



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE
CONTROL DE LAS INFECCIONES
POR NEMATODOS
GASTROINTESTINALES EN
GANADO OVINO**

Verónica Castilla Gómez de Agüero

Programa de Doctorado

“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

Tutor: Valentín Pérez Pérez

Dirigida por: María Martínez Valladares

León, 2023

El trabajo recogido en la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) de León, centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de León (ULE). Su realización ha sido posible gracias a la financiación de la Junta de Castilla y León, a través del contrato predoctoral (LE082-18) concedido (Resolución de 13 de junio de 2019, de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, BOCyL n° 12, Disp. 006) al amparo de la convocatoria “Ayudas para Financiar la Contratación Predoctoral de Personal Investigador “para el año 2019.



“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

Agradecimientos

En la vida no hay nada que se logre sin ayuda, y esta Tesis Doctoral no es la excepción. Este trabajo es el resultado del esfuerzo y la dedicación de una gran cantidad de personas a las que estaré eternamente agradecida. El camino ha sido duro, lleno de cuestas y curvas, pero he tenido la suerte de estar acompañada de grandes profesionales que me han ayudado a seguir adelante.

A mi directora María, gracias por confiar en mí, por tu tiempo y dedicación, por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por enseñarme todo lo que sabes. Nada de esto habría sido posible sin tu confianza. Al departamento de Toxicología, especialmente a Rafa.

A un equipo maravilloso. A Elora, gracias por cada momento vivido juntas, por cada muestreo, viaje y congreso. Por preocuparte por mí y ayudarme hasta el último día. Eres una mujer luchadora. Esta tesis es tanto tuya como mía. A Laura, gracias por acortarme los viajes y entender mi humor. Finalmente, a Marta, que nada ni nadie te quite esa energía y ganas de aprender. Llegarás lejos. A Maria, por tu disponibilidad incondicional, por enseñarme a gestionar mis frustraciones, a contar hasta 10 y a decir las cosas sin hacer daño.

No puedo olvidarme del personal del IGM, especialmente de Carmen y María Jesús. Me acogisteis desde el primer momento, me lo enseñasteis todo y luego me dejasteis volar sola, pero siempre vigilando por si os necesitaba. Habéis sido como una madre para mí y no puedo estar más agradecida. Al personal de las fincas, por vuestra paciencia buscando venas. A Mariví, por contagiarnos esa felicidad que te caracteriza, y sacarnos una sonrisa incluso en los momentos más difíciles.

A Fernando, mi persona de apoyo. Gracias por escucharme, ayudarme y entenderme. De este tiempo me quedo con nuestras risas, cotilleos, y reuniones. Sin saberlo, me has sujetado cuando no podía más y me has enseñado otro modo de ver la vida. A Marta, por endulzarme los días con chocolate y alegrarme los días con sonrisas. Sois felicidad. A Carmen Agudín, porque eres el claro ejemplo de que no hay distancia que rompa una verdadera amistad. Gracias por estar ahí siempre.

A Mari Tere y Marta por ser un ejemplo de mujeres fuertes y luchadoras. El día que os des cuenta de lo que valéis os comeréis el mundo. Gracias por cada frase de apoyo durante este proceso. Antonella, eres valiente, fuerte, luchadora y gran persona, que nadie te haga dudar de ello. A todos los que habéis formado parte en algún punto del trayecto, Raquel, Víctor, Esther, Alba, María M, Zapico, Miguel, Nuria, Camino, Sonia, Giráldez y Alex, gracias.

Dicen que, de todas las posesiones, la amistad es la más valiosa, y yo, del IGM me llevo un gran tesoro. Gracias a Dani, Marcos y Noive, por estar al otro lado cuando os he necesitado y formar parte de cada recuerdo. No tengo palabras para expresar todo lo que habéis hecho por mí. En poco tiempo me habéis demostrado que siempre estáis. Aún nos queda mucho camino que recorrer.

