

Fasciolosis caprina: estudio comparativo de infecciones crónicas experimentales

pR 7, núm.2: 8-17 (2006)

J. PÉREZ¹, R. ZAFRA¹, R.A. PÉREZ-ÉCIJA¹, L. BUFFONI², F.J. MARTÍNEZ-MORENO², A. MARTÍNEZ-MORENO²¹ Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas² Departamento de Sanidad Animal (Parasitología)

Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, 14014 Córdoba

Tel. 957 218178 · e-mail: an1pearj@uco.es

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis causada por *F. hepatica* es una parasitosis que causa importantes pérdidas económicas en la ganadería de ruminantes (bovinos, ovinos y caprinos). La adquisición de resistencia frente a reinfecciones y la respuesta inmune frente al parásito son muy diferentes en las distintas especies (Haroun and Hillyer, 1986). Así, en el ganado vacuno se ha demostrado cierto nivel de resistencia a reinfecciones (Hoyle y cols., 2003). Sin embargo, la oveja y la cabra son muy sensibles tanto a la infección natural como experimental por *F. hepatica* (Haroun and Hillyer, 1986; Reddington *et al.*, 1986; Martínez-Moreno *et al.*, 1997).

La prevalencia de la fasciolosis ovina y caprina en España es muy variable de unas regiones a otras, dependiendo principalmente de varios factores como la humedad. Así en regiones húmedas como Galicia se han descrito recientemente prevalencias en ovejas de hasta un 83%, con hasta un 59,5% de fasciolosis activas (Paz-Silva y cols., 2003), mientras que en áreas secas de Andalucía se detectó fasciolosis caprina en un 3% de los animales testados (Martínez y cols., 1996).

El control de la fasciolosis en ruminantes se basa en la actualidad en el uso de antihelmínticos y medidas de manejo. Debido a la aparición de resistencias frente a los antihelmínticos de mayor uso durante los últimos años (Moll y cols., 2000; Coles y cols., 2005), así como a las directivas comunitarias sobre los residuos medicamentosos en productos de origen animal, existe un gran interés en el desarrollo de vacunas eficaces para el control de la enfermedad (Dalton y Mulcahy, 2001; Dalton y cols., 2003). En la especie ovina se han realizado numerosos estudios encaminados a

evaluar la eficacia inmunoprotectora de diversos antígenos (Mulcahy y Dalton, 2001; Almeida y cols., 2003; Dalton y cols., 2003; Wedrychowicz y cols., 2003), así como los mecanismos de la respuesta inmune frente a la infección (Chauvin *et al.*, 1995; Meeusen *et al.*, 1995; Chauvin y Boulard, 1996). Por el contrario, en la especie caprina se han realizado un menor número de estudios. En el presente trabajo describimos los hallazgos clínico-lesionales, así como la respuesta inmune de cabras a infección experimental crónica por *F. hepatica*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Infecciones experimentales

Para el presente estudio se han utilizado 25 cabras de raza Serrana de unos 8 meses de edad aproximadamente. Los animales fueron examinados al comenzar la experiencia y no mostraron signos clínicos de enfermedad infecciosa o parasitaria, siendo el análisis parasitológico fecal negativo. Los animales fueron agrupados en cinco grupos

de cinco animales cada uno. Las pautas de las infecciones experimentales se muestran en la Tabla 1. El grupo 5 fue utilizado como control no infectado. Las metacercarias [mc] fueron administradas oralmente mediante cápsulas de gelatina, se usaron mc comerciales (Central Veterinary Laboratory, Webridge). Las cabras del grupo 1 (infección primaria única) fueron infectadas con 200 mc. Los animales del grupo 2 (infección primaria múltiple) fueron infectadas con 4 dosis semanales de 50 mc. Las cabras del grupo 3 (infección secundaria) fueron infectadas con 4 dosis semanales de 50 mc y reinfectadas a las 8 semanas postinfección (SPI) con una dosis de 200 mc. Las cabras del grupo 4 (infección secundaria) fueron infectadas con 200 mc al inicio del experimento, y reinfectadas con 4 dosis semanales de 50 mc entre las 8 y la 11 SPI. Las cabras de todos los grupos fueron sacrificadas mediante inyección intravenosa de thiobarbital [T61] entre las 53 y 55 semanas post-infección (SPI). Como consecuencia de la enfermedad 3

Tabla 1. Detalles de las infecciones experimentales con *F. hepatica*.

