las variables de exposición significativamente relacionadas con la seropositividad individual. Las variables estudiadas fueron las descritas en la Tabla 6. Para medir la fuerza de la asociación se calculó también el *odds ratio* (OR) de cada posible factor de riesgo, con intervalos de confianza del 95% (95% IC). Estos valores se representaron gráficamente; las figuras se generaron con la función `cc()` del paquete `epicalc` (Chongsuvivatwong, 2012) del programa estadístico R. Los criterios de interpretación del *odds ratio* se resumen en la siguiente Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Criterios de interpretación del *odds ratio*

OR>1 y límite inferior del IC 95%>1	la variable analizada se considera un factor de riesgo para la infección del animal
OR<1 y límite superior del IC 95%<1	la variable estudiada se considera un factor de protección frente a la infección
OR=1 y/o IC 95% comprende la unidad	no se puede establecer relación

De modo complementario, se realizó un estudio de las variables mediante un CHAID exhaustivo (exhaustive Chi-squared Automatic Interaction Detector) que es un árbol de clasificación realizado mediante minería de datos, basado en las pruebas de significación ajustada, y que ofrece la ventaja de clasificar los diferentes factores estudiados por su orden de importancia o significación sobre el porcentaje de seroprevalencia individual. Además proporciona unos resultados muy visuales y fáciles de interpretar; de ahí su empleo en este estudio.

Así, el CHAID identifica variables que permiten clasificar a los animales en subgrupos con distintos patrones de positividad. Empleando como criterio de discriminación la significación del test Chi-cuadrado, el CHAID evalúa todos los valores de un posible factor potencial, seleccionando la mejor variable predictora para formar la primera rama del árbol de clasificación. Posteriormente, el conjunto de datos se continúa dividiendo en nodos homogéneos en relación a la variable dependiente. Este proceso continúa hasta que el árbol de clasificación se construye completamente. El método es exhaustivo porque después de emplear un factor en el análisis, éste permanece en la lista de variables predictoras para su uso en futuros cálculos. El CHAID no restringe el número de ramas que pueden surgir de cada nodo a un número predeterminado, por lo que puede dividirse en más de dos ramas.

En estudios previos realizados sobre otras infecciones que afectan al ganado ovino hemos comprobado que para determinar la influencia de los diferentes factores epidemiológicos, hay que interpretar con cautela la valoración de los factores de riesgo empleando únicamente métodos estadísticos univariantes (Lago *et al.*, 2012; Viña *et al.*, 2013).

Por este motivo, se realizó un análisis multivariante empleando una regresión logística de efectos mixtos con objeto de determinar los factores que contribuyen en mayor medida sobre la seroprevalencia por *F. hepatica* y corregir el efecto de la segmentación del muestreo en rebaños, que puede generar una dependencia entre grupos de individuos y derivar en conclusiones erróneas en el análisis univariante. Este método es una extensión de los modelos de regresión logística donde se tiene en cuenta la correlación existente intragrupo en la estimación de los parámetros de regresión de un modelo y permite evitar sesgos en el estudio de datos con estructura jerárquica, justificándose por lo tanto su aplicación en el análisis de los factores de riesgo a nivel individual, ya que los objetos de estudio (animales) se encuentran distribuidos en conglomerados o jerarquías (rebaños). Así, la variable dependiente considerada fue el estatus serológico de cada individuo, mientras que el rebaño al que cada animal pertenecía se consideró un factor aleatorio. Se emplearon todas las variables descritas en la Tabla 6. Las variables se eliminaron del modelo una por una según los valores obtenidos de p , ajustándose el modelo hasta que todas las variables presentaban un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Posteriormente, se evaluaron todas las interacciones biológicamente plausibles entre las variables que formaban el modelo.







UNIVERSIDAD
DE
OSTELA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. SEROPREVALENCIA INDIVIDUAL Y POR REBAÑO DE *Fasciola hepatica* EN GANADO OVINO Y CAPRINO DE GALICIA

Al considerar el total de los animales analizados, el porcentaje individual de animales seropositivos fue del 24,3%; mientras que, el porcentaje de granjas que tenían al menos un animal positivo fue del 67,7%. Como se observa en la Figura 5.1, la seroprevalencia fue ligeramente superior en los rebaños de ovejas (25,3%) que en los de cabras (22,7%), aunque estas diferencias no fueron significativas ($\chi^2 = 0,154$; $p = 0,695$).

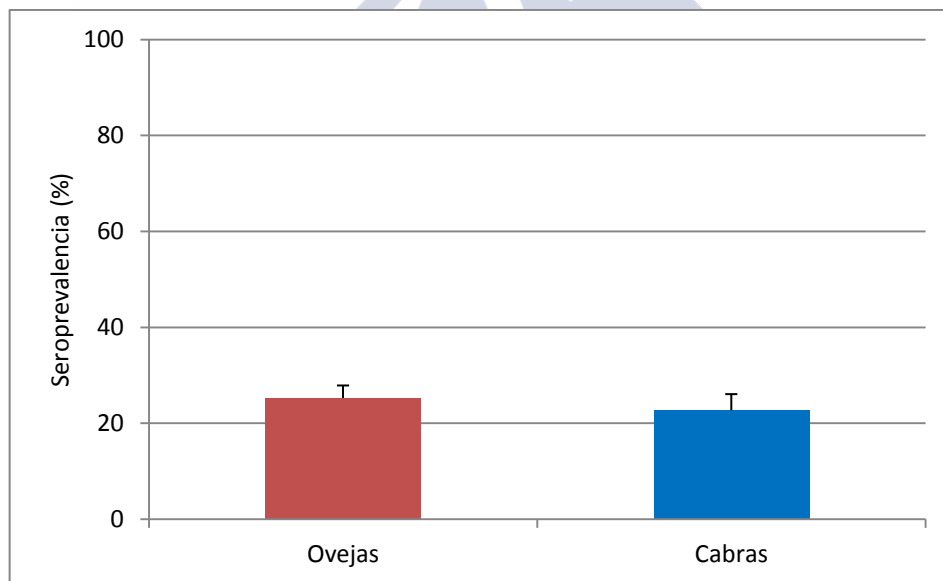


Figura 5.1. Seroprevalencia individual por *F. hepatica* en pequeños rumiantes de Galicia (IC 95%)

Los valores de *odds ratio* que se representan gráficamente en la Figura 5.2 muestran que las ovejas solo tienen una probabilidad de ser seropositivas 1,06 veces superior que las cabras.

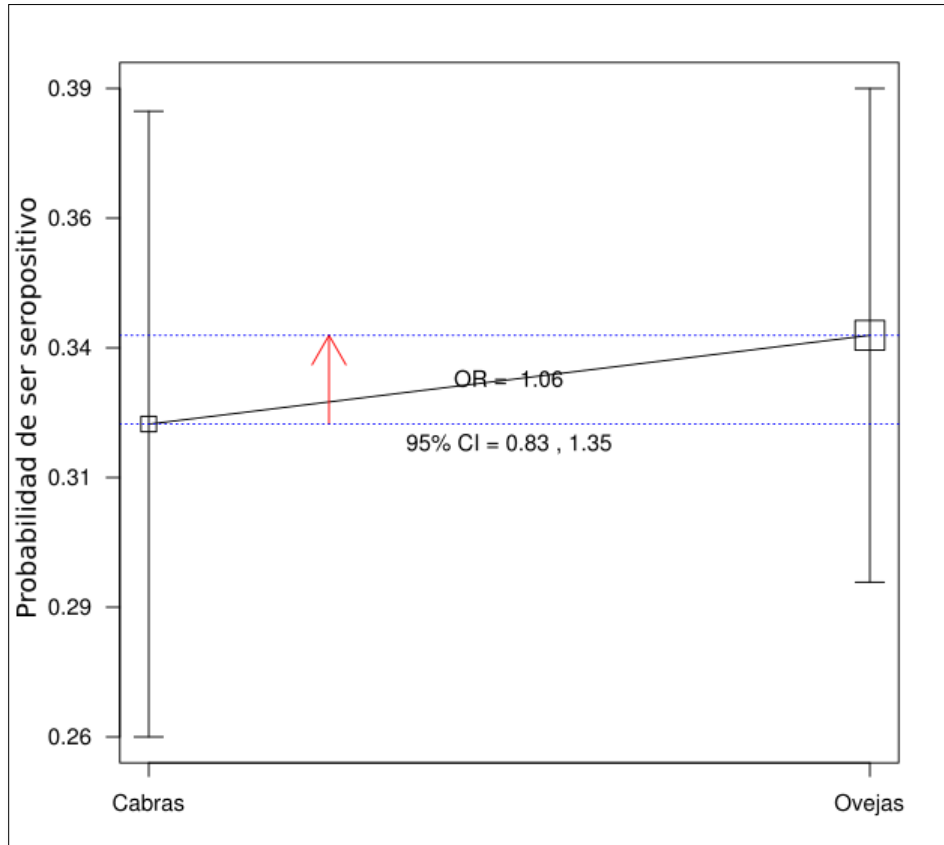


Figura 5.2. Diferencia entre la probabilidad de que un animal sea seropositivo a *F. hepatica* al considerar la especie de rumiante

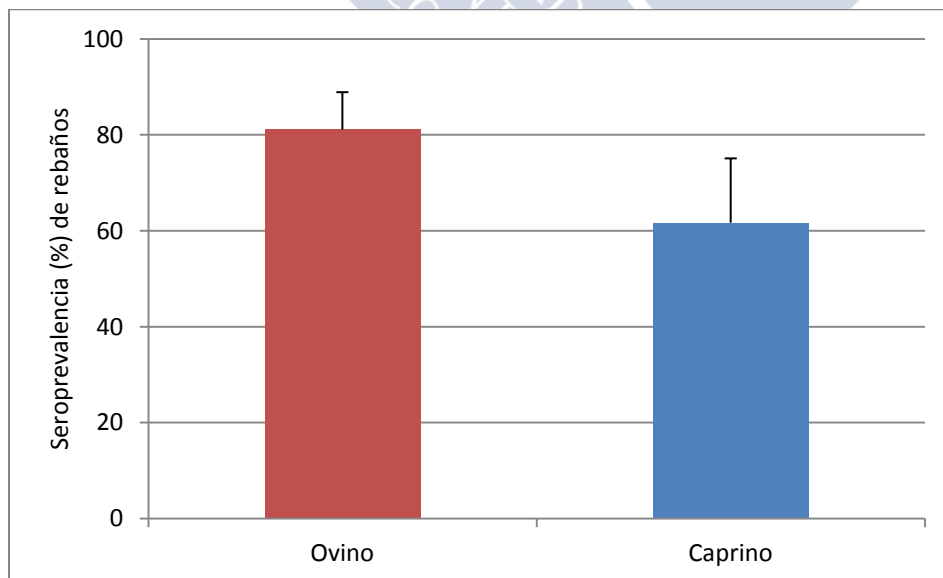


Figura 5.3. Seroprevalencia de *F. hepatica* al considerar los rebaños (IC 95%)

Respecto al porcentaje de rebaños que presentaban al menos un animal seropositivo, se constató que este era superior en los de ovino que en los de caprino (Figura 5.3), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2=4,598$; $p=0,032$).

Además, los valores de *odds ratio* indican que las granjas de ovino muestran una mayor probabilidad de tener animales seropositivos (OR=2,64; 1,07-6,63) que las de caprino (Fig. 5.4).

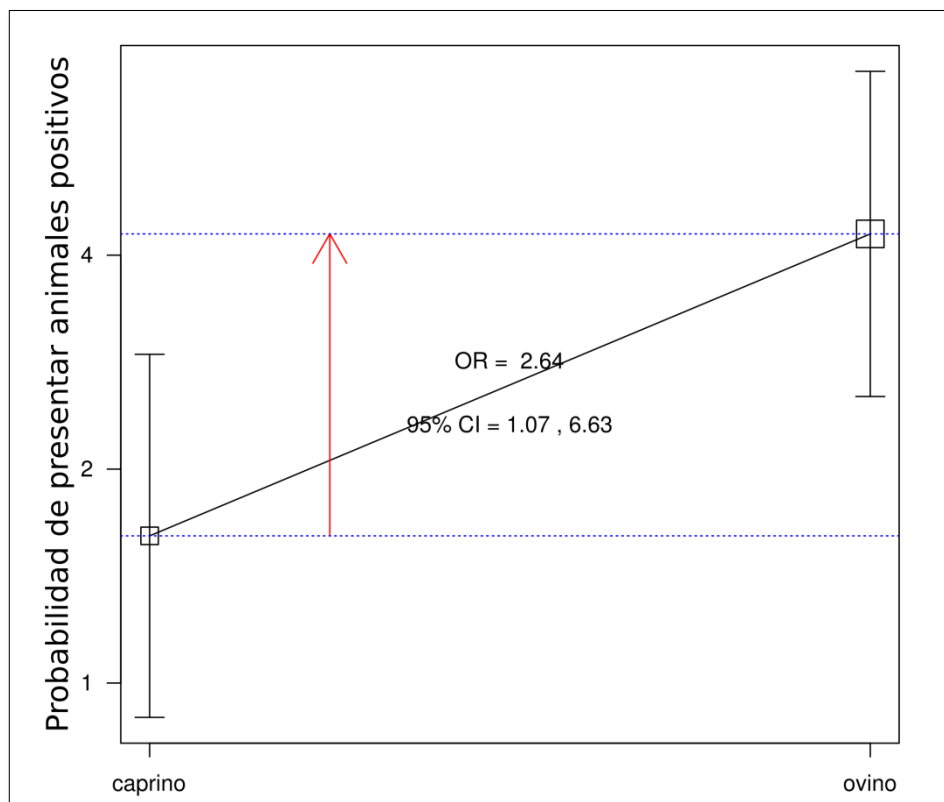


Fig. 5.4. Diferencia entre la probabilidad de que una granja tenga un animal seropositivo teniendo en cuenta la especie que maneja

Nuestros resultados indican que *F. hepatica* es un parásito muy prevalente y ampliamente distribuido en los rebaños de ovino y caprino de Galicia. Este elevado grado de exposición al parásito puede deberse a las condiciones climáticas y al manejo de los animales en nuestra Comunidad. Así, las temperaturas suaves, las abundantes precipitaciones y las características del suelo de la región gallega suponen un hábitat muy adecuado para el

desarrollo de los caracoles *G. truncatula* que actúan como hospedadores intermediarios del trematodo (Morrondo *et al.*, 1994) y para la supervivencia de las fases infectantes en el medio (Andrews, 1999; Arias *et al.*, 2011). Asimismo, el manejo en extensivo o semiextensivo de los rebaños de pequeños rumiantes, típico en la Comunidad gallega, favorece la ingestión de metacercarias del trematodo.

La elevada exposición a *F. hepatica* observada en este estudio coincide con los resultados obtenidos mediante técnicas directas en ganado vacuno explotado en semiextensivo en Galicia. Nuestro grupo de investigación (Díez-Baños *et al.*, 1994; Morrondo *et al.*, 2003; Díaz, 2006) comprobó mediante coprología que el porcentaje de infección individual oscilaba el 24% y el 27,1% y que el de explotaciones positivas variaba entre el 61,8% y el 63,9%. Además, mediante ELISA directo y análisis *post mortem*, se obtuvieron prevalencias individuales del 28% y del 20,4%, respectivamente (Sánchez Andrade *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2011). Asimismo, mediante ELISA indirecto y antígeno de excreción-secreción, se hallaron en ganado vacuno en Galicia seroprevalencias de 54,8% a 88,8%, de lo que se deduce que en los pastos gallegos debe existir un elevado número de metacercarias de *F. hepatica* a disposición de los animales (Morrondo *et al.*, 1994, 1997; Sánchez-Andrade *et al.*, 1995).

Al comparar la **seroprevalencia hallada en ganado ovino** con las obtenidas mediante coprología se comprobó que los valores obtenidos en el presente estudio eran superiores a los obtenidos en Galicia por Vázquez *et al.* (2008; 6%) y Cienfuegos *et al.* (2009b; 9,5%), así como a los señalados en Castilla-León (9,3-14,7%) por diversos autores (Manga *et al.*, 1990; Ferre *et al.*, 1995; Díez-Baños *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario señalar que las técnicas coprológicas muestran una menor sensibilidad (30-70%) en relación con el ELISA (Charlier *et al.*, 2008), puesto que no permiten detectar animales infectados en fase de prepatencia; además, la coprología no resulta adecuada para detectar animales con reducidos niveles de infección, puesto que, a veces, la cantidad de huevos en las heces no alcanza el límite de detección de la técnica. Por ello es normal que un porcentaje considerable de animales infectados se identifiquen como falsos negativos mediante métodos coprológicos.

Por el contrario, los niveles de seropositividad hallados en este trabajo resultan inferiores a los de otras investigaciones realizadas con otras técnicas de ELISA. Paz-Silva *et al.* (2003) detectaron una seroprevalencia individual del 56% en ganado ovino de Galicia, similar a la observada en otras zonas húmedas de España, donde el 35-58% de las ovejas presentaban anticuerpos frente a *F. hepatica* (Ferre *et al.*, 1995; Luzón *et al.*, 1997). Estas importantes diferencias pueden deberse a los desiguales valores de rendimiento diagnóstico de las técnicas, que están estrechamente relacionados con el antígeno empleado para detectar los anticuerpos anti-*Fasciola*. Así, la mayoría de los ELISA indirectos, empleados en estudios epidemiológicos, presentan valores de sensibilidad y especificidad que oscilan entre el 86-100% y el 83-100%, respectivamente (Anderson *et al.*, 1999; Cornelissen *et al.*, 1999; Salimi-Bejestani *et al.*, 2005; Charlier *et al.*, 2008; Kuerpick *et al.*, 2013). En este sentido, Mezo *et al.* (2007) destacan que aproximadamente el 5% de las muestras serológicas contienen anticuerpos heterófilos que pueden generar falsos positivos. Otro factor a tener en cuenta son las reacciones cruzadas con otros parásitos; por ejemplo, en el ELISA desarrollado a partir del total de productos de excreción-secreción de *F. hepatica* se han observado reacciones cruzadas con otros helmintos como *Dictyocaulus viviparus* (Cornelissen *et al.*, 2001) y *Dicrocoelium dendriticum* (Mezo *et al.*, 2007), lo que reduce notablemente su especificidad, que alcanzaría un 83-96%. Por el contrario, estos últimos autores, comprobaron mediante el fraccionamiento de AESs, que la fracción antigénica del ELISA MM3 utilizada en este estudio tenía una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%.

Los valores de **seroprevalencia individual en el ganado caprino** contrastan con los obtenidos mediante sedimentación en cabras en Galicia, puesto que no se había detectado ningún animal que eliminase huevos de *F. hepatica* (Cienfuegos *et al.*, 2009a y Béjar, 2011). No obstante, la mayoría de los estudios sobre infecciones por *F. hepatica* en ganado caprino señalan porcentajes muy reducidos, independientemente de la técnica utilizada. En cabras de Andalucía, Martínez-Cruz *et al.* (1995) obtuvieron prevalencias del 1,86% mediante ELISA indirecto; en la cabra pirenaica (*Capra pyrenaica*), Alaasad *et al.* (2007) hallaron valores del 0,53% mediante necropsia y del 1,87% mediante sedimentación. En otros países asiáticos, como Corea del Sur y Pakistán, los porcentajes de seropositividad, mediante ELISA indirecto, fueron del 1,1% y 4,08%, respectivamente (Afshan *et al.*, 2013; Gebeyehu *et al.*, 2013).

Por el contrario, Munguía *et al.* (2007) en México, obtuvieron valores de prevalencia en cabras muy superiores a los obtenidos en el resto de los estudios realizados hasta el momento, tanto mediante ELISA indirecto (43%) como por sedimentación (24,5%). Martínez-Moreno *et al.* (1997, 1999) han señalado que las cabras son más susceptibles a las reinfecciones, ya que no adquieren una respuesta inmunitaria protectora, pudiendo *F. hepatica* evadir los mecanismos defensivos del sistema inmunitario del ganado caprino; por lo que, los niveles de anticuerpos en las reinfecciones son similares a los observados en la primoinfección. No obstante, la elevada prevalencia hallada en México por Munguía *et al.* (2007) contrasta con la observada por la mayoría de las investigaciones en las que se comparan los datos de prevalencia por *F. hepatica* en ganado ovino y caprino. Así, en Polonia, Gorski *et al.* (2004) obtuvieron mediante sedimentación prevalencias de infección por *F. hepatica* del 11% en ovejas, pero no hallaron cabras infectadas. En Noruega, Domke *et al.* (2013) observaron mediante necropsia que el 18% de las ovejas albergaban adultos de este trematodo, mientras que no observaron cabras infectadas. Asimismo, en Pakistán, tanto por sedimentación (Gadahi *et al.*, 2009) como por ELISA indirecto (Afshan *et al.*, 2013), el porcentaje de cabras positivas (0,64% y 4,08%) fue netamente inferior al de ovejas (4,44% y 39,2%).

Otra posible explicación al hecho de observar menor seroprevalencia de infección en cabras que en ovejas puede ser el diferente tipo de alimentación entre las dos especies. Según Benavides *et al.* (2009), las cabras pasan más tiempo ramoneando (68%) que las ovejas (35%); de hecho, en Galicia, el 28% de la dieta de las cabras es a base de tojo (*Ulex europaeus*). En este sentido, Arias *et al.* (2013) señalan que los mayores porcentajes de seroprevalencia de *F. hepatica* hallados en ganado vacuno que en corzo se deben a que este último se alimenta principalmente de arbustos, matorrales y bayas. Asimismo, Afshan *et al.* (2013) concluyeron que el mayor grado de infección por *F. hepatica* observado en las ovejas respecto a las cabras se debe probablemente a que estas últimas son ramoneadoras.

5.2. DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS FACTORES DE RIESGO EN LA SEROPREVALENCIA POR *F. hepatica*.

La prevalencia de infección por *F. hepatica*, cuyo ciclo presenta una fase exógena, está muy influenciada, al igual que ocurre con otros parásitos, no solo por factores dependientes del hospedador (edad, raza, sexo) sino también por factores ambientales como el área climática, orografía, sistema de manejo, etc.

5.2.1. En ganado ovino

En cada granja se completó una encuesta epidemiológica con objeto de estudiar la posible influencia de determinados factores intrínsecos y extrínsecos sobre la seroprevalencia de *F. hepatica*.

En primer lugar se realizó una descripción de los porcentajes obtenidos teniendo en cuenta las diferentes categorías para cada uno de los factores que se recogen en la Tabla 5.1.

Al considerar los **factores intrínsecos**, respecto a la edad, los porcentajes más bajos de seroprevalencia se observaron en los animales más jóvenes, y a partir del año, la prevalencia se mantuvo estable. En relación al sexo, las hembras y los machos presentaron porcentajes de seropositividad similares.

Al considerar la posible influencia de los **factores extrínsecos**, se apreció que la seroprevalencia disminuía a medida que se incrementaba el tamaño del rebaño. Además, los porcentajes de animales seropositivos fueron muy similares, independientemente del sistema de manejo empleado para su cría (semiextensivo o extensivo) o de la zona climática (costa-centro o montaña). Sin embargo, se observaron valores de seroprevalencia más elevados en los animales en los que en sus rebaños había por lo menos una cabra entre sus efectivos.

