



FASCIOLIASIS: SITUACIÓN ACTUAL



TRABAJO FIN DE GRADO
María José Jurado Arjona

Universidad de Sevilla
Facultad en Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO
FASCIOLIASIS: SITUACIÓN ACTUAL

Grado en Farmacia
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla



Autor/a: María José Jurado Arjona

Tipología del trabajo: Revisión bibliográfica

Tutor/a: Rocío Callejón Fernández

Lugar y fecha de presentación: Facultad de Farmacia, septiembre 2020

RESUMEN

Introducción: La fascioliasis es un parasitismo producido por dos trematodos del género *Fasciola*, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. Este parasitismo tiene una especial relevancia en países como Asia, África y América del Sur, sin embargo, se han notificado casos en todos los continentes. **Objetivos:** Revisión del tratamiento del parasitismo y comparación entre los distintos métodos diagnósticos. **Metodología:** Se ha recurrido a diversas fuentes de información como libros, tesis doctorales, bases de datos, revistas y recursos electrónicos. **Resultados y discusión:** Triclabendazol es el tratamiento de elección del parasitismo, aunque debido a su uso masivo se ha notificado la aparición de resistencia. Por ello, en la actualidad se están buscando alternativas terapéuticas, como son Closantel y Oxiclozanida entre otros. En el diagnóstico contamos con métodos parasitológicos, inmunológicos y genético-moleculares. Los métodos parasitológicos resultan muy simples y baratos; no obstante, son laboriosos y su sensibilidad es especialmente baja, lo que obliga a tener que repetir numerosas veces las pruebas para poder obtener resultados fiables. Los métodos inmunológicos se basan en el uso de la técnica de Enzimoimmunoanálisis de Adsorción (ELISA) y estos suponen un aumento de la sensibilidad respecto a los anteriores. Existen dos tipos: ELISA para la detección de anticuerpos, que se considera la técnica más sensible, y ELISA para la detección de antígenos, que se consideran técnicas muy específicas. Los métodos genético-moleculares son los más recientes. Hay que destacar principalmente dos técnicas: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP). Ambas son técnicas de amplificación de material genético y presentan buenos resultados de sensibilidad, aunque, como en el caso de los métodos inmunológicos, presentan el inconveniente de la necesidad de laboratorios con instrumentación especializada. **Conclusiones:** A pesar del gran avance en las técnicas de diagnóstico, muchas zonas endémicas con pocos recursos no pueden acceder a ellas y esto limita enormemente su capacidad diagnóstica.

Palabras clave: *Fascioliasis*, *Fasciola*, Triclabendazol, sedimentación, ELISA, PCR

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Morfología	5
1.2. Ciclo biológico	8
1.3. Vectores	9
1.4. Patología y manifestaciones clínicas	10
1.5. Epidemiología	11
1.6. Profilaxis	12
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGÍA	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Tratamiento	17
4.2. Diagnóstico	19
4.2.1. Métodos parasitológicos.....	19
4.2.2. Métodos inmunológicos.....	23
4.2.3. Métodos genético-moleculares	28
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35

1. INTRODUCCIÓN

La fascioliasis, fasciolosis o distomatosis hepática es un parasitismo producido por dos trematodos del género *Fasciola* (familia Fasciolidae), *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. A estas especies se las conoce vulgarmente como duelas hepáticas (Kelly et al., 2019; Sumruayphol et al., 2020).

Este parasitismo fue considerado hasta el año 1990 un problema en el campo de la veterinaria y la ganadería; pero fue a partir de ese año cuando, debido al aumento de casos en humanos y al registro de las primeras zonas endémicas, la fascioliasis humana empezó a cobrar importancia (Ai et al., 2019; Mas-Coma et al., 2018). Recientemente, en el año 2013 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido la fascioliasis en la lista de enfermedades tropicales desatendidas (Mas-Coma et al., 2018). Esta decisión se tomó teniendo en cuenta numerosos factores, uno de los más importantes fue el descubrimiento del gran efecto que el cambio climático y los cambios globales (modificaciones antropogénicas del paisaje, viajes e importación/exportación de ganado) ejercen sobre la prevalencia, la intensidad y la diseminación de esta patología (Bargues et al., 2016; Mas-Coma, 2020; Takeuchi-storm et al., 2018). Esto parece deberse a la estrecha relación entre las características climáticas y los estadios larvales de *Fasciola* y los caracoles de la familia *Lymnaeidae*, que ejercen como vectores en el parasitismo (Bargues et al., 2017).

En la actualidad, se estima que hay cerca de 17 millones de personas infectadas a nivel mundial y otros 180 millones de personas se encuentran en riesgo de ser infectadas (Khademvatan et al., 2019). En la ganadería, nos encontramos con que más de 600 millones de animales se infectan anualmente (Gao et al., 2020; George et al., 2017; Martínez-Pérez et al., 2012; Uruburu Gómez et al., 2013), suponiendo una pérdida a la industria ganadera de más de 3 billones de dólares al año (Duthaler et al., 2010; Elliott et al., 2015; George et al., 2017).

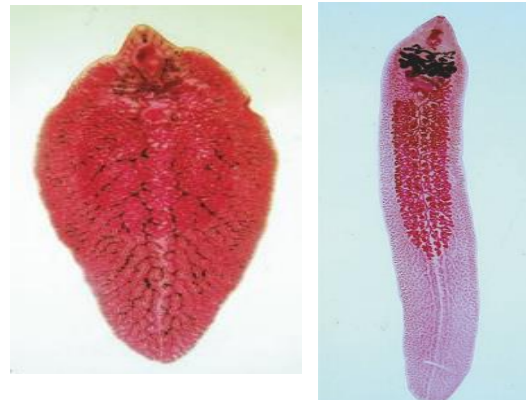
1.1. Morfología

Los parásitos causantes de esta enfermedad son helmintos. Concretamente estos parásitos pertenecen al phylum Plathelminthes, y dentro de este grupo subclase Digenea, orden Echinostomida, familia fasciolidae (Wikipedia). Los digénidos presentan una serie de características morfológicas generales (Cortés Carbonell and Fried, 2019):

- Son parásitos planos y no segmentados.
- Presentan dos órganos de fijación denominados ventosas.

- Todos son hermafroditas (a excepción de *Schistosoma* sp.), es decir, en el parásito encontramos aparato reproductor masculino y femenino

Los adultos presentan una forma de hoja muy característica, con una proyección cónica en la parte anterior denominada como cefálico. *F. hepatica* (Fig. 1 y 3) es más pequeña y ancha (29 mm x 14,1 mm); mientras que *F. gigantica* (Fig. 2) tiene una forma más alargada y estrecha (52,3 mm x 11,8 mm). Presentan dos ventosas: la ventosa oral, que se encuentra localizada en el cono cefálico, y la ventosa ventral, que se localiza



Figuras 1 y 2. Corte transversal de *F. hepática* (izq.) y *F. gigantica* (der.) (Mas-Coma et al., 2019)

en la base del cono cefálico. El intestino se encuentra profundamente ramificado y se bifurca en la parte anterior del cuerpo, dando lugar a dos ramas principales llenas de ramificaciones. En el caso de *F. gigantica* las ramificaciones son mucho más numerosas. Presentan dos testículos, también ramificados, localizados en la parte media del cuerpo, y una bolsa del cirro grande, que contiene un cirro protusible espinoso. El ovario, igualmente ramificado, en *F. gigantica* mucho más ramificado que en *F. hepatica*, se localiza por encima de los testículos, en la parte derecha del cuerpo. El útero es corto y está localizado en la zona entre el ovario y la bifurcación del intestino (Mas-Coma et al., 2019).

En algunos países hay especies híbridas de *F. hepatica* y *F. gigantica* que presentan unas características morfológicas difusas, que encajan con ambas especies, lo que impide su identificación dentro de una especie concreta (Ai et al., 2011; Sumruayphol et al., 2020).

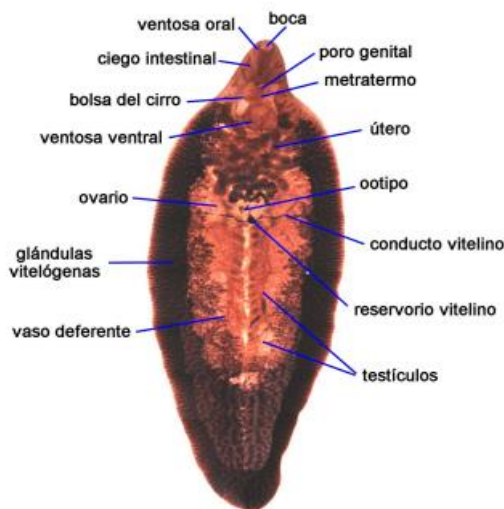
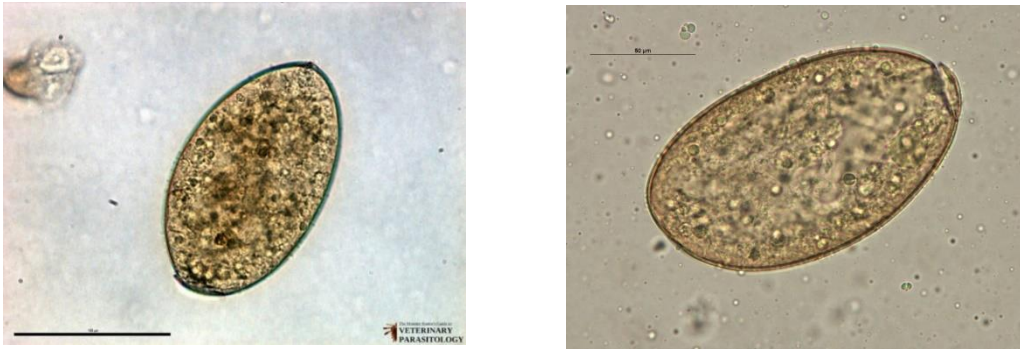


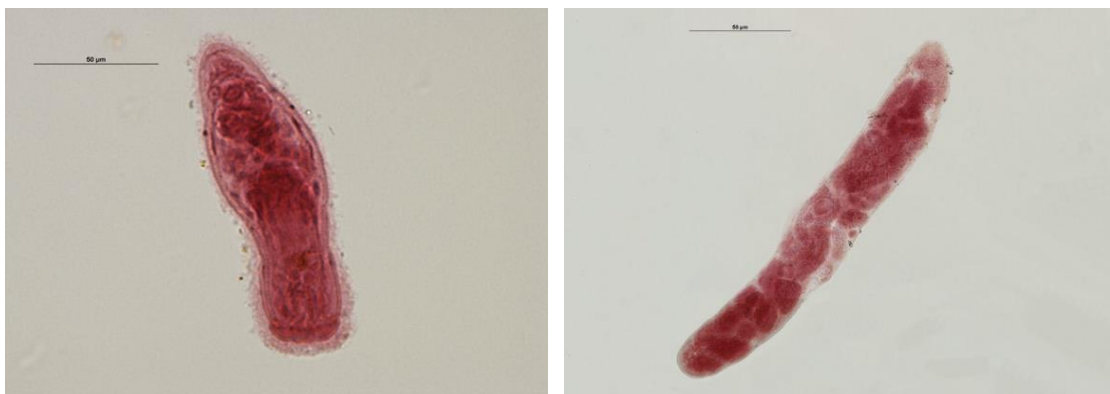
Figura 3. Corte transversal de *F. hepática* con las partes características de su morfología (García más et al., 2008)

En cuanto a los huevos (Fig. 4 y 5), en ambas especies son iguales, simplemente varían en el tamaño, ya que el huevo de *F. gigantica* (129,6 – 204,5 μm x 61,6 – 120 μm) es ligeramente más grande que el de *F. hepática* (73,8 – 162,2 μm x 58,1 – 104,6 μm). Son ovoides, amarillentos, presentan un pequeño opérculo en la parte superior y en la parte inferior, una especie de engrosamiento; estos dos detalles los hace muy característicos. En el momento de la ovoposición, son liberados sin embrionar y maduran una vez que son liberados al exterior (Mathison and Pritt, 2018; Mas-Coma et al., 2019).

