

Fasciolosis bovina: Valoración de parámetros parasitarios y de respuestas inmunitarias en infecciones experimentales y naturales

Mercedes Mezo-Menéndez*
Rita Sánchez-Andrade**
José Luis Martínez-Santiago**
Natividad Díez-Baños***
Pablo Díez-Baños**
Patrocinio Morrondo Pelayo**

Abstract

IgG specific antibody evolution was studied in experimentally infected and reinfected cattle by indirect ELISA with *F. hepatica* excretion-secretion antigen. Likewise, the utility of the test to evaluate the different treatment model and the detection of naturally acquired *F. hepatica* was assessed. Antibody levels rose progressively from the 8th to the 24th week after primoinfection. From the 8th week after primoinfection, 85.7% of the animals were positive by ELISA, which means 4 weeks before the coprological diagnosis. Antibody rate increased in reinfected cattle in the 4th week post-reinfection. Sera were positive during the 24 weeks post-reinfection in parasited cattle in the moment of reinfection. In cattle in which primoinfection had been eliminated with an anthelmintic treatment, sera were positive from 4 to 24 weeks after reinfection. It was proved in the necropsy that reinfected animals harboured adult fasciolas, confirming the results obtained by ELISA. The treatment applied 12 weeks after primoinfection was completely effective, however, 42.8% of the sera carried on to be positive during 6 weeks after the treatment. Taking into account this period, ELISA allowed to evaluate in a early and reliable way the efficacy of the treatment applied in the prepatent period (3 weeks after infection). Ten Friesian heifers without *F. hepatica* infection were kept in pastures with *L. truncatula* and *F. hepatica* metacercariae to study the evolution of antibody levels in natural infection. Every animal showed positive absorbance after being 3 months in these pastures, i.e. 5 months earlier than the egg output in faeces.

Keywords: *FASCIOLA HEPATICA*, EXPERIMENTAL INFECTION, NATURAL INFECTION, CATTLE, ELISA, COPROLOGY.

Resumen

Se estudia mediante ELISA indirecto, con antígeno de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*, la evolución de los anticuerpos IgG específicos en ganado bovino infectado y re infectado experimentalmente. Asimismo, se evalúa la utilidad de la prueba en la valoración de distintas pautas de tratamiento y en la detección de la fasciolosis bovina adquirida naturalmente. La tasa de anticuerpos aumentó progresivamente entre las 8 y 24 semanas siguientes a la primoinfección experimental.

Recibido el 16 de enero 1997 y aceptado el 22 de mayo de 1997.

* Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, 15080, La Coruña, España.

** Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27071, Lugo, España.

*** Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071, León, España.

El 85.7% de los animales fueron positivos por ELISA a partir de la octava semana de la primera infección, lo que supuso un adelanto de 4 semanas respecto del diagnóstico coprológico. En todos los bovinos re infectados aumentó el nivel de anticuerpos a las 4 semanas posre infección. En los animales que ya estaban parasitados en el momento de la re infección, todos los sueros fueron positivos durante las 24 semanas posre infección. En los bovinos en los que se había eliminado la primoinfección mediante tratamiento antiparasitario, todos los sueros fueron positivos entre las 4 y 24 semanas siguientes a la re infección, a pesar de que la eliminación de huevos fue escasa e intermitente. En la necropsia se comprobó que los animales re infectados tenían fasciolas adultas, esto último confirmó los resultados obtenidos por ELISA. El tratamiento administrado a las 12 semanas de la primoinfección fue completamente eficaz. No obstante, 42.8% de los sueros continuaron positivos durante las 6 semanas postratamiento. Teniendo en cuenta este periodo de persistencia, el ELISA permitió evaluar de forma precoz y fiable la eficacia de los tratamientos administrados durante el periodo de prepatencia (3 semanas después de la primo y re infección). Para estudiar la evolución del nivel de anticuerpos en las infecciones naturales se dispuso de 10 novillas frisonas sin infección por *F. hepatica* que se mantuvieron durante 11 meses en parcelas con *Lymnaea truncatula* y metacercarias de *F. hepatica*. Todos los animales tuvieron absorciones positivas a partir de los 3 meses de su entrada en las parcelas; es decir, con un adelanto de 5 meses sobre la detección de huevos en heces.