A Rosalía, por demostrarme cada día que siempre puedo contar contigo. Por estar en todos los grandes momentos, pero sobre todo por formar parte en todos los malos y no soltarme la mano. Gracias por estar ahí después de tantos años y ser mi pilar. Gracias por ser como eres.

A Magdalena, por demostrarme que los sueños se persiguen y se cumplen. Eres la imagen de la felicidad, y la mayor representación de la tolerancia. Gracias por abrirme aún más la mente. A Vero, por enseñarme la importancia de la amistad a pesar de las dificultades. Porque eres capaz de

hacerme llorar de risa. Por ser mi confidente. A Laura, por enseñarme que hay que reírse de cada momento de la vida y que la felicidad está en las pequeñas cosas. Por regalarme siempre una sonrisa y por estar cuando te necesito.

A Abel, porque eres el mejor compañero de vida que he podido elegir. Por quererme sin excusas. Porque eres parte esencial de mi vida, de mis noches y de mis días, de mis sueños y de mis desvelos. Porque hemos aprendido a superar las cosas juntos y hemos sanado heridas. Por ser casa. Significas mucho más de lo que logro expresar.

Finalmente, a mi familia, en especial a mis padres. Porque sin vuestro esfuerzo y dedicación no habría sido posible. Gracias por enseñarme a ser independiente, a no tener miedo y a conseguir las cosas con esfuerzo y constancia. Por confiar en mí más veces de las que lo hago yo. A mi hermana, porque puedes ser la persona más lejana y la más cercana a la vez. A Montse y Roberto, no tengo ni un recuerdo feliz en el que no estéis, y eso es magia. A mi tía, porque siempre estás ahí, aunque no te vea. En especial a los que ya no están, sé que seguís estando orgullosos.

A todos vosotros

Gracias

La presente Tesis Doctoral ha sido redactada en formato de **compendio de publicaciones** y siguiendo la normativa para la obtención de la **Mención Internacional del título de Doctor**. A continuación, se detallan las referencias bibliográficas de las publicaciones que integran la presente Tesis Doctoral:

- **Publicación I:** Castilla Gómez de Agüero V, González JF, Hernández JN, Valderas-García E, Rojo-Vázquez FA, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Martínez-Valladares M. (2021). Differences within Churra Breed Sheep in the Early Immune Response to the Infection by *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology Research*, 120 (3), 1115–1120. doi: 10.1007/s00436-020-06953-4.
 - Índice de impacto: 2,000
 - Cuartil: Q1
 - Open Access: Si

- **Publicación II:** Castilla Gómez de Agüero V, Valderas-García E, González del Palacio L, Giráldez FJ, Balaña-Fouce R, Martínez-Valladares M. Secretary IgA as Biomarker for Gastrointestinal Nematodes Natural Infection in Different Breed Sheep. *Animals*, 13, 2189. doi: 10.3390/ani13132189
 - Índice de impacto: 3,231
 - Cuartil: Q1
 - Open Access: Si

- **Publicación III:** Castilla Gómez de Agüero V, Esteban-Blanco C, Argüello H, Valderas-García E, Andrés S, Balaña-Fouce R, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Martínez-Valladares M. (2022). Microbial Community in Resistant and Susceptible Churra Sheep Infected by *Teladorsagia circumcincta*. *Scientific Report*, 12 (1). doi: 10.1038/s41598-022-21058-x.
 - Índice de impacto: 4,996
 - Cuartil: Q1
 - Open Access: Si