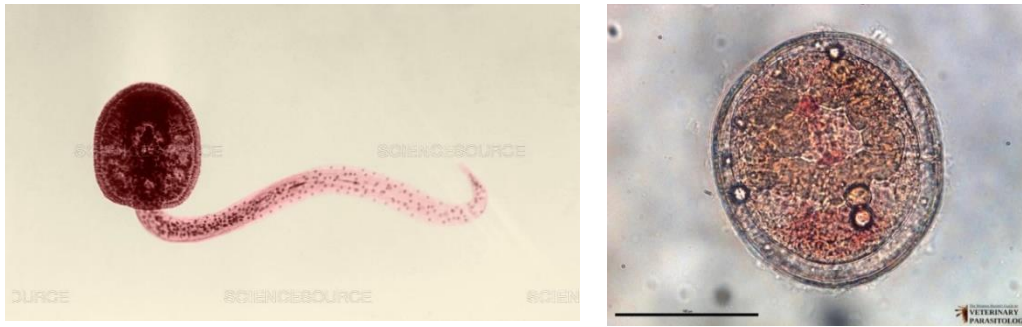


Figuras 4 y 5. Huevos de *Fasciola*, a la izquierda (Lance Wheeler, 2018) a la derecha (Bioimagen)

Por último, señalar algunas características morfológicas de los estadios larvarios de *Fasciola*. La primera fase larvaria es el miracidio (Fig. 6), que se caracteriza principalmente por su cubierta ciliada. La segunda fase larvaria es el esporocisto, que está conformado por una masa de células germinales, alargada y estrecha. La tercera fase, la redia (Fig. 7), es morfológicamente parecida al esporocisto, pero más corta y ancha. La cuarta fase es la cercaria (Fig. 8), su morfología es muy característica ya que presenta cola y una “cabeza” ovalada. Por último, la quinta fase sería la metacercaria (Fig. 9), que presenta una forma redondeada y una cubierta con tres estratos (Moazeni and Ahmadi, 2016; Pose, 2012).



Figuras 6 y 7. A la izquierda corte transversal del miracidio (Bioimagen); a la derecha corte transversal de la redia (Bioimagen)



Figuras 8 y 9. A la izquierda corte transversal de la cercaria (Bioimagen); a la derecha corte transversal de la metacercaria (Lance Wheeler, 2018)

1.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico es similar para ambas especies (Fig. 10).

Los adultos de *Fasciola* se localizan a nivel de los conductos y la vesícula biliares de animales herbívoros, donde comienzan a eliminar huevos. Estos huevos, sin embrionar, son liberados al exterior a través de las heces y, una vez en el exterior, solo podrán ser viables si llegan a un medio acuático. Una vez allí, si las condiciones son favorables, el miracidio se desarrollará en su interior en un plazo de 9-21 días. Posteriormente el huevo eclosiona, se abre el opérculo y se libera el miracidio, que nada, gracias a su superficie ciliada, hasta entrar en contacto con el hospedador intermediario que actúa como vector, el caracol de la familia *Lymnaeidae*. Una vez que el miracidio entra en contacto con el caracol, penetra en su interior y se desprende de la cubierta ciliada que lo caracteriza, dando lugar a otro estadio denominado esporocisto. El esporocisto, en el interior del caracol, evoluciona a otro estadio denominado redia, que posteriormente dará lugar a las cercarias (Bonilla-Quintero, 2016; Mas-Coma et al., 2019; Pose, 2012).

Las cercarias serán las que abandonarán el cuerpo del hospedador intermediario y volverán de nuevo al medio acuático; la cola que poseen les sirve para nadar durante un corto periodo de tiempo (1h) hasta entrar en contacto con una superficie sólida, generalmente plantas acuáticas o semiacuáticas. En el momento en que se produce ese contacto, las cercarias pierden su cola y se enquistan dando lugar a otro estadio, metacercaria. La metacercaria constituye la fase infectante para los hospedadores definitivos. Cuando este hospedador definitivo, bien mamíferos rumiantes o bien el ser humano, consumen las plantas acuáticas infestadas con metacercarias, estas atraviesan todo el sistema gastrointestinal hasta llegar al intestino. En el intestino se produce el desenquistamiento 1 hora después de la ingestión, y se obtiene un adulto joven que se conoce como adolescaria. Estas adolescarias atravesarán la pared intestinal y,

finalmente, llegarán al hígado unos 6 días después del desenquistamiento. Una vez dentro del hígado migran por el tejido hepático alimentándose de él, hasta que penetran en los conductos biliares y maduran dando lugar a los adultos (Bonilla-Quintero, 2016; Mas-Coma et al., 2019; Pose, 2012).

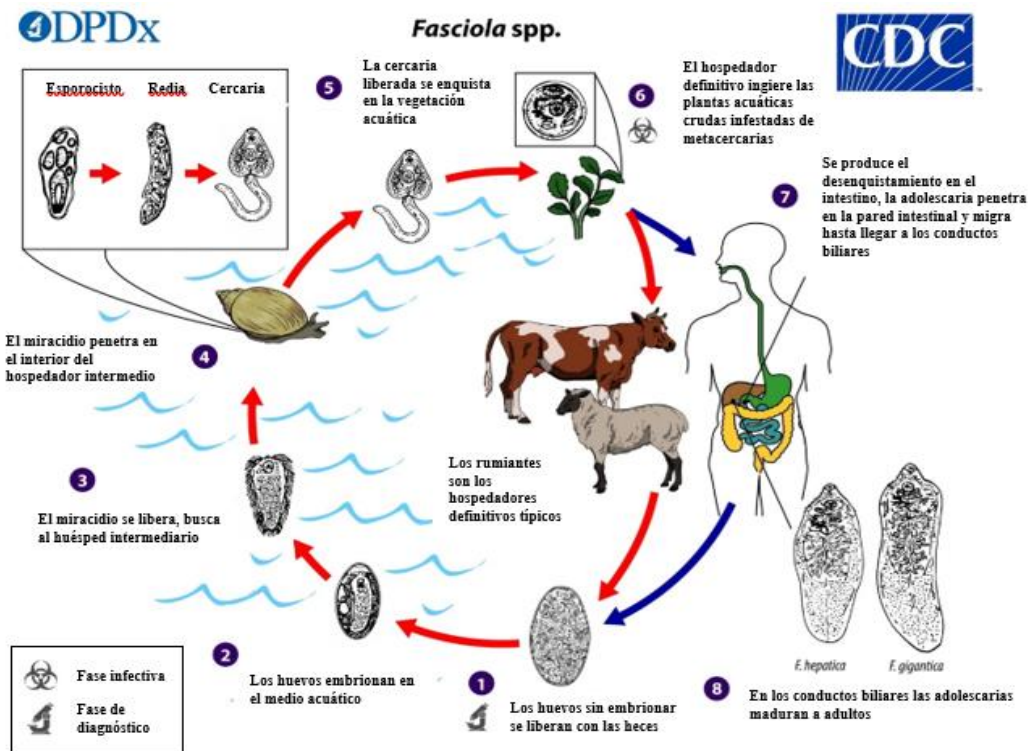


Figura 10. Ciclo biológico de *Fasciola* (Traducción propia del original de la página del CDC)

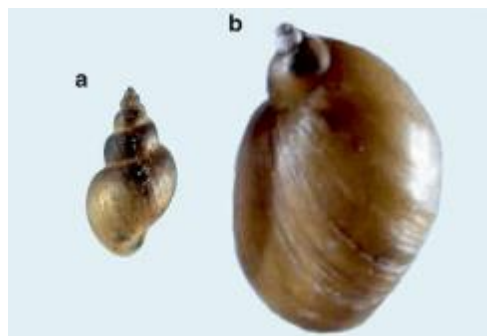
En humanos se ha visto que el periodo que tardan en adquirir la madurez sexual es de entre 3 y 4 meses en el caso de *F. hepatica*; para *F. gigantica* el periodo de tiempo necesario sería de 1 o 2 semanas más (Mas-Coma et al., 2018).

1.3. Vectores

Este parasitismo se transmite por medio de especies de caracoles de la familia Lymnaeidae. Gracias a la relación tan específica existente entre el caracol y el parásito, estos pueden ser utilizados como biomarcadores de la enfermedad (Bargues et al., 2016).

F. hepatica se transmite principalmente a través de caracoles del género *Galba*, especialmente la especie *Galba truncatula*; sin embargo, *F. gigantica* se transmite a través de especies del género *Radix*, principalmente la especie *Radix natalensis* (Bargues et al., 2016; Mas-Coma et al., 2019). Esto supone una explicación al hecho de que *F. hepatica* posea una distribución global y *F. gigantica* únicamente se encuentre en África y Asia (Bargues et al.,

2016). También hay otras especies que, en circunstancias excepcionales, pueden actuar como vectores para ambas especies, como es el caso de *Pseudosuccinea columella* con distribución mundial (Bargues et al., 2016); *Lymnaea neotropica* que se encuentra en zonas altas peruanas y en Argentina; *Lymnaea Viato*, en Argentina y Uruguay (Bargues et al., 2017).



a. *Galba truncatula* y **b.** *Radix natalensis*
(Mas-Coma et al., 2019)

Estos caracoles suelen encontrarse en zonas húmedas; y aquí podemos incluir hábitats artificiales, como los que se crean mediante el uso de determinadas técnicas de riego en la agricultura (Elliott et al., 2015; Kelley et al., 2020). Son capaces de resistir tanto a la sequía como al frío, debido a su capacidad para estar enterrados en el barro durante largos periodos, hasta el momento en el que las condiciones vuelvan a ser más favorables (Beesley et al., 2018).

1.4. Patología y manifestaciones clínicas

La enfermedad consta de cuatro fases clínicas (Ai et al., 2019):

- ❖ Fase de incubación. Comienza en el momento en que el individuo ingiere el estadio de “metacercaria” y termina cuando aparecen los primeros síntomas. En humanos esta fase no parece estar muy bien definida, puede durar entre varios días y varios meses (Ai et al., 2019).
- ❖ Fase invasiva o aguda. En esta fase tiene lugar la migración de *Fasciola* desde el intestino a los conductos biliares. Durante esta fase se pueden observar síntomas como fiebre, dolor abdominal, síntomas gastrointestinales, urticaria, prurito y eosinofilia (Perrodin et al., 2019).
- ❖ Fase latente. Los parásitos maduran hasta convertirse en adultos y comienzan el proceso de ovoposición. Durante esta fase, los parásitos van desplazándose por el hígado, lo que supone un daño al tejido, que puede verse reflejado en un aumento de las enzimas hepáticas (Perrodin et al., 2019). Es una fase larga cuya duración tampoco está bien definida, puede durar entre varios meses y varios años. Normalmente es una fase asintomática; aunque, si el paciente presenta una alta carga infectiva, pueden presentar una marcada eosinofilia o puede aquejarse de molestias gastrointestinales (Perrodin et al., 2019).