Palabras clave: *FASCIOLA HEPATICA*, INFECCIÓN EXPERIMENTAL, INFECCIÓN NATURAL, BOVINOS, ELISA, COPROLOGÍA.

Introducción

La forma más común de la fasciolosis bovina es la crónica, que no supone grave peligro para la vida del animal, pero que conlleva pérdidas económicas apreciables.^{1,2}

El diagnóstico coprológico sólo es fiable después del periodo prepatente y con frecuencia se hace tarde porque ya se han producido parte de los efectos patógenos. Además, los bovinos re infectados suelen eliminar escaso número de huevos, de modo que con frecuencia hay falsos negativos por coprología.

Hay fármacos muy activos frente a los estadios adultos e inmaduros de *F. hepatica*, son útiles para evitar en gran parte sus efectos patógenos y, al mismo tiempo, disminuir la contaminación ambiental con los huevos del parásito; sin embargo, para llevar a cabo los tratamientos tempranos se necesitan métodos de diagnóstico suficientemente sensibles y específicos para detectar la infección en sus inicios. Mediante la técnica inmunoenzimática ELISA, diversos autores^{3,4} demostraron respuestas anticuerpo frente a *F. hepatica* durante el periodo de prepatencia; a pesar de ello, la falta de estandarización de las técnicas y los diversos antígenos empleados hacen que no siempre los resultados sean comparables. En todo caso, la mayoría de los antígenos y técnicas se han empleado para diagnosticar primoinfecciones en condiciones experimentales, pero faltan estudios para determinar mejor su utilidad en situaciones de re infección y después de administrar los tratamientos antiparasitarios. Por otra parte, normalmente estas técnicas se han empleado para el diagnóstico de infecciones naturales de campo, se han hecho sobre una única muestra de suero de animales cuyos antecedentes parasitológicos se desconocían.^{5,6}

En este trabajo se pretende estudiar la respuesta anticuerpo detectable por ELISA, empleando un antígeno de excreción-secreción (ES) de *F. hepatica*, con ese fin se usaron bovinos primoinfectados y re infectados experimentalmente y sometidos a pautas de tratamiento diferentes. Además, se comparan los resultados obtenidos mediante el diagnóstico serológico y el coprológico.

Como complemento del estudio experimental, se realizó un ensayo paralelo con el fin de determinar la utilidad de ELISA en el diagnóstico de las infecciones naturales y mejorar la interpretación de los resultados.

Material y métodos

El estudio se realizó en una finca experimental, situada en la localidad de Mabegondo, La Coruña, España, cuya superficie total es de 350 ha, está situada a 43° 15' de latitud norte y 81° 18' de longitud oeste, a 97 msnm. Esta zona ofrece condiciones adecuadas para el desarrollo del ciclo de *F. hepatica*, tanto por su clima como por el sistema de explotación del ganado vacuno. Sin embargo, en esta misma finca existen áreas en las que no han pastado animales infectados por *F. hepatica* ni hay ejemplares del hospedero intermediario *L. truncatula*.

Infecciones experimentales y tratamientos fasciolicidas

28 terneras frisonas nacidas en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), La Coruña, España, se mantuvieron en estabulación, sin posibilidad de ingerir metacercarias de *F. hepatica* hasta su infección

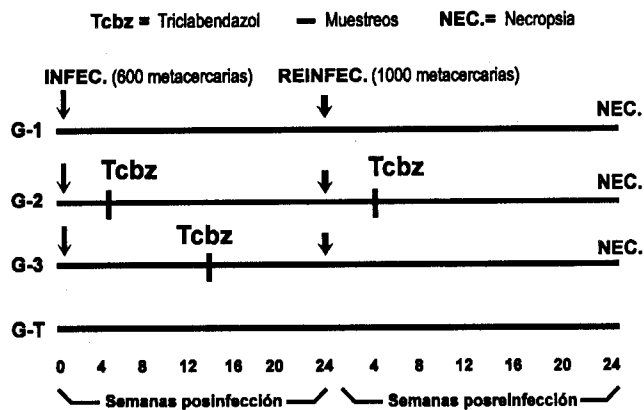


Figura 1. Infecciones experimentales y pautas de tratamiento.

experimental. Las metacercarias se obtuvieron en el laboratorio del CIAM infectando *L. truncatula* con miracidios procedentes de huevos de *F. hepatica* recogidos de vesícula biliar de vacas infectadas naturalmente y sacrificadas en un matadero cercano.