Tabla 5.1. Seroprevalencia por *F. hepatica* en ganado ovino al considerar diferentes factores de riesgo.

FACTOR DE RIESGO	CATEGORÍA	SEROPREVALENCIA
Edad	< 13 meses	29/158 (18,4%)
	13-48 meses	102/390 (26,2%)
	> 48 meses	138/515 (26,8%)
Sexo	Hembras	257/1010 (25,4%)
	Machos	12/53 (22,6%)
Tamaño del rebaño	< 96	74/216 (34,3%)
	96-194	99/344 (28,8%)
	> 194	96/503 (19,1%)
Sistema de manejo	Extensivo	31/125 (24,8%)
	Semiextensivo	238/938 (25,4%)
Área climática	Centro-Costa	228/897 (25,4%)
	Montaña	41/166 (24,7%)
Presencia de cabras	Al menos una cabra	100/331 (30,2%)
	Rebaño puro de ovejas	169/732 (23,1%)
TOTAL		269/1063 (25,3%)

En primer lugar, **mediante análisis univariantes**, se estudió de forma individualizada el efecto de los diferentes factores sobre la tasa de seroprevalencia.

Con respecto a la **edad de los animales**, se observó que los ovinos más jóvenes mostraron los porcentajes más reducidos; sin embargo, a partir del año de edad, los valores de seroprevalencia fueron muy similares. Con Chi-cuadrado se constató que estas diferencias no eran estadísticamente significativas ($\chi^2 = 4,793$; $p = 0,091$), lo que coincide con lo observado por Vázquez *et al.* (2008) y Khan *et al.* (2010) en ganado ovino de Galicia y Pakistán, respectivamente.

En la figura 5.5 se representan los *odds ratio* de los grupos de animales de mayor edad en relación al grupo de ovejas más jóvenes. Se constató que tanto los ovinos de 13-48 meses como los mayores de esta edad presentaban una probabilidad de aproximadamente 1,6 veces mayor de ser seropositivos que los más jóvenes.

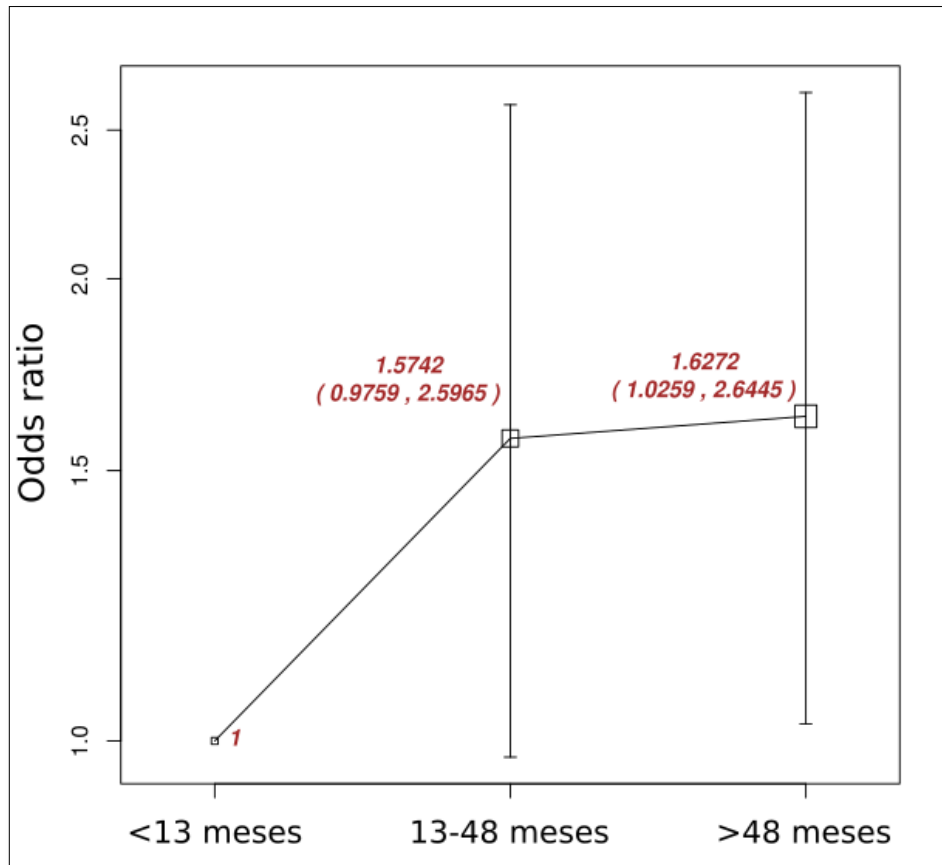


Figura 5.5. Odds ratio de los grupos de ovejas de mayor edad en comparación con las más jóvenes

Estos resultados coinciden con los observados por Vázquez *et al.* (2008) y Paineira (2012), quienes señalaron que la prevalencia de excreción de huevos de *F. hepatica* era superior en los ovinos de mayor edad, aunque estas diferencias no fueron significativas. En México, Munguía *et al.* (2007) también comprobaron, tanto por coprología como por ELISA, que la prevalencia de infección era superior en las ovejas de mayor edad (≥ 5 años) que en las más jóvenes. En este sentido, Ferre *et al.* (1991), en ovinos explotados en la provincia de Segovia, observaron que los animales que habían pastado sólo una temporada no eliminaban huevos de *F. hepatica* mientras que únicamente un pequeño porcentaje (0,9%) de los que lo habían hecho durante 2 o más temporadas lo hacían.

Además, nuestros datos también coinciden con numerosos estudios realizados sobre la infección por *F. hepatica* en ganado vacuno, en los que se comprobó que existía una relación positiva entre la edad de los animales y la prevalencia de infección (González-Lanza *et al.*, 1989, 1993; Ducommun y Pfister, 1991; Holland *et al.*, 2000; Waruiru *et al.*, 2000; Scala *et*

al., 2001; Cringoli *et al.*, 2002; Keyyu *et al.*, 2003; Pfukenyi *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2005). Este hecho puede deberse a que los animales jóvenes habrían tenido menos oportunidades de infectarse que los de mayor edad, puesto que estos últimos han tenido mayores posibilidades de ingerir metacercarias al haber permanecido más tiempo en los pastos (González-Lanza *et al.*, 1989; Scala *et al.*, 1997, 2001; Waruiru *et al.*, 2000; Cringoli *et al.*, 2002; Otranto y Traversa, 2003). Además, y al contrario de lo observado en el ganado vacuno, según diversos autores (Boray *et al.*, 1985; Rojo-Vázquez *et al.*, 1989; Quiroz, 1990; Urquhart *et al.*, 1996 y Pfukenyi *et al.*, 2005) los ovinos no son capaces de generar una respuesta inmunitaria eficaz frente a la infección por *F. hepatica*, siendo ésta, incluso, menos intensa en las reinfecciones (Chauvin *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1999 y Zhang *et al.*, 2005; Pleasance *et al.*, 2011). Por el contrario, otros autores (López-Abán *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2010) no observaron diferencias en la seroprevalencia de *F. hepatica* respecto a la edad de los animales.

Al analizar el efecto del **sexo de los animales** sobre la seroprevalencia frente a *F. hepatica*, se comprobó que eran ligeramente superiores en las hembras (Tabla 5.1).

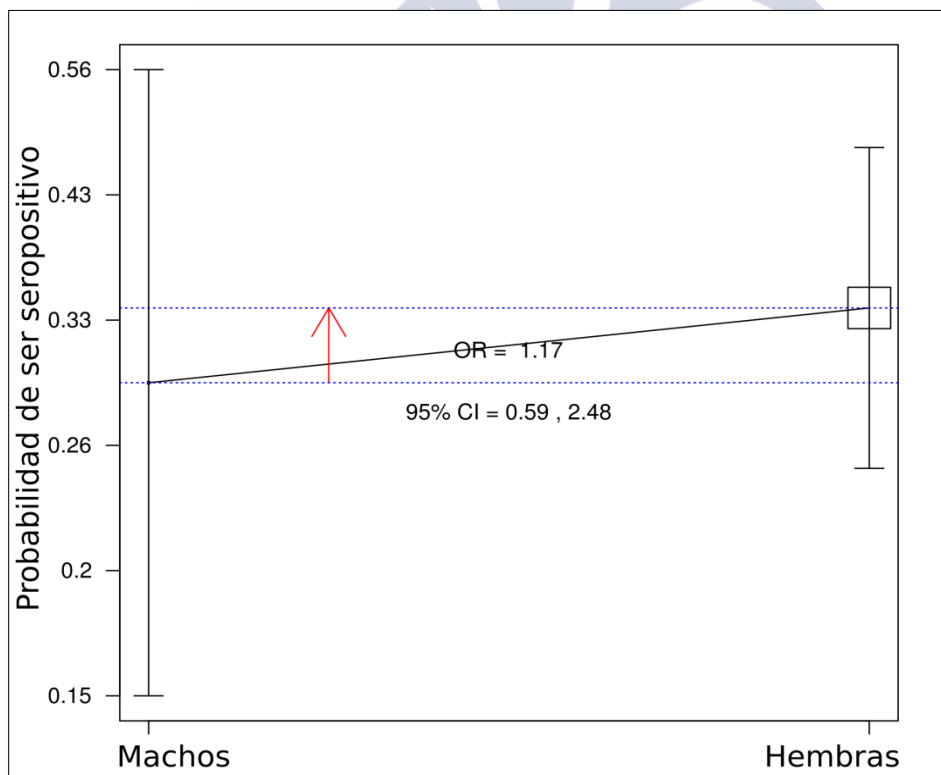


Figura 5.7. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar el sexo de las ovejas

Los *odds ratio* representados en la Figura 5.7 muestran que las hembras presentan una probabilidad 1,2 veces superior de ser seropositivas que los machos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($\chi^2 = 0,087$; $p = 0,767$). Este hecho puede deberse a que, en las explotaciones de ovino en Galicia, tanto los machos como las hembras se manejan, generalmente, de forma muy similar.

Según diversos autores, el sexo es un factor que influye sobre la prevalencia de infección por diversos parásitos. Pal y Qayyum (1992), Valcárcel y García Romero (1999) y Khan *et al.* (2010) señalaron mayores porcentajes de infección por nematodos gastrointestinales en las hembras, relacionándolo con una cierta inmunosupresión derivada del estrés al que se ven sometidas durante la gestación y el parto. Por el contrario, otras investigaciones sugieren que ciertas hormonas sexuales, como los esteroides gonadales o sexuales, están implicadas en la modulación de diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria del hospedador, de modo que los machos serían más receptivos que las hembras a las infecciones por diversos patógenos, entre los que se incluyen los helmintos (Poulin, 1996; Klein, 2000).

Respecto a la influencia del **tamaño de la granja** sobre la tasa de seroprevalencia, se apreció una relación negativa, de modo que los porcentajes disminuyeron de forma significativa a medida que se incrementó el número de cabezas de la explotación ($\chi^2 = 21,653$; $p < 0,001$). En la figura 5.8 se representan los valores de *odds ratio* según el tamaño de las explotaciones, constatándose que los ovinos procedentes de rebaños de menos de 96 animales y de 96-194 animales tenían un riesgo 2,2 y 1,3 veces mayor de ser seropositivos a *F. hepatica*, respectivamente, que los que se explotaban en granjas más grandes. Por el contrario, Ferre *et al.* (1995), en ganado ovino de la provincia de León, mediante coprología, no observaron diferencias en la prevalencia de infección por *F. hepatica* al considerar el tamaño de las granjas.

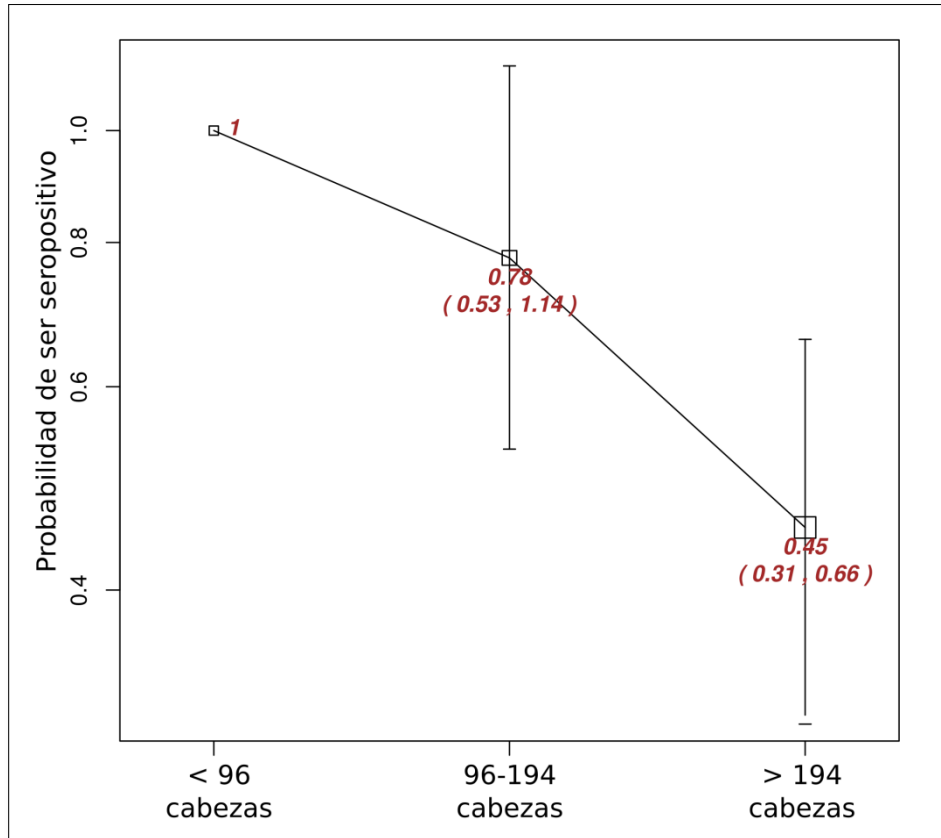


Figura 5.8. Odds ratio de las granjas de pequeño y mediano tamaño en comparación con las grandes

Las diferencias de seroprevalencia observadas en el presente estudio pueden estar ocasionadas por las variaciones en el manejo de los animales según el tamaño de la explotación; las más grandes suelen estar dedicadas a la producción industrial de carne y su objetivo final es maximizar la producción y minimizar los riesgos para el rebaño. Por ello, en las explotaciones con mayor número de animales se realizan controles periódicos del estado sanitario del rebaño y tienen un equipo veterinario que las asesora; todo ello repercute en una reducción de los porcentajes de infección por diversos parásitos. Por el contrario, en las granjas más pequeñas los ovinos suelen explotarse en un sistema de manejo tradicional, donde no se aplican medidas de control y prevención de enfermedades infecciosas y parasitarias, lo que favorece la contaminación de los pastos y la infección de los animales. No obstante, en el manejo de las explotaciones, uno de los mayores problemas es la disponibilidad de pastos; en este sentido, es frecuente que las granjas con mayor número de ovejas no puedan autoabastecerse debido a la escasez de praderas, por lo que suelen realizar un suplemento con hierba seca o ensilado, que si está bien conservado no presenta fases infectantes del trematodo

(Andrews, 1999). Por el contrario, los ganaderos de las granjas gallegas de pequeño y mediano tamaño no suelen suplementar a los animales, y generalmente disponen de un limitado número de pastos y de tamaño reducido, que se aprovechan al máximo, incluso las zonas encharcadas o cercanas a caminos, cercas o sus propios excrementos. Además, en Galicia es común que en las granjas pequeñas, donde el manejo del ganado ovino es de tipo tradicional, los ganaderos exploten diferentes especies animales; en estos casos, el ganado vacuno suele aprovechar los mejores pastizales, mientras que los ovinos pastan en zonas de peor calidad, como por ejemplo pastos encharcados, donde la presencia de caracoles hospedadores intermediarios es mucho más común.

Con respecto al **sistema de manejo**, la seroprevalencia fue ligeramente superior en las explotaciones en semi-extensivo, aunque estas diferencias no fueron significativas ($\chi^2 < 0,001$; $p = 0,977$). La representación gráfica de los *odds ratio* (Fig. 5.9) muestra que la probabilidad de que un animal sea seropositivo es prácticamente idéntica, independientemente del sistema de manejo empleado.

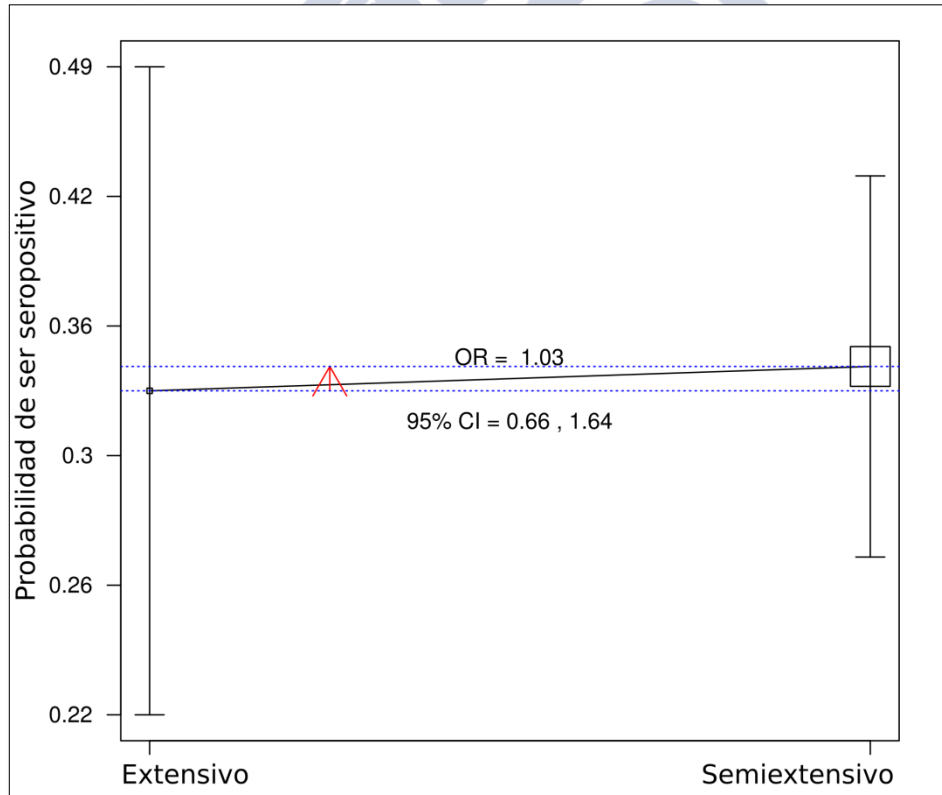


Figura 5.9. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar el sistema de manejo de las ovejas

Por el contrario, Khan *et al.* (2010) observaron que las ovejas en extensivo presentaban mayores prevalencias de infección que las que se estabulan, puesto que las que se explotan en extensivo, tienen mayores posibilidades de ingerir metacercarias en los pastos.

Al considerar la **zona edafoclimática**, se observó que los porcentajes de seroprevalencia eran ligeramente superiores en la Costa-Centro (25,4%) que en la Montaña (24,7%), aunque con Chi-cuadrado se constató que estas diferencias no eran significativas ($\chi^2 = 0,492$; $p = 0,782$). En este sentido, los resultados del *odds ratio* nos indican que la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* es prácticamente igual, independientemente de la zona climática en la que pasten los animales (Figura 5.10).

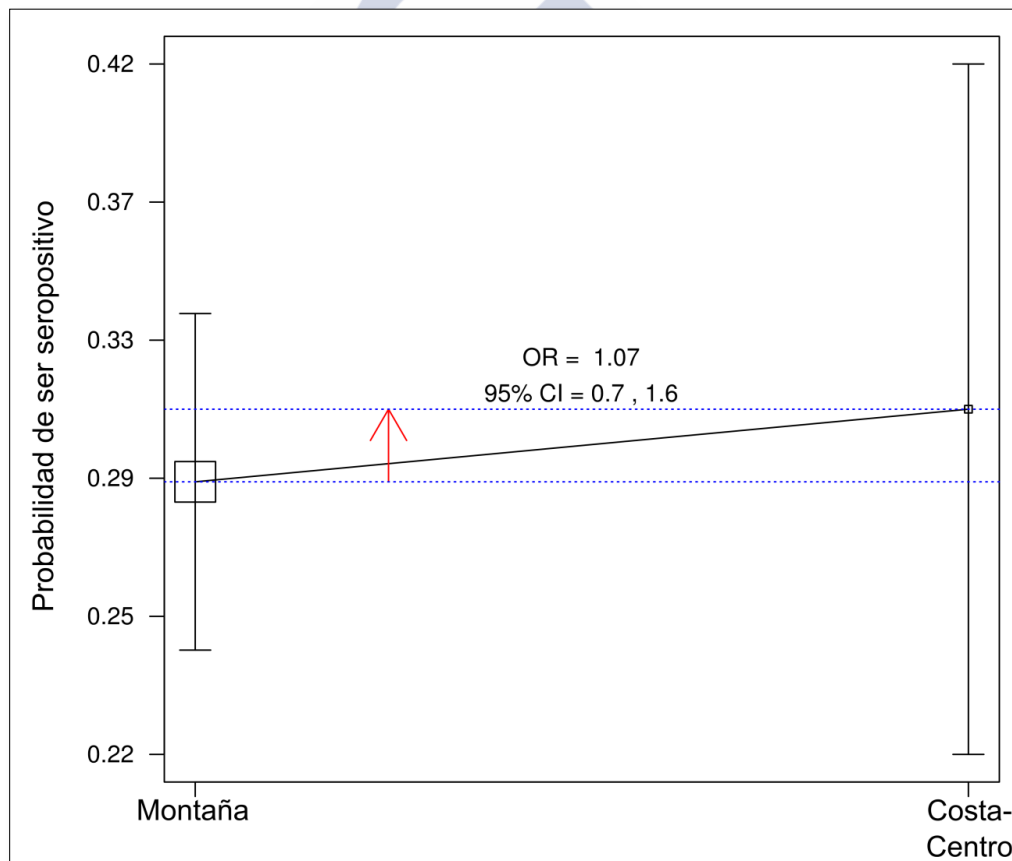


Figura 5.10. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar la zona climática donde se encontraban los rebaños de ovino

Aunque se ha demostrado que las condiciones de temperatura y humedad influyen notablemente sobre los porcentajes de infección por el trematodo (Domke *et al.*, 2013), nuestros datos coinciden con los señalados por Díaz (2006) en ganado vacuno de raza Rubia Gallega explotado en semi-extensivo en la provincia de Lugo, puesto que no halló diferencias significativas en las prevalencias de infección por *F. hepatica* entre los animales que pastaban en la montaña y en el centro de la provincia lucense. Aunque las zonas montañosas de Galicia se caracterizan por registrar mayores precipitaciones, las zonas del centro poseen una menor pendiente, lo que favorece el encharcamiento de los pastos incluso con bajas precipitaciones, constituyendo así hábitats adecuados para el desarrollo y la supervivencia del molusco hospedador intermediario *G. truncatula*. Asimismo, Díaz *et al.* (2007b), comprobaron que el porcentaje de infección por *Calicophoron daubneyi*, trematodo que comparte el mismo hospedador intermediario con *F. hepatica*, era significativamente superior en la zona centro.