- ❖ Fase biliar, crónica u obstructiva. Durante esta fase los parásitos producen el engrosamiento y la dilatación de los conductos biliares, dando lugar a la aparición de cólicos biliares y colangitis (Guerrero-Espejo and Bernad-Anso, 2019), además de síntomas como fuerte dolor abdominal, pérdida de peso y fatiga (Perrodin et al., 2019). Esta fase puede llegar a durar hasta 13,5 años en humanos (Mas-Coma, 2020).

Las complicaciones más graves que derivan de esta patología son las afecciones neurológicas y oftálmicas, ya que están asociadas a secuelas permanentes e incluso la muerte (Mas-Coma et al., 2018). Estas complicaciones predominan en los países desarrollados, como España, que resulta ser el segundo país con más casos de secuelas neurológicas asociadas a fascioliasis. Esto supone un problema añadido, ya que muchos médicos no consiguen relacionar estos problemas neurológicos con la fascioliasis (Guerrero-Espejo and Bernad-Anso, 2019; Mas-Coma, 2020).

Por último, también se ha observado en algunos estudios que estos parásitos tienen la capacidad de modular el sistema inmune del hospedador en fascioliasis crónicas, disminuyendo la respuesta frente a nuevas infecciones con otros parásitos o bacterias (Beesley et al., 2018; Charlier et al., 2014; Mas-Coma, 2020).

1.5. Epidemiología

La principal fuente de infección en este parasitismo es la ingestión de plantas acuáticas crudas, bien salvajes o cultivadas, principalmente del género *Nasturtium* sp. (berros); sin embargo, hay otros géneros que también presentan un papel importante, como son *Taraxacum* sp., *Valerianella* sp. y *Mentha* sp. El consumo de estas plantas acuáticas se ha incrementado últimamente en los países desarrollados, debido en parte a la creciente necesidad de recurrir a productos más naturales, y esto podría ligarse a la aparición de brotes (Gandhi et al., 2019; Mas-Coma et al., 2018; Zoghi et al., 2019).

La fascioliasis es un parasitismo de distribución mundial. Como podemos observar en la (Fig. 11), *F. hepatica* presenta una distribución más cosmopolita, pudiendo encontrarse en todos los continentes; sin embargo, *F. gigantica* se distribuye principalmente en África y Asia, donde se produce solapamiento entre ambas especies. En estas zonas se ha descrito también la presencia de especies híbridas (Afshan et al., 2014).

Los continentes donde la prevalencia de este parasitismo es más significativa son África, Asia y América, más concretamente América del Sur (Kueakhai et al., 2019; Mehmood et al., 2017; Zoghi et al., 2019). En general, se ha observado que la prevalencia de la

enfermedad es más alta en los países en desarrollo, lo que parece estar relacionado con la falta de conocimiento sobre el parasitismo y su tratamiento (Mehmood et al., 2017).

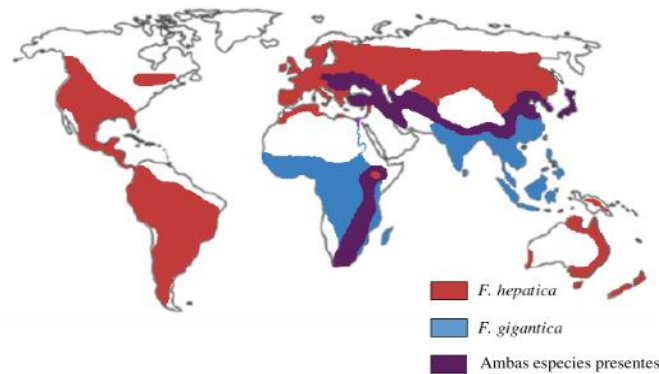


Figura 11. Distribución mundial del género Fasciola (Giacaman, 2011)

En España la incidencia de la enfermedad es baja en comparación con las zonas que he mencionado anteriormente. La mayoría de los casos se registran en la zona del norte y centro de la península. En zonas como Ceuta, donde las tasas de inmigración son elevadas, la mayoría de los casos que se registran son importados (Guerrero-Espejo and Bernad-Anso, 2019).

Es importante destacar que en ocasiones se subestima el número total de casos ya que en muchos países, como es el caso de España, únicamente se cuantifican las personas que han necesitado hospitalización, que suele ser un porcentaje menor (Guerrero-Espejo and Bernad-Anso, 2019).

1.6. Profilaxis

Para evitar la incontrolable expansión de este parasitismo es recomendable llevar a cabo una serie de medidas:

- Fomentar el diagnóstico y el tratamiento precoz, tanto en animales como en humanos (Ai et al., 2019; Köstenberger et al., 2017). También es importante promover el uso responsable de los antihelmínticos con el fin de evitar la aparición de resistencias (Takeuchi-storm et al., 2018)
- Instruir a la población sobre educación sanitaria e higiene, especialmente en países en desarrollo (Ai et al., 2019).
- Prestar especial atención al lavado de los vegetales que se consuman crudos (Ai et al., 2019).
- Desechar, cercar o evitar las zonas donde se encuentran los caracoles que actúan como vectores (Bonilla-Quintero, 2016; Köstenberger et al., 2017; Takeuchi-storm et al., 2018).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se ha querido llevar a cabo una revisión bibliográfica de los aspectos más importantes de la Fascioliasis, centrando la atención especialmente en el diagnóstico y tratamiento de la misma. Asimismo, esta revisión recoge información de relevancia para comprender la situación actual del parasitismo.

Los objetivos específicos que se persiguen son los siguientes:

- Revisar la evolución del tratamiento y la problemática asociada a su uso, poniendo especial énfasis en la aparición de resistencia y las posibles alternativas terapéuticas.
- Exponer y comparar las distintas técnicas de diagnóstico con el fin de identificar las ventajas e inconvenientes asociados a ellas.

3. METODOLOGÍA

En la búsqueda de la información necesaria para realizar este trabajo fin de grado se ha recurrido a diversas fuentes de información, como pueden ser libros, tesis doctorales, bases de datos, revistas y recursos electrónicos.

Las dos principales bases de datos utilizadas en el trabajo han sido PubMed y Dialnet. En ambas se han utilizado una serie de filtros para realizar una búsqueda más selectiva: al inicio se usaron filtros que acotaban la búsqueda a 10 años y texto completo; y posteriormente se pasó a usar el filtro de 5 años, para obtener la información más actual.

En cuanto a los recursos electrónicos, cabe destacar el uso de numerosos sitios web para búsqueda inicial de información, revistas electrónicas y el uso de la herramienta Google Scholar. También ha resultado de mucha utilidad el uso de la herramienta Fama de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla, que permite acceder a un extenso catálogo de recursos electrónicos.

Para la búsqueda de información se usó un intervalo de tiempo de 10 años (2010-2020) e inicialmente se recurrió a una serie de palabras clave básicas, como ***Fascioliasis, Fasciola hepatica, Fasciola gigantica*** y ***“Liver fluke”***. A medida que se avanzaba en el trabajo, se utilizaron palabras clave secundarias más específicas como **diagnóstico (“diagnosis”), tratamiento (“treatment”), ELISA, PCR, triclabendazol (“triclabendazole”), profilaxis (“prophylaxis”), etc.**

Para gestionar toda la bibliografía recabada se ha usado el programa Mendeley. Este programa ha servido tanto para archivar toda la bibliografía encontrada como para la redacción de las referencias bibliográficas.

Para la realización de las estructuras químicas de triclabendazol, closantel, oxiclozanida y clorsulón se recurrió al programa ChemSketch.

La mayor parte de los recursos utilizados en este trabajo estaban en inglés, por ello, para facilitar su entendimiento se ha recurrido al sitio web WordReference, que ha facilitado la traducción de determinados términos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tratamiento

Los fármacos usados para la fascioliasis se dividen principalmente en cuatro grupos (Ceballos et al., 2017; Pose, 2012):

- **Benzimidazoles (Albendazol, triclabendazol)**
- **Fenoles halogenados (Niclofolán, nitroxinil)**
- **Salicilanilidas (Closantel, oxiclozanida, rafoxanida)**
- **Sulfonamidas (Clorsulón).**

La OMS, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) coinciden en la recomendación de triclabendazol (Fig. 12) como fármaco de elección. Recientemente, la FDA (Food and drug administration) aprobó el uso de triclabendazol en Estados Unidos para el tratamiento de la fascioliasis humana (Gandhi et al., 2019; Mas-Coma, 2020). Esta unanimidad en la elección de triclabendazol como tratamiento se debe a la eficacia que este fármaco ha demostrado frente a los estadios adultos y juveniles de *Fasciola*, incluso con la administración 2 días después del inicio de la infección (Bonilla-Quintero, 2016; Ceballos et al., 2017; Elliott et al., 2015; Gandhi et al., 2019; Mas-Coma, 2020; Pose, 2012; Novobilský et al., 2012; Novobilský and Höglund, 2015; Robles-Pérez et al., 2013). Por el contrario, el resto de fármacos comienzan a hacer efecto entre 6-14 semanas tras el inicio de la infección, cuando los parásitos alcanzan la madurez (Beesley et al., 2018).

La elevada eficacia de triclabendazol ha supuesto su uso en masa para el tratamiento del ganado, y esto ha desencadenado la aparición de resistencia en numerosas regiones, principalmente zonas endémicas (Elliott et al., 2015; Graham-Brown et al., 2019; Kelley et al., 2020; Mehmood et al.,

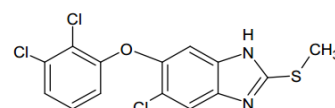
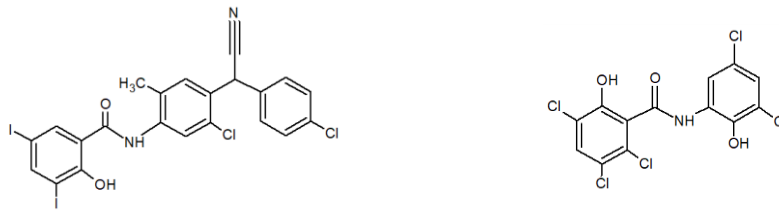


Figura 12. Estructura química de triclabendazol

2017; Perrodin et al., 2019). La resistencia a triclabendazol se notificó por primera vez en Australia y posteriormente en otros países como Reino Unido, Irlanda, Países Bajos, España y Perú (George et al., 2017). También se han notificado casos de resistencia a triclabendazol en humanos en zonas donde la resistencia en el ganado es algo frecuente (Gandhi et al., 2019). Debido a esto, se comenzaron a buscar alternativas terapéuticas de utilidad:

- ❖ **Closantel (Fig. 13).** Es eficaz a partir de las 6 semanas de infección con una eficacia del 95-100%. Ha sido probado en varias ocasiones frente a cepas resistentes a triclabendazol con muy buenos resultados (Novobilský and Höglund, 2015).

- ❖ **Oxiclozanida (Fig. 14).** Varios estudios establecieron que este fármaco producía una reducción del 99,6% en el recuento de huevos en heces frente a cepas resistentes a triclabendazol (Elliott et al., 2015).