Índice general

Abreviaciones/ Abbreviations.....	XIII
Resumen/Summary	1
Introducción	11
1. La producción ganadera	13
1.1. Contexto histórico	13
1.1. Producción ganadera ovina en España	15
1.2. La producción ovina en términos económicos	17
2. Nematodosis gastrointestinales.....	18
2.1. Etiología de las nematodosis gastrointestinales	19
3. Familia Trichostrongylidae	21
3.1. Morfología	21
3.2. Ciclo biológico	22
3.3. Epidemiología.....	24
3.4. Hipobiosis.....	27
4. Respuesta inmunitaria frente a la infección por nematodos gastrointestinales.....	30
4.1. Componentes del sistema inmune	32
4.1.1. Eosinófilos.....	32
4.1.2. Mastocitos/ leucocitos globulares	33
4.1.3. Linfocitos T CD4 ⁺ y T $\gamma\delta$	35
4.1.4. Anticuerpos	36
4.2. Respuesta inmunitaria innata.....	38
4.3. Respuesta inmunitaria adaptativa	40
5. Métodos de control	43
5.1. Control químico.....	43
5.2. La resistencia antihelmíntica.....	46
6. Métodos alternativos de control	51
6.1. Tratamiento selectivo y dirigido	52
6.2. Control biológico	52
6.3. Manejo de pastos	53
7. Selección genética	55
8. Microbiota gastrointestinal	60

8.1.	El concepto de microbiota	60
8.2.	Ecosistema microbiano abomasal.....	61
8.3.	Relación parásito-hospedador-microbiota.....	62
Objetivos		67
Capítulo I:		71
Capítulo II:		75
Capítulo III:		79
Discusión		83
Conclusions		99
Bibliografía		103

Abreviaciones/ Abbreviations

°C	Grados centígrados	Degree Centigrade
μL	Microlitro	Microliter
μm	Micrómetro	Micrometre
AAD	Derivados del aminoacetnitrilo	Derivatives of Aminoacetonitrile
AH	Antihelmíntico	Anthelmintic
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico	Ribosomal Ribonucleic Acid
ASV	Variante de secuencia de amplicón	Amplicon Variant Sequence
BDZ	Benzimidazol	Benzimidazole
CarLA	Antígeno larvario de carbohidrato	Carbohydrate Larval Antigen
CCAA	Comunidades Autónomas	Autonomous Communities
cFEC	Recuento fecal de huevos acumulado	Cumulative faecal egg count
CHM	Complejo mayor de histocompatibilidad	Major Histocompatibility Complex
Cl ⁻	Ion cloro	Chlorine ion
CO ₂	Dióxido de Carbono	Carbon dioxide
CPA	Células presentadoras de antígeno	Antigen Presenting Cells
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPG	Huevos por gramo de heces	Egg per Gram
FEC	Recuento fecal de huevos	Faecal Egg Count
GIN	Nematodos gastrointestinales	Gastrointestinal Nematodes
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	Sulfuric Acid
HCl	Ácido Clorhídrico	Hydrochloric Acid
HGH	Huevos por gramo de heces	Eggs per Gram of Faeces
HRP	Peroxidasa del rábano	Horseradish Peroxidase
IgA	Inmunoglobulina A	Immunoglobulin A
IgE	Inmunoglobulina E	Immunoglobulin E
IgG	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
IgG ₁	Inmunoglobulina G isotipo 1	Immunoglobulin G isotype 1
IL-	Interleuquina	Interleukin
IM	Imidazoles	Imidazole
K ⁺	Ion potasio	Potassium ion
kg	kilogramo	Kilogram
L ₁	Primer estadio larvario	First larval stage
L ₂	Segundo estadio larvario	Second larval stage
L ₃	Tercer estadio larvario	Third larval stage
L ₃ SE	Antígeno somático de larvas III	Somatic Antigen Third Larval Stage
L ₄	Cuarto estadio larvario	Fourth larval stage
L ₅	Quinto estadio larvario	Fifth larval stage