Grupo	Número de mc* administrados en la semana indicada								Nº total De mc*	Nº medio de fasciolas recuperadas [% implantación]	Longitud media de fasciolas (mm)
	1	2	3	4	8	9	10	11			
1	200	-	-	-	-	-	-	-	200	41,8 (20,9)	31,1
2	50	50	50	50	-	-	-	-	200	48,4 (24,3)	25,3
3	50	50	50	50	200	-	-	-	400	80,8 (19,7)	26,53
4	200	-	-	-	50	50	50	50	400	83 (20,1)	27,1
5	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0 (0)	0

* mc: metacercarias.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

cabras murieron en el grupo 2 (a las 26, 27 y 39 SPI), otras 3 murieron en el grupo 3 (a las 12, 15 y 28 SPI), y otras tres en el grupo 4 (a las 21, 22 y 34 SPI). Todos los animales fueron necropsiados y se recogieron muestras de hígado (lóbulo izquierdo y derecho) y nódulos linfáticos hepáticos. Parte de estas muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10%, procesadas rutinariamente e incluidas en parafina. Otra parte de las muestras fueron fijadas por congelación en 2-metil butano (Merk, Darmstadt, Alemania) enfriado en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta que se realizaron cortes seriados de 7 μ m de grosor en un criostato a -20°C.

Estudio clínico y parasitológico

La repercusión clínica de la infección se estudió durante las 25 primeras SPI. Cada semana, todos los animales fueron examinados para detectar signos clínicos de la enfermedad y se tomaron muestras de sangre para el estudio biopatológico. Se determinaron los niveles séricos de los enzimas hepáticos Gamma-Glutation Transferasa (GGT) y Lactato De Hidrogenasa (LDH) mediante un analizador espectrofotométrico de química seca Ektakchem DT60 II (Kodak, Alemania).

Se recogieron también muestras fecales de cada animal todas las semanas y se realizaron exámenes coprológicos mediante la técnica de sedimentación. En la necropsia, se diseccionó cuidadosamente el hígado y la vesícula biliar y se recogieron todas las fasciolas, que se midieron después de ser fijadas por los métodos habituales.

Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Para el estudio histopatológico se emplearon las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 μ m de grosor en un microtomo que fueron teñidos con las técnicas de Hematoxilina-eosina (HE), Giemsa, ácido periódico de Schiff (PAS) y tricrómico de Masson para fibras colágenas.

Para el estudio inmunohistoquímico se emplearon muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (anticuerpos CD3, CD79a, IgG), mientras que para el resto de anticuerpos monoclonales se utilizaron las muestras fijadas por congelación. Se empleó la técnica inmunohistoquímica de avidina-biotina-peroxidasa (ABC) descrita previamente (Pérez y cols., 1998, 1999). Los anticuerpos primarios empleados, diluciones, tratamientos de desensambramiento antigénico y las casas comerciales de los anticuerpos se detallan en la tabla 2. Como anticuerpos secundarios se emplearon anti-inmunoglobulinas de conejo biotinado (Vector, Burlingame, USA) y anti-inmunoglobulinas de ratón biotinado (Dako). Como reactivo terciario se usó el complejo ABC (Vector). El cromógeno empleado fue 3 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma). Todos los cortes fueron lavados y contrateñidos con hematoxilina, los cortes de muestras fijadas en formol fueron deshidratados y montados con DPX, mientras que los cortes de muestras fijadas por congelación fueron montadas en medio de montaje no acuoso. Como controles negativos se emplearon cortes seriados en los que los

anticuerpos primarios fueron sustituidos con suero no inmune de ratón o cabra.

Para la valoración de los resultados se realizaron recuentos de las células marcadas con cada anticuerpo en áreas de 0,02 mm² seleccionadas al azar en los cortes histológicos de hígado, se contaron un total de 20 áreas por animal. Los resultados fueron expresados en número de células por campo de 0,02 mm² de la siguiente forma:

+/-, 0-1; +, 1-10; ++, 10-20; +++, 20-30; +++++, > 30.