Figuras 13 y 14. A la izq. estructura química de closantel, a la der. estructura química de oxiclozanida (ChemSketch)

- ❖ **Derivados de artemisinina.** Artesunato y artemeter son fármacos antimaláricos que han sido investigados para el tratamiento de la fascioliasis. Ambos son capaces de actuar sobre los estadios adultos, reduciendo las cargas parasitarias 91,3% y 91,9% respectivamente, y artemeter ha demostrado su eficacia incluso frente a una cepa resistente a triclabendazol (Pose, 2012). En humanos, los ensayos con artemeter no han dado buenos resultados, por lo que no se considera como alternativa (Pose, 2012).
- ❖ **Compuesto alfa.** Es un derivado de triclabendazol y tiene eficacia contra adultos y contra estadios inmaduros; sin embargo, no ha resultado eficaz frente a parásitos resistentes a triclabendazol (Pose, 2012).
- ❖ **Combinación de clorsulón (Fig. 15) e ivermectina.** Se ha notificado que esta combinación es eficaz a la hora de eliminar adultos resistentes a triclabendazol; aunque otros estudios solo recogen una reducción del 73,2% en el recuento de huevos en heces (Elliott et al., 2015).
- ❖ **Combinación de triclabendazol y clorsulón.** La administración conjunta de ambos ha presentado efectos sinérgicos frente a cepas resistentes a triclabendazol (Pose, 2012).

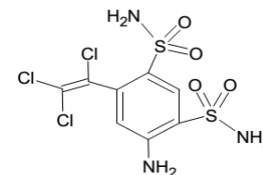


Figura 15. Estructura química de clorsulón (ChemSketch)

Como se puede observar, hay varias alternativas posibles; no obstante, seguirá surgiendo el problema de la aparición de resistencia mientras el control del parasitismo siga basándose únicamente en el uso de antihelmínticos (Bonilla-Quintero, 2016; Pose, 2012). Por ello, resulta fundamental, no solo la inversión y la incentivación en la búsqueda de nuevos fármacos (Charlier et al., 2014), sino también la puesta a punto de las medidas profilácticas, el desarrollo de protocolos de tratamiento estandarizados y el uso de métodos diagnósticos que permitan detectar la infección y evaluar la efectividad del tratamiento (Pose, 2012).

4.2. Diagnóstico

Desde el punto de vista de la ganadería, la fascioliasis presenta un gran impacto en la productividad: un 9% de pérdida de peso de los animales, una reducción del 10% en la producción de leche, descenso de la fertilidad y aumento de la mortalidad (Charlier et al., 2014; Graham-Brown et al., 2019). En los países endémicos muchos ganaderos administran directamente tratamiento a todo el ganado, independientemente de si están infectados o no, lo que supone una pérdida de tiempo y dinero; además puede aumentar la aparición de resistencia al tratamiento. En muchos casos, esto se podría evitar usando un método diagnóstico fiable (Kelley et al., 2020).

En lo referente al diagnóstico en humanos, en muchos países se realiza un mal diagnóstico de la enfermedad por la falta de conocimiento al respecto. Esto puede suponerle al paciente numerosas intervenciones terapéuticas y diagnósticas innecesarias. Por tanto, sería conveniente el fomento y desarrollo de un protocolo adecuado de diagnóstico que facilite la identificación de la enfermedad (Ai et al., 2019; Mas-Coma, 2020; Perrodin et al., 2019).

Las principales técnicas diagnósticas empleadas en la actualidad son las siguientes:

4.2.1. Métodos parasitológicos

Tradicionalmente el diagnóstico de la fascioliasis se ha realizado mediante la detección de huevos en heces (Calvani et al., 2018; Charlier et al., 2014; Dacal and Köster, 2020; Delgado, 2012; Duthaler et al., 2010; Kueakhai et al., 2019; Mathison and Pritt, 2018; Munita et al., 2019); y este es considerado por muchos el “patrón de oro” en el diagnóstico de este parasitismo (Mirzadeh et al., 2018; Husch et al., 2020).

Debido a su simplicidad, las técnicas más usadas son las de sedimentación (Arifin et al., 2016; Calvani et al., 2018; Calvani et al., 2017; Charlier et al., 2014; Duthaler et al., 2010; George et al., 2017; Graham-Brown et al., 2019; Martínez-Pérez et al., 2012; Robles-Pérez et al., 2013). Con estas se ha notificado la detección del parasitismo entre las semanas 7-10 tras la infección (Calvani et al., 2018; Martínez-Pérez et al., 2012; Robles-Pérez et al., 2013); aunque también ha habido casos en los que la detección ha sido más tardía, entre las semanas 11-16 (Martínez-Pérez et al., 2012). En lo que respecta a la sensibilidad, esta resulta baja, del 33% en muestras con baja carga parasitaria (< 10 huevos por gramo de heces) (Calvani et al., 2018). Sin embargo, se ha observado que esta puede verse incrementada si se aumenta el volumen de muestra o se realiza el proceso por duplicado, alcanzándose valores de sensibilidad del 66% (Calvani et al., 2018), llegando incluso a un 90% (Charlier et al., 2014). Sin embargo, la realización de las técnicas por duplicado supone un aumento del tiempo de procesamiento que resulta contraproducente

en el diagnóstico a gran escala (Calvani et al., 2018; Munita et al., 2019). A pesar de esto, estas técnicas siguen siendo las más usadas debido a que no requieren de instrumentación muy sofisticada (vidrio cónico, solución salina, mortero y pistilo), lo que permite que se lleven a cabo en zonas con menos recursos y un acceso limitado a la tecnología (Duthaler et al., 2010). Algunas de las más usadas son el método de sedimentación etil-acetato-formalina o formalina-etilacetato, la técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET), la técnica de sedimentación rápida o técnica de lumbreras (TSR) y la técnica de Dennis.

También se usan con cierta frecuencia las técnicas de flotación (Calvani et al., 2018; Charlier et al., 2014; George et al., 2017). Recientemente ha surgido el método FLOTAC y se ha notificado que un único FLOTAC presenta una sensibilidad del 92,6%, frente a la obtenida tras el procesamiento de ocho portaobjetos de sedimentación, con los que se obtuvo una sensibilidad del 85,2%; también se observó que si en lugar de 8, solo se procesan 2 – 4 portaobjetos la sensibilidad baja a un rango de 63 - 77,8%. Además, el método FLOTAC permite la obtención de resultados más rápidamente, ya que únicamente tomó 21 minutos para su procesamiento y lectura, pero se necesitaron 114 minutos para la realización de las 8 pruebas de sedimentación (Fig. 16) (Duthaler et al., 2010). Por lo tanto, no solo un único FLOTAC es más sensible que múltiples lecturas de sedimentación, sino que además su procesamiento es 5-6 veces más rápido. El principal inconveniente de esta técnica es la necesidad de laboratorios relativamente bien equipados (centrífuga, diferentes soluciones de flotación, densitómetro). Teniendo en cuenta todas las características, FLOTAC podría ser el método parasitológico de elección en aquellos laboratorios que cuenten con este material básico y en los que la sensibilidad y la velocidad resulten esenciales (Duthaler et al., 2010).

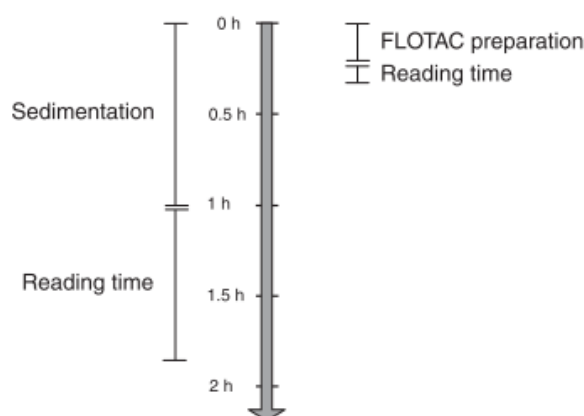


Figura 16. Comparación del tiempo empleado en la realización de Pruebas de sedimentación y prueba FLOTAC (Duthaler et al., 2010)

Finalmente se encuentra la técnica Kato-katz, que es simple y barata; además está estandarizada, lo que permite que los resultados puedan contrastarse en diferentes laboratorios. En un estudio en el que se comparó esta técnica con diferentes técnicas de

sedimentación (TSET y TSR) se obtuvo una sensibilidad significativamente superior con la técnica TSR, con una sensibilidad del 75%, frente a la técnica Kato-katz, con una sensibilidad del 45%; sin embargo, esta última presentó una mayor sensibilidad que la técnica TSET, con tan solo un 10% (Delgado, 2012). Aunque su sensibilidad no es demasiado elevada, esto podría solucionarse con el procesamiento repetido de la muestra, aunque aumentaría el tiempo empleado (Ai et al., 2019).

La prueba de reducción del recuento de huevos en heces (FECRT) se ha utilizado para el seguimiento del tratamiento y la detección de resistencias (Arifin et al., 2016). Según Robles-Pérez et al. (2013), la FECRT no es capaz de detectar con precisión la resistencia a antihelmínticos debido a la baja sensibilidad de sus pruebas y, además, los huevos no empiezan a liberarse hasta la octava semana aproximadamente (Novobilský et al., 2012). A pesar de estas limitaciones es una de las técnicas más usadas a la hora de detectar resistencia a antihelmínticos.

Las principales ventajas de los métodos parasitológicos para la detección de la fascioliasis son los siguientes (Tabla 1):

- Capacidad de detectar infecciones en curso (Charlier et al., 2014; Graham-Brown et al., 2019; Munita et al., 2019).
- Bajo coste y mínimo equipamiento requerido, lo que permite su uso en zonas endémicas, con pocos recursos y laboratorios con un bajo perfil tecnológico (Dacal and Köster, 2020; Delgado, 2012; Duthaler et al., 2010; George et al., 2017; Graham-Brown et al., 2019; Mubanga et al., 2019; Zárate-Rendón et al., 2019).
- Valores de sensibilidad razonables en el caso de infecciones con cargas parasitarias moderadas o intensas (Duthaler et al., 2010; Pose, 2012).
- Útil para evaluar la eficacia del tratamiento y la aparición de resistencias (Arifin et al., 2016).

Los principales inconvenientes de los métodos parasitológicos para la detección de la fascioliasis son los siguientes (Tabla 1):

- Sensibilidad intrínsecamente baja, especialmente en muestras con cargas parasitarias leves (Calvani et al., 2018; Duthaler et al., 2010; Mirzadeh et al., 2018; Pose, 2012; Husch et al., 2020; Uruburu Gómez et al., 2013).
- Técnicas muy laboriosas, que requieren de mucho tiempo (Dacal et al., 2020; George et al., 2017; Kelly et al., 2019; Kueakhai et al., 2019; Munita et al., 2019).
- Necesidad de personal técnico cualificado para la identificación de los huevos de *Fasciola* (Dacal et al., 2020; Delgado et al., 2012; Kueakhai et al., 2019; Munita et al., 2019; Ricciardi and Ndao, 2015).