Con 4-5 meses de edad, las terneras se separaron en 4 grupos homogéneos respecto al peso (Figura 1), un testigo (G-T) y 3 infectados (G-1, G-2, G-3). Cada animal de los lotes infectados recibió una dosis inicial de 600 metacercarias de *F. hepatica* dada por vía oral mediante cápsulas de gelatina; a los 6 meses se reinfectaron con otra segunda dosis de 1000 metacercarias, también por vía oral. Las terneras del G-2 y G-3 se trataron oralmente con triclabendazol (12 mg/kg p.v.) siguiendo dos pautas de tratamiento diferentes. En el G-2 se hicieron dos tratamientos, uno a las 3 semanas de la primoinfección y otro a las 3 semanas después de la reinfección; las terneras del G-3 se trataron sólo una vez a las 12 semanas de la primera infección y las del G-1 y G-T no recibieron ningún tratamiento.

Durante los 12 meses siguientes a la primera infección, todos los animales pastaron juntos en parcelas libres de limneas y metacercarias de *F. hepatica*, pero no de otros parásitos. Las novillas de los 4 grupos excretaron huevos de nematodos gastrointestinales desde las 4 semanas siguientes a su salida al pasto. Los géneros predominantes fueron *Ostertagia*, *Cooperia* y *Trichostrongylus*, aunque también se identificaron *Trichuris*, *Nematodirus*, *Moniezia* y ooquistes de *Eimeria*.

Antes de la infección experimental se tomaron muestras de sangre y heces de cada animal. Posteriormente, los muestreos se efectuaron con periodicidad quincenal o mensual; los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Al final del ensayo se sacrificaron 9 animales (3 de cada uno de los grupos infectados G-1, G-2 y G-3) elegidos al azar y se realizó la necropsia.

Infección natural por *F. hepatica*

Para hacer el seguimiento de la infección natural, se dispuso de 10 novillas frisonas de 2 años de edad que habían nacido en la misma explotación y se habían mantenido en una parte de la finca libre de metacercarias de *F. hepatica*. Desde enero hasta noviembre estos 10 animales permanecieron en otras parcelas con abundantes poblaciones de *L. truncatula* y en las que previamente habían pastado vacas infectadas por *F. hepatica*. En los periodos con escasez de pasto, la alimentación se suplementó con pienso y ensilado.

Se tomaron muestras de sangre y heces de cada animal antes de su entrada a las parcelas contaminadas con metacercarias y después con periodicidad mensual hasta noviembre. Las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta que se utilizaron para la determinación de los niveles de anticuerpos frente a *F. hepatica*.

Técnicas parasitológicas

Para determinar el número de huevos de *F. hepatica* por gramo de heces (h.p.g.), se analizaron por duplicado las muestras de heces mediante sedimentación directa y se utilizaron las cámaras de McMaster para el recuento final.

Para determinar las cargas parasitarias se examinaron los canales biliares y las vesículas de los hígados de los animales sacrificados y se recuperaron todas las fasciolas.

Los niveles séricos de anticuerpos IgG específicos frente a *F. hepatica* se determinaron por ELISA indirecto utilizando como antígeno productos de excreción-secreción de *F. hepatica*. El antígeno se obtuvo a partir de fasciolas adultas vivas recogidas de hígados de vacas sacrificadas en matadero. Después de 3 lavados en tampón fosfato salino estéril (PBS), pH 7.5, las fasciolas se incubaron a 37°C durante 3 horas en PBS al que se añadió una mezcla antibiótica (25 Mg/ml de ampicilina y 30 Mg/ml de cloranfenicol) y un inhibidor de proteasas (PMSF 0.5 mM). El medio se centrifugó a 40000 g durante 50 minutos a 4°C y una vez obtenido el sobrenadante se determinó la concentración proteínica mediante el kit comercial BCA* y se liofilizó hasta su uso.