RESULTADOS

Desarrollo de la infección

Huevos de *F. hepatica* aparecieron en las heces de todos los animales infectados entre las 9 y 13 SPI y se mantuvieron hasta el final de la experiencia. Los mayores recuentos se encontraron a las 24-25 SPI en los grupos 1 y 2 (870 y 910 huevos por gamo de heces). No se encontraron huevos en las heces del grupo 5.

Las cargas parasitarias medias de cada grupo, según los recuentos obtenidos en las necropsias, se ofrecen en la Tabla 1. Las fasciolas recuperadas de cada grupo se midieron y no se encontraron diferencias significativas en el tamaño medio de todos los grupos, aunque el porcentaje de fasciolas mayores de 30 mm era mayor en el grupo 1 que en los otros grupos.

Aspectos clínicos

Apenas se apreciaron signos clínicos durante el desarrollo de la experiencia. Sólo en animales aislados de los grupos infectados se encontraron signos de anemia (palidez de mucosas) y menor crecimiento (con diferencia de peso significativa sobre los controles).

La evolución de las enzimas hepáticas durante la infección se muestra en la gráfica 1. Los niveles séricos de GGT estu-

Tabla 2. Detalles de los anticuerpos, tratamientos y diluciones de los anticuerpos empleados en el estudio.

Anticuerpo	Especificidad	Clon	Tratamiento	Dilución	Fuente
CD2	Pan T	BA095A	No	1:200	VMRD
CD3	Pan T	Policlonal	Pronasa*	1:200	Dako
CD4	CD4	GC50A1	No	1:50	VMRD
CD8	CD8	CACT80C	No	1:200	VMRD
TCR-1	$\delta\gamma\geq$	CACTB6A	No	1:200	VMRD
CD79a	Pan B	HM57	Microondas**	1:20	Dako
B-B4	IgM	BA0155A	No	1:800	VMRD
IgG	IgG	Policlonal	Pronasa	1:2000	Dako

* Pronasa 0.1% 10 min;

** Tampón citrato 0.01 M, pH 6.0, 7 min en microondas; VMRD Pullman Inc. (Pullman, USA); Dako, Glostrup, Dinamarca.

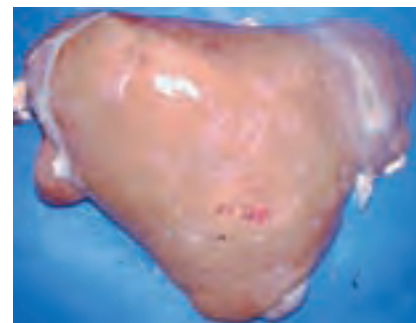


Figura 1. Grupo 1, superficie diafrágica del hígado mostrando un moderado número de trayectos blanquecinos en la superficie.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

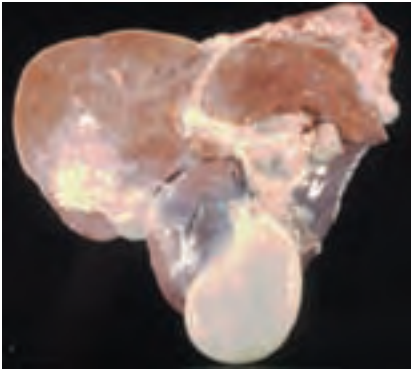


Figura 2. Grupo 3, superficie visceral de hígado mostrando un severo engrosamiento de conductos biliares y vesícula biliar.



Figura 3. Grupo 3, superficie de corte del lóbulo izquierdo hepático mostrando amplias áreas irregulares de coloración blanquecina-amarillenta.

vieron significativamente elevados desde la semana 9 a la 16 PI, encontrándose, entre las 11 y 15 SPI, valores mayores (con significación estadística) en los grupos 3 y 4, que albergaron mayores cargas parasitarias. El comportamiento de la LDH fue diferente en los grupos infectados y reinfectados. Durante la infección primaria se alcanzó un pico a las 10 SPI, produciéndose después un descenso progresivo, aun con valores mayores que los del grupo control. En las infecciones secundarias, el pico inicial (11 SPI) fue más elevado que en el grupo 1 primoinfectado y además se observaron otras elevaciones significativas a las 16 SPI (grupo 2), 18, 21 y 24 SPI (grupos 3 y 4).