- Únicamente permite detectar la infección cuando esta se vuelve patente, es decir, cuando comienzan a aparecer huevos en las heces; esto ocurre aproximadamente a las 7-12 semanas de infección. A estas alturas, el parasitismo ya es crónico y el daño hepático es avanzado (Beesley et al., 2018; Calvani et al., 2018; Kueakhai et al., 2019; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016; Mirzadeh et al., 2018; Pose, 2012; Uruburu Gómez et al., 2013).
- Aparición de falsos negativos cuando la infección es leve y la carga parasitaria es muy baja, o durante los periodos en los que no se liberan huevos, ya que esta liberación no se produce de forma continua (Ghodsian et al., 2019; Mathison and Pritt, 2018; Mirzadeh et al., 2018; Munita et al., 2019; Husch et al., 2020). Los huevos también son indetectables en casos de fascioliasis ectópicas (Husch et al., 2020).
- Aparición de falsos positivos debido a la retención de huevos en la vesícula biliar hasta 2 semanas después de la curación del paciente (Beesley et al., 2018) o debido al consumo de hígado de algún animal infectado (Mathison and Pritt, 2018).
- Dificultad a la hora de distinguir los huevos de *F. hepatica* respecto a los de *F. gigantica* (Calvani et al., 2017; Dacal et al., 2020), y respecto a los de otros trematodos patógenos como *Fasciolopsis buski* (causante de la Fasciolopsiasis) y *Gastrodiscoides hominis* (causante de la gastrodiscoidiasis), que son endémicas en la India y en el sudeste de Asia (Ai et al., 2019; Beesley et al., 2018; Mathison and Pritt, 2018).

Ventajas	Inconvenientes
Bajo coste y mínimo equipamiento	Laboriosa y requiere tiempo
Buena sensibilidad para cargas parasitarias moderadas o intensas	Baja sensibilidad para cargas parasitarias leves
Permiten la detección de infecciones en activo	Debe realizarla personal técnico cualificado
Evaluación del tratamiento y detección de resistencias	Únicamente pueden detectar infecciones a partir de 8-10 semanas del inicio de la infección
	Falsos negativos
	Falsos positivos
	Difícil distinguir entre especies

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de los métodos parasitológicos

4.2.2. Métodos inmunológicos

Las pruebas de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) suponen un aumento de la sensibilidad y un diagnóstico precoz del parasitismo, a partir de las 4 semanas tras el comienzo de la infección (Beesley et al., 2018; Munita et al., 2019).

❖ ELISA para la detección de anticuerpos

Esta técnica es considerada una de las más sensibles para la detección del parasitismo (Charlier et al., 2014; Graham-Brown et al., 2019). Se basa en la detección de anticuerpos generados contra el parásito durante la infección (Fig. 17). Principalmente las pruebas ELISA van a detectar IgG, ya que hay un alto título de estas inmunoglobulinas en el 100 % de los pacientes (Beesley et al., 2018; Pose, 2012; Uruburu Gómez et al., 2013). Para la detección de los anticuerpos, se utilizan diferentes antígenos de *Fasciola*. Los más usados son los productos de excreción-secreción (ES) (Charlier et al., 2014; Graham-Brown et al., 2019; Kelly et al., 2019; Mirzadeh et al., 2018; Pose, 2012); estos presentan la ventaja de que son fáciles de producir, aunque se ha notificado la aparición de reacciones cruzadas con anticuerpos contra otros helmintos como *Dictyocaulus viviparus* y *Dicrocoelium dendriticum*, dando lugar a la notificación de falsos positivos. En general, las pruebas ELISA que utilizan estos antígenos, como el kit comercial Svanovir, presentan una buena sensibilidad y especificidad, 86-100% y 83-96% respectivamente (Charlier et al., 2014; Mirzadeh et al., 2018). Uno de los productos ES más utilizados son las catepsinas L, que son proteínas secretadas durante todas las etapas del ciclo vital del parásito; estas son muy inmunogénicas y los anticuerpos frente a ellas pueden detectarse a partir de los 10 primeros días de infección (Pose, 2012). La prueba comercializada que utiliza como antígenos las catepsinas L, el kit BIO K 211, presenta una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100% (Charlier et al., 2014), y además permite la detección del parasitismo a partir de la segunda semana tras la infección (Uruburu Gómez et al., 2013).

También se ha desarrollado una prueba ELISA basada en el uso de catepsina L1 recombinante, el kit comercializado Ildana, que no depende de la disponibilidad de parásitos vivos para la obtención del antígeno; sin embargo, la sensibilidad y especificidad obtenidas son significativamente inferiores a las ELISA que usan antígenos naturales (Charlier et al., 2014), entorno al 98% de sensibilidad y especificidad (Munita et al., 2019).

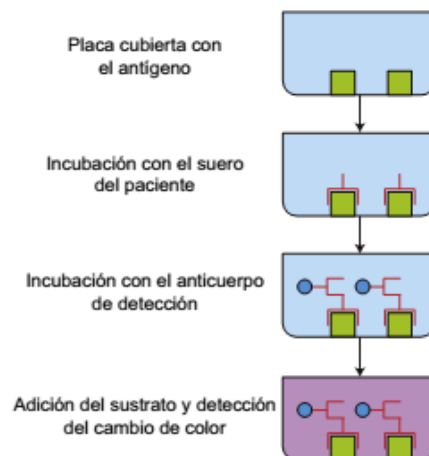


Figura 17. ELISA para la detección de anticuerpos (Hernández Ramírez and Cabiedes, 2010)

Otro antígeno que se utiliza es una subfracción de los productos ES, el antígeno f2 (Beesley et al., 2018; Charlier et al., 2014). En la actualidad se encuentra comercializado el kit IDEXX, que usa este tipo de antígeno y presenta una sensibilidad de 88-98% y una especificidad de 84-98% (Charlier et al., 2014). Algunos estudios indican valores de sensibilidad y especificidad del 100%, sin embargo, otros arrojan resultados más moderados con una especificidad del 56% (Munita et al., 2019).

Diferentes estudios han demostrado que los niveles de anticuerpos en suero están relacionados con los niveles de anticuerpos en leche (Pose, 2012; Uruburu Gómez et al., 2013). De esta forma, la leche se convierte en una muestra alternativa al suero, con unos valores similares de sensibilidad y especificidad, pero con la ventaja añadida de ser una muestra menos invasiva y más económica (Charlier et al., 2014; Uruburu Gómez et al., 2013). Se han reportado valores de sensibilidad del 92-98% y de especificidad del 80-96%; sin embargo, en el estudio de Uruburu Gómez et al., (2013) los valores fueron inferiores, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 72,2 %.

La detección de anticuerpos en leche se puede realizar a escala individual o a escala colectiva, mediante la técnica de tanque de leche denominada “Bulk tank milk” (Pose, 2012). Esta técnica ha demostrado ser especialmente útil a la hora de establecer la prevalencia y distribución de la fascioliasis y presenta, en general, buenos valores de sensibilidad y especificidad, llegando al 100% en rebaños con una prevalencia igual o superior al 12%; no obstante, la sensibilidad puede verse reducida drásticamente, a un 87,9%, en rebaños con una prevalencia entre el 0-7% (Uruburu Gómez et al., 2013; Villa-Mancera and Reynoso-Palomar, 2019). En un estudio realizado por Munita et al., (2019), en el que se comparaban diferentes kits ELISA para la detección de anticuerpos en leche “Bulk tank milk”, se observó que Ildana, IDEXX y BIO K 211 presentaban sensibilidades y especificidades del 100%; aunque Svanovir presentó una sensibilidad muy inferior, del 59,1% y una especificidad del 95,8%. Todas las pruebas detectaron el parasitismo 6 semanas antes de la detección de huevos en heces por técnicas coprológicas (Munita et al., 2019).

En general, las pruebas ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Fasciola* permiten llevar a cabo un diagnóstico precoz del parasitismo, ya que es posible detectar los anticuerpos a partir de las 2-4 semanas tras la infección (Graham-Brown et al., 2019; Martínez-Sernández et al., 2016; Pose, 2012; Uruburu Gómez et al., 2013). Además, permiten el procesamiento simultáneo de varias muestras, aumentando el rendimiento y disminuyendo así el tiempo de diagnóstico (George et al., 2017). Sin embargo, los niveles de IgG se mantienen elevados al menos 2-4 meses tras el tratamiento, generando un gran número de falsos positivos (Beesley et al., 2018; Calvani et al., 2018; George et al., 2017). Esto impide usar esta técnica para la

evaluación de la eficacia del tratamiento e impide también detectar reinfección (Calvani et al., 2018; Novobilský et al., 2012). Esta técnica tampoco permite diferenciar entre las distintas especies causantes del parasitismo (Calvani et al., 2017).

Por lo tanto, esta técnica solo resultaría útil para evaluar la exposición al parásito (Arifin et al., 2016; Calvani et al., 2018); cribar rápidamente un número elevado de muestras (Kelly et al., 2019); y diagnosticar infecciones en fase aguda y crónica en combinación con las técnicas coprológicas (Mirzadeh et al., 2018; Pose, 2012).

❖ ELISA para la detección de antígenos

Estas técnicas se basan en la detección de productos metabólicos o componentes estructurales del parásito, que son liberados a la sangre (antígenos circulantes) y/o a las heces (coproantígenos) del hospedador (Fig. 18) (Elliott et al., 2015; Pose, 2012).

Los anticuerpos empleados son sintetizados frente a estos antígenos, principalmente productos ES; aunque estos presentan epítomos comunes a otros helmintos, lo que puede generar la aparición de reacciones cruzadas (Mirzadeh et al., 2018; Pose, 2012), dando lugar a falsos positivos. Las principales ventajas de los métodos de detección de antígenos son su elevada sensibilidad y especificidad; además solo detectan infecciones en curso (Elliott et al., 2015; Martínez-Pérez et al., 2012; Pose, 2012), a diferencia de la técnica ELISA de detección de anticuerpos. Esta técnica supone un aumento del rendimiento respecto a la técnica de sedimentación tradicional (Calvani et al., 2018).

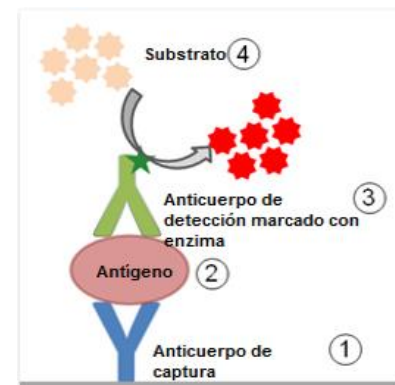


Figura 18. ELISA para la detección de antígenos (British society of immunology; Horlock C)

La detección de antígenos circulantes es posible desde 1-2 semanas tras la infección; sin embargo, los niveles de antígenos únicamente se mantienen hasta las 6-8 semanas, cuando los parásitos alcanzan los canalículos biliares. Debido a esta corta presencia en sangre, este método no es recomendable para el diagnóstico rutinario (Pose, 2012).

Por otro lado, los coproantígenos se mantienen mientras el parásito sigue siendo metabólicamente activo (Pose, 2012). Con esta técnica se pueden analizar las muestras fecales de forma individual o combinarlas de manera que se obtenga una única muestra global, y así poder evaluar un mayor número de muestras; en ambos casos la sensibilidad y especificidad es elevada, incluso en muestras con una baja carga parasitaria. Las muestras compuestas podrían permitir el cribado del ganado a gran escala (Elliott et al., 2015).