La prueba ELISA se realizó según lo descrito por Sánchez-Andrade *et al.*⁷ Se utilizaron placas de polietileno tereftalato glycol** que se tapizaron con 100 μl /pocillo de antígeno a una concentración de 7 mg/ μl y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Después de dos lavados con tween 20 al 0.1% en PBS (PT), los pocillos se bloquearon con leche en polvo descremada al 1% en PT durante 2 horas a 37°C . Los sueros se diluyeron 1:20 en tampón de bloqueo. El anticuerpo de conejo frente

* Pierce.

** Costar Fast-Binder.

a IgG bovina conjugado con peroxidasa (RaB/IgG/(H+L)/PO)* se diluyó 1/1050 en tampón de bloqueo. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1 hora. Como sustrato se utilizó Ortho-phenylene-diamine al 0.1% en tampón citrato (pH 5) y se incubó en presencia de agua oxigenada al 30% durante 15 minutos a 25°C y en oscuridad. La reacción se frenó añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 3N. La lectura de las densidades ópticas se realiza a 450 nanómetros en un lector automático de microplacas.** Todos los sueros se analizaron por duplicado.

En los 24 muestreos realizados durante el estudio, las absorciones de los sueros testigo variaron entre 0.10 y 0.36, con una media de 0.22 (SD= 0.06, N= 168). Teniendo en cuenta estos datos previos, se consideró que el ELISA podía estimarse como positivo para el diagnóstico de la infección por *F. hepatica* cuando la densidad óptica (D.O.) del suero fuera igual o superior a 0.40 ($\bar{x} + 3SD$).

Resultados

Seguimiento de la respuesta anticuerpo de los grupos de animales experimentales

Como puede apreciarse en la Figura 2, los resultados de las absorciones medias de los sueros del grupo testigo (G-T) fueron uniformes, mediante análisis de varianza se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.53$) entre los valores hallados en los diferentes muestreos. Por el contrario, las densidades ópticas de los 3 grupos infectados fluctuaron significativamente ($P = 0.0001$).

En las 24 semanas siguientes a la primoinfección, en los animales del G-1 la densidad óptica (D.O.) aumentó progresivamente desde la octava semana posinfección (spi); asimismo, en los del G-3 se apreció la misma tendencia hasta que se efectuó el tratamiento a las 12 spi.

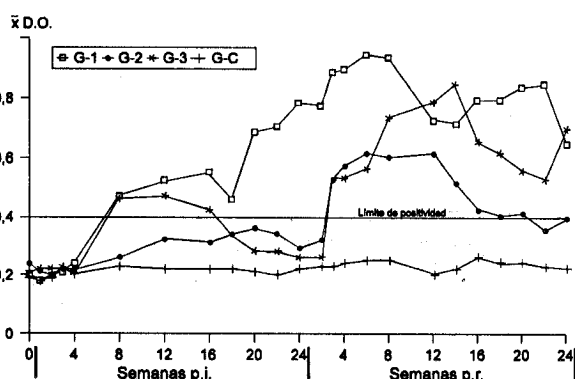


Figura 2. Evolución de las absorciones medias después de la primoinfección y reinfección con metacercarias de *F. hepatica* y tras la administración de las dos pautas de tratamiento.

* Nordic Immunology Dynatec MR 700.

** Dinattec MR 700.

Al examinar por separado cada uno de los sueros de los animales del G-3 (Cuadro 1 a) se observó que durante las 6 semanas siguientes al tratamiento y eliminación de las fasciolas, la especificidad del inmunodiagnóstico fue baja (57%), ya que 3 de los 7 animales dieron absorciones consideradas como positivas.

En los animales tratados para eliminar las fases inmaduras de *F. hepatica* (G-2), se observó un pequeño incremento de la absorción media entre las 12 y las 20 spi, esto último se justifica porque 3 animales tuvieron absorciones positivas desde las 9 semanas postratamiento (Cuadro 1 b). A partir de las 15 semanas postratamiento (spt) en estos 3 animales también se observaron huevos de *F. hepatica*.

En las 24 semanas siguientes a la reinfección, en las terneras del G-1 (Figura 2), la D.O. media aumentó ligeramente durante las 6 semanas posreinfección (spr), hubo un ligero descenso a las 12 spr y posteriormente los valores de absorción se mantuvieron constantes hasta las 22 spr. En los animales del G-3 la D.O. aumentó rápidamente entre las 4 y 14 spr para posteriormente descender.