La ausencia de diferencias entre la seroprevalencia observada en los ovinos que pastaban en la montaña y en el centro coincide con los resultados obtenidos por Ferre *et al.* (1995), quienes tampoco observaron diferencias entre el porcentaje de animales que eliminaban huevos de *F. hepatica* al considerar las diferentes zonas edafoclimáticas (montaña y centro) de la provincia de León. Por el contrario, en Andalucía, Martínez-Cruz *et al.* (1995) hallaron mayor seroprevalencia en ovinos explotados en áreas de montaña (3,5%) que en los que pastaban en la rivera del Guadalquivir (0,36%).

La **presencia de cabras** en los rebaños de ovino repercutió significativamente y de forma positiva sobre el porcentaje de seroprevalencia ($\chi^2 = 6,120$; $p = 0,013$); así, la probabilidad de ser seropositivo fue 1,44 veces más elevada en los ovinos en los que al menos había una cabra en la granja (Figura 5.11). Diversos estudios han puesto de manifiesto los riesgos que entraña el manejo conjunto de ovejas y cabras sobre los porcentajes de infección por diversos agentes infecciosos y parasitarios. En este sentido, Lago *et al.* (2012) observaron que la presencia de cabras en las explotaciones de ovino de carne es un factor de riesgo para la infección por el virus Maedi Visna, incluso cuando el número de cabras en la granja es reducido; asimismo, López *et al.* (2011), comprobaron que la presencia de ganado caprino en las granjas de ovino constituye un importante riesgo para que las ovejas se infecten por protostronglidos.

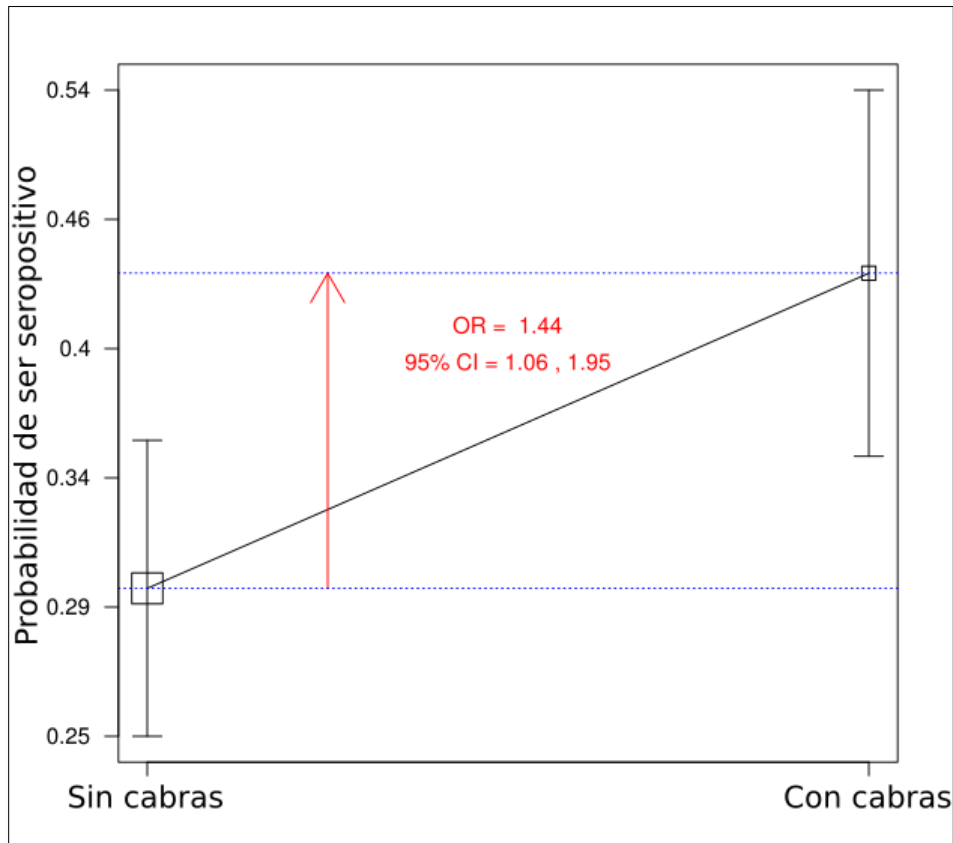


Figura 5.11. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar la presencia de cabras en las explotaciones de ovino

Tras analizar cada una de las variables de manera individual, se realizó un **CHAID exhaustivo** (Figura 5.12) para clasificar la influencia de los diferentes factores estudiados sobre la seroprevalencia. Así, se constató que el factor de riesgo que más influye sobre la seroprevalencia de *F. hepatica* era el tamaño del rebaño, debido a que este factor genera grupos más homogéneos y una mayor diferencia entre grupos tras la segmentación; así, en los ovinos de los rebaños pequeños y medianos se observó mayor seroprevalencia (30,9%) que en los de las explotaciones grandes (19,1%). Como se señaló anteriormente, este hecho se puede deber a que los animales de las explotaciones de menor tamaño, debido a la escasez de pasto, a veces se ven obligados a aprovechar áreas en las que suele haber pocos abrevaderos y estos son naturales. Estos lugares presentan un alto riesgo de infección por *F. hepatica*, ya que en ellos se dan varios factores determinantes; son las zonas más húmedas y por lo tanto donde hay mayor densidad de *G. truncatula*, por lo que hay mayor número de metacercarias enquistadas en la hierba de alrededor (Morrondo *et al.*, 1994) e incluso libres en el agua (Mas-

Coma *et al.*, 2005); además, son lugares de paso obligado tanto para animales de pastoreo como silvestres, que dejan allí sus heces perpetuándose el ciclo en un área de reducido tamaño.

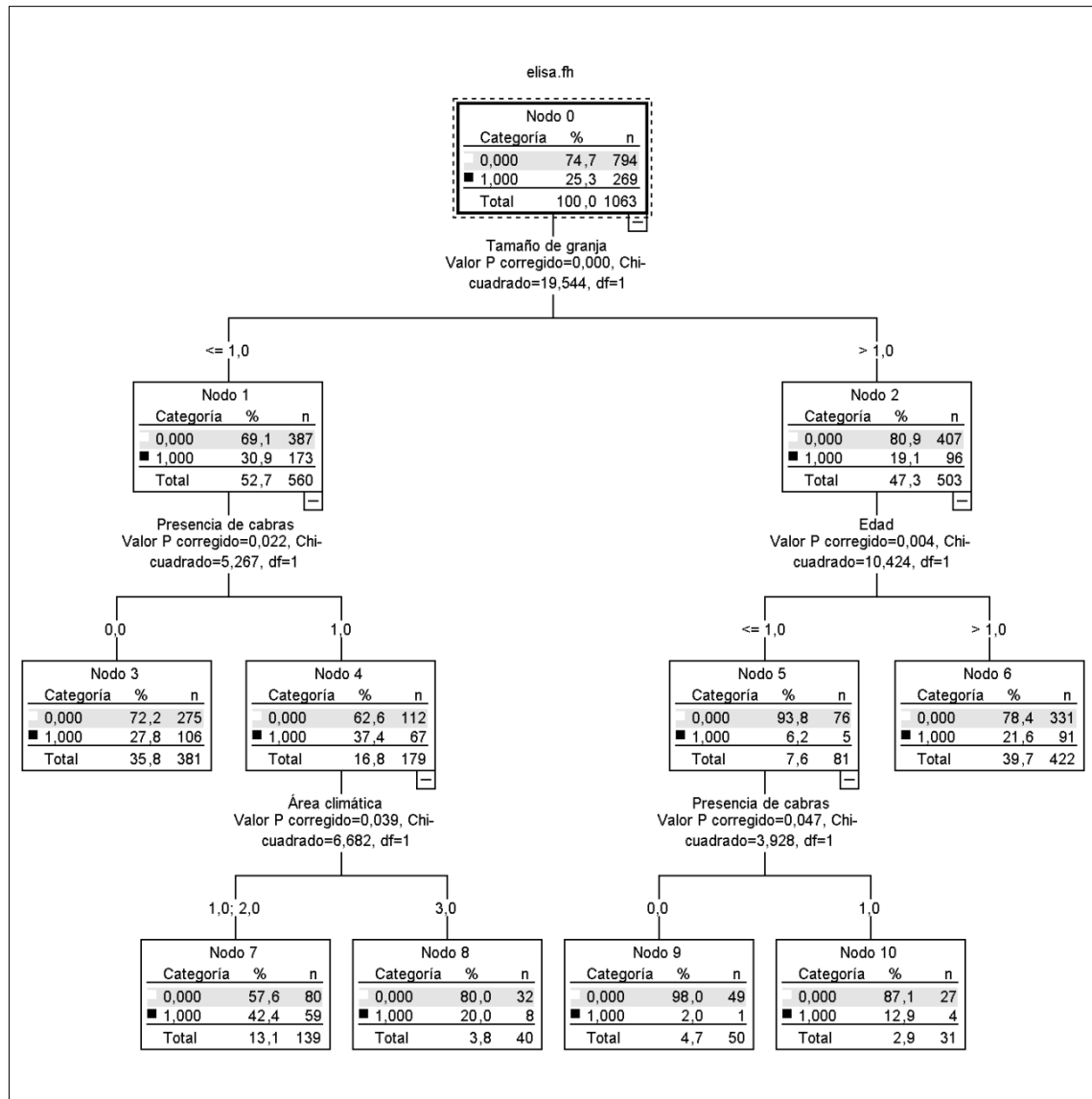


Figura 5.12. Árbol de clasificación obtenido mediante CHAID exhaustivo que muestra los factores determinantes sobre la seroprevalencia de *F. hepatica*

El árbol de clasificación muestra que en el nodo de rebaños de menor tamaño (nodo 1), el segundo factor en importancia es la presencia de cabras en la explotación; así, los ovinos de aquellas granjas que poseen al menos una cabra presentan mayores porcentajes de

seroprevalencia. Además de que el ganado caprino constituye un importante riesgo para que las ovejas adquieran determinadas parasitosis, este incremento en la seroprevalencia podría deberse a que los rebaños mixtos son, por lo general, los menos tecnificados y en los que se realiza un control sanitario menos estricto.

Finalmente, en las granjas de tamaño pequeño y mediano en las que hay cabras (nodo 4), la seroprevalencia fue significativamente superior en los rebaños de la zona costa-centro (42,4%) que en los de la montaña (20,0%). Como se comentó anteriormente, las características edafoclimáticas de la zona costa-centro favorecen la supervivencia y desarrollo de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios del trematodo, lo que supone que haya mayor número de metacercarias en los pastos y por tanto un mayor riesgo de infección para los animales. Teniendo en cuenta la segmentación que muestra el árbol de clasificación, parece como si la presencia de cabras en los rebaños potenciara el efecto de la zona climática.

Por otro lado, en los rebaños más grandes (nodo 2), se observa que el segundo factor determinante sobre la seroprevalencia por *Fasciola* en el ganado ovino es la edad de los animales. Si bien, como se ha comprobado anteriormente, esta variable no parecía influir sobre la infección al considerarla de forma aislada, los ovinos mayores de 48 meses muestran una seroprevalencia significativamente superior (21,6%) que los más jóvenes (6,2%). En las granjas más pequeñas y tradicionales, no se detecta el efecto de este factor, probablemente debido a que el menor control sanitario de estas explotaciones implica que no se realicen desparasitaciones o estas no sean las correctas. Por el contrario, en las granjas grandes y profesionales, la instauración de medidas sanitarias y de manejo de pastos, así como la suplementación con alimentos libres de metacercarias (heno y ensilado de calidad), reducen en gran medida la ingestión de metacercarias, lo que se traduce en un incremento menos acusado del porcentaje de animales positivos. Además, otro factor que puede estar influyendo en este aspecto es que las explotaciones con un gran número de animales pueden verse obligadas, debido al medio agreste del clima montañoso, a la transformación de los pastos toscos y poco productivos en lugares más húmedos (mediante presas, sistemas de irrigación, etc.) para así poder mantener una buena alimentación del rebaño y favorecer al mismo tiempo, la expansión y la continuidad del ciclo de *F. hepatica* en los pastos (Rojo y Ferre, 1999).

El árbol de clasificación muestra que la presencia de cabras en las granjas grandes solo se hace patente en el grupo de animales jóvenes; sin embargo, est efecto se diluye en los ovinos de mayor edad.

Finalmente, y con objeto de determinar los factores que contribuyen en mayor medida sobre la seroprevalencia por *F. hepatica*, y para corregir el efecto de la segmentación del muestreo en rebaños, que puede generar una dependencia entre grupos de individuos, se realizó **un análisis multivariante mixto**. Este análisis estadístico considera la agregación de datos individuales (los animales están agrupados en rebaños) que pueden derivar en conclusiones erróneas en el análisis univariante. Por ello, para paliar el posible efecto que tuviera sobre los factores estudiados, se introdujo el rebaño como factor aleatorio. Al realizar el análisis, se eliminaron, uno a uno, cada uno de los factores con menor significación hasta obtener el mejor modelo. Así, los resultados de la regresión logística de efectos mixtos (Tabla 5.2) indicaron que la edad y el tamaño de la granja son los factores que influyen de forma más significativa sobre la seropositividad de los ovinos. Las diferencias observadas con los otros métodos estadísticos empleados posiblemente estén provocadas por el efecto de algunos rebaños en particular. Estos resultados también revelan que hay que interpretar con cautela los resultados de estudios que realicen un análisis de factores de riesgo empleando únicamente métodos estadísticos univariantes.

Tabla 5.2. Último paso de la regresión logística de efectos mixtos. Los factores se han eliminado paso a paso hasta la obtención del mejor modelo.

	Estimación	E. E.	p	OR	IC 95%	
					inferior	superior
Paso 4 Intercept	-1,472	0,427	<0,001	0,229	0,099	0,530
Edad < 13 m	-	-	-	-	-	-
Edad 13-48 m	0,737	0,294	0,012	2,090	1,174	3,720
Edad >48 m	0,804	0,286	0,005	2,235	1,276	3,918
Tamaño granja <96	-	-	-	-	-	-
Tamaño granja 96-194	-0,663	0,486	0,173	0,515	0,198	1,337
Tamaño granja >194	-0,971	0,476	0,041	0,378	0,149	0,962

E.E. - Error estándar

OR - Odds ratio calculado mediante el exponencial de B

IC 95% - Intervalo de confianza al 95% del OR

Los resultados del análisis multivariante confirman algunos de los datos obtenidos con Chi-cuadrado y con CHAID, al identificar el **tamaño de granja** como uno de los factores determinantes en la seropositividad a *F. hepatica* en las ovejas.

La probabilidad de que los ovinos de las granjas pequeñas sean seropositivos (Tabla 5.2) es más de doble ($2,6 = 1/0,378$) que los de las grandes, es decir, como ya se comentó anteriormente, la instauración de medidas sanitarias y de manejo de pastos, así como la suplementación con alimentos libres de metacercarias (heno y ensilado) evita la infección de las ovejas con *F. hepatica*.

La regresión logística de efectos mixtos también identificó la **edad** como un factor significativo sobre los porcentajes de seroprevalencia frente a *F. hepatica*. Este resultado contrasta con la ausencia de significación mediante Chi-cuadrado, mientras que el CHAID solo lo identificaba como determinante en los rebaños de gran tamaño. Asimismo, en la Tabla 9 se puede apreciar que los animales de mayor edad tienen una probabilidad de ser seropositivos entre 2,1 y 2,2 veces superior a la de los animales menores de un año, pues al haber permanecido durante más tiempo en los pastos, han tenido más posibilidades de ingerir metacercarias.

5.2.2. En el ganado caprino

En el análisis de factores de riesgo en el ganado caprino, se emplearon las mismas variables utilizadas en el ganado ovino y, además, se añadió el factor raza, puesto que un número importante de cabras pertenecía a la raza “Cabra Galega”. Los porcentajes de seropositividad a *F. hepatica* considerando los diferentes factores y categorías, se muestran en la tabla 5.3. Los resultados obtenidos en el ganado caprino coincidieron, en general, con los obtenidos en ovino. Dentro de los factores intrínsecos, se observó que la seroprevalencia en las cabras se incrementó con la edad; los animales de Pura Raza Galega y las hembras presentaron los porcentajes más elevados. Al considerar los factores extrínsecos, se apreció una relación negativa entre los porcentajes de seropositividad y el tamaño de granja, mientras que la seroprevalencia fue superior en aquellos rebaños del área costa-centro, con manejo en extensivo, donde las cabras conviven con ovejas.

Tabla 5.3. Seropositividad a *F. hepatica* en cabras de Galicia. Resultados en las diferentes categorías de factores de riesgo

FACTOR DE RIESGO	CATEGORÍA	SEROPREVALENCIA
Edad	< 13 meses	7/64 (10,9%)
	13-48 meses	21/123 (17,1%)
	> 48 meses	109/425 (25,6%)
Sexo	Hembras	131/570 (23,0%)
	Machos	6/33 (18,2%)
Raza	Cruce	112/420 (26,7%)
	Cabra Galega	25/183 (13,7%)
Tamaño del rebaño	< 96	55/169 (32,5%)
	96-194	38/153 (24,8%)
	> 194	44/281 (15,7%)
Área climática	Centro-Costa	105/439 (23,9%)
	Montaña	32/164 (19,5%)
Sistema de manejo	Extensivo	16/63 (25,4%)
	Semiextensivo	121/540 (22,4%)
Presencia de ovejas	Al menos una oveja	118/482 (24,5%)
	Rebaño puro de cabras	19/121 (15,7%)
TOTAL		137/603 (22,7%)

Al considerar la **edad de los animales**, se constató que la seroprevalencia se incrementaba significativamente ($\chi^2 = 8,126$; $p = 0,017$) con la edad, oscilando entre el 10,9% en los más jóvenes y el 25,6% en los de mayor edad (Tabla 5.3); los resultados de *odds ratio* mostraron que los animales de entre 13 y 48 meses y los mayores de 48 meses presentan una probabilidad 1,85 y 2,6 veces superior, respectivamente, de ser seropositivos a *F. hepatica* que los menores de un año (Figura 5.13).

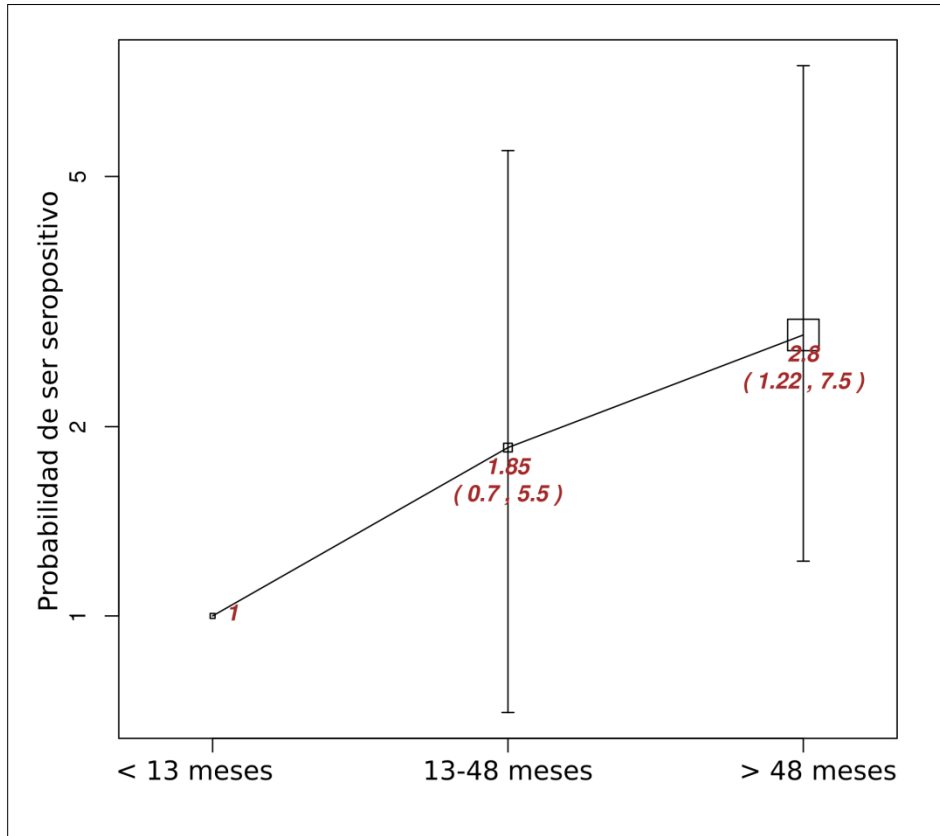


Figura 5.13. Odds ratio de los animales de más de 13 meses en comparación con el de las cabras de menor edad

Aunque Khan *et al.* (2010) no observaron diferencias estadísticas entre los animales menores de 6 meses y aquellos de mayor edad, los resultados de la mayoría de los estudios realizados en cabras concuerdan con los hallados en este trabajo, como por ejemplo las investigaciones llevadas a cabo en México y Corea del Sur por Munguía *et al.* (2007) y Gebeyehu *et al.* (2013). Al igual que en ovino, estos resultados podrían deberse a que la posibilidad de ingerir metacercarias del trematodo se incrementa con la edad (González-Lanza *et al.*, 1989; Scala *et al.*, 1997, 2001; Waruiru *et al.*, 2000; Cringoli *et al.*, 2002; Otranto y Traversa, 2003). Además, Asfhan *et al.* (2013) señalan que este incremento en la prevalencia de infección por *F. hepatica* podría estar relacionado con una menor eficiencia del sistema inmunitario de los animales a medida que aumenta la edad. Martínez-Moreno (1997) y Zafra *et al.* (2013) observaron una escasa reacción de las cabras frente a *F. hepatica*, comprobando que los títulos de IgG y de linfocitos eran similares en las primoinfecciones que en las reinfecciones.

En relación al **sexo** de los animales, y de modo similar a lo observado en las ovejas, la seroprevalencia fue similar en los machos y en las hembras, aunque fue ligeramente superior en estas últimas (Tabla 5.3); no obstante, con Chi-cuadrado se constató que estas diferencias no eran estadísticamente significativas ($\chi^2 = 0,182$; $p = 0,670$). Los valores de *odds ratio* (Figura 5.14) muestran que la probabilidad de ser seropositivo es 1,34 veces superior en las hembras, valor que no es significativo (IC 95% = 0,53-4,08). Este hecho se debe a que, en Galicia, al igual a lo observado en las ovejas, los machos se manejan de manera similar a las hembras y por lo tanto presentan el mismo riesgo de infección por *F. hepatica*.