Actualmente solo hay una técnica copro-ELISA (cELISA) comercializada (ELISA kit BIO K 201), que se basa en el uso del anticuerpo monoclonal MM3 para la detección de catepsinas L. Esta es altamente sensible y específica, cerca del 100 %, incluso con solo 1-2 parásitos (Charlier et al., 2014), y no presenta reactividad cruzada con *Paramphistomum cervi*, *Taenia hydatigena*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Moniezia* spp., *Echinococcus* spp. y varios nematodos gastrointestinales (Beesley et al., 2018; George et al., 2017). Ha habido autores que han informado de sensibilidades inferiores, del 30-40%; estas discrepancias en los valores de sensibilidad podrían achacarse a ligeras variaciones en el procedimiento (Graham-Brown et al., 2019), pero también a la elevada variabilidad en la concentración de catepsina L en la muestra (Beesley et al., 2018). Se ha demostrado que permite detectar coproantígenos entre 1-5 semanas antes de que aparezcan los huevos en heces; sin embargo, en todos los casos, el total de las muestras no se detectaron hasta el comienzo del periodo patente (Calvani et al., 2018; Charlier et al., 2014; Martínez-Pérez et al., 2012; Pose, 2012; Robles-Pérez et al., 2013). Al igual que ocurría con la detección de anticuerpos, esta técnica no nos permite diferenciar entre las distintas especies causantes del parasitismo (Calvani et al., 2017).

Los niveles de antígenos fecales suelen reducirse a los 7-17 días tras el tratamiento, este hecho permite que se pueda utilizar esta técnica a la hora de evaluar la eficacia de un tratamiento y la aparición de resistencia al mismo (Charlier et al., 2014; George et al., 2017). Además, esta técnica en ocasiones permite detectar la infección antes de la aparición de huevos en las heces, lo cual resulta especialmente beneficioso para la detección de resistencia a fármacos que actúan durante las primeras semanas tras la infección como, por ejemplo, triclabendazol (George et al., 2017; Novobilský et al., 2012). Tanto la prueba de reducción de coproantígenos (CRT) como la prueba de reducción del recuento fecal de óvulos (FECRT) son los métodos más adecuados para la determinación de la eficacia farmacológica y la detección de resistencia al tratamiento. Por tanto, se recomienda el uso conjunto de ambas técnicas para obtener un resultado óptimo (Arifin et al., 2016; George et al., 2017).

Las principales ventajas de los métodos inmunológicos para la detección de la fascioliasis son las siguientes (Tabla 2):

- Obtención de resultados de forma rápida (Dacal et al., 2020; Ricciardi and Ndao, 2015).
- Técnicas prácticas, no especialmente laboriosas y relativamente asequibles (Dacal et al., 2020; Ricciardi and Ndao, 2015).
- No requieren personal altamente cualificado para la interpretación de los resultados (Ricciardi and Ndao, 2015).

- Administración simultánea de un elevado número de muestras, gracias a su fácil automatización, obteniéndose un alto rendimiento (Bonilla-Quintero, 2016; Charlier et al., 2014; George et al., 2017; Graham-Brown et al., 2019; Martínez-Sernández et al., 2016).
- Aplicación en diferentes matrices como suero, leche y heces (Charlier et al., 2014; George et al., 2017).
- Elevada sensibilidad, incluso en muestras con cargas parasitarias bajas (Charlier et al., 2014; Duthaler et al., 2010).
- Permiten la detección precoz del parasitismo en el periodo prepatente (Bonilla-Quintero, 2016).

Los inconvenientes de los métodos inmunológicos para la detección de la fascioliasis son los siguientes (Tabla 2):

- Obtención de un gran número de falsos positivos, bien por reacciones cruzadas o por la permanencia de los anticuerpos en circulación meses después de la administración de tratamiento (Beesley et al., 2018; Charlier et al., 2014; George et al., 2017; Pose, 2012).
- Requieren equipo costoso e infraestructuras, escasos en entornos con recursos limitados (Delgado et al., 2012; Mubanga et al., 2019).
- No permiten confirmar la especie causante del parasitismo (Calvani et al., 2017; Mas-Coma, 2020).
- No permiten evaluar la carga parasitaria (Mas-Coma, 2020).

Ventajas	Inconvenientes
Resultados rápidos	Falsos positivos
Técnicas prácticas y asequibles	Equipo e infraestructuras costosas
No requieren personal altamente cualificado	No se utilizan en zonas con escasos recursos
Elevado rendimiento	No permite la diferenciación de especies
Eficaz en diferentes matrices (suero, leche y heces)	No permite evaluar la carga parasitaria
Elevada sensibilidad	
Permiten una detección precoz	

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de los métodos inmunológicos

4.2.3. Métodos genético-moleculares

Las técnicas genético-moleculares se desarrollaron con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de los diagnósticos convencionales (Beesley et al., 2018).

❖ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica (Fig. 19) presenta un gran potencial como herramienta diagnóstica debido a su gran rendimiento, reproducibilidad y sensibilidad (Calvani et al., 2017).

Uno de los factores clave en el diseño de PCR es la elección del marcador genético. Por lo general, en el caso de *Fasciola*, los marcadores más usados son los espaciadores internos transcritos (ITS) (Calvani et al., 2018; Dacal et al., 2020; Robles-Pérez et al., 2013) y diversas secuencias de ADN mitocondrial, principalmente *ssu rARN* (Dacal et al., 2020). Estos marcadores son genes multicopia, lo que supone un aumento considerable de la sensibilidad ya que existen múltiples dianas en la reacción inicial de amplificación. Sin embargo, estas secuencias genómicas se han conservado bien evolutivamente hablando y pueden detectarse en otras especies cercanas; esto puede suponer la notificación de falsos positivos, debido a una amplificación inespecífica (Dacalet et al., 2020). El genoma mitocondrial evoluciona más rápido, de forma que resulta más útil para identificar a nivel de especie (Ai et al., 2011). También juegan un papel crucial en estos métodos la cantidad de muestra fecal utilizada y el tipo de kit comercial usado para la extracción de ADN (Arifin et al., 2016).

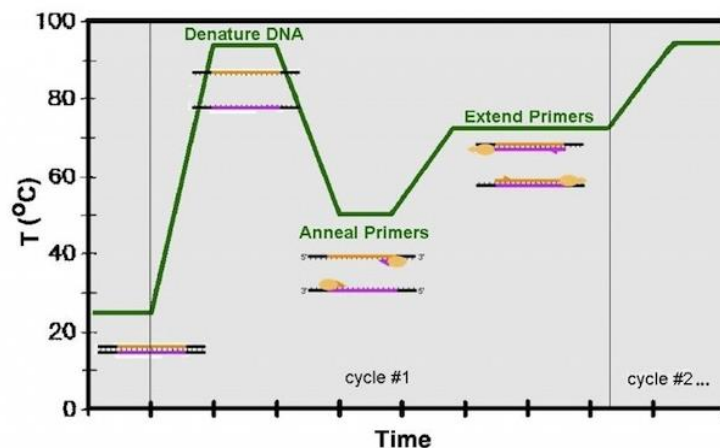


Figura 19. Ciclo de PCR (Blog de laboratorio)

Calvani et al., (2017) ha notificado una sensibilidad del 91-100% en bovinos con una baja carga parasitaria (menos o igual a 10 huevos por gramo de heces) usando un método de concentración de la muestra mediante sedimentación previo a la PCR. Sin embargo, otros estudios han obtenido valores de sensibilidad considerablemente más bajos, del 10,7% (Arifin et al., 2016). Estos valores tan bajos parecen estar relacionados con el procedimiento de

extracción de ADN y el volumen de muestra (Arifin et al., 2016). En algunos estudios como Calvani et al., (2018) y Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, (2016) se optó por aumentar el volumen inicial de muestra recomendado por el fabricante del kit de extracción, aumentando así la sensibilidad de la técnica.

Muchos estudios han notificado la elevada especificidad de la técnica: Robles-Pérez et al., (2013) ha realizado PCR en muestras de ovejas no infectadas e infectadas con nematodos gastrointestinales, donde la ausencia de productos de amplificación confirmó la especificidad de la técnica; también Calvani et al., (2017) probó la técnica con ADN de huevo de *Paramphistomum* y no se produjo la amplificación de este en infecciones concurrentes de ambos parásitos; por último, Martínez-Pérez et al., (2012) ha notificado que tras exponer la técnica PCR a nematodos gastrointestinales no se obtuvo ningún producto de amplificación.

La técnica PCR permite detectar el parasitismo de forma muy temprana, incluso 1-2 semanas después de la infección (Calvani et al., 2018; Charlier et al., 2014; Martínez-Pérez et al., 2012; Robles-Pérez et al., 2013). Varios autores han relacionado esta detección precoz con la presencia en heces de material celular o ADN del propio parásito inmaduro. Este ADN parece provenir de células desprendidas del tegumento de los parásitos inmaduros y algunos adultos como consecuencia del ataque del sistema inmune (Calvani et al., 2018; Martínez-Pérez et al., 2012). Sin embargo, la principal fuente de material genético son los huevos, que se detectan aproximadamente a partir de la semana 7-8; de manera que la detección precoz del parasitismo mediante esta técnica estaría limitada a la presencia de "ADN libre" en las heces (Calvani et al., 2018).

A diferencia de las técnicas anteriores esta permite la diferenciación entre especies (Calvani et al., 2017), pudiendo identificar así el parasitismo producido por *F. hepática*, *F. gigantica* o los híbridos intermedios. Esto supone una gran ventaja sobre todo en zonas donde se produce solapamiento entre ambas especies y sus formas intermedias híbridas (Ai et al., 2019).

Numerosos estudios han comparado la técnica PCR con FEC y cELISA. En el estudio de Robles-Pérez et al., (2013) se llegó a la conclusión de que la técnica PCR era la más sensible, seguida de cELISA y, por último, FEC (sedimentación). En cuanto a la detección de resistencia al tratamiento, también se detectaron más positivos con PCR, por lo tanto, esta técnica puede resultar útil en este aspecto. A diferencia del anterior, Arifin et al., (2016) concluyó que las técnicas FEC y cELISA seguían siendo más sensibles, ya que PCR y LAMP no detectaron *F. hepatica* en las muestras fecales. Tanto PCR como cELISA permiten un mayor rendimiento, especialmente si se requiere repetir la FEC varias veces para aumentar la sensibilidad de la técnica (Calvani et

al., 2018). Ya solo la diferenciación de especies y el aumento del rendimiento suponen claras mejoras respecto al resto de técnicas (Calvani et al., 2017); por ello, esta técnica está reemplazando en Europa y EEUU a las pruebas microscópicas como primera línea en el diagnóstico (Dacal et al., 2020).

El principal inconveniente que limita mucho su uso es la necesidad de un equipo especializado para realizar la prueba, únicamente disponible en algunos laboratorios; aunque se ha visto que las muestras pueden conservarse en etanol 70% y transportarse a otros laboratorios con una capacidad diagnóstica superior (Calvani et al., 2017). También se han notificado algunos problemas en cuanto a la reproducibilidad entre laboratorios (Beesley et al., 2018).

❖ Amplificación isotérmica medida por bucle (LAMP)

La técnica de Amplificación Isotérmica Medida por Bucle o LAMP (Fig. 20) se desarrolló como alternativa a la PCR (Beesley et al., 2018; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016). Se trata también de un procedimiento de amplificación genética, pero en este caso el proceso es isotérmico, es decir, la reacción se produce a una temperatura constante (61-62 °C) (Ai et al., 2011; Charlier et al., 2014).