Lesiones macroscópicas

Las cabras del grupo 3 que murieron a las 12 y 15 SPI mostraron lesiones hepáticas características de fasciolosis crónica y aguda; las primeras también se encontraron en el resto de cabras infectadas experimentalmente, mientras que las segundas consistieron en perihepatitis fibrinosa severa y numerosos trayectos sinuosos hemorrágicos sobre la superficie del parénquima hepático, principalmente en el lóbulo izquierdo.

Todas las cabras infectadas mostraron lesiones hepáticas características de fasciolosis crónica, estas lesiones se resumen en la Tabla 2. En general, las lesiones hepáticas eran moderadas en las cabras del grupo 1 (Figura 1) y severas o muy severas en las de los otros tres grupos infectados (Figuras 2 y 3). Lo más llamativo fue la presencia de una severa perihepatitis fibrinosa afectando principalmente al lóbulo izquierdo, y mostrando numerosos trayectos irregulares de color blanquecino o blanco-amarillento sobre la superficie hepática. Los conductos biliares de la superficie visceral del órgano mostraban engrosamiento moderado (grupo 1) o severo (grupos 2, 3 y 4) con coloración blanquecina. La vesícula biliar presentaba distensión moderada (grupos 1 y 2) o severa (grupos 3 y 4). Al abrir tanto conductos biliares mayores como vesícula biliar, fluía un material viscoso y de color marrón-rojizo, junto a variable cantidad de Fasciolas adultas. La superficie de corte del hígado mostraba áreas de tamaño y forma variables y coloración blanquecina o blanco-amarillenta, particularmente en el lóbulo izquierdo.

Los nódulos linfáticos hepáticos mostraron un marcado aumento de tamaño en todos los animales infectados en relación al grupo control. Algunos animales del grupo 3 y 4 mostraron moderado edema en la porción ventral del cuello y mandíbula, aunque este no fue un hallazgo generalizado.

Lesiones microscópicas

Las cabras del grupo 3 que murieron a las 12 y 15 SPI mostraron túneles ocupados

por fibrina, sangre, detritus celulares y, en ocasiones, larvas de Fasciola (Figura 4). Estos túneles eran rodeados por un tejido de granulación con variable infiltrado de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, siendo moderado el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas.

Todas las cabras infectadas mostraron lesiones microscópicas típicas de fasciolosis crónica, las diferencias entre grupos se detallan en la Tabla 3. Estas lesiones consistieron en trayectos irregulares constituidos por abundantes macrófagos cargados con hemosiderina, acompañados por escasa fibrosis e infiltrado linfoplasmocitario (trayectos crónicos). Los espacios porta mostraban fibrosis e hiperplasia de conductos biliares severas (grupo 1) o muy severas (grupos 2, 3 y 4). A nivel intraepitelial se observó moderado infiltrado de leucocitos globulares en todos los grupos infectados. Tanto en espacios porta como en el parénquima hepático se observaron granulomas moderados (grupo 1) o numerosos (grupos 2, 3 y 4) con centro acidófilo constituido por detritus celulares y rodeado por macrófagos y células gigantes multinucleadas, y más periféricamente por fibrosis y variable infiltrado linfoplasmocitario. En espacios porta, en los trayectos crónicos y en la periferia de los granulomas se observó un infiltrado de eosinófilos discreto (grupo 1) o moderado (grupos 2, 3 y 4). El infiltrado de linfocitos y células plasmáticas varió de severo (grupo 1) a muy severo en los grupos 2, 3 y 4 (Figura 4), y se localizó principalmente en espacios porta y periferia de los granulomas, formando a veces folículos

Tabla 3. Resumen de las lesiones hepáticas en los grupos de ovejas y cabras infectados y control.

Lesiones	Grupos				
	1	2	3	4	5
Trayectos crónicos	++	+++	+++	+++	-
Fibrosis Portal	++	+++	+++	+++	-
Hiperplasia ductal	++	+++	+++	+++	-
Hipertrofia RE liso	-	+	+	+	-
Granulomas	+	+++	+++	+++	-
Eosinófilos	±	+	+	+	-
Leucocitos globulares	+	+	+	+	-
Linfocitos y células plasmáticas	++	+++	+++	+++	-

-: ausencia, ±: discreto, +: moderado, ++: severo, +++: muy severo.