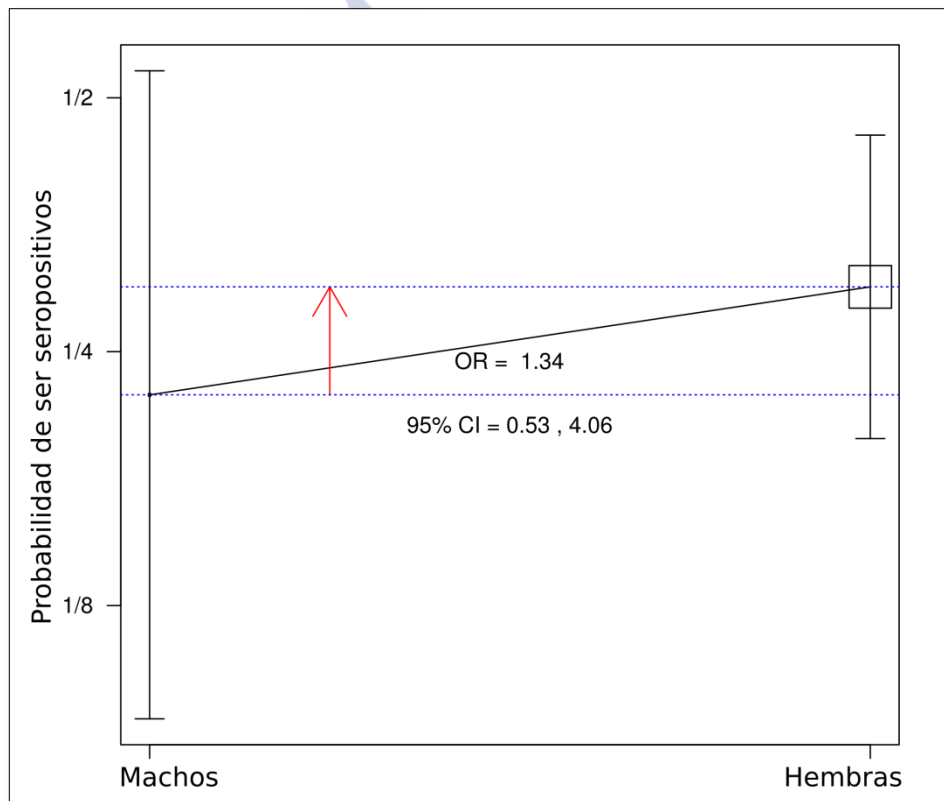


Figura 5.14. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar el sexo de las cabras

Esta ausencia de diferencias respecto al sexo de las cabras también ha sido observada por Raza *et al.* (2007) y Afshan *et al.* (2013). Por el contrario, en cabras de Pakistán, Khan *et al.* (2010) apreciaron tasas de infección significativamente superiores en las hembras.

Respecto a la **raza**, se apreció que la seroprevalencia hallada en las cabras procedentes de cruces era superior a la obtenida en los animales de la raza autóctona “Cabra Gallega”, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 12,279$; $p < 0,001$). Los valores de *odds ratio* nos indican que los cruces presentan una probabilidad de ser seropositivo 2,3 veces superior que las de raza “Cabra Gallega” (Figura 5.15).

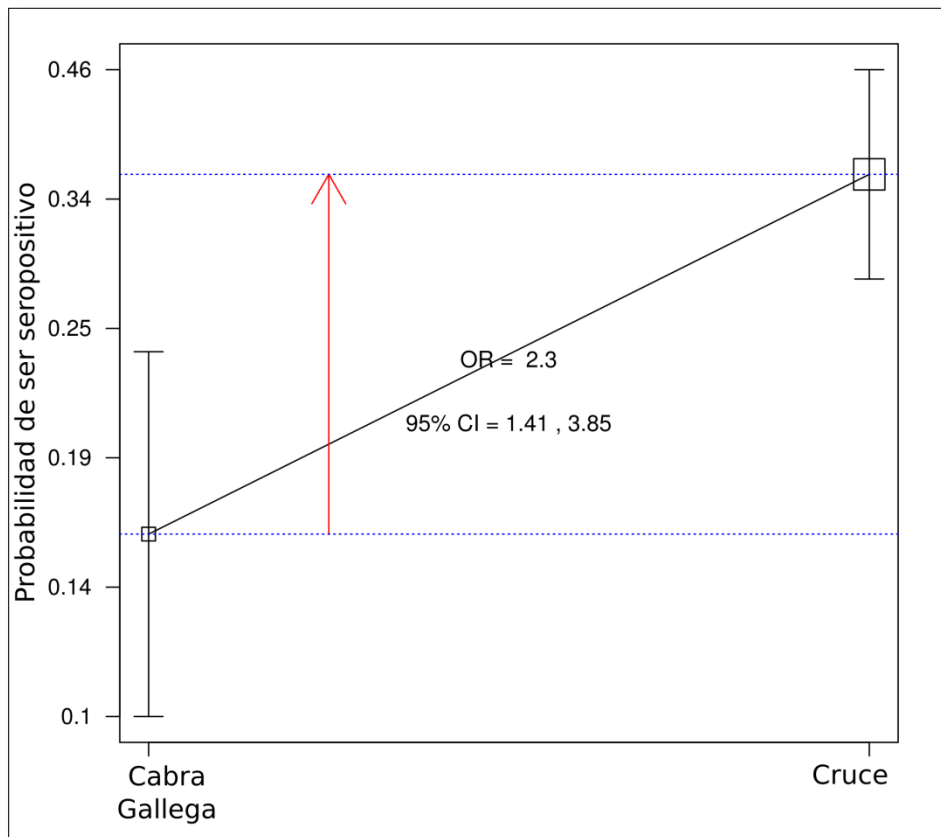


Figura 5.15. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar la raza de cabra

La menor seroprevalencia hallada en las Cabras Gallegas, raza caracterizada por su rusticidad y adaptación al medio en el que viven, concuerdan con los obtenidos por Afshan *et al.* (2013) quienes, empleando técnicas coprológicas y serológicas, hallaron prevalencias de *F. hepatica* más reducidas en cabras de razas autóctonas (3,12% en Beetal y 3,57% en Local Hairy) que en los cruces (10%). Asimismo, Roberts *et al.* (1997a) observaron que ciertas

razas autóctonas de ganado caprino muestran un cierto nivel de resistencia frente a *Fasciola gigantica*, que se traduce en menores cargas parasitarias. Este hecho podría tener una base genética, relacionada con la expresión de genes de dominancia incompleta (Roberts *et al.*, 1997b). No obstante, estas observaciones todavía no se han demostrado en las infecciones por *F. hepatica*, por lo que es necesario realizar estudios más específicos para determinar la razón fisiológica que explique la posible resistencia de la raza Cabra Gallega frente a *F. hepatica*.

Otra posible explicación podría ser la forma de alimentarse que tienen las diversas razas; así, Hoste *et al.* (2001) observaron diferencias en la forma de obtener el alimento entre la raza Angora, que pastorea, y la Saanen, que ramonea, comprobando que estas últimas se encontraban menos parasitadas por nematodos gastrointestinales.

La menor seroprevalencia hallada en la raza autóctona “Cabra Gallega” coincide con los resultados obtenidos mediante ELISA directo por Sánchez-Andrade *et al.* (2002), quienes también hallaron menores porcentajes de seroprevalencia de *F. hepatica* en el ganado vacuno de la raza autóctona Rubia Gallega, de gran rusticidad y bien adaptada al medio, que en otras razas más seleccionadas, como la Frisona y la Parda Alpina.

Cuando se analizó la posible influencia del **tamaño de las granjas** sobre la seroprevalencia por *F. hepatica*, se observó la misma tendencia que en ganado ovino: los porcentajes de seropositividad se redujeron a medida que se incrementaba el número de cabezas del rebaño, siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 15,477$; $p < 0,001$). En la Figura 5.16 se representan los valores de *odds ratio*, que muestran que las cabras de las granjas pequeñas (<96 animales) y medianas (96-194 cabezas) tienen una probabilidad 2,4 y 1,4 veces más elevada de ser seropositivos, respectivamente, que las de las granjas de mayor tamaño (> 194 cabezas).

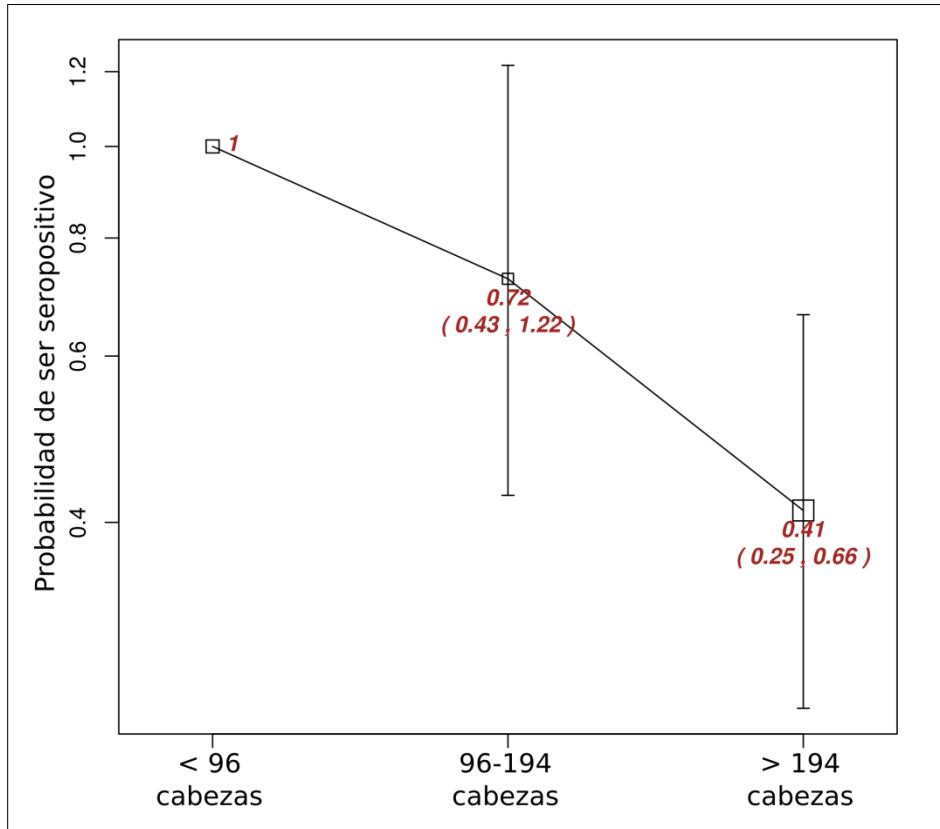


Figura 5.16. Odds ratio de las granjas de pequeño y mediano tamaño en comparación con las grandes explotaciones

Nuestros datos difieren de los hallados por Hassan *et al.* (2011), ya que detectaron mayores prevalencias por varios endo y ectoparásitos en los rebaños con un número más elevado de animales, atribuyéndolo al hacinamiento y peores condiciones higiénicas de estas granjas. Sin embargo, estas razones no son aplicables en una parasitosis de ciclo indirecto como la fasciolosis.

En Galicia, de forma similar a lo observado en ganado ovino, las granjas de caprino de mayor tamaño son más profesionales y presentan, generalmente, un manejo más adecuado. Además, los propietarios de los grandes rebaños suelen pertenecer a Asociaciones de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) en las que se llevan a cabo distintos programas de control de enfermedades, entre ellas las infecciones por endo y ectoparásitos. Por el contrario, un elevado porcentaje de las granjas pequeñas y medianas no presentan una orientación comercial; los animales se explotan siguiendo un sistema de manejo tradicional, donde es común la ausencia de medidas de control parasitario. Además, es común que estas granjas de

pequeño tamaño estén asociadas a la explotación de otros animales domésticos, como el ganado vacuno; en estos casos, el ganado caprino, junto con el ovino, suele utilizar instalaciones rústicas, aprovechando los peores pastos, entre los que se incluyen los más húmedos y sombríos, lo que favorece que los animales de estas explotaciones tengan una mayor probabilidad de ingerir metacercarias.

Al tener en cuenta el **sistema de manejo**, se hallaron porcentajes de seropositividad similares en los animales explotados en extensivo y en semiextensivo (Tabla 5.3), constatándose que estas diferencias no eran significativas ($\chi^2 = 0,142$; $p = 0,706$). Estos resultados se confirman en el análisis del *odds ratio* (Figura 5.17).

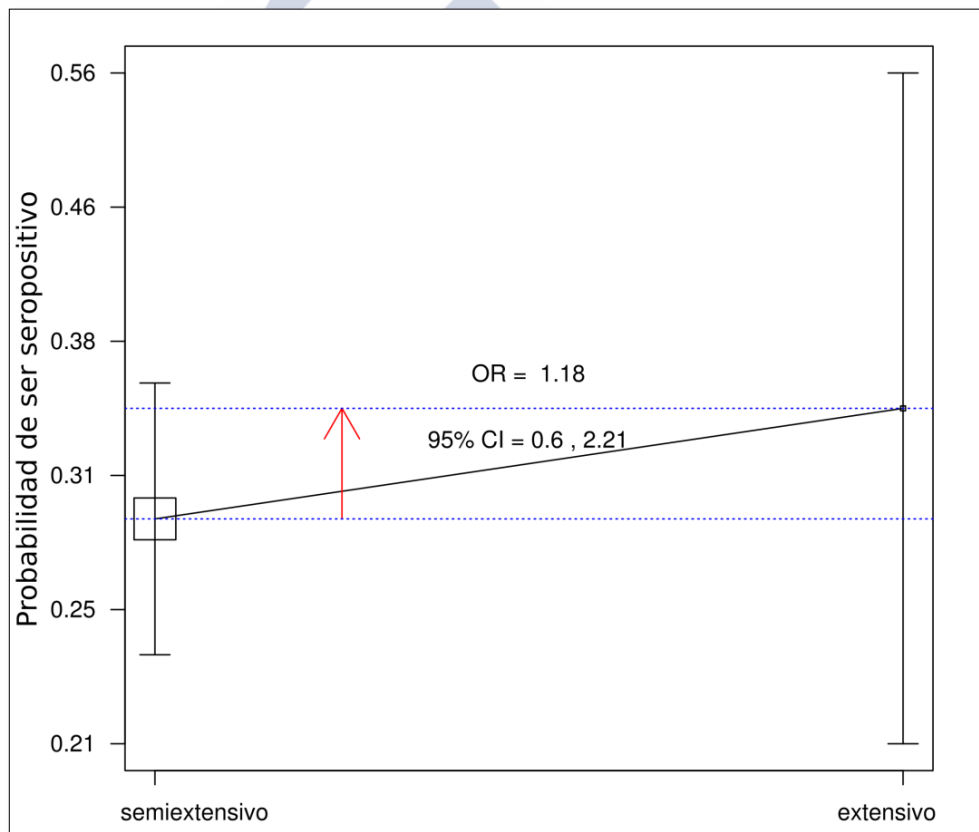


Figura 5.17. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar el sistema de manejo empleado en el ganado caprino.

Como se observa en la Figura 5.17, la probabilidad de ser seropositivo es 1,2 veces superior en los animales manejados en extensivo. La ausencia de diferencias significativas

puede deberse, al igual que lo observado en ovino, al tamaño de muestra, ya que únicamente se tomaron muestras de suero de 63 cabras en pastoreo extensivo; de todos modos, es necesario señalar que el tamaño de muestra de animales de rebaños explotados en extensivo es representativo, pues en Galicia la gran mayoría de los pequeños rumiantes se explota en régimen semiextensivo.

Al considerar el **área edafoclimática** donde se encontraban los rebaños, los porcentajes más elevados se observaron en los animales de la zona Costa-Centro, al igual que en ovino; con Chi-cuadrado se comprobó que estas diferencias no eran significativas ($\chi^2=1,081$; $p=0,299$). El análisis de los *odds ratio* mostró que las cabras de la zona Costa-Centro presentaban una probabilidad 1,3 veces superior de ser seropositivas que los de la zona de la Montaña (Figura 5.18).

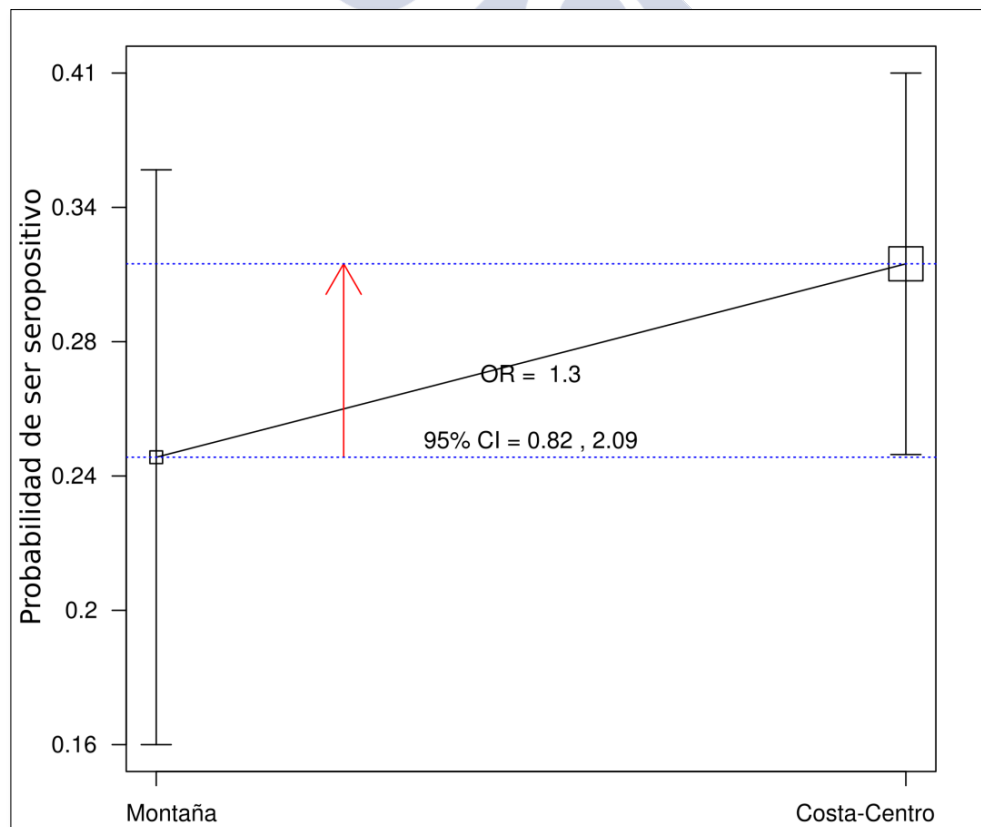


Figura 5.18. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar la zona climática donde se encontraban los rebaños de cabras

No obstante, la mayor seroprevalencia observada en las cabras de la zona Costa-Centro pueden deberse a que en esta área las condiciones edafoclimáticas son más adecuadas para la supervivencia y desarrollo de *G. truncatula*; debido a que los pastos que se encharcan con más facilidad son los que abundan en esta zona (Díaz, 2006; Díaz *et al.*, 2007). Estos datos difieren de los observados, en Andalucía, por Martínez-Cruz *et al.* (1995), ya que obtuvieron seroprevalencias de infección superiores en cabras procedentes de zonas de montaña; no obstante las condiciones edafoclimáticas de las montañas gallegas son diferentes de las de Sierra Morena.

Como habíamos comprobado en el ganado ovino, cuando en las explotaciones hay al menos una cabra, la presencia conjunta de ambas especies de pequeños rumiantes, incrementa la seroprevalencia de *F. hepatica*, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=3,84$; $p=0,05$). Estas notables diferencias pueden apreciarse en la Figura 5.19; los valores de *odds ratio* muestran que las cabras de las granjas que tienen al menos una oveja tienen una probabilidad de ser seropositivos 1,7 veces superior que aquellas granjas que están integradas solo por cabras.

Estas diferencias se podrían deber a que, como se comentó anteriormente, las ovejas presentan, por lo general, mayores prevalencias de infección por *F. hepatica* que las cabras, contribuyendo en mayor medida a la contaminación de los pastos y, por lo tanto, las cabras tienen mayor posibilidad de infectarse cuando comparten pastos con las ovejas que cuando pastan ellas solas. Aunque las repercusiones de la cría mixta de ovejas y cabras sobre el estado sanitario del rebaño todavía no se han estudiado en profundidad, en un estudio reciente sobre la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cabras de Galicia, Cabanelas *et al.* (2014) comprobaron que la presencia de ovejas constituye un factor de riesgo para las cabras (51,6% vs 26,1%).

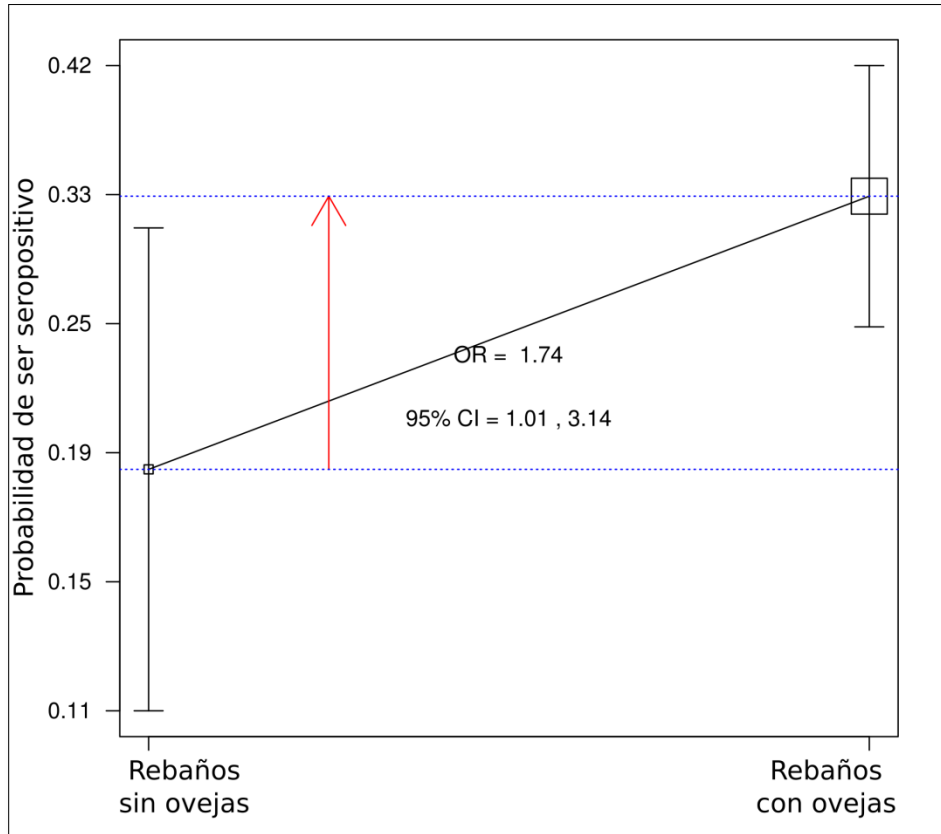


Figura 5.19. Diferencia entre la probabilidad de ser seropositivo a *F. hepatica* al considerar la presencia de ovejas en los rebaños de ganado caprino

El **resultado del algoritmo CHAID** (Figura 5.20) reflejó que únicamente **la raza y el tamaño de rebaño** se consideran factores que influyen sobre el porcentaje de seropositividad a *F. hepatica*. El efecto del resto de factores, algunos de ellos identificados como significativos mediante Chi-cuadrado, se diluyó al clasificar las variables por su orden de significación. Así, la variable determinante fue la raza de cabra, observándose una seroprevalencia más elevada en los cruces (22,4%) que en las de raza gallega (7,7%). El árbol de clasificación muestra que en las cabras procedentes de cruces el tamaño de granja es un factor determinante en la seropositividad por el trematodo; así, la seroprevalencia más elevada se halló en las cabras pertenecientes a explotaciones pequeñas y medianas, debido principalmente a su menor profesionalidad y manejo tradicional.