Al comparar los resultados por ELISA y coprología, en las 24 spi se observó (Figura 3) que únicamente los animales infectados y no tratados (G-1) eliminaron huevos de *F. hepatica* a partir de la duodécima spi, mientras que en la octava spi, 85.7% ya eran positivas por ELISA.

Después de la reinfección, se comprobó que todos los animales del G-1 (Figura 4 a) fueron positivos por ELISA entre las 2 y las 24 spr. A partir de las 10 spr todas las terneras eliminaron huevos en algún momento del ensayo, aunque de forma intermitente, por lo que el porcentaje de animales con coprologías positivas osciló entre 28.6% y 85.7%.

En los animales del G-3 (Figura 4 b) a las 4 spr se detectaron absorciones positivas en 85.7% de las terneras y todas fueron positivas desde la sexta spr,

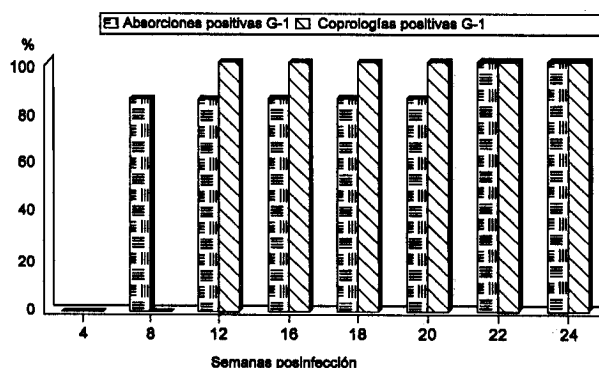


Figura 3. Porcentaje de animales (G1) diagnosticados por ELISA y coprología durante las 24 semanas siguientes a la primoinfección experimental.

Cuadro 1
VALORACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

<i>a) Animales diagnosticados positivos tras el tratamiento a las 12 semanas posinfección (G-3)</i>									
Semanas									
postratamiento		4	6	8	10	12			
ELISA		3	3	0	0	0			
Coprología		0	0	0	0	0			
<i>b) Animales diagnosticados positivos tras el tratamiento a las 3 semanas posinfección (G-2)</i>									
Semanas									
postratamiento	1	5	9	13	15	17	19	21	
ELISA	0	0	3	3	2	2	1	1	
Coprología	0	0	0	0	3	3	0	1	
<i>c) Animales diagnosticados positivos tras el tratamiento a las 3 semanas posreinfeción (G-2)</i>									
Semanas									
postratamiento	1	5	9	11	13	15	17	19	21
ELISA	5	7	7	7	4	4	2	3	4
Coprología	0	0	0	1	3	2	2	-	0

mientras que por coprología hasta las 14 spr no se detectó 100% de los animales infectados.

Tras el segundo tratamiento, todos los animales del G-2 tuvieron absorciones positivas entre las 5 y 11 spr. (Cuadro 1 c); por el contrario, sólo una ternera de ese grupo eliminó huevos de *F. hepatica* a las 11 spt. En los muestreos posteriores otros 3 animales eliminaron huevos de forma intermitente. La seroprevalencia descendió a partir de las 13 semanas postratamiento.

Los resultados de las necropsias evidenciaron que todas las terneras sacrificadas tenían fasciolas en sus hígados, lo que confirmó las ventajas de sensibilidad del inmunodiagnóstico sobre la coprología. Los animales tratados una sola vez (G-3), tuvieron más fasciolas (21-135, \bar{x} = 95) que los tratados 2 veces (2-12, \bar{x} = 7) e incluso que los no tratados (4-42, \bar{x} = 18)

Infeción natural

Las novillas comenzaron a eliminar huevos de *F. hepatica* en agosto (Figura 5), mientras que los resultados de ELISA ya mostraron que en febrero y marzo, 10% tenían absorciones positivas. A partir de abril todas las novillas fueron positivas por ELISA, mientras que, en agosto, por coprología sólo lo eran 60% y no fueron todas positivas hasta noviembre.