LEV	Levamisol	Levamisol
LG	Leucocitos globulares	Globule leukocytes
LM	Lactonas Macrocíclicas	Macrocyclic Lactones
M	Molar	Molar
mg	Miligramo	Milligram
ml	Mililitro	Millilitre
Na ⁺	Ion sodio	Sodium ion
NGI	Nematodo gastrointestinal	Gastrointestinal Nematodes
NMDS	Escala multidimensional no métrica	Non-metric Multidimensional Scale
OD	Densidad óptica	Optical Density
ODR	Ratio de densidad óptica	Optical Density Ratio
OMS	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
ONU	Organización de Naciones Unidas.	United Nations
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	Polymerase Chain Reaction:
PDI	Proteína Disulfuro Isomerasa	Protein Disulfide Isomerase
pi	Post-infección	Post-infection
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones	Pattern Recognition Receptor
PT-milk	PBS-Tween leche	PBS Tween milk
RA	Resistencia antihelmíntica	Anthelmintic Resistance
RG	Grupo resistente	Resistant group
SCFA	Ácidos Grasos de Cadena Corta	Short Chain Fatty Acids
SD	Desviación estándar	Standard Derivation
SG	Grupo susceptible	Susceptible group
Sp	Especie	Specie
SPSS	Paquete Estadístico de Ciencias Sociales	Statistical Package for the Social Sciences
T reg	Linfocitos T Reguladores	Regulatory T cells
TCR	Receptor de Linfocitos T	T Cell Receptor
TST	Tratamiento Selectivo de Diana	Target Selective Treatment
TT	Tratamiento de Diana	Target Treatment
UE-27	Unión Europea de los 27	European Union-27
UV	Ultravioleta	Ultraviolet

Resumen/Summary

RESUMEN

Las infecciones provocadas por nematodos gastrointestinales representan un grave inconveniente para el sector ganadero de pequeños rumiantes. A estas infecciones se le atribuyen importantes pérdidas económicas debido a que afectan negativamente a los parámetros productivos y reproductivos, ocasionando descenso de la producción de leche y lana y la reducción del crecimiento y de la fertilidad, por lo que la realización de un control efectivo incrementaría los beneficios producidos por cada animal. En pequeños rumiantes, las especies que provocan mayores pérdidas económicas son *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp. En condiciones naturales, las infecciones son mixtas y están provocadas por diferentes especies de nematodos. En zonas templadas las especies más prevalentes son *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp, mientras que en climas tropicales predomina *H. contortus*.

Hasta el momento, los programas de control se han basado en la administración de fármacos antihelmínticos debido a su buena relación costo-beneficio, y a eliminación/reducción de la carga parasitaria y de la excreción fecal de huevos. No obstante, su uso indiscriminado ha favorecido el desarrollo de resistencias antihelmínticas, por lo que el efecto de los fármacos se ve reducido. La expansión de la resistencia ha hecho inviable el uso de estos tratamientos a largo plazo, por lo que en los últimos años han surgido nuevos enfoques en el desarrollo de métodos alternativos o complementarios al control químico. El control a través de la selección de animales se ha postulado como una alternativa de control sostenible, debido a que la adaptación de los helmintos a los mecanismos inmunitarios del hospedador se desarrolla lentamente. Además, no se favorecería la selección de resistencias, ni generaría residuos químicos. Cabe destacar que el cambio climático está provocando cambios en la distribución de estas especies, por lo que desarrollar métodos de control que eviten los tratamientos farmacológicos y que sean sostenibles en el tiempo es de vital

importancia. No obstante, la relación huésped-parásito es sumamente compleja y resulta necesario realizar más estudios para poder profundizar en los mecanismos inmunitarios que intervienen que puedan proporcionar información para poder identificar los animales capaces de controlar la infección.

Para abordar esta problemática, la presente Tesis Doctoral se centra en la exploración de los mecanismos inmunitarios de ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente y susceptible que habían sido infectadas experimentalmente con *T. circumcincta*. Además, se evaluaron los posibles efectos de la infección en la composición de la microbiota. Asimismo, se han estudiado los niveles del anticuerpo IgA como indicador molecular de la infección por NGI en condiciones naturales.