Por el contrario, el nodo constituido por los animales de raza “Cabra Galega” (nodo 1) no se dividió en más subgrupos, es decir, ninguno de los factores estudiados influyó de manera determinante sobre la seroprevalencia por *F. hepatica* en estos animales.

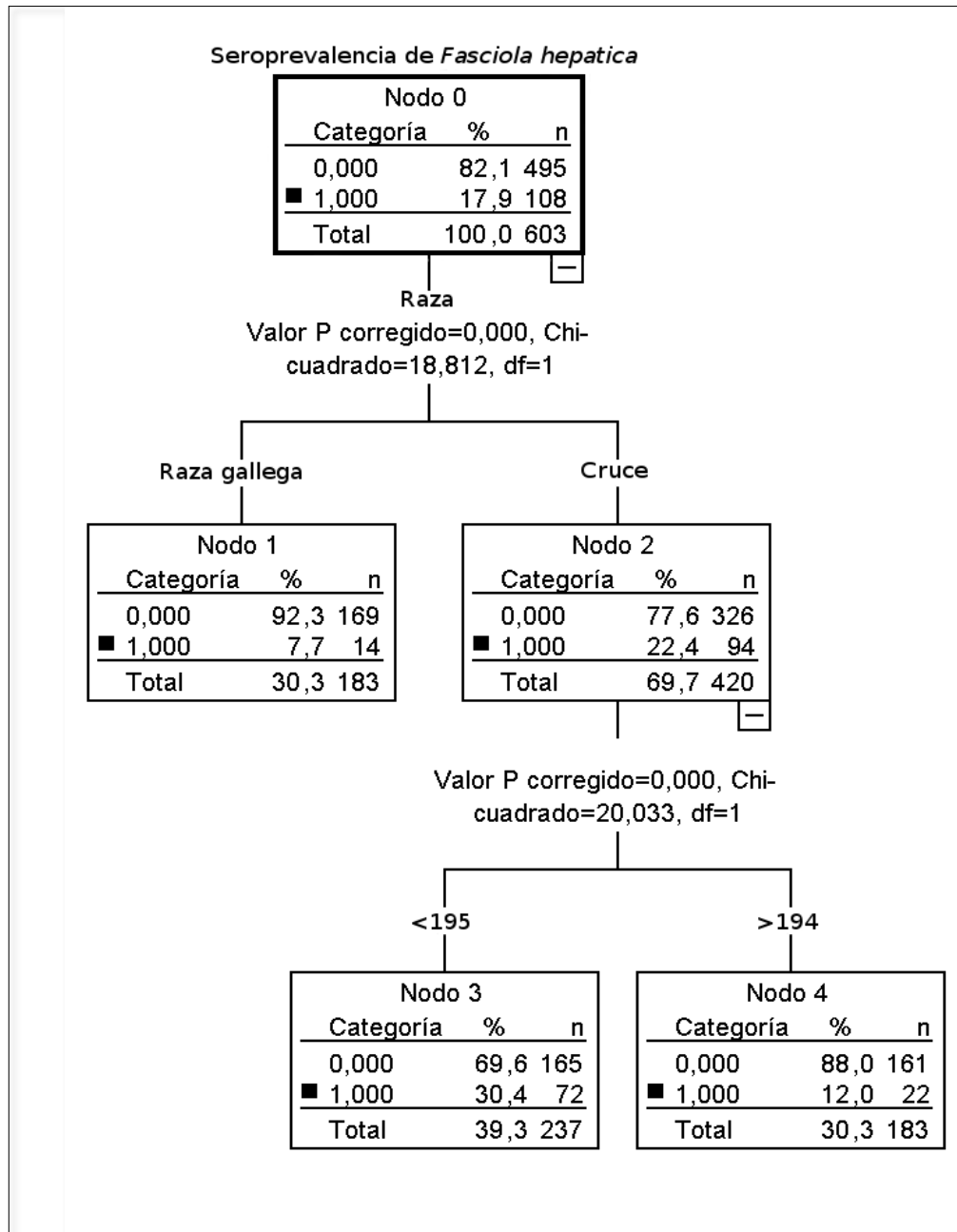


Figura 5.20. Árbol de clasificación obtenido mediante un análisis CHAID exhaustivo que muestra los factores determinantes sobre la seroprevalencia de *F. hepatica* en cabras.

Al igual que en el ganado ovino, en el análisis de los resultados obtenidos en el ganado caprino se empleó una **regresión logística de efectos mixtos**, introduciendo el rebaño como factor aleatorio para evitar el efecto de agregación. Se fueron excluyendo del análisis uno a uno los factores hasta hallar el mejor modelo posible. Los resultados de este análisis

permitieron determinar que en las cabras de Galicia los principales factores que influyen sobre el porcentaje de seropositividad a *F. hepatica* eran la edad y la raza (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Último paso de la regresión logística de efectos mixtos. Los factores se han eliminado uno a uno hasta alcanzar el mejor modelo

	IC 95%					
	Estimación	E. E.	p	OR	Lim. inf	Lim. sup
Paso 6 Intercept	-2,453	0,572	0,000			
Edad < 13 meses	-	-	-	-	-	-
Edad 13-48 meses	0,942	0,573	0,100	2,566	0,833	7,899
Edad >48 meses	1,461	0,503	0,003	4,312	1,609	11,552
Cabra Gallega	-1,129	0,508	0,026	0,323	0,119	0,875

E.E. - Error estándar OR - Odds ratio calculado mediante el exponencial de B
 IC 95% - Intervalo de confianza al 95% del OR

Como se observa en la Tabla 5.4, los datos del análisis multivariante confirman los resultados del Chi-cuadrado y del CHAID, pues identifica la raza como uno de los factores determinantes en la seropositividad a *F. hepatica* en las cabras. Así, los cruces tienen una probabilidad 3 veces superior ($1/0,323= 3,09$) de ser seropositivos que los de la raza autóctona “Cabra Galega”. Aunque se necesitan nuevos estudios para determinar las razones de esta menor seroprevalencia, esta característica puede ser de gran interés en la aplicación de planes de control del trematodo.

La regresión logística de efectos mixtos también identificó la **edad** como un factor que influye significativamente sobre los porcentajes de seroprevalencia frente a *F. hepatica*. Este resultado contrasta con la ausencia de significación mediante CHAID. En la Tabla 5.4 se puede apreciar que los animales de mayor edad tienen una probabilidad de ser seropositivos entre 2,5 y 4,3 veces superior a la de los animales menores de un año, pues al haber permanecido durante más tiempo en los pastos, han tenido más posibilidades de ingerir metacercarias.

5.3. MEDIDAS A ADOPTAR PARA REDUCIR LAS INFECCIONES POR *F. hepatica* EN GANADO OVINO Y CAPRINO DE GALICIA.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que *F. hepatica* es un parásito muy común y ampliamente distribuido en las granjas de pequeños rumiantes de Galicia. Los elevados porcentajes de seroprevalencia confirman que las medidas empleadas por los ganaderos frente al trematodo no son totalmente eficaces, por lo que es necesario revisar y mejorar los programas de control.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos han permitido identificar los principales factores de riesgo que influyen sobre la seroprevalencia de *F. hepatica* en ganado en ovino y caprino de Galicia, siendo estos el tamaño de las explotaciones, la edad de los animales y la presencia de cabras en las explotaciones ovinas. En consecuencia, y como se expondrá a continuación, en las explotaciones de ganado ovino y caprino en Galicia, para minimizar algunos factores de riesgo no se deben utilizar las mismas pautas de control recomendadas para otras especies animales como el ganado vacuno.

Los factores de riesgo identificados en este estudio, deberían tenerse en cuenta en el diseño de nuevos planes de control o cuando se adopten nuevas medidas en los ya existentes, por lo que se proponen las siguientes medidas:

1ª. Las explotaciones de ganado ovino y caprino, en general, y las de menor tamaño en particular, deben profesionalizarse y realizar un adecuado manejo de los pastos.

Los ganaderos deben conocer que, para el control de esta trematodosis y de las parasitosis en general, no es suficiente la aplicación de antihelmínticos, incluso cuando estos son los adecuados. En este sentido, Paz-Silva *et al.* (1999) comprobaron que no existían diferencias entre la prevalencia de infección por *F. hepatica* en ovejas tratadas con diferentes fasciolicidas y las no tratadas; de hecho, los animales desparasitados nunca alcanzaron valores de absorbancia considerados como negativos, y al cabo de unas semanas volvían a eliminar huevos de *F. hepatica*, lo que es lógico, si se tiene en cuenta que los animales continuaban pastando en pastos contaminados con metacercarias de *F. hepatica* y, por lo tanto, se reinfectaban. Por ello, es imprescindible evitar el pastoreo en los pastos que se encharcan con

facilidad o cercar las zonas más húmedas, en las que habrá mayor número de metacercarias viables.

Cuando sea necesario complementar la alimentación de los animales con heno o ensilado, este se ha de elaborar de forma que se garantice que está libre de metacercarias; también es aconsejable añadir algún conservante a los forrajes que reduzca la viabilidad de las metacercarias (Andrews, 1999).

2ª. Para reducir la prevalencia de infección en los animales de mayor edad, estos deben pastar en las praderas menos contaminadas.

Nuestros resultados demuestran que los animales de mayor edad presentan seroprevalencias significativamente más elevadas que los más jóvenes. Además, el ganado ovino y caprino no desarrolla una respuesta inmunitaria protectora frente a *F. hepatica*, y las reinfecciones repetitivas, aunque sean con un número reducido de metacercarias, producen un aumento de la intensidad de las lesiones, sobre todo en las cabras (Pérez *et al.*, 2002), comprobándose incluso que estas pueden ocasionar la muerte de los animales (Martínez-Moreno *et al.*, 2006). En consecuencia, se recomendaría que los animales de mayor edad utilicen las parcelas menos contaminadas con metacercarias de *F. hepatica*.

3ª. Se recomienda que no se exploten conjuntamente el ganado ovino y el caprino.

Aunque no se ha constatado que sea un factor de riesgo determinante del incremento de la prevalencia de infección por *F. hepatica*; sin embargo, se ha comprobado que en las granjas de mayor tamaño, la presencia de cabras incrementa la seroprevalencia de infección en los ovinos más jóvenes.

4ª. Incrementar el número de efectivos de la raza autóctona “Cabra Gallega”.

Esta raza, además de su rusticidad y adaptación al medio, se ha constatado que tiene un menor riesgo de infección por *F. hepatica* que las cabras procedentes de cruces. Asimismo, de esta forma se contribuiría al fomento y conservación de las razas autóctonas de nuestra Comunidad.

5ª. Realizar un correcto diagnóstico de esta y otras infecciones parasitarias antes de realizar los tratamientos antihelmínticos.

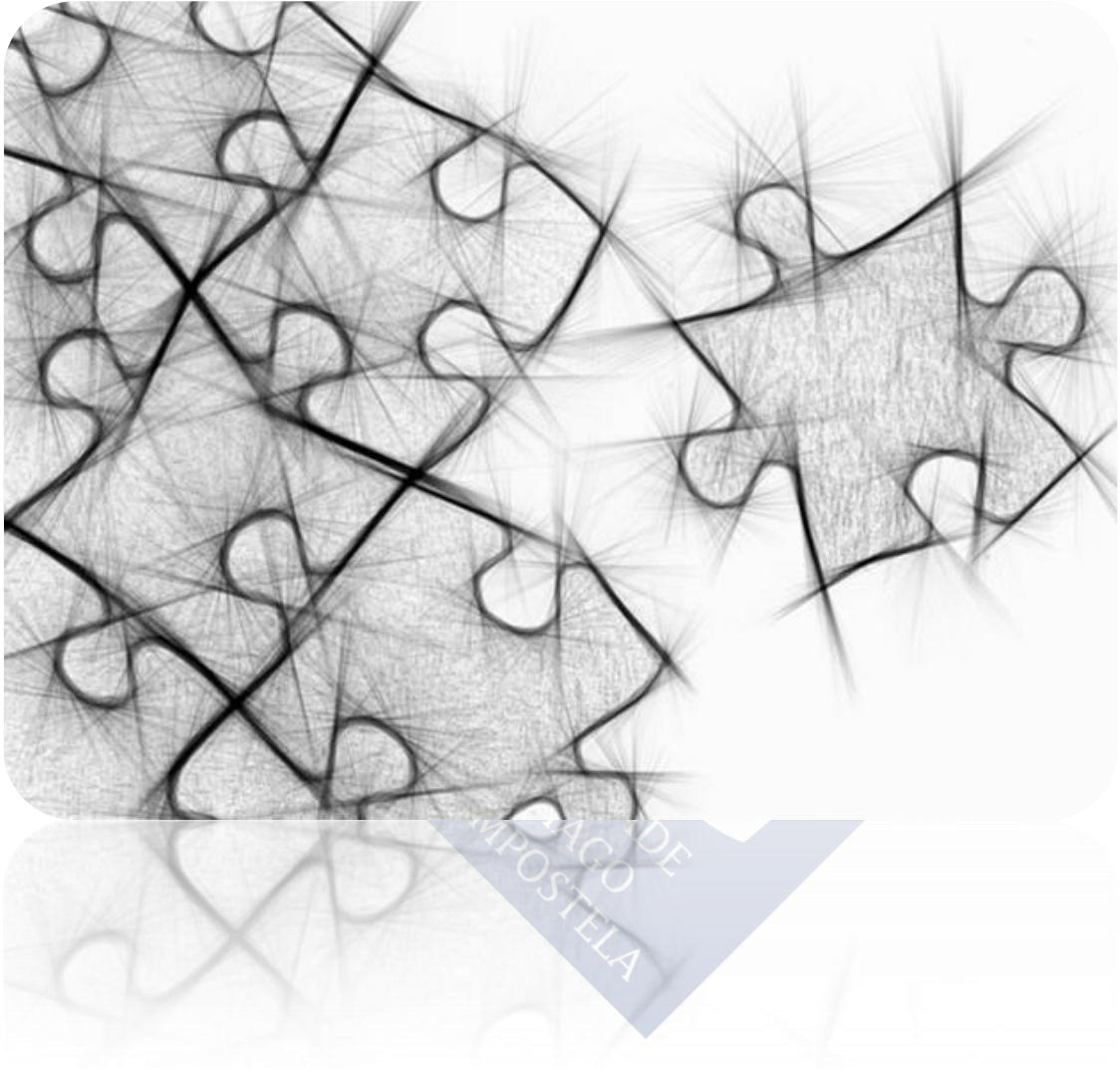
En la actualidad, el control de las infecciones por *F. hepatica* se basa, fundamentalmente, en el uso de antihelmínticos; sin embargo, en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Pedreira *et al.*, 2006) se comprobó que, en granjas de ganado ovino de Galicia, la elección del producto antihelmíntico se basaba, en la mayoría de los casos, en la experiencia personal del ganadero o en el consejo de la comercial farmacéutica y solo un pequeño porcentaje de ganaderos seguían el consejo del veterinario. Además, en la mayoría de los rebaños donde se administran tratamientos antihelmínticos, éstos se llevan a cabo sin conocer las infecciones parasitarias que afectan a los animales, debido a que no es frecuente la realización de análisis coprológicos previos o posteriores a su aplicación, por lo que en la mayoría de los casos no se emplean los fármacos adecuados. Asimismo, la inadecuada utilización de los antihelmínticos de mayor uso ha ocasionado la aparición de resistencias frente a este trematodo (Moll *et al.*, 2000; Alvarez-Sánchez *et al.*, 2006; Vara del Río, 2007) y otros helmintos (Coles *et al.*, 2005; Díez Baños *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*, 2012; Torres-Acosta *et al.*, 2012; Geurden *et al.*, 2014; Martínez-Valladares *et al.*, 2015).

6ª. Incrementar la formación de los ganaderos y concienciarles de que es imprescindible el asesoramiento veterinario en las explotaciones de ganado ovino y caprino.

Se deben impartir charlas formativas sobre las principales infecciones parasitarias que afectan a estos pequeños rumiantes, entre las que se encuentra las infecciones por *F. hepatica*, puesto que en este estudio se ha comprobado que estos animales y, en especial los ovinos, son muy receptivos a este trematodo.

El profesional veterinario es el único que puede realizar el control de las infecciones que afectan a la cabaña ganadera y de esta forma garantizar que el estado sanitario de las explotaciones es el óptimo para que estas sean más rentables.





CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio se concluye:

1ª. La técnica de inmunodiagnóstico ELISA MM3-SERO, basada en el empleo del anticuerpo monoclonal MM3, nos ha permitido demostrar que *F. hepatica* es un parásito muy prevalente y ampliamente distribuido en los rebaños de ovino y caprino de Galicia.

2ª. La influencia de los diferentes factores de riesgo sobre la seroprevalencia se debe interpretar con cautela cuando se utilizan únicamente métodos estadísticos univariantes, siendo necesario complementar estos análisis con otros multivariantes, como el algoritmo CHAID y el análisis de regresión logística múltiple de efectos mixtos.

3ª. Uno de los factores de riesgo más importantes en las infecciones por *F. hepatica* en ganado ovino y caprino fue el tamaño del rebaño, siendo la seroprevalencia significativamente superior en las explotaciones pequeñas, debido a que se utilizan métodos de manejo tradicionales y no se aplican medidas adecuadas de control y prevención de las enfermedades infecciosas y parasitarias.

4ª. La edad de los animales fue también un factor determinante en ambas especies, constatándose que la seroprevalencia se incrementaba en los animales de mayor edad, lo que manifiesta el contacto continuo que los pequeños rumiantes tienen con el parásito en esta región.

5ª. Se constató que la presencia de cabras en los rebaños de ovejas incrementaba significativamente la seroprevalencia de infección por este trematodo, probablemente debido a que en los rebaños mixtos se realiza un control sanitario menos estricto.

6ª. La raza autóctona “Cabra Galega” es menos sensible a las infecciones por *F. hepatica* que las cabras procedentes de cruces, probablemente debido a su mayor rusticidad y adaptación al medio.

7ª. El sexo y la zona edafoclimática en la que pasta el ganado ovino y caprino en Galicia no influyen sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*.

8ª. La alta seroprevalencia de *F. hepatica* hallada en los pequeños rumiantes de Galicia demuestra que no se adoptan las medidas necesarias para controlar esta infección. Los nuevos planes de control frente a este trematodo deberían tener en cuenta los factores de riesgo hallados en el presente estudio.





RESUMEN



7. RESUMEN

En 98 granjas de ganado ovino y caprino se recogieron 1.666 muestras de sangre de animales explotados en régimen extensivo o semi-extensivo en Galicia. El muestreo se realizó de forma que los rebaños incluidos en el estudio representaran a todas las zonas agroganaderas de esta Comunidad Autónoma. Las explotaciones muestreadas pertenecían a la Asociación de Defensa Sanitaria de Ovino y Caprino de Galicia "ACIVO", que engloba rebaños tanto semiprofesionales como profesionales que presentan, por lo general, más de 100 cabezas. Además, todas las explotaciones de ganado caprino de raza "Cabra Galega" estaban inscritas en el libro genealógico gestionado por la Asociación de Gandeiros da Raza Cabra Galega "CAPRIGA".

Debido a que en Galicia, un importante porcentaje de explotaciones están integradas por ganado ovino y caprino, se muestrearon 51 rebaños donde solo había ovejas, 13 rebaños compuestos únicamente por cabras y 34 rebaños donde convivían ambas especies de pequeños rumiantes. En cada rebaño se recogieron muestras de sangre de un porcentaje representativo de la población con objeto de analizar la presencia de animales seropositivos a *F. hepatica*. Para evitar posibles interferencias con anticuerpos colostrales, todos los animales muestreados eran mayores de seis meses. Tras la realización de los correspondientes cálculos, se recogieron 1.063 muestras de ovejas y 603 de cabras. El número medio de ovejas y de cabras muestreadas por granja fue de $14,4 \pm 7,6$ y de $12,8 \pm 17,4$, respectivamente.

La sangre se extrajo mediante punción en la vena yugular empleando tubos estériles al vacío sin anticoagulante. Las muestras se anotaron de forma consecutiva y siempre constaba el número de referencia de la explotación de origen. Simultáneamente, se realizó una encuesta epidemiológica con objeto de conocer el tipo de manejo y orientación productiva, censo de animales, proximidad a otras explotaciones y presencia o ausencia de otras especies de rumiantes. También se tomaron datos relativos a la realización de desparasitaciones y, en su

caso, de los productos empleados; también se anotó si se había detectado algún problema de etiología infecciosa o parasitaria en los últimos años. En todas las explotaciones se administraban tratamientos antihelmínticos, dirigidos fundamentalmente hacia el control de las infecciones por nematodos gastrointestinales y los ganaderos no habían realizado ninguna medida manejo de los pastos o de los animales orientados hacia la prevención y/o control de las infecciones por este trematodo.

La mayoría de las granjas (86,7%) se explotaban en régimen semiextensivo y en menor proporción en extensivo. El manejo de la cría del ovino y del caprino, cuando se estaban en la misma explotación, era el típico de los rebaños semiextensivos de carne. Los corderos/cabritos permanecían estabulados con sus madres en grupos de 5-10 animales durante 3-7 días tras el parto. Posteriormente, se integraban dentro del rebaño con los adultos o se mantenían separados hasta que eran destetados a los 2-3 meses de edad. Asimismo, se consideraron las características edafoclimáticas de las zonas de procedencia de los animales (Costa-Centro y Montaña). La zona climática Costa-Centro se caracteriza por tener un clima marítimo-templado y pendientes moderadas que facilitan el encharcamiento de los prados, mientras que en la Montaña la pendiente es muy acusada y su clima es pirenaico. Además, el manejo es diferente en ambas zonas; en la Costa-Centro, los animales pastan en pequeños prados cerca del establo y se estabulan al anochecer; mientras que, en la montaña, lo hacen en prados de gran tamaño y durante el invierno permanecen estabulados para protegerles de las condiciones adversas.

Para determinar la presencia de anticuerpos frente a *F. hepatica*, las muestras de suero se analizaron mediante ELISA MM3-SERO, basado en el empleo del anticuerpo monoclonal MM3. Este test emplea antígenos de excreción-secreción de *F. hepatica*, presentes en un solo epítipo conformacional del pico IV; identificadas como catepsinas L1 y L2, que tienen un 100% de especificidad y una sensibilidad elevada. Además, el MM3-SERO ELISA detecta como positivas muestras de suero en animales infectados con una dosis baja, incluso en diluciones de 1:12.500. Como testigo positivo se utilizó un suero de un animal que, previamente, se había identificado como positivo mediante coprología y ELISA MM3. El suero testigo y los sueros a estudiar se diluyeron en una proporción 1/100 en de PTL 0,2%. Se añadieron 100 µl de los sueros diluidos a la placa por duplicado. Se incubaron en cámara

húmeda a 37°C durante 2 horas. Se vació el contenido de las placas, se lavaron los pocillos con 200 µl de PBS-T y se repitió este procedimiento cinco veces más. Posteriormente, se dispensaron 100 µl por pocillo de la solución de peroxidasa-conjugado diluido 1:30000 en PTL. Se realizó una segunda incubación en cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C. Se vació de nuevo el contenido de las placas y se lavaron con PBS-T repitiendo el proceso cinco veces. Se añadió 200 µl de solución de revelado por pocillo. En oscuridad se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para detener la reacción, se dispensaron 25 µl de H₂SO₄ 3N por pocillo. La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

Los sueros tanto de ovino como de caprino se clasificaron como positivos o negativos según el valor de densidad óptica (DO) obtenido tras restar la DO del pocillo sin antígenar a la DO del pocillo antigenado. En ganado ovino, se empleó el punto de corte obtenido por Mezo *et al.* (2007), siendo esta cifra de 0,074. El punto de corte utilizado para los sueros de caprino fue el mismo que en el ovino (0,074), aunque en este caso se calculó en base a los valores de DO obtenidos de los sueros de 47 cabras de un año de edad que nunca habían tenido contacto con *F. hepatica*.