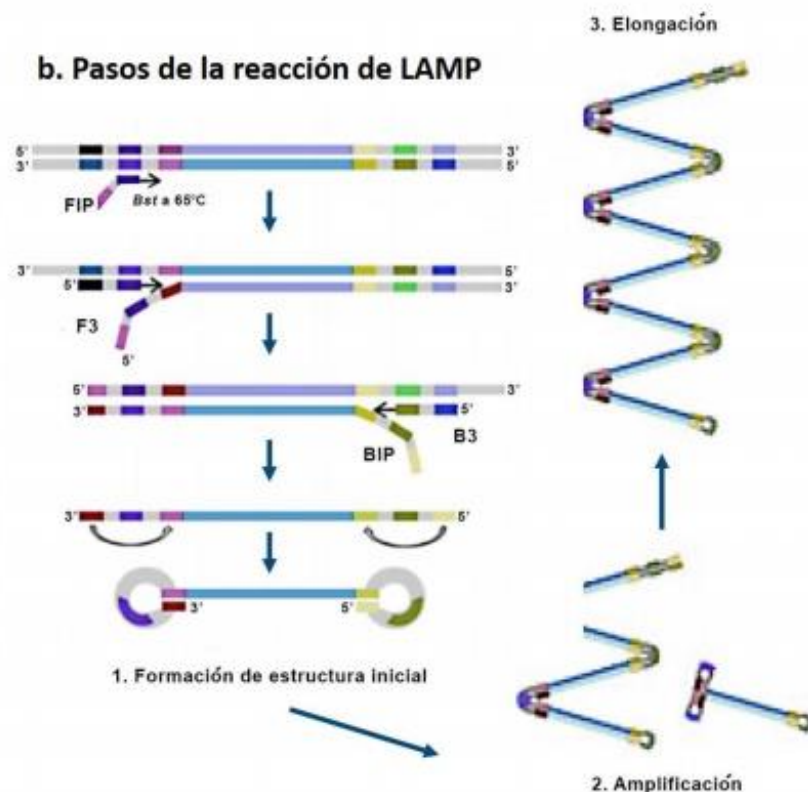


Figura 20. Proceso de la técnica LAMP (Carmona et al., 2018)

El hecho de que el proceso se lleve a cabo a una temperatura constante supone una gran ventaja frente a la PCR convencional, ya que no requiere instrumentación tan específica

-concretamente no requiere termociclador-, lo cual permite que esta técnica se pueda llevar a cabo en zonas con menos recursos o con tecnología más limitada (Beesley et al., 2018; Charlier et al., 2014; Ghodsian et al., 2019; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016).

Es una técnica muy sensible (Charlier et al., 2014), resulta hasta 105 veces más sensible que la técnica PCR (Ai et al., 2011). Sin embargo, hay estudios en los que se han aportado valores de sensibilidad realmente bajos, del 17,9% (Arifin et al., 2016). Como ocurría con los resultados obtenidos con la PCR en este mismo estudio, estos valores tan bajos parecen estar relacionados con el procedimiento de extracción de ADN y el volumen de muestra usado (Arifin et al., 2016).

Con LAMP se ha permitido detectar ADN en las heces desde una semana después de la infección en estudios experimentales (Calvani et al., 2018; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016). Además es un método rápido, ya que su duración es de 1 hora y 10 minutos, en comparación con la PCR estándar, cuya duración es de 3 horas (Beesley et al., 2018; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016).

Presenta una elevada especificidad, del 97,2% (Arifin et al., 2016); esto se debe al uso de cebadores o “primers” muy específicos. Concretamente requiere de entre 4-6 cebadores, a diferencia de la PCR que únicamente usa 2. Estos cebadores se unirán a seis regiones objetivo en el ADN (Ai et al., 2011; Ghodsian et al., 2019). Los más usados son los que se citan a continuación (Arifin et al., 2016; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016):

F3 -GCTGGCGTGATCTCCTCTA-

B3 -AACGTGCCTGGTATGGAATT-

FIP (F1c-F2) -TCTGCCAAGACAAGGGTGCATGTGAGGTGCCAGATCTATGG-

BIP (B1c-B2) -GTGCAGTGGCGGAATCGTGGTGTGCCGACTAGGGGATC-

Debido a todas estas características, el desarrollo de la técnica LAMP resulta prometedor, principalmente para el cribado de muestras en estudios epidemiológicos (Dacal et al., 2020; Ghodsian et al., 2019).

Las ventajas de los métodos genético-moleculares para la detección de la fascioliasis son las siguientes (Tabla 3):

- Permite un elevado grado de automatización, lo que supone un aumento considerable del rendimiento diagnóstico, ya que permite procesar un mayor número de muestras en menos tiempo (Calvani et al., 2018; Calvani et al., 2017; Dacal et al., 2020).
- Posibilita la comparación de resultados entre laboratorios, ya que los resultados son reproducibles (Calvani et al., 2017; Dacal et al., 2020).

- Alta sensibilidad, incluso en muestras fecales con baja carga parasitaria (< 10 huevos por gramo de heces), y alta especificidad (Arifin et al., 2016; Calvani et al., 2017; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016).
- Permite la diferenciación entre especies (Calvani et al., 2017).
- Permite la detección precoz de “ADN libre” en la heces, 1-2 semanas tras la infección (Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016).

Los inconvenientes de los métodos genético-moleculares para la detección de la fascioliasis son los siguientes (Tabla 3):

- La principal fuente de ADN en las heces son los huevos, de manera que, si no se detecta “ADN libre”, no se produciría diagnóstico precoz de la enfermedad y su uso quedaría limitado únicamente al diagnóstico tras la finalización del periodo prepatente, cuando ya se pueden detectar los huevos en las heces (Calvani et al., 2018; Charlier et al., 2014).
- Requieren el uso de equipo costoso e infraestructuras (Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016; Mubanga et al., 2019), por lo que no es posible su uso en zonas con escasos recursos y tecnología limitada (Mubanga et al., 2019).
- En la muestra de heces hay sustancias como polisacáridos, fenol y urea, que actúan como inhibidores de la PCR y pueden llevar a un fallo en la amplificación del ADN (Arifin et al., 2016).
- Notificación de falsos positivos, bien debido a los marcadores genéticos, detectables en otros parásitos, o bien debido a la retención de huevos en la vesícula biliar y su posterior liberación semanas después de la administración de tratamiento (Dacal et al., 2020; Martínez-Valladares and Rojo-Vázquez, 2016).

Ventajas	Inconvenientes
Automatización y elevado rendimiento	Huevos como principal fuente de ADN
Resultados reproducibles	Equipo e infraestructuras costosas
Elevada sensibilidad y especificidad	Interferencias en la amplificación del ADN
Permite la diferenciación entre especies	Falsos positivos
Permite una detección precoz	

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de los métodos genético-moleculares

	Técnicas	Detección parasitismo	Muestras	Equipo	Sensibilidad	Diferenciación especies	Detección resistencia
Parasitológicos	Sedimentación			Básico	33 - 90 %		
	Flotación	Fase patente	Heces	Más complejo	92,6 %	Difícil	Si
	Kato-Katz			Básico	45 %		
Inmunológicos	Ac en suero		Sangre		86 – 100 %		No
	Ac en leche (Individual)	Fase prepatente (2-4 semanas)			80 – 98%		No
	Ac en leche (“Bulk tank milk”)		Leche		59,1 – 100 %	No	No
	Ag circulantes	Fase prepatente (1-2 semanas)	Sangre	Equipo especializado	----		No
	Copro-Ag	Fase patente	Heces		30 – 100 %		Si
Genético-moleculares	PCR	Fase prepatente (ADN libre) o			10,7 – 100 %		
	LAMP	Fase patente (ADN huevos)	Heces	Equipo especializado	17.9 %	Si	Si

Tabla 4. Comparación de las diferentes técnicas

5. CONCLUSIONES

- La fascioliasis es un parasitismo causado por *F. hepatica* y *F. gigantica*, que afecta principalmente a la industria ganadera y, cada vez más, a los seres humanos.
- Para el tratamiento de este parasitismo, el fármaco de elección es triclabendazol; sin embargo, debido a la aparición de resistencia, en la actualidad se están buscando alternativas terapéuticas, principalmente Closantel y Oxiclozanida. A pesar de ello, parece previsible que siga apareciendo resistencia al tratamiento si el control del parasitismo sigue basándose únicamente en el uso de antihelmínticos.
- El diagnóstico de este parasitismo se basa en el uso de métodos parasitológicos, inmunológicos y genético-moleculares. Un diagnóstico óptimo exige el uso combinado de varias técnicas.
- Los métodos parasitológicos son los más empleados, ya que, a pesar de que presentan una sensibilidad muy baja y es necesario repetir el procedimiento para obtener un resultado fiable, son muy simples y no requieren de una instrumentación muy sofisticada.
- Los métodos inmunológicos suponen un aumento en la sensibilidad del diagnóstico. Entre ellos hay que destacar la ELISA para la detección de corpoantígenos porque resulta mucho menos laboriosa y especialmente sensible y específica. Asimismo la ELISA para la detección de anticuerpos permite un descubrimiento precoz del parasitismo y, a pesar de no indicar si la infección está en curso, resulta muy útil para el cribado de muestras.
- Los métodos genético-moleculares son los de uso más reciente y, aunque presentan una gran variabilidad en cuanto a su sensibilidad diagnóstica, se postulan actualmente como una de las opciones de diagnóstico más adecuada. Esto es debido a que, no solo permiten distinguir entre las especies causantes del parasitismo, sino que además permiten evaluar la eficacia del tratamiento.
- Los métodos inmunológicos y genético-moleculares han supuesto un gran avance y una enorme mejora en el diagnóstico de la fascioliasis, sin embargo, en la actualidad las zonas endémicas que cuentan con una instrumentación diagnóstica más precaria no pueden acceder a ellas y siguen dependiendo en exclusiva de los métodos parasitológicos. Esto supone para estas zonas una gran limitación en su capacidad diagnóstica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Afshan K, Fortes-Lima CA, Artigas P, Valero MA, Qayyum M, Mas-Coma S. Impact of climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and seasonality of human and animal fascioliasis in Pakistan. *Geospat Health*. 2014; 8(2): 317-34.
- Ai L, Chen JX, Cai YC, Lu Y, Chu YH, Chen SH, et al. Prevalence and risk factors of Fascioliasis in China. *Acta Trop*. 2019; 196: 180-8.
- Ai L, Chen MX, Alasaad S, Elsheikha HM, Li J, Li HL, et al. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches. *Parasit Vectors*. 2011; 4.
- Arifin MI, Höglund J, Novobilský A. Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Vet. Parasitol*. 2016; 232: 8–11.
- Baggini SP. 24 jul 2020. [Consultado en julio 2020]. Seguridad alimentaria, bromatología y microbiología de los alimentos [Blog]. Disponible en: <https://bagginis.blogspot.com/2014/12/las-enfermedades-transmitidas-por-los-30.html>
- Bargues MD, Gayo V, Sanchis J, Artigas P, Khoubbane M, Birriel S, et al. DNA multigene characterization of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea neotropica* and its fascioliasis transmission capacity in Uruguay, with historical correlation, human report review and infection risk analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(2).
- Bargues MD, Malandrini JB, Artigas P, Soria CC, Velásquez JN, Carnevale S, et al. Human fascioliasis endemic areas in Argentina: Multigene characterisation of the lymnaeid vectors and climatic-environmental assessment of the transmission pattern. *Parasit Vectors*. 2016; 9.
- Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martinez-Moreno A, et al. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 65(1): 199-216.
- Bonilla-Quintero R. Diagnóstico y control de trematodosis en ganado vacuno de Colombia: fasciolosis y paramphistomidosis [Tesis]. Lugo: Universidad de Santiago de Compostela; 2016.
- Calvani NED, George SD, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Comparison of early detection of *Fasciola hepatica* in experimentally infected Merino sheep by real-time PCR, coproantigen ELISA and sedimentation. *Vet. Parasitol*. 2018; 251: 85–9.
- Calvani NED, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Scrambled eggs: A highly sensitive molecular diagnostic workflow for *Fasciola* species specific detection from faecal samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(9).