Bajo este contexto, el Capítulo I se centra en la búsqueda de diferencias en la respuesta inmunitaria a nivel humoral y celular de ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta*. Los datos de IgA medidos en suero sanguíneo frente al antígeno somático de L₄ de *T. circumcincta* mostraron diferencias significativas el día 3 post-infección (pi), y cercano a la significancia el día 21 pi. Tras desparasitar a los animales, estos fueron infectados en una segunda infección experimental y sacrificados 7 días después. Los datos de recuento de L₄ mostraron una diferencia del 68% de carga larvaria entre grupos. Por su parte, el grupo resistente mostró un incremento en las poblaciones características de la respuesta inmunitaria tipo Th2; los linfocitos T $\gamma\delta$, los linfocitos T CD4⁺ y los leucocitos globulares, aunque sin diferencias significativas. Igualmente, se detectó una correlación positiva entre el número de linfocitos T $\gamma\delta$ y el número de eosinófilos, pero tan solo en el grupo resistente. Estos datos respaldan la hipótesis de variabilidad intraespecífica de la raza Churra que permitiría la selección de animales usando los parámetros adecuados.

Debido a que las infecciones naturales suelen estar causadas por varias especies de nematodos gastrointestinales y que la respuesta inmunitaria del

hospedador es muy variable, y no solo depende de las condiciones fisiológicas, edad y raza, sino también de la especie de nematodo, es necesario el desarrollo de métodos de selección más sencillos, rápidos y fiables. Bajo este contexto se desarrolló el Capítulo II de esta Tesis Doctoral. Se tomaron muestras de heces, sangre, saliva y secreciones nasales de 582 ovejas hembra (193 menores de un año y 389 adultas mayores de un año) de raza Assaf, Castellana y Churra. Mediante ELISA se midieron los niveles de IgA específica presentes en suero sanguíneo, saliva y secreciones nasales, frente al antígeno somático de L₃ y un fragmento de la proteína disulfuro isomerasa, con el fin de buscar una asociación con el número de huevos con gramo de heces. El modelo desarrollado verificó que las tres razas presentaban el mismo comportamiento respecto a la eliminación de heces, por lo que fueron tratadas como único grupo, y tan solo se diferenciaron los animales por edad. Además, a través de un modelo se demostró que la edad influye en el riesgo de infección, siendo las ovejas jóvenes las que presentaban mayor riesgo que las adultas, con la excepción de la raza Castellana, cuyo riesgo de infección era similar independientemente de la edad. Asimismo, la asociación entre los niveles de IgA medidos en secreciones nasales y en suero con la eliminación de huevos en heces fue la más significativa. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las infecciones en campo podrían comportarse de manera contraria a las infecciones experimentales, por lo que sería interesante estudios en otras razas con el fin de comprobarlo. Además, parece que los niveles de IgA presentes en las secreciones nasales en animales jóvenes Assaf, Castellana y Churra, podría ser un buen candidato como método de selección de corderos menores de un año para su cría o incluso su reproducción.

El Capítulo III de la presente Tesis Doctoral se centró en la caracterización de la composición de la microbiota del contenido gástrico y de la mucosa gástrica del abomaso de los animales del Capítulo I. Cada vez existen más evidencias que respaldan la hipótesis de que la microbiota del huésped puede jugar un papel clave en la relación parásito-hospedador y que las

alteraciones de composición están asociadas a las infecciones por nematodos gastrointestinales, incluso se especula con que la microbiota podría resultar un objetivo prometedor en el desarrollo de nuevas estrategias destinadas a reducir el impacto de estas infecciones. Para ello, se secuenció la región V3-V4 del gen 16S del ARN ribosomal, utilizando tecnología Illumina, de muestras de mucosa gástrica y de contenido gástrico. Aunque la riqueza y la diversidad de especies no cambiaron entre grupos, sí se detectó mayor abundancia en especies bacterianas productoras de butirato, un ácido graso de cadena corta con efecto antiinflamatorio, como *Clostridium sensu stricto-1* y *Turicibacter*, en la mucosa gástrica. El contenido gástrico mostró diferencias significativas en *Serratia* spp un género bacteriano reconocido por producir compuestos con acción nematocida. Estos datos apoyan la hipótesis de que la composición de la microbiota tiene un importante papel en el desarrollo de las infecciones gastrointestinales.