RE: retículo endoplásmico.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN



Figura 4. Grupo 3, túnel migratorio en el que se aprecia una larva de *F. hepatica* rodeada por abundantes detritus celulares y hemorragias. Hematoxilina-eosina, x25.

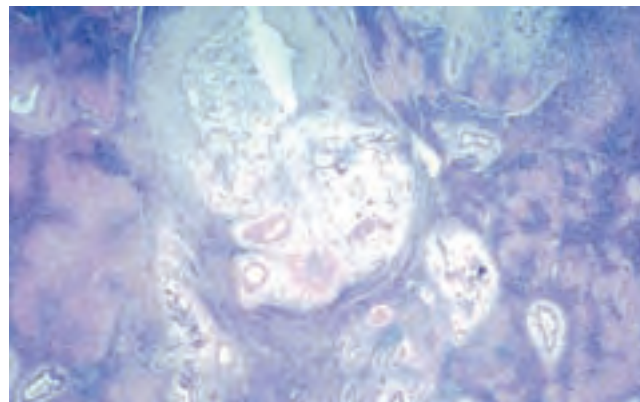


Figura 5. Grupo 3, espacio porta mostrando hiperplasia de canaliculos biliares y severo infiltrado inflamatorio que desplaza al parénquima hepático. Hematoxilina-eosina, x25.

linfoides. En varias de las cabras de los grupos 2, 3 y 4 se observó moderada a severa hipertrofia de retículo endoplásmico liso. Los nódulos linfáticos hepáticos mostraron moderada a severa hiperplasia de folículos linfoides y cordones medulares, particularmente en el grupo 1, mientras que las áreas paracorticales mostraron hiperplasia más discreta. En algunos animales presentaron hemorragias focales, macrófagos cargados de hemosiderina e infiltrado de eosinófilos.

Poblaciones y subpoblaciones celulares

Los anticuerpos CD2 y CD3 (marcadores pan T) reaccionaron con numerosos linfocitos de las lesiones hepáticas, particularmente en los grupos 3 y 4. Los linfocitos CD4⁺ fueron escasos en todos los grupos analizados. En cambio los linfocitos CD8 fueron más abundantes, particularmente en los grupos 3 y 4. Los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺ fue-

ron ocasionales en los grupos 1 y 2 y escasos en los grupos 3 y 4. Respecto al infiltrado de células B, el anticuerpo CD79a [marcador pan B] B-B4 [marcador B] e IgG, reaccionaron con un escaso (grupos 1 y 2) a moderado (grupos 3 y 4) infiltrado inflamatorio.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio experimental confirman que las cabras no desarrollan resistencia a la reinfección con *F. hepatica* como demuestran los porcentajes de implantación en los grupos infectados secundariamente (3 y 4), los cuales no diferían significativamente de los primoinfectados (1 y 2). Por otra parte, las infecciones pequeñas y repetitivas, similares a las que ocurren en la infección natural, producían mayor daño hepático que una infección única con el mismo número de metacercarias, así las lesiones

hepáticas en las cabras del grupo 2 [infecciones repetitivas] fueron más severas que las del grupo 1 [infección única]. Además, 3 cabras del grupo 2 murieron durante la experiencia con severas lesiones hepáticas, todos ellos fueron infectados de forma repetitiva. Estos resultados confirman los datos de estudios previos que indicaban la elevada sensibilidad de las cabras a la infección por *F. hepatica* [Reddington et al., 1986; Martínez-Moreno et al., 1997], y sugieren que el parásito podría emplear mecanismos de evasión de la respuesta inmune durante su migración hepática. Aunque la oveja no desarrolla resistencia a reinfecciones, las infecciones pequeñas y repetitivas no producen un aumento de las lesiones tan grave como en las cabras [Pérez y cols., 2002]. La hipertrofia del RE liso de los hepatocitos fue una de las lesiones presentes en las cabras infectadas secundariamente, probablemente debido a la liberación de productos tóxicos por las larvas migratorias. El hecho de que en infecciones pequeñas y repetitivas existen larvas en migración durante un tiempo más prolongado que en infecciones únicas, podría justificar no sólo el mayor daño celular en los hepatocitos en infecciones secundarias, sino también la mayor mortalidad en los grupos infectados secundariamente. Este hecho no se ha observado en infecciones experimentales ovinas [Pérez y cols., 2002], y el ganado vacuno, por el contrario, presenta cierta resistencia a la reinfección, lo que ha sido asociado a un cambio en la respuesta inmune [Hoyle y cols., 2003].