Respecto del nivel de anticuerpos (Figura 5) se confirmaron 2 máximos de los valores de absorción media, uno entre marzo y mayo y otro en junio y agosto. En todos los muestreos, las cifras de h.p.g. eliminadas fueron muy pequeñas, no pudiendo establecer correlación estadística entre las absorciones y las cifras de h.p.g.

Discusión

En la mayoría de las terneras infectadas experimentalmente se detectaron anticuerpos específicos por ELISA ya a las 8 spi, lo que coincide con lo observado por otros autores.^{3,4,8} Con ELISA se detectaron los animales positivos con 4 semanas de adelanto respecto del diagnóstico coprológico, aunque hubo algunas excepciones porque en una de las terneras no se detectaron anticuerpos hasta las 22 spi. Esto concuerda con lo descrito por diversos autores,^{4,9,10,11} quienes comprobaron algunos animales infectados de forma natural y con coprologías positivas eran negativos por ELISA.

La técnica ELISA resultó especialmente ventajosa cuando se aplicó en animales reinfecidos, puesto que todas las terneras reinfecidas y no tratadas ya eran positivas por ELISA a las 6 spr, lo que supuso un adelanto de 8 semanas respecto del diagnóstico coprológico. Además, la eliminación de huevos fue escasa y los porcentajes de animales con coprologías positivas variaron considerablemente en los diferentes muestreos, de modo que para que el diagnóstico coprológico sea fiable se requiere repetir los muestreos. Por el contrario, la prevalencia de animales seropositivos fue alta y constante, por lo que el inmunodiagnóstico permite reducir el número de muestras necesarias a tomar por rebaño.

En la bibliografía no se ha encontrado estudios que comparen la sensibilidad de ELISA con la coprología en bovinos reinfecidos experimentalmente; sin embargo, en rebaños infectados de forma natural por *F. hepatica* otros autores^{4,10,12,13} habían señalado que ELISA

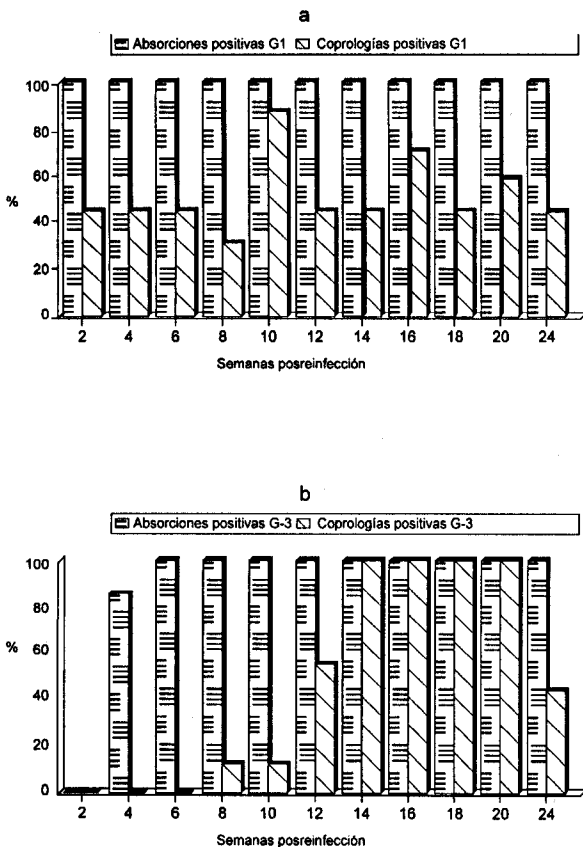


Figura 4. Porcentaje de animales a-G-1 y b-G-3 diagnosticados por ELISA y coprología durante las 24 siguientes a la reinfección experimental.

daba mayores índices de prevalencia; aunque no pudieron constatar infecciones individuales de los animales.

Cuando se reinfectaron las terneras, los valores de absorción aumentaron poco, lo que coincide con lo hallado por Boulard *et al.*⁹ y Clery *et al.*¹⁴ cuando reinfectaron experimentalmente vacas previamente infectadas de forma natural. Por el contrario, en las terneras del G-3, tratadas a las 12 spi, y que cuando se reinfectaron eran negativas por ELISA y coprología, la D.O. aumentó bruscamente; de ello se puede deducir que, en animales previamente sensibilizados, el establecimiento de nuevas infecciones representa incrementos apreciables de la D.O. Además, en los animales del G-3, el periodo de persistencia de los anticuerpos específicos (6 semanas) coincidió con el obtenido mediante hemoaglutinación pasiva por Levieux *et al.*¹⁵ además, se comprobó mediante coprología o necropsia que las terneras de este grupo tenían cargas parasitarias mayores.