El estudio de la asociación entre los factores de riesgo (edad, sexo y zona climática de procedencia de los animales, tamaño del rebaño, tipo de manejo, presencia/ausencia de cabras) y la seroprevalencia por *F. hepatica* se realizó mediante 3 tipos de pruebas estadísticas. Un análisis univariante, utilizando el test de Chi-cuadrado, que identifica las variables de exposición significativamente relacionadas con la seropositividad individual; además, se calcularon los *odds ratio*, con intervalos de confianza del 95%, para determinar el nivel de la asociación. De modo complementario, se analizó la influencia de las variables mediante un CHAID exhaustivo de minería de datos. Finalmente, se realizó un análisis multivariante empleando una regresión logística de efectos mixtos con objeto de determinar los factores que contribuyen en mayor medida sobre la seroprevalencia por *F. hepatica* y corregir el efecto de la segmentación del muestreo en rebaños, que puede generar una dependencia entre grupos de individuos y derivar en conclusiones erróneas en el análisis univariante. Las variables se eliminaron del modelo una por una según los valores obtenidos

de p , ajustándose hasta que todas las variables presentaban un valor de p significativo ($p < 0,05$).

Al considerar el total de los animales analizados, el porcentaje individual de seropositivos fue del 24,3%, mientras que el porcentaje de granjas que tenían al menos un animal positivo fue del 67,7%. La seroprevalencia fue ligeramente superior en los rebaños de ovejas (25,3%) que en los de cabras (22,7%), aunque estas diferencias no fueron significativas. El porcentaje de rebaños que presentaban al menos un animal seropositivo fue superior en las explotaciones de ovino que en las de caprino, siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 4,598$; $p = 0,032$). Además, los valores de *odds ratio* indican que las granjas de ovino muestran una mayor probabilidad de tener animales seropositivos (OR= 2,64; 1,07-6,63) que las de caprino.

En el **ganado ovino**, mediante **análisis univariante**, se constató que la seroprevalencia era inferior en los animales menores de un año, pero que esta se mantenía estable a partir de esta edad. No se hallaron diferencias en la seroprevalencia al considerar el sexo. Por el contrario, se comprobó que el porcentaje de animales seropositivos disminuía a medida que se incrementaba el tamaño del rebaño. La seroprevalencia fue más elevada en los rebaños en los que había por lo menos una cabra entre sus efectivos; por el contrario, el porcentaje de animales seropositivos no varió con el sistema de manejo empleado para su cría (semiextensivo o extensivo) ni con la zona climática.

Cuando se utilizó un **CHAID exhaustivo** para clasificar la influencia de los diferentes factores estudiados sobre la seroprevalencia, se constató que el factor de riesgo que más influía era el tamaño del rebaño, siendo significativamente superior en las explotaciones pequeñas (30,9%) que en las grandes (19,1%). Además, el árbol de clasificación muestra que en los rebaños de menor tamaño el segundo factor en importancia era la presencia de cabras en la explotación; este incremento en la seroprevalencia podría deberse a que los rebaños mixtos son, en general, los menos tecnificados y en los que se realiza un control menos estricto. Asimismo, se constató que en las granjas de tamaño pequeño y mediano en las que había cabras, la seroprevalencia era significativamente superior en los rebaños de la zona costa-centro (42,4%) que en los de la montaña (20,0%). En las explotaciones de mayor

tamaño, se observó que el segundo factor determinante sobre la seroprevalencia por *Fasciola* era la edad de los animales, observándose que esta era significativamente superior en los mayores de 48 meses (21,6%) que en los de menor edad (6,2%). Por el contrario, el efecto de este factor no se observó en las granjas más pequeñas.

Al aplicar el **análisis multivariante de regresión logística**, se comprobó que la edad y el tamaño de la granja eran los factores que influían de forma más significativa sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*. Estos resultados confirman los datos obtenidos con el CHAID y ponen en evidencia que hay que interpretar con cautela la valoración de los factores de riesgo empleando únicamente métodos estadísticos univariantes.

En el **ganado caprino** se obtuvieron resultados similares a los hallados en el ovino. Mediante **análisis univariante** se observó que la seroprevalencia se incrementaba con la edad y en los rebaños del área costa-centro, en los que se realizaba un manejo en extensivo, así como en las explotaciones en las que las cabras convivían con las ovejas. Por el contrario, se apreció una relación inversa entre los porcentajes de seropositividad y el tamaño de granja. Además, en el ganado caprino, se observó la influencia de la raza como factor determinante, constatándose que los animales pertenecientes a la raza autóctona “Cabra Galega” presentaban seroprevalencias inferiores a las halladas en los cruces.

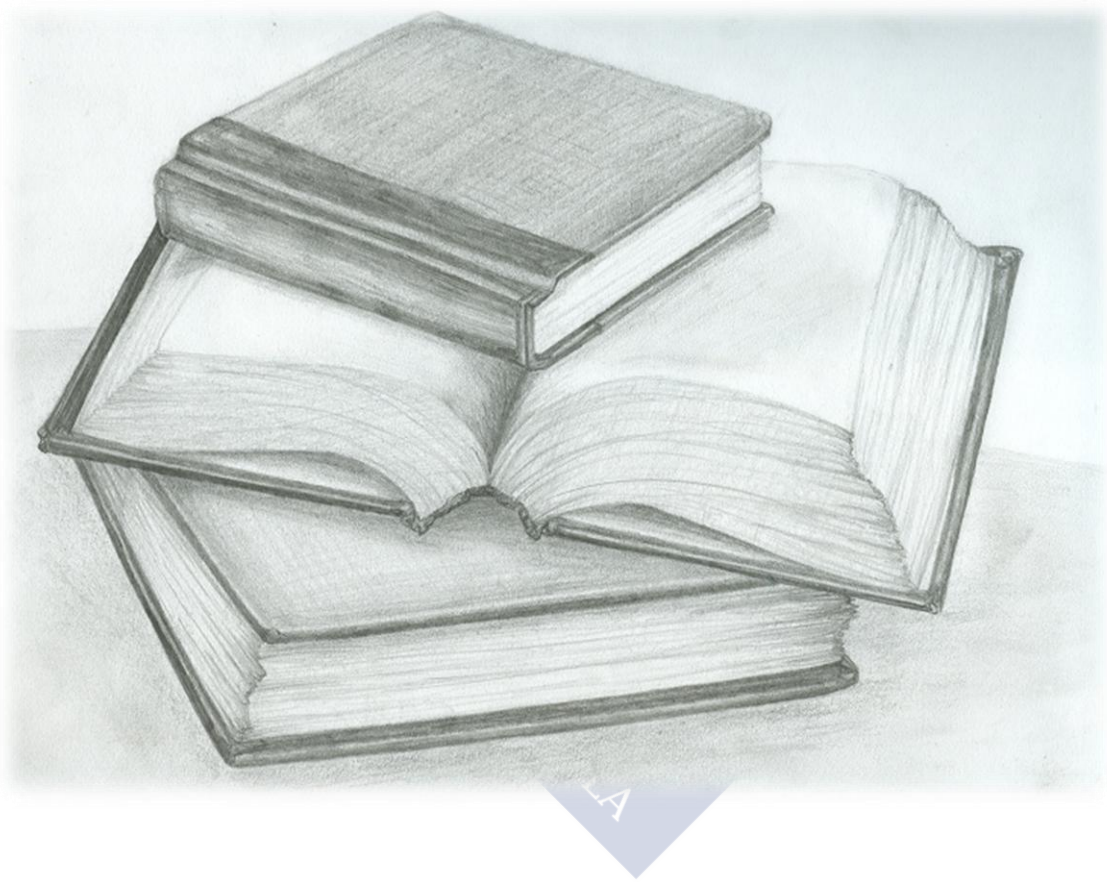
Al estudiar la influencia de los diferentes factores de riesgo mediante el **algoritmo CHAID** se observó una seroprevalencia significativamente más elevada en los cruces (22,4%) que en las de raza gallega (7,7%). Además, el árbol de clasificación muestra que en las cabras procedentes de cruces el tamaño de granja es un factor determinante sobre la seroprevalencia por *F. hepatica*; así, el mayor porcentaje de cabras seropositivas se halló en las explotaciones de pequeño y mediano tamaño. Por el contrario, en los animales de raza “Cabra Galega” ninguno de los factores estudiados afectó de manera determinante sobre la seroprevalencia por *F. hepatica* en estos animales.

Con el **análisis multivariante** se comprobó que la raza y la edad eran los principales factores que influían sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica*. Así, los cruces tienen una probabilidad 3 veces superior de ser seropositivos que los de la raza autóctona

“Cabra Galega”. Respecto a la influencia de la edad, se comprobó que las cabras de mayor edad tienen una probabilidad de ser seropositivos entre 2,5 y 4,3 veces superior a la de los animales menores de un año; estos resultados contrastan con la ausencia de significación mediante CHAID.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos han permitido identificar los principales factores de riesgo que influyen sobre la seroprevalencia de *F. hepatica* en ganado en ovino y caprino de Galicia, siendo estos el tamaño de las explotaciones, la edad de los animales y la presencia de cabras en las explotaciones ovinas; además, sobre la seroprevalencia de infección por *F. hepatica* en ganado caprino en Galicia, se ha comprobado que influye la raza, siendo las “Cabras de raza pura gallega” las que presentan menores porcentajes de seropositividad.

Los factores de riesgo identificados en ganado ovino y caprino en Galicia deben tenerse en cuenta en el diseño de nuevos planes de control de las infecciones por *F. hepatica* o cuando se adopten nuevas medidas en los ya existentes. Para minimizar el efecto de los principales factores de riesgo identificados en este estudio, es necesario utilizar pautas de control específicas, no siendo extrapolables algunas de las recomendadas para el ganado vacuno.



BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-RAHMAN, S.M.; O'REILLY, K.; 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 Veterinary Research*, **59**: 533-537.

ABROUS, M.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G.; CABARET, J. (1999). Infection of *Limnaea Truncatula* and *Lymnea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Veterinary Research*, **30**: 113-118.

AFSHAN, K.; QAYYUM, M.; RAZA-RIZVI, S.S.; MUKHTAR, M.; MUSHTAQ, M.; MILLER, J.E. (2013). Serological and coprological comparison for rapid diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in small ruminants from sub-tropical area of Pakistan. *Small Ruminant Research*, **113**: 267-272.

ALASAAD, S.; GRANADOS, J.E.; CANO-MANUEL, F.J.; MEANA, A.; ZHU, X.Q.; PÉREZ, J.M. (2007). Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in southern Spain. *Parasitology Research*, **102**: 751-755.

ALMAZÁN, C.; AVILA, G.; QUIROZ, H.; IBARRA, F.; OCHOA, P. (2001). Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, **97**: 101-112.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-GARCÍA, J.; CRUZ-ROJO, M. A.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. (2006 a). Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. *Parasitology Research*, **99**: 78-83.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M. A.; MAINAR-JAIME, R. C.; PÉREZ-GARCÍA, J.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. (2006 b). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*, **159**: 424-425.

ANDERSON, N.; LUONG, T.; VO, N.; BUI, K.; SMOOKER, P.; SPITHILL, T. (1999). The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, **83**: 15-24.

ANDREWS, S.J. (1999). The life cycle of *Fasciola hepatica*. In: Fasciolosis, Dalton J.P. (Ed). CABI Publishing, pp. 1-21.

ANSARI-LARI, M.; MOAZZENI, M. (2006). A retrospective survey of liver fluke disease in livestock based on abattoir data in Shiraz, South of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, **73**: 93-96.

ARIAS, M.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; LOMBA, C.; ÁLVAREZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2004). Prevalence of bovine fasciolosis by using a 2.9 kDa *Fasciola hepatica* recombinant protein. *Parassitologia*, **46**: 21.

ARIAS, M.; HILLYER, G. V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J. L.; PEDREIRA, J.; LOMBA C.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. (2006). A 2.9 kDa *Fasciola hepatica*-recombinant protein based ELISA test for the detection of current-ovine fasciolosis trickle infected. *Veterinary Parasitology*, **137**: 67-73.

ARIAS, M., MORRONDO, P.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; LOMBA, C.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A. (2007). Immunodiagnosis of current fascioliasis in sheep naturally exposed to *Fasciola hepatica* by using a 2.9 kDa recombinant protein. *Veterinary Parasitology*, **146**:46-49.

ARIAS, M.S.; SUÁREZ, J.L.; HILLYER, G.V.; FRANCISCO, I.; CALVO, E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍAZ, P.; FRANCISCO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PAZ-

SILVA, A. (2009). A recombinant-based ELISA evaluating the efficacy of netobimin and albendazole in ruminants with naturally acquired fascioliasis. *The Veterinary Journal*, **182**:73-78.

ARIAS, M., PIÑEIRO, P.; HILLYER, G.V.; SUÁREZ, J. L.; FRANCISCO, I.; CORTIÑAS, F.J.; DÍEZ-BAÑOS, P. MORRONDO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A. (2010). An approach of the laboratory to the field: Assessment of the influence of cattle management on the seroprevalence of fascioliasis by using polyclonal- and recombinant-based ELISAs. *Journal of Parasitology*, **96**: 626-631.

ARIAS, M.; LOMBA, C.; DACAL, V.; VÁZQUEZ, L.; PEDREIRA, J.; FRANCISCO, I.; PIÑEIRO, P.; CAZAPAL-MONTEIRO, C.; SUÁREZ, J.L.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A. (2011). Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record*, **168**: 408-412.

ARIAS, M.S.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; LEÓN-VIZCAÍNO, L.; PAZ-SILVA, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; ALONSO, F. (2012). Detection of antibodies in wild ruminants to evaluate exposure to liver trematodes. *Journal of Parasitology*, **98**: 754-759.

ARIAS, M.S.; PIÑEIRO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; HILLYER, G.V.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PAZ-SILVA, A.; MORRONDO, P. (2013). Relationship between exposure to *Fasciola hepatica* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and cattle extensively reared in an endemic area. *Research Veterinary Science*, **95**: 1031-1035.

AYADI, A.; RACHID, B.; KANNOU, H.; BRADAI, K.; RONDELAUD, D. (1993). Étude épidémiologique sur un foyer de distomatose à *F. hepatica* L. dans les oasis de Tozeur (Tunisie). *Bulletin De La Société Française de Parasitologie*, **11**: 217-222.

BARNOUIN, J.; MIALOT, M.; LEVIEUX, D. (1981). Evaluation de la pathologie hépatique des bovins sur un prélèvement de sang. Relations avec l'histopathologie. *Annales des Reserches Vétérinaires*, **12**: 363-369.

BEHM, C.A.; SANGSTER, N.C. (1999). Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.), CABI Publishing, pp. 185-224.

BÉJAR, P. (2011). *Infecciones digestivas y pulmonares de etiología parasitaria en ganado de la raza autóctona "Cabra Galega": influencia de factores intrínsecos y extrínsecos*. Trabajo de fin de Máster. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.

BENAVIDES, R.; CELAYA, R.; FERREITA, C.M.M.; JÁUREGUI, B.M.; GARCÍA, U.; OSORO, K. (2009). Grazing behaviour of domestic ruminants according to flock type and subsequent vegetation changes on partially improved heathlands. *Biodiversity and Conservation*, **20**: 3317-3339.

BENNETT, C.E. (1978). The identification of soluble adult antigen on the tegumental surface of juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **77**: 325-332.

BENNETT, C.E.; THREADGOLD, L.T. (1975). *Fasciola hepatica*: development of the tegument during migration in the mouse. *Experimental Parasitology*, **38**: 38-55.

BENNETT, C.E.; JOSHUA, G.W.P.; HUGHEST, D.L. (1982). Demonstration of juvenile-specific antigens of *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, **68**: 791-795.

BORAY, J.C. (1978). The potencial impact of exotic *Lymnaea* spp. On fascioliasis in Australasia. *Veterinary Parasitology*, **4**: 127-141.

BORAY, J.C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, **7**: 95-210.

BORAY, J.C. (1981). Fascioliasis and other trematode infections. Recent advances in research of *Fasciola* and other trematodes of animals. Review. *Advances in Parasitology*. (W. Slusarsky edit.). *Polish Scientific Publishers, Warszawa*, pp. 317-339.

BORAY, J.C (1982). Fascioliasis. In: Hiller, G.V. and Hopla, C.E. (Eds) *Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses*. Vol.III. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 71-88.

BORAY, J.C. (1985). Flukes of domestic animals. En: GAAFAR, S.M., HOWARD, W.E., MARSH, R.E. (eds). *Parasites, pests and predators*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179-185.

BOSSAERT, K.; FARNIR, F.; LECLIPTEUX, T.; PROTZ, M.; LONNEUS, J.F.; LOSSON, B. (2000). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **87**: 103-123.

BOUHIER, A. (1979). *La Galice. Essai géographique d'analyse et d'interprétation d'un vieux complexe agraire*. La Roche-Sur-Yon, (2 volumenes), 1516 pp.

BURDEN, D.J.; HAMMET, N.C. (1980). *Fasciola hepatica*: Attempts to immunize rats using fluke eggs and in vitro culture products. *Veterinary Parasitology*, **7**: 51-57.

CABANELAS, E.; BÉJAR, J.P.; PÉREZ, A.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO, P.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2014). Seroprevalence on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Galicia (N.W. Spain). XXI International Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of ruminants. Cartagena, 23-24 de Abril.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; OUMA, J.H.; BUTTERWORTH, A.E. (1987). Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science*, **238**: 1065-1027.

CARBALLEIRA, A.; DEVESA, C.; RESTUERTA, R.; SANTILLÁN, E.; UCIEDA, F. (1983). Bioclimatología de Galicia. Fundación Pedro Barrié de la Maza. A Coruña, España.

CHARLIER, J.; DE MEULEMEESTER, L.; CLAEREBOUT, E.; WILLIAMS, D.; VERCRUYSSSE, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, **153**: 44-51.

CHAUVIN, A.; BOUVET, G.; BOULARD. (1995). Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal of Parasitology*, **25**: 1227-1241.

CHONGSUVIVATWONG, V. (2012). Epicalc: Epidemiological calculator. R package versión 2.15.1.0. <http://CRAN.R-project.org/package=epicalc>

CIENFUEGOS, S.; DÍEZ-BANOS, P.; VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; DÍAZ, P.; PANADERO, P.; RODRÍGUEZ, G.; LAGO, N.; PATO, F.J.; VINA, M.; MORRONDO, M.; LÓPEZ, C. (2009 a). Endoparasitic infections in grazing goats in Galicia (NWSpain): possible effects on health and productivity. *XVII International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants*. Perugia, (Italy): 27-30.

CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; LAGO, N.; PATO, F.J.; RODRÍGUEZ, G.; PANADERO, R.; VINA, M. MORRONDO, M. DÍEZ-BANOS, P. LÓPEZ, C. (2009 b). Prevalencia e intensidad de parasitación en granjas de pequeños rumiantes en Galicia. *XIII Jornadas sobre producción animal*. Zaragoza: 143-145.

CLERY, D.; TORGERSON, P.R.; MULCAHY, G. (1996). Immune responses of chronically-infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **62**: 71-82.

COBBOLD, T.S. (1855). Description of a new trematode worm (*Fasciola gigantica*). *Edin N Phil J NS*, **2**: 262-266.

COLES, G.C. (2005). Anthelmintic resistance-looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, **78**: 199-108.

COLTORI, E. (1986). Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **35**: 1000-1005.

CONCEIÇÃO, M.A.; DURÃO R.M.; COSTA, I.H.; DA COSTA, J.M. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliosis. *Veterinary Parasitology*, **105**: 337-43.

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL (2013). Anuarios de estadística agraria, 2012. <http://www.medioruralemar.xunta.es/fileadmin/arquivos/estatisticas/2010/31501/31501-Serie-historica-2012>

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL (2014). Anuarios de estadística agraria, 2013. http://mediorural.xunta.es/institucional/estatisticas/gando_ovino_e_cabrun.

COOP, R.L.; SYKES, A.R. (1977). *Fasciola hepatica*: the effect of subclinical infection on food intake and efficiency of food utilization. *Parasitology (British Society for Parasitology: Poceeding)*, **7**: XXXVI-XXXVII.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1974). Parasitic zoonoses in Spain. *Internal Journal Zoonoses*, **1**:43-57.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1989). Fasciolosis: revisión de algunos aspectos. *Información Veterinaria*, **87**: 32-40.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (eds.) (1980). *Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos*. Servicio de Publicaciones Ministerio de Sanidad y de Seguridad Social, Madrid 579 pp.

CORNELISSEN, J.B.; GAASENBEEK, C.P.; BOERSMA, W.; BORGSTEEDE, F.H.; VAN MILLINGEN, F.J. (1999). Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal for Parasitology*, **29**: 685-696.

CORNELISSEN, J.B.; GAASENBEEK, C.P.; BORGSTEEDE, F.H.; HOLLAND, W.G.; HARMSSEN, M.M.; BOERSMA, W. (2001). Early immunodiagnosis of fasciolosis in

ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal of Parasitology*, **31**: 728-737.

CRINGOLI, G; RINALDI, L; VENEZIANO, V; CAPELLI, G; MALONE, J.B. (2002). A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology*, **108**: 137-43.

CROSSLAND, N.O.; JOHNSTONE, A.; BEAUMONT, G.; BENNETT, M.S. (1977). The effect of chronic fasciolosis on the productivity of lowland sheep. *British Veterinary Journal*, **133**: 518-525.

DAWES, B. (1962). On the growth and maturation of *Fasciola hepatica* L. in the mouse. *Journal of Helminthology*, **36**: 11-38.

DEL RÍO, J. (1967). Epizootiología de la dicroceliosis en la provincia de León. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, **13**: 211-253.

DÍAZ, A.; LI-ELÍAS, O.; GARCÍA, C.; ESPINO, A.M. (1998). Identificación, mediante Western Blot, de inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **50**: 12-17.

DÍAZ, P.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; LOMBA, C.; SUÁREZ, J.L.; PAZ, A.; MORRONDO, P. (2005). Infecciones parasitarias en vacas de raza rubia gallega de la provincia de Lugo: influencia de la edad. *Buiatría española*, **10**: 231-234.

DÍAZ, P. (2006). *Estudio epidemiológico de las principales endoparasitosis del ganado vacuno de raza Rubia Gallega de la provincia de Lugo*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.

DÍAZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO-PELAYO, P. (2007a). The

electroimmunotrasferblot (EITB) as a useful tool in the early evaluation of two anthelmintics in natural *Fasciola hepatica* infected sheep. *Revista Ibérica de Parasitología*, **67**: 3-8.