SUMMARY

Gastrointestinal nematodes (GIN) infections are a serious problem in the small ruminant sector worldwide. These infections cause significant economic losses, mainly because they affect the productive and reproductive parameters, which has led to a reduction in milk and wool production, and growth and fertility. For this reason, effective control would increase the benefits produced by each animal. In small ruminants, the main species are *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, and *Trichostrongylus* spp. In natural conditions, the infections are varied and are provoked by different nematode species. In temperate regions, the most prevalent species are *T. circumcincta* and *Trichostrongylus* spp. while in tropical climates *H. contortus* is the most predominant.

The control programs have been based on the use of anthelmintic drugs due to a good cost-benefit relationship and the elimination/reduction of the parasitic burden and the fecal excretion of eggs. However, their indiscriminate use has favoured the development of anthelmintic resistance that reduces the drug effect. This increase in resistance makes impracticable the use of these treatments long-term. For this reason, the development of alternative or complementary methods to chemistry control has emerged. The control using breeding selection has been raised as a sustainable alternative on account of the time that helminths take to be adapted to the host immune mechanism is slow. Besides, the method would not promote the selection of resistance, and would not generate chemical residues. It is important to say that climate change is modifying the nematode species distribution, hence developing control methods which avoid pharmacological treatments and are sustainable in time is vital. Nevertheless, the relationship between host-parasite is extremely complex and it is needed to carry on more research deep into immunological mechanisms that intervene and to obtain information to identify animals that are able to control the infection.

To address this dilemma, this Doctoral Thesis is focused on the exploration of immunological mechanisms in ewes Churra breed sheep with resistant or susceptible phenotype that have been previously experimental infected with *T. circumcincta*. Besides, the possible effect caused by the infection on microbiota composition in gastric content and mucosa content has been evaluated. Likewise, it has been studied that IgA levels as infection marker by GIN in natural conditions.

Under this context, Chapter I is focused on the lookup of the differences in the immune response in Churra ewes previously classified as resistant or susceptible phenotype according to the fecal egg count (FEC) after a first experimental infection with *T. circumcincta*. IgA in serum against the L₄ somatic antigen of *T. circumcincta* showed significant differences the day 3 post-infection (pi) and approaching significance the day 21 pi. After being dewormed, the animals were challenged with a second experimental infection and then were slaughtered the day 7 pi. The larval count showed a reduction of 68% in the between groups. The resistant group showed an increase in cellular populations characteristic of immune response type II; $\gamma\delta$ T cells, CD4⁺ T cells, and globule leukocytes but without significant differences. At the same time, a positive correlation was found between the number of $\gamma\delta$ T cells and the number of eosinophils in the resistant group. These data could indicate that the Churra breed has intra-specific variability that could allow selecting animals to use appropriate parameters.

Since natural infections are usually caused by several species of gastrointestinal nematodes and the immune response is highly variable, depending, not only on physiological conditions, age, and breed but also on the species of nematode too, it is imperative to develop simpler, faster, and more reliable selection methods. In this context, the second chapter of this Doctoral Thesis was developed. Samples of blood, saliva, and nasal secretions were taken from 582 female ewes (193 younger than one age and 389 older than one year

old) of the Assaf, Castellana, and Churra breeds as they are the most common breeds in this area which this study was carried out. IgA levels in serum, saliva, and nasal secretions were measured against L₃ somatic antigen of *T. circumcincta* and a fragment of protein disulfide isomerase using ELISA, in search of an association between IgA levels and FEC. The intercept model verified that all the breeds had the same behaviour in the ranks of FEC and were studied as the only group being the age the only variable. Besides, this model demonstrated that age influenced the infection risk, being young sheep the ones with a higher risk to be infected than adults, except for the Castellana breed, whose infection risk was similar, regardless the age. Likewise, the association between IgA levels measured in nasal secretions and serum with FEC was the most significant. Our results indicated that infections in natural conditions could have different behaviour from experimental infections, so it would be interesting to study other breeds to verify it. In addition, it seems that the IgA levels in the nasal secretions of young Assaf, Castellana, and Churra animals could be a good candidate as a selection method for young sheep for breeding or even reproduction.