La caracterización de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en las lesiones hepáticas indican una respuesta inmune, tanto de base celular como humoral, en todos los grupos infectados, si bien

Tabla 4. Distribución de las poblaciones celulares marcadas con los siguientes anticuerpos en el hígado de las cabras infectadas con *F. hepatica* y controles no infectadas.

Anticuerpos	Grupos				
	1	2	3	4	5
CD2	++	++	++++	++++	±
CD3	++	++	++++	++++	±
CD4	+	+	+	+	±
CD8	++	++	+++	+++	±
dg	±	±	+	+	±
CD79a	+	+	++	++	±
B-B4	+	+	++	++	+
IgG	+	+	++	++	±

* Número de células por campo de 0,02 mm²:

+/-, 0-1; +, 1-10; ++, 10-20; +++, 20-30; +++++, > 30.

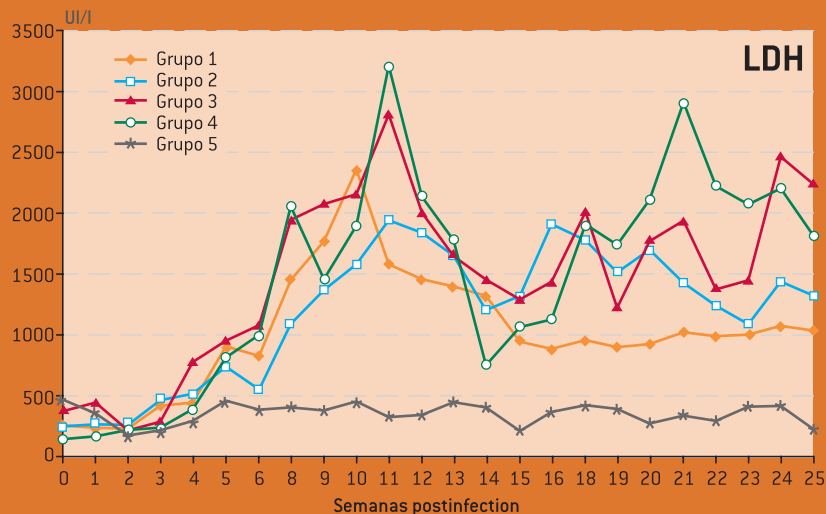
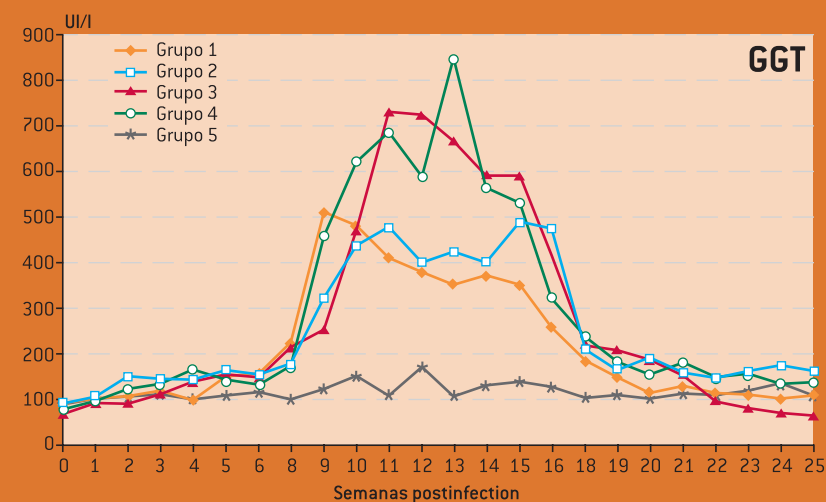
ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN



el infiltrado de la mayoría de las poblaciones celulares fue mayor en la infección secundaria. La determinación de anticuerpos séricos también demostró una marcada respuesta humoral en los grupos del presente estudio (Martínez-Moreno y cols., 1999) y en otros previos (Martínez-Moreno y cols., 1997). A pesar de la severa respuesta inmune local, ésta no produjo ningún efecto protector en infecciones secundarias, confirmando la ausencia de resistencia en la cabra a reinfecciones por *F. hepatica*. En la oveja, la naturaleza del infiltrado inflamatorio tanto en infecciones primarias como secundarias fue similar al encontrado en las cabras del presente estudio. En infecciones crónicas ovinas los linfocitos CD8+ eran más numerosos que en las infecciones agudas, en las que predominaron los linfocitos CD4+ (Meeusen et al., 1995; Chauvin and Boulard, 1996).