DÍAZ, P.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.S.; FRANCISCO, I.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PAZ-SILVA, A. (2007b). Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) in cattle from oceanic climate areas. *Parasitology Research*, **101**: 339-342.

DÍEZ, P.; PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MEZO, M.; LÓPEZ, C.; MORRONDO, P. (1997). Aplicación de EITB en la respuesta humoral de ratas re infectadas durante la fase de migración de *Fasciola hepatica*. *XIII Congreso Federación Latinoamericana de Parasitología, La Habana, Cuba*.

DÍEZ BAÑOS, P. (2011). *Fasciola y fasciolosis: un problema antiguo con nuevas soluciones impulsadas por la relación pluridisciplinar de la parasitología con otras ciencias*. Discurso de ingreso como Académico de Número en la Academia de Farmacia de Galicia. Santiago de Compostela.

DÍEZ-BAÑOS, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO-PELAYO, P. (1989a). Estudio epidemiológico de la fasciolosis bovina en Galicia. *IV Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres, 25-29 Septiembre*.

DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO-PELAYO, P.; BARREIRO, A; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (1989b). Influencia en las medidas de control en la fasciolosis del ganado vacuno de Galicia. *Seminario de Estudos galegos: V Xornadas de Estudos da Sanidade Animal en Galicia*. (Santiago, España).

DÍEZ-BAÑOS, P.; MEZO, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO, P.; DIEZ, N. (1994). Experimental bovine fasciolosis. II Assessment of hepatic indicators in animals treated with triclabendazole. *8th International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey*.

DÍEZ-BAÑOS, N.; MARTINEZ-DELGADO, A.; HIDALGO-ARGÜELLO, M.R. (2006). Estudio parasitológico del ganado ovino en la provincia de León (España) mediante análisis coprológico. *Veinte años de Buiatría. XIV Congreso Internacional de la Federación Mediaterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes (Fe.Me.S.P.Rum)*. Lugo-Santiago de Compostela: 380-383.

DÍEZ-BAÑOS, P.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; FRANCISCO, I.; SUÁREZ, J. L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; ARIAS, M.; PAINCEIRA, A.; PAZ-SILVA, A.; MORRONGO, P. (2008). Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by in vitro and in vivo assays. *Journal of Parasitology*, **94**: 925-928.

DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. (2003). Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. *Veterinary Parasitology*, **111**: 193-209.

DIXIT, A.K.; DIXIT, P.; SHARMA, R.L. (2008). Immunodiagnostic/ protective role of cathepsin L. cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology*, **154**: 177-184.

DOMÉNECH GRACÍA, J.; BARCO ROJO, E. (1994). Mil millones de ovejas: Estudio socioeconómico del sector ganadero ovino en La Rioja, España y el mundo. Edit. *Fundación Rural de la Caja de ahorros de La Rioja. Logroño*.

DOMKE, A.V.; CHARTIER, C.; GJERDE, B.; LEINE, N.; VATN, S.; STUEN, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminthes, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, **194**: 40-48.

DUCOMMUN, D.; PFISTER, K. (1991). Prevalence and distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* infections in cattle in Switzerland. *Parasitology Research*, **77**: 364-366.

- DUFFUS, W.P.H.; FRANKS, D. (1980). In vivo effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clinical and Experimental Immunology*, **41**: 430-440.
- DUFFUS, W.P.H.; FRANKS, D. (1981). The interaction in vitro between bovine immunoglobulin and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **82**: 1-10.
- DUMÉNIGO, B.E.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M. (1996). Detection of *Fasciola hepatica* antigen in cattle faeces by a monoclonal antibody-based sandwich immunoassay. *Research in Veterinary Science*, **60**: 278-279.
- DUMÉNIGO, B.E.; ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M.; MEZO, M. (2000). Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **89**: 153-161.
- DUSCHER, R.; DUSCHER, G.; HOFER, J.; TICHY, A.; PROSL, H.; JOACHIM, A. (2011). *Fasciola hepatica* - monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. *Veterinary Parasitology*, **178**: 273-278.
- DÜWEL, D.; REISENLEITER, R. (1984). *Fasciola hepatica*: coproscopic diagnosis compared with the worm burden in sheep. *Helminthologia*, **21**: 151-159.
- EDWARDS, C.M.; SAIGH, M.N.R.; WILLIAMS, G.L.; CHAMBERIAIN, A.G. (1976). Effect of liver-fluke on wool production in Walsh Mountain Sheep (correspondence). *Veterinary Records*, **98**: 372.
- ERICKSEN, L.; FLAGSTAD, T. (1974). *Fasciola hepatica*: influence of extrahepatic adult flukes on infections and immunity in rats. *Experimental Parasitology*, **35**: 411-417.

ESPINO, A.M.; FINLAY, C.M. (1994). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**: 190-193.

ESPINO, A.M.; DUMÉNIGO, B.M.; FERNÁNDEZ, R.; FINLAY, C.M. (1987). Immunodiagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**: 605-608.

ESPINO, A.M.; MARCET, R.; FINLAY, C.M. (1997). *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology*, **85**: 117-120.

ESPINOZA, J.R.; TIMOTEO, O.; HERRERA-VELIT, P. (2005). Fas2-ELISA in the detection of human infection by *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, **79**: 235-240.

EUZEBY, J. (1982). Diagnostic expérimentale des helminthoses animales. 2 Edit. Informations techniques des Services Vétérinaires. Ministère de l'Agriculture, Paris, 364 pp.

FERRE, I.; CALVO, E.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (1991). Contribución a la confección de un mapa parasitológico del ganado ovino de la provincia de Segovia. *Medicina Veterinaria*, **8**: 556-559.

FERRE, I.; BARRIO, J.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (1994). Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Veterinary Parasitology*, **55**: 71-79.

FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L.M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (1995). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* infection in sheep in Northwestern Spain. *Parasitology Research*, **81**: 127-131.

- 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.
- FROYD, G. (1974). Liver fluke in Great Britain: a survey of affected livers. *The Veterinary Record*, **97**: 492-495.
- GADAHÍ, J.A.; ARSHED, M.J.; ALI, Q.; JAVAID, S.B.; SHAH, S.I. (2009). Prevalence of gastrointestinal parasites of sheep and goat in and around Rawalpindi and Islamabad, Pakistan. *Veterinary World*, **2**: 51-53.
- GALLEGO, J. (1993). Introducción a la edición española. En *La cabra*. Edit. *Mundi Prensa, Madrid*.
- GARCÍA, A.L.; JUSTE, R.A. (1987). Observaciones sobre la prevalencia de los helmintos parásitos del ganado vacuno de la C.A.V. *ITEA*, **7**: 262-322.
- GEBEYEHU, E.B.; JUNG, B.Y.; BYUN J.W.; OEM, J.K.; KIM, H.Y.; LEE, S.J.; PARK, S.C.; KWAK, D. (2013). Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in a native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). *Veterinari Medicina*, **58**: 609-612.
- GEURDEN, T; HOSTE, H.; JACQUIET, P.; TRAVERSA, D.; SOTIRAKI, S.; FRANGIPANE, A.; TZANIDAKIS, N.; KOSTOPOULOU, D.; GAILLAC, C.; PRIVAT, S.; GIANGASPEROF, A.; ZANARDELLOG, C.; NOÉA, L.; VANIMISSETTIH, B.; BARTRAMI, D. (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastrointestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, **201**: 59-66.
- GOLDEN, O.; FLYNN, R.J.; READ, C.; SEKIYA, M.; DONNELLY, S.M.; STACK, C.; DALTON, J.P.; MULCAHY, G. (2010). Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine*, **28**: 5551-5557.

GONZÁLEZ-LANZA, C.; MANGA, Y.; DEL POZO, P.; HIDALGO, R. (1989). Dynamics of elimination of the eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma Basin, Spain. *Veterinary Parasitology*, **34**: 35-43.

GONZÁLEZ-LANZA, C.; MANGA-GONZÁLEZ, M.Y.; DEL POZO-CARNERO, P. (1993). Coprological study of the *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg elimination by cattle in highland areas in Leon Province, Northwest Spain. *Parasitology Research*, **79**: 488-491.

GORSKI, P.; NIZNIKOWSKI, R.; STRZELEC, E.; POPIELARCZYK, D.; GAJEWSKA, A.; WEDRYCHOWICZ, H. (2004). Prevalence of protozoan and helminth internal parasite infections in goat and sheep flocks in Poland. *Archives Tieraucht Dummerstorf*, **47**: 43-49.

HANDEMIR, E. (1997). Liver fluke parasitic infections in sheep slaughtered in Donya Meat and Fish Plant. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, **21**: 311-316.

HANNA, R.E.B. (1979). Surface antigenicity of *Fasciola hepatica* during development. *Parasitology*, **79**: XXXI.

HANNA, R.E.B. (1980a). *Fasciola hepatica*: an immunoflorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Experimental Parasitology*, **50**: 155-170.

HANNA, R.E.B. (1980b). *Fasciola hepatica*: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism from protection against host immunity. *Experimental Parasitology*, **50**: 103-114.

HANNA, R.E.; JURA, W. (1977). Antibody response of calves to a single infection of *Fasciola gigantica* determined by an indirect fluorescent antibody technique. *Research in Veterinary Science*, **22**: 339-342.

- HANNA, R.E.; TRUDGETT, A.G. (1983). *Fasciola hepatica*: development of monoclonal antibodies and their use to characterize a glycolyx antigen in migrating flukes. *Parasite Immunology*, **5**: 409-425.
- HANSEN, D.S.; CLERY, D.G.; ESTUNINGSIH, S.E.; WIDJAJANTI, S.; PARTOUTOMO, S.; SPITHILL, T.W. (1999). Immune responses in Indonesian thin tail and Merino sheep during a primary infection with *Fasciola gigantica*: lack of a specific IgG2 antibody response is associated with increased resistance to infection in Indonesian sheep. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1027-1035.
- HAROUN, E.M.; HUSSEIN, M.F. (1975). Clinico-pathological studies on naturally-occurring bovine fascioliasis in the Sudan. *Journal of Helminthology*, **49**: 143-52.
- HAROUN, E.M.; HAMMOND, J.A.; SEWELL, M.M.H. (1980). Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following implantation of adult flukes contained in diffusion chambers. *Research Veterinary Science*, **29**: 310-314.
- HAROUN, E.M.; HILLYER, G.V. (1986). Resistance to fascioliasis- a review. *Veterinary Parasitology*, **20**: 63-93.
- HASSAN, M.M.; HOQUE, M.A.; ISLAM, S.K.M.A.; KHAN, S.A.; ROY, K.; BANU, Q. (2011). A prevalence of parasites in black bengal goats in Chittagong, Bangladesh. *International Journal of Livestock Production*, **2**: 40-44.
- HEGAB, B.H.; HASSAN, R.M. (2003). Role of circulating *Fasciola* antigens and IgG4 isotype in assessment of cure from fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **33**: 561-570.
- HILLYER, C.V. (1993). Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. *Parasitología al día*, **17**: 130-136.

HILLYER, C.V. (1986). Fascioliasis, paragonimiasis, clonorchiasis and opisthorchiasis. In: walls, K and Shan P. M. (eds). *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*, vol. 1 Academic Press, London, pp. 39-68.

HILLYER, G.V.; SOLER DE GALANES, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.B.; DE LAGRAVA, M.S.; RAMÍREZ-GUZMÁN, S.; BRYEN, R.T. (1992). Use of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST ELISA) and the enzyme-linked immunotransfer blot (WITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**: 603-609.

HILLYER, G.V.; SOLER DE GALANES, M.; BUCHÓN, P.; BJORLAND, J. (1996). Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. *Veterinary Parasitology*, **61**: 211-20.

HOLLAND, W.G.; LUONG, T.T.; NGUYEN, L.A.; DO, T.T.; VERCRUYSSSE, J. (2000). The epidemiology of nematode and fluke infections in cattle in the Red River Delta in Vietnam. *Veterinary Parasitology*, **93**: 141-147.

HOPE CAWDERY, M.J. (1984). Review of the economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. *Irish Veterinary News* (September), 14-22.

HOPE CAWDERY, M.J.; CONWAY, A. (1972). Production effects of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, on beef cattle. *Veterinary Record*, **89**: 641-643.

HOSTE, H.; LEVEQUE, H.; DORCHIES, P.H. (2001). Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behavior. *Veterinary Parasitology*, **101**: 127-135.

HUGHES, D.L.; HARNESS, E.; DOY, T.G. (1981). The different stages of *Fasciola hepatica* capable of including immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitized rat. *Research Veterinary Science*, **30**: 93-98.

- INTAPAN, P.M.; TANTRAWATPAN, C.; MALEEWONG, W.; WONGKHAM, S.; WONGKHAM, C.; NAKASHIMA, K. (2005). Potent epitopes derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 in peptide-based immunoassay for the serodiagnosis of human fascioliasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **53**: 125-129.
- ITAGAKI, T.; SAKAMOTO, T.; ITAGAKI, H. (1995). Analysis of *Fasciola* sp. antigen by enzyme-linked immunotransfer blot using sera from experimentally and naturally infected cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. **57**: 511-513.
- JITHENDRAN, K.P.; BAHT, T.K. (1999). Epidemiology of parasitoses in dairy animals in the North West Humid Himalayan Region of India with particular reference to gastrointestinal nematodes. *Tropical Animal Health and Production*, **31**: 205-204.
- KENDALL, S.B. (1965). Relationship between the species of *Fasciola* and their molluscan host. *Advances in Parasitology*, **3**: 59-98.
- KENDALL, S.B.; OLLERENSHAW, C.B. (1963). The effects of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. *Proceedings of the Nutrition Society*, **22**: 41-46.
- KENDALL, S.B.; SINCLAIR, I.J.; EVERRETT, G.; PARFITT, J.W. (1978). Resistance to *Fasciola hepatica* in cattle: I Parasitological and serological observations. *Journal of Comparative Pathology*, **88**: 115-122.
- KEYYU, J.D.; KYVSGAARD, N.C.; KASSUKU, A.A.; WILLINGHAM, A.L. (2003). Worm control practices and anthelmintic usage in traditional and dairy cattle farms in the southern highlands of Tanzania. *Veterinary Parasitology*, **114**: 51-61.
- KHAN, M.K.; SAJID, M.S.; KHAN, M.N.; IGBAL, Z. (2009). Bovine fasciolosis: revalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Research in Veterinary Science*, **87**: 70-75.

KHAN, M.N.; SAJID, M.S.; KHAN, M.K.; IQBAL, Z. (2010). Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Parasitology Research*, **107**: 787-794.

KLEIN, S.L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **24**: 627-638.

KLOOSTERMAN, A. (1971). Observations on the Epidemiology of Trichostrongylosis of Calves. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

KUERPICK, B.; SCHNIEDER, T.; STRUBE, C. (2013). Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **193**: 206-213.

LAGO, N.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; CIENFUEGOS, S.; PATO, J.; PRIETO, A.; DÍAZ, P.; MOURAZOS, N.; FERNÁNDEZ, G. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **103**: 163-169.

LANG, B.Z.; HALL, R.F. (1977). Host parasite relationship of *Fasciola hepatica* in the white mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubate antigens and antigens from sonic disruption of immature worms. *Parasitology*, **63**: 1046-1049.

LANGLEY, R.; HILLYER, G.V. (1989). Detection of circulating parasite antigen in murine fasciolosis by two-site enzyme-linked immunosorbent assays. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **41**: 472-478.

LASHARI, M.H. AND Z. TASAWAR. (2011). Prevalence of some gastrointestinal parasites in sheep in southern Punjab, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, **31**: 295-298.

LEATHERS, C.W.; FOREYT, W.J.; FETCHER, A.; FOREYT, K.M. (1982). Clinical fasciolosis in domestic goats in Montana. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**: 1451-1454.

LEVIEUX, D.; LEVIEUX, A.; MAGE, C.; VENIEN, A. (1992). Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. *Veterinary Parasitology*, **44**: 77-86.

LEVIEUX, D.; LEVIEUX, A. (1994). Early immunodiagnosis of caprine fasciolosis using the specific f2 antigen in a passive hemagglutination test. *Veterinary Parasitology*, **53**: 59-66.

LOMBA (2005). *Caracterización de la respuesta inmunitaria y estudio de la inmunidad cruzada en fasciolosis ovina*. Tesis doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; VIÑA, M.; CIENFUEGOS, S.; PANADERO, R.; VÁZQUEZ, L.; DÍAZ, P.; PATO, J.; LAGO, N.; DACAL, V.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2011). Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain: Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, **178**: 108-114.

LÓPEZ, C.M.; PANADERO, R.; DÍAZ, P.; PÉREZ, A.; CABANELAS, E.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2013). The goat as a risk factor for parasitic infections in ovine flocks. *Congreso de la Sociedad Española de Parasitología*. Gran Canaria, 17-20 de Septiembre.

LÓPEZ-ABÁN, J.; RAMOS, S.; RAMAJO, V.; OLEAGA, A.; MURO, A. (2004). A sero-epidemiological study of infection by *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis* in cattle and sheep in Western Spain. *Revista Ibérica de Parasitología*, 41-47.

LÓPEZ-ABÁN, J.; CASANUEVA, P.; NOGAL, J.; ARIAS, M.; MORRONDO, P.; DIEZ-BANOS, P.; HILLYER, G.V.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; MURO, A. (2007). Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid

binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary Parasitology*, **145**: 287-296.

LÓPEZ-ABÁN, J.; NOGAL-RUIZ, J.J.; VICENTE, B.; MORRONDO, P.; DIEZ-BANOS, P.; HILLYER, G.V.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; FELICIANO, A.S.; MURO, A. (2008). The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **153**: 176-181.

LÓPEZ-ABÁN, J.; ESTEBAN, A.; VICENTE, B.; ROJAS-CARABALLO, J.; OLMO, E.D.; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A.R.; HILLYER, G.V.; MURO, A. (2012). Adaptive immune stimulation is required to obtain high protection with fatty acid binding protein vaccine candidate against *Fasciola hepatica* in Balb/C mice. *Journal of Parasitology*, **98**: 527-35.

LUZÓN, M.; CERRADA, C.; MEANA, A.; GÓMEZ, G. (1995). Prevalencia de la fasciolosis en vacuno en diferentes regímenes de explotación. *III Congreso Internacional de Medicina Bovina*. Santander.

LUZÓN PEÑA, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; GÓMEZ BAUTISTA, M. (1991). Influencia de las temperaturas de marzo a octubre/noviembre (>10°C) sobre la embrionación y eclosión de los huevos de *Fasciola hepatica*. *I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidentales Europeas de Parasitología*, Valencia.

LUZÓN PEÑA, M.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; GÓMEZ BAUTISTA, M. (1992). The overwintering of *Fasciola hepatica* egg under semiarid and temperate Mediterranean climate (Madrid, Spain). *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, **39**: 369-375.

LUZÓN, M.; MIRANDA, M.; MEANA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. (1997). Prevalencia de la fasciolosis en ovino en pastos húmedos del área septentrional de España. *Medicina Veterinaria*, **10**: 323-337.

M.A.F.F. (1986). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Reference Book 418. HMSO, London, UK.

M.A.G.R.A.M.A. (2014). Caracterización del sector ovino y caprino en España año 2013. Dirección General de producciones y mercados agrarios. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

MANGA-GONZÁLEZ, M.Y. (1999). Trematodos. Cordero del Campillo (Ed.), *et al.*, Parasitología Veterinaria, McGraw-Hill Interamericana, pp. 79-104.

MANGA, Y.; GONZALEZ-LANZA, C.; DEL-POZO, P.; HIDALGO, R. (1990). Kinetics of *Fasciola hepatica* egg passage in the faeces of sheep in the Porma basin, Spain. *Acta Parasitologica Polonica*, **35**: 149-157.

MANGA-GONZÁLEZ, Y.; GONZÁLEZ-LANZA, C.; DEL POZO, P.; (1991). Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in Porma basin (León, NW Spain). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, **66**: 57-61.

MANSOUR, W.A.; KADDAH, M.A.; SHAKER, Z.A.; AL ASSAL, F.M.; DERBALA, M.F. (1998). A monoclonal antibody diagnoses active *Fasciola* infection in humans. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **28**: 711-727.

MARCOS, L.A.; TERASHIMA, A.; GOTUZZO, E. (2008). Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **21**: 523-530.

MARÍN, M.S. (1992). *Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo. España.

MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ CRUZ, M.S.; MARTÍNEZ, F.J.; GUTIÉRREZ, P.N.; HERNÁNDEZ, S. (1996). Detection of antibodies of *Fasciola hepatica* excretory-secretory

antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, **62**: 247-252.

MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; RODRÍGUEZ, R.; QUIRANTES, C.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. (1995). Seroprevalencia de las fasciolosis caprina en Andalucía. *Investigación Agraria: Producción Sanidad Animales*, **10**: 135-143.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; NOGAL RUIZ, J.J.; LÓPEZ-ABÁN, J.; RAMAJO, V.; OLEGA, A.; MANGA-GONZÁLEZ, Y.; HILLYER, G.V.; MURO, A. (2004). Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology*, **126**: 287-298.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J., ACOSTA, I., GUTIÉREZ, P.N., BECERRA, C., HERNÁNDEZ, S. (1997). Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitology Research*, **83**: 680-686.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; JIMÉNEZ-LUQUE, V.; MORENO, T.; REDONDO, E.S.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. (1999). Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Veterinary Parasitology*, **82**: 119-133.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; ROBLES-PÉREZ, D.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M.R.; FERNÁNDEZ-PATO, N.; GONZÁLEZ-LANZA, C.; CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, L.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (2013). Increase in prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* infections in sheep in the Northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasite and Vectors*, **6**: 282-290.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; GEURDEN, T.; BARTRAM, D.J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J.M.; ROBLES-PÉREZ, D.; BOHÓRQUEZ, A.; FLOREZ, E.; MEANA, A.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (2015). Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, **211**: 228-233.

MAS-COMA, S.; BARGES, M.D.; ESTEBAN, J.G. (1999). In: *Fasciolosis*, Dalton J.P. (Ed.). CABI Publishing, pp. 411-434.

MAS-COMA, S.; BARGES, M.D.; VALERO, M.A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **11-12**: 1255-1278.

METEOGALICIA (2007). Informe climatológico Anual 2006. http://www.meteogalicia.es/datosred/infoweb/clima/informes/estacions/anuais/2006_gl.pdf.

MEZO, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ, N. (1994). Experimental bovine fasciolosis. I Study of activity of hepatic enzymes on calves infected with metacercariae of *Fasciola hepatica*. 8th International Congress of Parasitology, Izmir, Turkey.

MEZO, M.; CORREIA, J.M.; DÍEZ BAÑOS, P.; SAMPAIO, M.L. (1997). Estudio de la respuesta anticuerpo en bovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*. *Acta parasitológica Portuguesa*, **4**: 26.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; UBEIRA, F.M. (2003). Optimized serodiagnosis of sheep fascioliasis by FPLC fractionation of *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens. *Journal of Parasitology*, **89**: 843-849.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CARRO, C.; UBEIRA, F. M. (2004). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, **90**: 845-852.

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.

MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; MUIÑO, L.; UBIERA, F.M. (2010). Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy

cows during lactation and in serum from calves after feeding colostrums from infected dams. *Veterinary Parasitology*, **168**: 36-44.