En algunos animales tratados a las 3 spi y 3 semanas después de la reinfección (G-2), entre las 13 y 15 spt los valores de absorción fueron negativos. No obstante, de los 3 animales sacrificados al final del estudio, los dos que tenían cargas parasitarias mayores (6 y 12 *F. hepatica*) mantuvieron valores de absorción positivos, mientras que el animal con D.O. negativa, tenía el

número más bajo (2) de fasciolas. El hecho de que las absorciones se reduzcan hasta ser negativas cuando las cargas parasitarias son muy bajas, podría explicarse si se tiene en cuenta que según Hughes *et al.*,¹⁶ el estímulo antigénico inducido por *F. hepatica* disminuye cuando ésta se establece definitivamente en los conductos biliares.

En los animales con infección natural las cifras de eliminación de huevos fueron siempre bajas, siendo muy similares a las halladas en animales de granjas de la zona.^{17,18} Al comparar los resultados obtenidos por coprología y ELISA, con el último método se detectaron títulos de anticuerpos positivos entre 4 y 6 meses antes de la eliminación de huevos.

Se debe señalar que 70% de los animales tuvieron absorciones positivas en marzo, 8 semanas después de la probable ingestión de metacercarias, lo que coincide con los resultados de las terneras infectadas experimentalmente. Las absorciones superaron a las de las terneras primoinfectadas, siendo similares a los encontrados después de la reinfección experimental, esto último resulta lógico, si se tiene en cuenta que en la naturaleza los animales se reinfectan con metacercarias de modo gradual y, por tanto, los valores de la D.O. se mantienen altos en las infecciones naturales, mientras que en terneros infectados experimentalmente una sola vez y posteriormente estabulados, las D.O. descienden a partir de las 28 spi.³

Al considerar el periodo de prepatencia de *F. hepatica*, los animales ya deberían eliminar huevos a partir de abril; pero como sólo alcanza el estado adulto un pequeño porcentaje de las metacercarias ingeridas,¹⁹ es probable que el número de adultos fuese muy pequeño. Por el contrario, la alta sensibilidad de ELISA permitió detectar un incremento de las absorciones entre marzo y mayo. Probablemente, como consecuencia de la mayor ingestión de metacercarias en mayo, las cifras de D.O. aumentaron de nuevo a partir de junio, lo que coincide con lo observado en diferentes regiones de España.^{18,20}

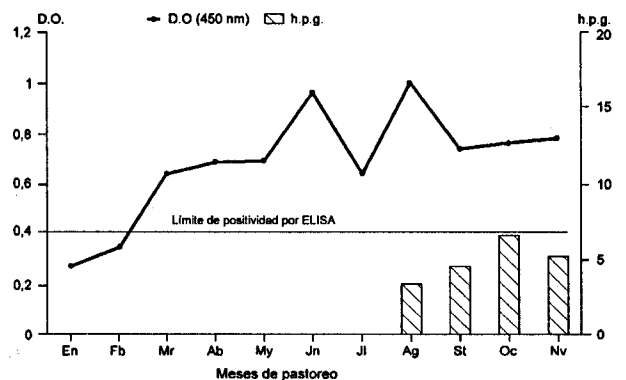


Figura 5. Evolución anual de las cifras medias de densidad óptica y h.p.g. en novillas infectadas de forma natural.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la técnica inmunoenzimática ELISA indirecta (usando como antígeno los productos de excreción-secreción de *F. hepatica*) resulta más temprana y sensible que la coprología en el diagnóstico de la fasciolosis bovina experimental, sobre todo en animales reinfectados con eliminación muy escasa de huevos. Además, a partir de la sexta spt, permite valorar la eficacia de los tratamientos realizados durante el periodo de prepatencia.