El patrón de producción de citoquinas, y por tanto la polarización de respuesta Th1/Th2 no ha sido caracterizada en cabras infectadas con *F. hepatica*. Estos estudios son de interés debido a que en ratas, ratones, vacas y ovejas se ha descrito una respuesta de tipo Th2 en infecciones naturales y experimentales con respuesta no protectora (Mulcahy and Dalton, 2001; O'Neill y cols., 2001; Tliba y cols., 2002), mientras que en algunos ensayos de inmunización mediante ciertos antígenos se ha conseguido un nivel significativo de protección asociado a una respuesta de tipo Th1 (Mulcahy and Dalton, 2001; Cervi y cols., 2004). Los resultados preliminares de ensayos de inmunización llevados a cabo por nuestro grupo en cabras indican cierto nivel de reducción en el número de parásitos (aproximadamente del 30%) respecto a los controles no infectados al usar un péptido sintético de proteínas de ácidos grasos, mientras que los resultados fueron peores al utilizar glutatión-S-transferasa purificada de *F. hepatica* (datos no mostrados). En oveja y vaca se han obtenido niveles de protección de hasta el 72 y 79%, respectivamente mediante inmunización con Catepsinas L1 y L2 recombinantes (Mulcahy y Dalton, 2001). En ovejas y ratones también se obtuvieron elevados niveles de protección con el antígeno recombinante Sm14 de *Schistosoma mansoni* (Almeida y cols., 2003). La inmunización intranasal con vacunas de ADN cíclico codificando cisterna proteinasa indujo niveles de protección entre 61-75% en rata (Wedrychowicz y cols., 2003). Debido a lo prometedor de estos resultados, en la actualidad estamos iniciando varios ensayos vacunales empleando antígenos recombinantes de catepsina L1, tierredoxina-peroxidasa y antígeno rSm14, y de combinaciones de ellos en cabras para evaluar los niveles de protección que inducen frente a infecciones por *F. hepatica*, así como los mecanismos de respuesta inducidos por cada uno de dichos antígenos. Estos trabajos, junto a los que se están desarrollando en oveja y vacas por otros grupos de investigación, podrán contribuir a conseguir una futura vacuna que pueda ayudar al control de la enfermedad en el ganado bovino, ovino y caprino.

Gráfica 1 - Evolución de las enzimas hepáticas GGT (A) y LDH (B) durante la infección experimental. Cada punto representa la media de las cinco cabras del grupo. Grupo 1, infectado primariamente con 200 mtc; grupo 2, reinfectado con 200 mtc (50+50+50+50); grupo 3, reinfectado con 400 mtc (200+50+50+50+50); grupo 4, reinfectado con 400 mtc (50+50+50+50+200) y grupo 5, control no infectado.



AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado con proyectos AGLL2002-02777 del MCYT, y AGR137 de la Junta de Andalucía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.S., TORLONI, H., LEE-HO, P., VILAR, M.M., THAUMATURGO, N., SIMPSON, A.J., TENDLER, M. 2003: Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunol.*, 25:135-137.
- CERVI, L., BORGONOVO, J., EGGA, M., CHIAPELLO, L., MASIH, D. 2004: Immunization of rats against *Fasciola hepatica* using crude antigens conjugated with Freund's adjuvant or oligodeoxynucleotides. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 97: 97-104.
- CHAUVIN, A. Y BOULARD, C. 1996: Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite*, 3: 209-215.
- CHAUVIN, A., BOUVET, G., BOULARD, C. 1995: Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *Int. J. Parasitol.*, 25: 1227-1241.
- COLES, G.C. 2005: Anthelmintic resistance—looking to the future: a UK perspective. *Res. Vet. Sci.*, 78: 99-108.
- DALTON, J.P. Y MULCAHY, G. 2001: Parasite vaccines—a reality? *Vet. Parasitol.*, 98: 149-167.
- DALTON, J.P., NEILL, S.O., STACK, C., COLLINS, P., WALSH, A., SEKIYA, M., DOYLE, S., MULCAHY, G., HOYLE, D., KHAZNADJI, E., MOIRE, N., BRENNAN, G., MOUSLEY, A., KRESHCHENKO, N., MAULE, A.G., DONNELLY, S.M. 2003: *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33:1173-1181.
- HAROUN, E.M. Y HILLYER, G.V. 1986: Resistance to fascioliasis - a review. *Vet. Parasitol.*, 20: 63-93.
- HOYLE, D.V., DALTON, J.P., CHASE-TOPPING, M., TAYLOR, D.W. 2003: Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Vet. Parasitol.* 111: 65-82.
- MARTINEZ-MORENO, A., JIMENEZ-LUQUE, V., MORENO, T., REDONDO, E.S., DE LAS MULAS, J.M., PEREZ, J. 1999: Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet. Parasitol.*, 82: 19-33.
- MARTÍNEZ-MORENO A., MARTÍNEZ-CRUZ M.S., MARTÍNEZ F.J., GUTIERREZ P.N., HERNÁNDEZ S. 1996: Detection of antibodies to *Fasciola hepatica* excretory-secretory antigens in experimentally infected goats by enzyme immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, 62: 247-252.
- MARTÍNEZ-MORENO, A., MARTÍNEZ-MORENO, F.J., ACOSTA, Y., GUTIÉRREZ, P.N., BECERRA, C., HERNÁNDEZ, S., 1997: Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. *Parasitol. Res.*, 83: 680-686.
- MEEUSEN, E., LEE, C.S., RICKARD, M.D. AND BRANDON M.R. 1995: Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite. *Parasite Immunol.*, 17: 37-45.
- MOLL, L., GAASENBEEK, C.P., VELLEMA, P., BORGSTEEDE, F.H. 2000: Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 91: 153-158.
- MULCAHY, G. Y DALTON, J.P. 2001: Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.*, 70: 83-86.
- O'NEILL, S.M., MILLS, K.H., DALTON, J.P. 2001: *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon-gamma production in vivo. *Parasite Immunol.*, 23: 541-547.
- PAZ-SILVA, A., SANCHEZ-ANDRADE, R., SUAREZ, J.L., PEDREIRA, J., ARIAS, M., LOPEZ, C., PANADERO, R., DIAZ, P., DIEZ-BANOS, P., MORRONGO, P. 2003: Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol. Res.*, 91: 328-331.
- PÉREZ J., MARTÍN DE LAS MULAS J., CARRASCO L., GUTIERREZ P.N., MARTÍNEZ-CRUZ M.S., MARTÍNEZ-MORENO A. 1999: Pathological and immunohistological study of the liver and hepatic lymph nodes in goats primarily and secondarily infected with *Fasciola hepatica*. *J. Comp. Pathol.*, 120: 199-210.
- PÉREZ J., MARTÍN DE LAS MULAS J., CHACÓN-M. DE LARA F., GUTIERREZ-PALOMINO P.N., BECERRA-MARTEL C., MARTÍNEZ-MORENO A. 1998: Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 64: 337-348.
- PÉREZ J., ORTEGA J., MORENO T., MORRONGO P., LÓPEZ-SÁNCHEZ C., MARTÍNEZ-MORENO A. 2002: Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.*, 127: 30-36.
- REDDINGTON, J.J., LEID, R.W., WESCOTT, R.B. 1986: The susceptibility of the goat to *Fasciola hepatica* infections. *Vet. Parasitol.*, 19: 145-150.
- TLIBA, O., MOIRE, N., LE VERN, Y., BOULARD, C., CHAUVIN, A., SIBILLE, P. 2002: Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Res.*, 33: 261-270.
- WEDRYCHOWICZ, H., LAMPARSKA, M., KESIK, M., KOTOMSKI, G., MIESZCZANEK, J., JEDLINA-PANASIUK, L., PLUCIENNICZAK, A. 2003: The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 94: 83-93.