MICHEL, J.F. (1968). *Immunity to helminths associated with the tissues*. Sixth Symposium of the British Society for Parasitology. Immunity to parasites. Edited by Ángela E.R. Taylor. Blackwell Scientific Publications.

MOLL, L.; GAASENBEEK, C.P.; VELLEMA, P.; BORGSTEEDE, F.H. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, **91**: 153-58.

MORRONDO, P. (2000). *Validez y aplicación de la técnica ELISA-doble para el diagnóstico de la fasciolosis ovina y valoración de un fasciolicida: comparación con otros métodos diagnósticos*. Trabajo original de investigación. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

MORRONDO-PELAYO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PÉREZ-VERDUGO, L.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C. (1994). Dynamics of *Fasciola hepatica* egg elimination and *Lymnaea Truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West Spain). *Research and Reviews in parasitology*, **54**: 47-50.

MORRONDO-PELAYO, P.; MOLEDO-MARTÍNEZ, J.A.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE-FERNÁNDEZ, R.; DÍEZ-BAÑOS, P. (1997). Estudio de la distribución de la infección por *Fasciola hepatica* en el ganado vacuno de las provincias gallegas por medio del ensayo inmunoenzimático ELISA. *Medicina Veterinaria*, **14**: 234-239.

MORRONDO, P.; DÍAZ, P.; PEDREIRA, J.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2003). Digestive parasitosis affecting to the autochthonous Rubia Gallega cattle. *XI Congresso Internazionale della Federazione Mediterranea Sanità e Produzione Ruminanti (Fe.Me.S.P.Rum)*, Olbia (Sassari).

- MORRONDO, P.; ARIAS, M.S.; LOMBA, C.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2005). Comparative dynamics of the antigens and antibodies in sheep experimentally infected and reinfected with *Fasciola hepatica*. *1st Symposium of Scandinavian-Baltic Society for Parasitology*, Vilnius, Lithuania.
- MUIÑO, L.; PERTEGUER, M.J.; GÁRATE, T.; MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ, V.; BELTRÁN, A.; ROMARÍS, F.; MEZO, M.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; UBEIRA, F.M. (2011). Molecular and immunological characterization of *Fasciola* antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **179**: 80-90.
- MULCAHY, G.; DALTON, J.P. (2001). Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science*, **70**: 83-86.
- MULCAHY, G.; JOYCE, P.; DALTON, J.P. (1999). Immunology of *Fasciola hepatica* infection. *Fasciolosis*. Dalton, L.P. ed. CABI Publishing. Pp. 341-375.
- MUNGUÍA-XÓCHIHUA, J.A.; IBARRA-VELARDE, F.; CUCOING-WATTY, A.; MONTENEGRO-CRISTINO, N.; QUIROZ-ROMERO, H. (2007). Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitology Research*, **101**: 127-130.
- MUÑOZ, C.; NIETO, A.; GAYA, A.; MARTÍNEZ, J.; VIVES, J. (1986). New experimental criteria for optimization of solid phase antigen concentration and stability in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, **94**: 137-144.
- MURRAY, M.; RUSHTON, B. (1975.). The pathology of fascioliasis, with particular reference to hepatic fibrosis. En: Taylor, A.E.R.; Muller, R. (Eds), *Pathogenic processes in parasitic infections*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 27-41.

NEYRA, V.; CHAVARRY, E.; ESPINOZA, J.R. (2002). Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Veterinary Parasitology*, **105**: 21-32.

OLDHAM, G. (1983). Protection against *Fasciola hepatica* in rats with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of the antigen batch, antigen dose and number of sensitizing injections. *Research in Veterinary Science*, **34**: 240-244.

OLLERENSHAW, C.B.; ROWLANDS, W.T. (1959). A method of forecasting the incidence of fascioliasis in Anglesey. *Veterinary Record*, **71**: 591-598.

OLLERENSHAW, C.B.; SMITH, L.P.; BEN, D. (1969). Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Advances in Parasitology*, **7**: 283-323.

O'NEILL, S.M.; PARKINSON, M.; DOWD, A.J.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; DALTON, J.P. (1999). Short report: Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60**: 749-751.

ORTIZ, P.L.; CLAXTON, J.R.; CLARKSON, M.J.; MCGARRY, J.; WILLIAMS, D.J.L. (2000). The specificity of antibody responses in cattle naturally exposed to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **93**: 121-134.

OTRANTO, D.; TRAVERSA, D. (2002). A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*, **107**: 317-335.

OTRANTO, D.; TRAVERSA, D. (2003). Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends in Parasitology*, **19**: 12-15.

PAINCEIRA, A. (2012). *Prevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por endoparásitos en rumiantes domésticos y silvestres de la provincia de Lugo*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.

PAL, R.A.; QAYYUM, M. (1992). Breed, age and sex-wise distribution of gastrointestinal helminthes of sheep and goats in an around Rawalpindi region. *Pakistan Veterinary Journal*, **12**: 60-63.

PANADERO, R.; PAINCEIRA, A.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; PAZ, A.; DÍAZ, P.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; FERNÁNDEZ, G.; LAGO, N.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Research in Veterinary Science*, **88**: 111-115.

PAPADOPOULOS, E.; GALLIDIS, E.; PTOCHOS, S. (2012). Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology*, **189**: 85-88.

PAZ SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO FONTÁN, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO PELAYO, P. (1997). Histopathological changes and antibody response in rats infected with *Fasciola hepatica* and treated with triclabendazole. *Helminthologia*, **1**: 3-8.

PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (1998). Comparación entre el ELISA-indirecto y el ELISA-doble en el diagnóstico de fasciolosis bovina. *Consulta*, **54**: 74-77.

PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PEDREIRA, J.; SUÁREZ, J.L.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P. (1999). Aplicación de la detección de antígenos circulantes en la evaluación de antihelmínticos en ovejas con fasciolosis natural. *Medicina Veterinaria*, **16**: 429-434.

PAZ-SILVA, A.; PEDREIRA, J.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; DÍAZ, P.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2002). Time-course analysis of coproantigens in rats infected and challenged with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Research*, **88**: 568-573.

PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2003).

Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, **91**: 328-331.

PAZ-SILVA, A.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; RODRÍGUEZ-MEDINA, J.R.; ARIAS, M.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2005). Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitology. Research*, **95**: 129-135.

PEINADO-PELÁEZ, M.; GÓMEZ-GARCÍA, V.; RODRÍGUEZ-OSORIO, M. (1989). Estudio epidemiológico de la fasciolosis en el ganado de la provincia de Granada. *Resúmenes del VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología*, Cáceres (Spain), 25-29 September.

PEDREIRA, J.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; SUÁREZ, J.L.; ARIAS, M.; LOMBA, C.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2006). Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **75**: 56-62.

PÉREZ VERDUGO, L. (1992). *Epidemiología de Fasciola hepatica en ganado vacuno de la provincia de Lugo*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela.

PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; MORENO, T.; MORRONDO, P.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *Journal of Comparative Pathology*, **127**: 30-36.

PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; BRAVO, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. *Veterinary Research*, **36**: 1-12.

PFISTER, K.; TURNER, K.; CURRIE, A.; HALL, E.; JARRETT E.E.E. (1983). IgE production in rat fascioliasis. *Parasite Immunology*, **5**: 587-593.

PFISTER, K.; DAVEAU, C.H.; AMBROISE-THOMAS, P. (1984). Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA. *Research in Veterinary Science*, **37**: 39-43.

PFUKENYI, D.M.; MUKARATIRWA, S.; WILLINGHAM, A.L.; MONRAD, J. (2005). Epidemiological studies of amphistome infections in cattle in the highveld and lowveld communal grazing areas of Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **72**: 67-86.

PHIRI, A.M.; PHIRI, I.K.; SIKASUNGE, C.S.; MONRAD, J. (2005a). Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age, sex and origin. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **52**: 414-416.

PHIRI, A.M.; PHIRI, I.K.; SIZIYA, S.; SIKASUNGE, C.S.; CHEMBENSOFU, M.; MONRAD, J. (2005b). Seasonal pattern of bovine fasciolosis in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. *Veterinary Parasitology*, **134**: 87-92.

PIEDRAFITA, D.; RAADSMA, H.W.; 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.

PLEASANCE, J.; RAADSMA, H.W.; ESTUNINGSIH, S.E.; WIDJAJANTI, S.; MEEUSEN, E.; PIEDRAFITA, D. (2011). Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: A comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* infection. *Veterinary Parasitology*, **178**: 264-272.

POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. (1992). Humoral and cellular responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **45**: 59-71.

POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leukocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **49**: 179-190.

POULIN, R. (1996). Sexual Inequalities in Helminth Infections: A Cost of Being a Male? *The American Naturalist*, **147**: 287-295.

PRESTON, J.M. y ALLONBY, E.W. (1979). The influence of breed on the susceptibility of sheep of *Haemonchus contortus* infection in Kenya. *Research in Veterinary Science*, **26**: 134-139.

PRICE, T.A.; TUAZÓN, C.U.; SIMÓN, G.L. (1993). Fascioliasis: Case Reports and Review. *Clinical Infectious Diseases*, **17**: 426-30.

RAMAJO, V.; OLEAGA, A.; CASANUEVA, P.; HILLYER, G.V.; MURO, A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology*, **97**: 35-46.

RAJASEKARIAH, G.R.; HOWELL, M.J. (1978). *Fasciola hepatica*: role of developmental stages on the rat's resistance to challenge. *Experimental Parasitology*, **44**: 233-238.

RAJASEKARIAH, G.R.; MITCHELL, G.F.; CHAPMAN, C.E.; MONTAGUE, P.W. (1979). *Fasciola hepatica*: attempts to induce protection against infection in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. *Parasitology*, **79**: 393-400.

RAPSCH, C.; SCHWEIZER, G.; GRIMM, F.; KOHIER, L.; BAUER, C.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; TORGERSON, P.R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1153-1158.

R CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>

- RAZA, M.A.; IQBAL, Z.; JABBAR, A.; YASEEN, M. (2007). Point prevalence of gastrointestinal helminthiasis in ruminants in southern Punjab. *Pakistan Journal of Helminthology*, **81**: 323-328.
- REDDINGTON, J.J.; LEID, R.W.; WESCOTT, R.B. (1984). A review of the antigens of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **107**: 65-72.
- REDDINGTON, J.J.; LEID, R.W.; WESCOTT, R.B. (1986). The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Veterinary Parasitology*, **19**:145-150.
- REICHEL, M.P. (2002). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, **107**: 65-72.
- REICHEL, M.P.; VANHOFF, K.; BAXTER, B. (2005). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology* **129**: 61-66.
- REINA, D.; NAVARRETE, I.; HERNÁNDEZ, S.; HABELA, M. (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. *Revista Ibérica de Parasitología*, **Volumen Extraordinario**: 85-90.
- RIVERA-MARRERO, C.A.; SANTIAGO, N.; HILLYER, G.V. (1988). Evaluation of Immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, **74**: 646-652.
- 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.

- ROBERTS, J.A.; WIDJAJANTI, ESTUNINGSIH, E.; HETZEL, D.J. (1997b). Evidence for a major gene determining the resistance of Indonesian Thin Tail sheep against *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, **68**: 309-314.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; HILLYER, G.V. (1995). Detection of excretory-secretory circulating antigens in sheep infected with *Fasciola hepatica* and with *Schistosoma mansoni* and *F. hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **56**: 57-66.
- RODRÍGUEZ-RAJO, F.J.; FRENGUELLI, G.; JATO, M.V. (2003). Effect of air temperature on forecasting the start of the Betula pollen season at two contrasting sites in the south of Europe (1995-2001). *International Journal of Biometeorology*, **47**: 117-125.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; CASTAÑO-ROSADO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, M. (1989). Trematodosis hepáticas. Fasciolosis. *Bovis*, **31**: 9-71.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; DÍEZ-BAÑOS, N.; DÍEZ-BAÑOS, P; MORRONDO-PELAYO, P. (1997). Gastroenteritis Parasitarias. *Bovis (Tratado de Verinaria práctica)*, **79**: 78.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; FERRE-PÉREZ, I. (1999). Parasitosis hepáticas. Fasciolosis. En: Cordero de Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. (Coordinadores). *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill interamericana, Madrid. ISBN 84-486-0236-3. Pp.: 260-272.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO-PELAYO, P. (2003). Fasciolosis. En: *Enfermedades parasitarias del ganado ovino y caprino*. (Coordinadores): Sánchez-Acevo *et al.*). Veterinaria Esteve, Ediciones GEA, Barcelona: 62-66.
- ROJO-VÁZQUEZ, F.A.; MEANA, A.; VALCÁRCEL, F.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, **189**: 15-38.

- ROKNI, M.B.; MASSOUD, J.; O'NEILL, S.M.; PARKINSON, M.; DALTON, J.P. (2002). Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L- ELISA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **44**: 175-179.
- ROMAGOSA, J.A (1975). Manejo de cabras y cabritos de cebo precoz. Editorial Ponds. Madrid, 486 pp.
- RONDELAUD, D.; MAGE, C. (1991). Données épidémiologiques sur les cressomères naturelles du Limousin et leur contamination par *Fasciola hepatica*. A propos de quelques observations sur 18 années. *Bulletin des Sociétés Française Parasitologie*, **9**: 75-80.
- ROSEBY, F.B. (1970). The effect of fasciolosis on the wool production of merino sheep. *Australian Veterinary Journal*, **46**: 361-365.
- RUIZ-NAVARRETE, M.A.; ARRIAGA, C.; BAUTISTA, C.R.; MORILLA, A. (1993). *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory–secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **35**: 301-307.
- SALIMI-BEJESTANI, R.; DANIEL, R.G.; FELSTEAD, S.M.; CRIPPS, P.J.; MAHMOODY, H.; WILLIAMS, D.J.L. (2005). Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Veterinary Record*, **156**: 729-731.
- SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MORRONDO-PELAYO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO-FONTÁN, R.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C. (1994). Seroprevalencia de la fasciolosis bovina en Lugo. *X Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*. Barcelona-Sitges, 23-24 de Septiembre.
- SÁNCHEZ-ANDRADE-FERNÁNDEZ, R.; MORRONDO-PELAYO, P.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; PANADERO-FONTÁN, R.; DÍEZ-BAÑOS, P. (1995). Evaluation of *Fasciola hepatica* infection prevalence in cattle in Galicia (Northwest Spain) by enzyme linked immunosorbent assay. *Revista Ibérica de Parasitología (Research and Reviews in Parasitology)*, **55**: 103-107.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ, A.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; DÍEZ, N. (1997). Aplicación de EITB en la respuesta humoral de ratas re infectadas con *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitologica Portuguesa*, **4**: 192.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2000). Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **93**: 39-46.

SÁNCHEZ-ANDRADE-FERNÁNDEZ, R.; SUÁREZ, J.L.; PAZ-SILVA, A.; PANADERO, R.; MARTÍNEZ, M.J.; PEDREIRA, J.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2001a). Seroprevalence of *Fasciola hepatica* by indirect-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) and indirect-ELISA of bovine from Galicia (NW Spain) according to their origin. *Revista Ibérica de Parasitología (Research and Reviews in Parasitology)*, **61**: 97-101.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PANADERO, R.; PEDREIRA, J.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2001b). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **87**: 609-614.

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ-SILVA, A.; SUÁREZ, J.L.; PANADERO, R.; PEDREIRA, J.; LÓPEZ, C.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; (2002). Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications*, **26**: 361-370.

SÁNCHEZ BELDA, A.; SÁNCHEZ TUJILLANO, M.C. (1986). *Razas ovinas españolas*. Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura, Madrid. 24 pp.

SANDEMAN, R.M.; HOWELL M.J., (1981). Precipitating antibodies against excretory secretory antigens of *Fasciola hepatica* in sheep serum. *Veterinary Parasitology*, **9**: 35-46.

SANTIAGO, N.; HILLYER, G.V. (1998). Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, **74**: 810-818.

SAVIN, Z.; PETROVIC, Z.; VUJIC, B.; BORDJOSKI, A.; POPOVIC, B. (1978). Importance of fascioliosis in the high mountainous pasture lands. *Proceedings 4th International Congress of Parasitology*, August 19-26, Warszawa, Poland.

SCALA, A.; LIGIOS, C.; SATTA, G.; GAETANI, W.; SINI, T. (1997). Parassitosi bovine: Rilevi epidemiologici in Sardegna. *Praxis Veterinaria*, **3**: 10-13.

SCALA, A.; CARFAGNA, G.; URAS, P.; POGLAYEN, G.; GIANETTO, S.; GAGLIO, G. (2001). Rilevi parassitologici in bovini allevati in Gallera (Sardegna). *XVIII International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)*. Stresa (Italia).

SILVA, E.; CASTRO, A.; LOPES, A.; RODRIGUES, A.; DIAS, C.; CONCEIÇÃO, A.; ALONSO, J.; CORREIA DA COSTA, J.M.; BASTOS, M.; PARRA, F.; MORADAS-FERREIRA, P.; SILVA, M. (2004). A recombinant antigen recognized by *Fasciola hepatica*-infected hosts. *Journal of Parasitology*, **90**: 746-751.

SILVA, A.; MORRONGO PELAYO, M.P.; PANADERO FONTÁN, R.; LOPEZ SANCHEZ, C.M.; SÁNCHEZ-ANDRADE FERNÁNDEZ, R. (1995). Infección experimental de ratas Sprague-Dawley de distinta edad con metacercarias de " *Fasciola hepatica*" de origen ovino. *Revista de experimentación animal*, **6**: 13-18.

SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CABARET, J. (2000). Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Veterinary Record*, **146**: 674-675.

SIMÓN, F.; RAMAJO, V. (1985). Principales problemas parasitarios ligados al pastoreo en especial en el ganado ovino de la provincia de Salamanca. *Las parasitosis de los rumiantes en pastoreo en España*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Comunicaciones INIA, Servicio de Higiene y Sanidad Animal, **11**: 35-37.

SINCLAIR, K.B. (1962). Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *British Veterinary Journal*, **118**: 37-53.

SINCLAIR, K.B. (1972). The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in sheep. *British Veterinary Journal*, **128**: 249-259.

SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. (1988). Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, **27**: 283-290.

SMYTH, J.D.; HALTON, D.W. (1983). *The Physiology of trematodes*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 446 pp.

SOULSBY, E.J.L. (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7th London: Bailliere Tindall, 809 pp.

SRIVENY, D.; RAINA, O.K.; YADAV, S.C.; CHANDRA, D.; JAYRAW, A.K.; SINGH, M.; VELUSAMYA, R.; SINGH, B.P. (2006). Cathepsin L cysteine proteinase in the diagnosis of bovine *Fasciola gigantica* infection. *Veterinary Parasitology*, **135**: 25-31.

SZMIDT-ADJIDE, V.; ABROUS, M.; ADJIDE, C.C.; DREYFUSS, G.; LECOMPTE, A.; CABARET, J.; RONDELAUD, D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Veterinary Parasitology*, **87**: 133-138.

TARAZONA, J.M.; SANZ PASTOR, A.; BABIN, M.M.; CANALS, A.; DOMÍNGUEZ, T.; MARTÍN, M.; TRUJILLO, J. (1985). Problemas parasitarios de los rumiantes en pastoreo en la meseta meridional: *Comunicaciones INIA. Serie Higiene y sanidad Animal*, **11**: 63-69.

TAYLOR M. (1987). Liver fluke treatment. *In practice*, **9**: 163-166.

THREADGOLD, L.T. (1963). The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica*. *The Quarterly Journal of Microscopical Science*, **104**: 505-512.

TORGERSON, P.; CLAXTON, J. (1999). Epidemiology and control. *Fasciolosis*. Dalton, L.P. ed. CABI Publishing. Pp. 113-149.

TORRES-ACOSTA, J.F.J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; CUELLAR-ORDAZ, J.A. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, **189**: 89-96.

UENO, H.; GUTIERRES, V.C.; DE MATTOS, M.J.T.; MÜLLER, G. (1982). Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **11**: 185-191.

URIARTE, J. (1983). *Fasciolosis y gastroenteritis parasitarias de los ruminates. Epizootiología y control en sistemas de manejo*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 23 pp.

URIARTE, J.; CABARET, J.; TANCO, J.A. (1985). The distribution and abundance of parasitic infections in sheep grazing on irrigated pastures in north-eastern Spain. *Annales de Recherches Vétérinaires*, **16**: 321-325.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. (1987). *Veterinary parasitology*. Longman Scientific and Technical, UK, 286 pp.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; JENNINGS, F.W.; DUNN, A.M. (1996). *Veterinary Parasitology*. Ed. Blackwell Science Inc., Oxford.

VALCÁRCEL, F.; GARCÍA ROMERO, C. (1999). Prevalence and seasonal pattern of caprine trichostrongyles in a dry area of central Spain. *Journal of Veterinary Medicine series B*, **6**: 673-681.

VALERO, M.A.; UBEIRA, F.M.; KHOUBBANE, M.; ARTISAGA, P.; MUIÑO, L.; MEZO, M.; PÉREZ-CRESPO, I.; PERIAGO, M.V.; MAS-COMA, S. (2009). Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **159**: 77-81.

VARA-DEL RÍO, M.P.; VILLA, H.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. (2007). Genetic heterogeneity of *Fasciola hepatica* isolates in the northwest of Spain. *Parasitology Research*, **101**: 1003-1006.

VARGAS, D.; SABBE, G.; CASTRO, R.; PÉREZ, C.; APT, W.; DE RICKE, P.H. (1995). Implementation of an ELISA-test for the diagnosis in human hydatid disease. *Research in Veterinary Parasitology*, **55**: 223-226.

VARGAS, D.; DEL PINO, S.; GONZÁLEZ, C.G.; VIDAL, M. (2001). Implementación de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la fasciolosis equina. *Boletín chileno de parasitología*, **57**: 1-8.

VÁZQUEZ, L.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; LAGO, N.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO, P.; LÓPEZ, C. (2008). Occurrence of trematode infections in sheep managed in a semiextensive system in northwestern Spain. *The XVI Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*. Zadar (Croacia).

VIÑA, M.; PANADERO, R.; DÍAZ, P.; FERNÁNDEZ, G.; PÉREZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; LÓPEZ C.M. (2013). Evaluation of the use of pooled fecal samples for the diagnosis of protostrongylid infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, **197**: 231-234.

WARUIRU, R.M.; MBUTHIA, P.G.; KIMORO, C.O. (1993). Prevalence of gastrointestinal parasites and liver flukes in calves in Mathira Division of Nyeri District, Kenya. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, **41**: 291-296.

WARUIRU, R.M.; KYVSGAARD, N.C.; THAMSBORG, S.M.; NANSEN, P.; BOGH, H.O.; MUNYUA, W.K.; GATHUMA, J.M. (2000). The prevalence and intensity of helminth and coccidial infections in dairy cattle in central Kenya. *Veterinary Research Communications*, **24**: 39-53.

ZAFRA, R.; PÉREZ, J.; BUFFONI, L.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; MOZOS, E.; MARTÍNEZ MORENO, A. (2013). Peripheral blood lymphocyte subsets in *Fasciola*

hepatica infected and immunized goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **155**: 135-138.

ZHANG, W.Y.; MOREAU, E.; HOPE, J.C.; HOWARD, C.J.; HUANG, W.Y.; CHAUVIN, A. (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, **111**: 154-159.