Por otra parte, con el umbral de positividad establecido (punto de corte = 0.4), la técnica ELISA permite el diagnóstico precoz y fiable de la fasciolosis bovina adquirida de forma natural. Las infecciones por *Ostertagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Moniezia*, parásitos muy frecuentes en esta región, no interfirieron en el diagnóstico de fasciolosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con el proyecto de investigación INIA número SC93-095(I+D). Agradecemos la colaboración técnica de los doctores Adolfo Paz Silva y Ceferino López Sánchez (Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria, de Lugo, España).

Referencias

- Dargie JD. The impact on production and mechanism of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *Int J Parasitol* 1987;17:453-463.
- Mage C. Epidémiologie, conséquences économiques et traitement de la grande douve. Symposium de Parasitologie; 1990 octubre 2-3; París, Francia. París, Francia: Arkovet Ciba-Geigy, 1990: s/n.
- Hillyer GV, Sanchez Z, Leon de D. Immunodiagnosis of bovine fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation methods. *J Parasitol* 1985;71:449-454.
- Itakagi T, Ohta N, Hosaka Y, Iso H, Konishi M, Chinone S, Itagaki H. Diagnosis of *Fasciola* sp. infections in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay. *Jpn J Vet Sci* 1989;51:757-764.
- Pfister K, Daveau Ch, Ambroise-Thomas P. 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. *Res Vet Sci* 1984;37:39-43.
- Sinclair IJ, Wassal DA. Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Vet Parasitol* 1988;27:283-290.
- Sanchez-Andrade R, Morrondo P, Lopez C, Panadero R, Díez P. Evaluation of *Fasciola hepatica* infection prevalence in cattle in Galicia (Northwest Spain) by enzyme linked immunosorbent assay. *Res Rev Parasitol* 1995;55:1-5.
- Marín MS. Epizootiología de la fasciolosis bovina en Asturias. Identificación y expresión de un antígeno unitario (tesis). Oviedo, España: Fac Biol, Univ Oviedo, 1992.
- Boulard Ch, Régnault A. L'immunodiagnostic de la fasciolose bovine par la technique ELISA. *Bull Group Tech Vet* 1989;89:59-68.
- Hillyer GV, Soler-de Galanes M, Buchón P, Bjorland J. Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Altiplano of Bolivia. *Vet Parasitol* 1996;61:211-220.
- Welch RD, Smith PH, Malone JB, Holmes RA, Geaghan JP. Herd evaluation of *Fasciola hepatica* infection levels in Louisiana cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1987;48:345-347.
- Boulard Ch, Bouvry M, Argente G. Comparaison de la détection des foyers de fasciolose par test ELISA sur lactosérum et sérum et par coproscopie. *Ann Rech Vét* 1985;16:363-368.
- Martignoni L, Mage C, Reynal PH. Prevention de l'infestation des bovins par *Fasciola hepatica* avec le triclabendazole. *Rev Med Vét* 1995;146:413-420.
- Clery D, Torgerson P, Mulcahy G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 1996;62:71-82.
- Levieux D, Levieux A, Mage C, Garel JP. Immunological detection of chemotherapeutic success in bovine fasciolosis using specific antigen f2. *Vet Parasitol* 1992;45:81-88.
- Hughes DL, Hanna REB, Doy TG. Antibody response in cattle, sheep and rats to infection with gamma irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci* 1982;32:354-358.
- Díez P, Sánchez-Andrade R, Morrondo P. Estudio epidemiológico de la fasciolosis bovina en Galicia. Comunicaciones del I Congreso Ibérico de Parasitología; 1989 septiembre 25-29; Cáceres, España. Cáceres, España: Caja de Ahorros de Salamanca, 1989:124.
- Morrondo P, Sanchez-Andrade RM, Díez P, Perez L, Lopez C. Dynamics of *Fasciola hepatica* egg elimination and *Lymnaea truncatula* populations in cattle farms in Galicia (North-West Spain). *Res Rev Parasitol* 1994;54:47-50.
- Boch J, Supperer R. Parasitología en medicina veterinaria. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur, 1982.
- Luzon M, Rojo FA, Gomez M. Overwintering of *Fasciola hepatica*: comparative resistance according to the larval stage and degree of development. VI European Multicolloquium of Parasitology; 1992 September 7-11; The Hague, Netherlands. The Hague, Netherlands: Netherlands Society for Parasitology, 1992:219.