- Ceballos L, Canton C, Cadenazzi G, Larsen K, Virkel G, Moreno L, et al. Understanding the main route of drug entry in adult *Fasciola hepatica*: Further insights into closantel pharmacological activity. *Exp. Parasitol.* 2017; 181: 23–9.
- Charlier J, Vercruyse J, Morgan E, Van Dijk J, Williams DJL. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitol Open.* 2014; 141(3): 326–35.
- Cortés Carbonell A, Fried B. Form and function in the digenea. En: Toledo R, Fried B, editores. *Digenetic trematodes*. 2ª ed. Switzerland: Springer; 2019. 3-20.
- Dacal E, Köster PC, Carmena D. Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2020; 38: 24–31.
- De la Puente R. 7 may 2020 [Consultado en julio 2020]. Blog de laboratorio [Blog]. Disponible en: <http://blogdelaboratorio.com/amplificacion-del-adn-la-pcr/>
- Delgado UN, Sierra Balcárcel RF, Espinosa González CT. Comparación de las técnicas Kato-Katz, TSET y TSR en el diagnóstico de infección por *Fasciola hepatica* en humanos. *Salud UIS.* 2012; 44(3): 7–12.
- Dodangeh S, Daryani A, Sharif M, Gholami S, Kialashaki E, Moosazadeh M, et al. Freshwater snails as the intermediate host of trematodes in Iran: a systematic review. *Epidemiol Health.* 2019; 41.
- Duthaler U, Rinaldi L, Maurelli MP, Vargas M, Utzinger J, Cringoli G, et al. *Fasciola hepatica*: Comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for the detection and quantification of faecal egg counts in rats. *Exp. Parasitol.* 2010; 126(2): 161–6.
- Elliott TP, Kelley JM, Rawlin G, Spithill TW. High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet. Parasitol.* 2015; 209(1–2): 117–24.
- Facultad de Biología UCM © [Internet]. 2020. Bioimágenes. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <http://bioimagen.bioucm.es/buscar/>
- Fundación Wikimedia [Internet]. 28 Jun 2020. Wikipedia. [Consultado en agosto 2020]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Fasciola_hepatica
- Gandhi P, Schmitt EK, Chen CW, Samantray S, Venishetty VK, Hughes D. Triclabendazole in the treatment of human fascioliasis: a review. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2019; 113(12): 797-804.
- Gao X, Zhang L, Tong X, Zhang H, Mehmood K, Jiang X, et al. Epidemiological survey of fasciolosis in yaks and sheep living on the Qinghai-Tibet plateau, China. *Acta Trop.* 2020; 201.
- García Más I, Muñoz Araújo B, Aguirre Inchaurre A, Polo Roldán I, García Moreno A, Refoyo

- Román P. Manual de laboratorio de Parasitología. Introducción a los Helminetos. Trematodos. REDUCA. 2008; 1(1): 67-93.
- George SD, Vanhoff K, Baker K, Lake L, Rolfe PF, Seewald W, et al. Application of a coproantigen ELISA as an indicator of efficacy against multiple life stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 2017; 246: 60-9.
 - Ghodsian S, Rouhani S, Fallahi S, Seyyed-Tabaei SJ, Taghipour N. Detection of spiked *Fasciola hepatica* eggs in stool specimens using LAMP technique. *Iran J Parasitol.* 2019; 14(3): 387-93.
 - Giacaman Salvo S. Estudios bioquímicos y moleculares sobre la leucina aminopeptidasa de *Fasciola hepatica* [Tesis]. Uruguay: Universidad de la republica; 2011.
 - Graham-Brown J, Williams DJL, Skuce P, Zadoks RN, Dawes S, Swales H, et al. Composite *Fasciola hepatica* faecal egg sedimentation test for cattle. *Vet. Rec. Open.* 2019; 184(19).
 - Guerrero-Espejo A, Bernad-Anso A. Incidence and geographical distribution of patients hospitalised with fascioliasis in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2019.
 - Hernández Ramírez DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol Clin.* 2010; 6(3): 173–7.
 - Horlock C [Internet]. n.d. British Society for immunology [Consultado en julio 2020]. Disponible en: <http://inmunologia.eu/tecnicas-experimentales/ensayo-de-inmunoabsorcion-ligado-enzima-elisa>
 - Husch C, Sattmann H, Haefeli I, Prosl H, Walochnik J. Genetic diversity of *Fasciola hepatica* in Austria. *Parasitol. Res.* 2020; 119: 1697–1701.
 - Kelley JM, Rathinasamy V, Elliott TP, Rawlin G, Beddoe T, Stevenson MA, et al. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. *Vet. Parasitol.* 2020; 277.
 - Kelly RF, Mazeri S, Hartley C, Hamman SM, Ngu Ngwa V, Nkongho EF, et al. Assessing the performance of a *Fasciola gigantica* serum antibody ELISA to estimate prevalence in cattle in Cameroon. *BMC Vet. Res.* 2019; 15.
 - Khademvatan S, Majidiani H, Khalkhali H, Taghipour A, Asadi N, Yousefi E. Prevalence of fasciolosis in livestock and humans: A systematic review and meta-analysis in Iran. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; 65: 116-23.
 - Köstenberger K, Tichy A, Bauer K, Pless P, Wittek T. Associations between fasciolosis and milk production, and the impact of anthelmintic treatment in dairy herds. *Parasitol. Res.* 2017; 116: 1981–7.
 - Kueakhai P, Chaithirayanon K, Chaiwichien A, Samrit T, Osotprasit S, Suksomboon P, et al.

- Monoclonal antibody against *Fasciola gigantica* glutathione peroxidase and their immunodiagnosis potential for fasciolosis. *Vet. Parasitol.* 2019; 276.
- Lance Wheeler © [Internet]. 2019. The Monster hunter's guide to: Veterinary parasitology. [Consultado en marzo 2020]. Disponible en: <https://www.veterinaryparasitology.com/>
 - Martínez-Pérez JM, Robles-pérez D, Rojo-vázquez FA, Martínez-valladares M. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 2012; 190: 80–6.
 - Martínez-Sernández V, Orbegozo-Medina RA, González-Warleta M, Mezo M, Ubeira FM. Rapid Enhanced MM3-COPRO ELISA for Detection of *Fasciola* Coproantigens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(7).
 - Martínez-Valladares M, Rojo-Vázquez FA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. *Parasit Vectors.* 2016; 9.
 - Mas-Coma S. Human fascioliasis emergence risks in developed countries: From individual patients and small epidemics to climate and global change impacts. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2020.
 - Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Human fascioliasis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitology* [Internet]. 2018; 145(13): 1665-99.
 - Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis. En: Toledo R, Fried B, editores. *Digenetic trematodes*. 2ª ed. Switzerland: Springer; 2019. 71-103.
 - Mathison BA, Pritt BS. A Systematic Overview of Zoonotic Helminth Infections in North America. *Lab Medicine.* 2018; 49(4): 61-93.
 - Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, Abbas RZ, Ijaz M, Durrani AZ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb. Pathog.* 2017; 109: 253-62.
 - Mirzadeh A, Yoosefy A, Kazemirad E, Barati Z, Golkar M, Babaie J, et al. Evaluation of a set of refolded recombinant antigens for serodiagnosis of human fascioliasis. *PLoS ONE.* 2018; 13(10).
 - Moazeni M, Ahmadi A. Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 2016; 169: 81–9.
 - Mubanga C, Mwape KE, Phiri IK, Trevisan C, Zulu G, Chabala C, et al. Progress on the development of rapid diagnostic tests for foodborne neglected zoonotic helminthiasis : A systematic review. *Acta Trop.* 2019; 194: 135–47.
 - Munita MP, Rea R, Martinez-Ibeas AM, Byrne N, Kennedy A, Sekiya M, et al. Comparison of

- four commercially available ELISA kits for diagnosis of *Fasciola hepatica* in Irish cattle. BMC Vet. Res. 2019; 15(414): 1–12.
- Novobilský A, Averpil HB, Höglund J. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. Vet. Parasitol. 2012; 190: 272–6.
 - Novobilský A, Höglund J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2015; 5(3): 172–7.
 - Perrodin S, Walti L, Gottstein B, Kim-Fuchs C, Candinas D, Banz V. *Fasciola hepatica* in a country of low incidence: a tricky diagnosis. Hepatobiliary Surg Nutr. 2019; 8(6): 597–603.
 - Pose LM. Avances en el diagnóstico Inmunológico de la Fasciolosis [Tesis]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2012.
 - Ricciardi A, Ndao M. Diagnosis of parasitic infections: What's going on? J Biomol Screen. 2015; 20(1): 6–21.
 - Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M. The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. Vet. Parasitol. 2013; 197: 277–82.
 - Serra AN. Optimización de técnicas coprológicas para el diagnóstico parasitario en el mono vervet [Tesis]. Valencia: Universidad CEU Cardenal Herrera; 2017.
 - Sumruayphol S, Siribat P, Dujardin J-P, Dujardin S, Komalamisra C, Thaenkham U. *Fasciola gigantica*, *F. hepatica* and *Fasciola* intermediate forms: geometric morphometrics and an artificial neural network to help morphological identification. PeerJ. 2020; 8.
 - Takeuchi-storm N, Denwood M, Petersen HH, Enemark HL, Stensgaard A-S, Sengupta ME, et al. Patterns of *Fasciola hepatica* infection in Danish dairy cattle: implications for on-farm control of the parasite based on different diagnostic methods. Parasit Vectors. 2018; 11.
 - Uruburu Gómez M, Bedoya Blandon JC, Velásquez Trujillo LE. ELISA indirecta para el diagnóstico de fasciolosis bovina en leche. CES Med Zootec. 2013; 8(2): 93–100.
 - US Department of health & Human Services [Internet]. 31 dic 2018. Centers for Disease Control and Prevention, CDC. [Consultado en julio 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>
 - Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A. Bulk tank milk ELISA to detect IgG1 prevalence and clustering to determine spatial distribution and risk factors of *Fasciola hepatica*-infected herds in Mexico. J. Helminthol. 2019; 93(6): 704–10.
 - Zárate-Rendón DA, Vlaminck J, Levecke B, Briones-Montero A, Geldhof P. Comparison of Kato-Katz Thick Smear, Mini-FLOTAC, and flukefinder for the detection and quantification of *Fasciola hepatica* eggs in artificially spiked human stool. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2019; 101(1):

59–61.

- Zoghi S, Emami M, Shahriarirad S, Vahedi R, Cheraghi MR, Zamiri B, et al. Human fascioliasis in nomads: A population-based serosurvey in southwest Iran. *Infez Med.* 2019; 27(1): 68–72.