Chapter III of this Doctoral Thesis focused on searching for differences in the microbiota composition of the gastric content and the gastric mucosa of the abomasum from the animals mentioned as the first chapter. There is more evidence that supports the hypothesis that the host microbiota may play a key role in the host-parasite relationship and that compositional changes are associated with infections by GIN, or even that the microbiota could be a promising goal in the development of new strategies aimed at reducing the impact of these infections. For this, the V3-V4 of the 16S ribosomal RNA gene was sequenced, using Illumina technology, from samples of gastric mucosa and gastric contents. Although species richness and diversity did not change between groups, a greater abundance was detected in butyrate-producers-bacteria. Butyrate is a short-chain fatty acid with anti-inflammatory effects, such as *Clostridium sensu stricto-1* and *Turicibacter*, in the gastric mucosa. The gastric content showed significant differences in *Serratia* spp, a bacterial genus

recognized for producing compounds with nematocidal effect. These data support the hypothesis that the composition of the microbiota plays an important role in the development of gastrointestinal infections.

Introducción

1. La producción ganadera

1.1 Contexto histórico

La actividad ganadera comenzó hace aproximadamente 11.000 años en una región conocida como el Creciente Fértil (actual Irán, Turquía, Irak y Siria), cuando el ser humano domesticó las primeras ovejas (Figura 1) [1,2]. La domesticación de animales salvajes y el cultivo de especies vegetales provocaron un cambio fundamental en el desarrollo de la humanidad, dando inicio al periodo neolítico [3]. Este proceso desencadenó una relación simbiótica en la que el animal recibía alimentos y protección por parte de los humanos y estos accedían fácilmente a los productos necesarios para su supervivencia (leche, carne, lana, desplazamiento...) [4]. Debido a esta cooperación, el estilo de vida de ambos cambió significativamente; los humanos pudieron asentarse permanentemente, mientras que los animales sufrieron modificaciones de algunas de sus condiciones, tales como su fenotipo, su crecimiento o su reproductibilidad, perdiendo aquellas capacidades que no necesitaban en cautividad [4]. Los individuos fueron seleccionados en función de las cualidades más adecuadas para los seres humanos; redujeron su tamaño, disminuyeron las dimensiones de sus cuernos y se seleccionaron aquellos que tenían un carácter más dócil [5].

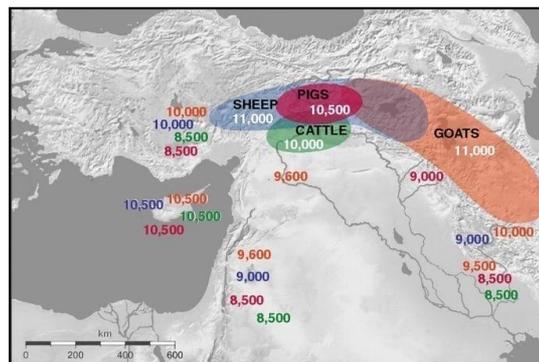


Figura 1. Origen y dispersión de la domesticación de ganado en el Creciente Fértil (actual Irán, Turquía, Siria e Irak), hace aproximadamente 11.000 años. Fuente: Hancock (2022).

Los datos arqueológicos de la Edad de Hierro y del periodo romano indican que la distribución de las especies dependía de las condiciones de la región y del estilo de vida. Por ejemplo, el ganado ovino predominaba en las costas holandesas debido a que las condiciones saladas del suelo protegían a los animales de infectarse por el parásito *Fasciola hepatica* [3].

Durante la Edad Media, los sistemas de manejo y producción ganadera no difirieron de los siglos anteriores. A pesar de que lentamente se fueron produciendo mejoras, estas se vieron frenadas por hambrunas y plagas [6]. La devastadora peste bovina de mediados del siglo XVIII impulsó la creación de las primeras **Escuelas Veterinarias** en Europa, lo que facilitó la cría y tuvo como consecuencia un aumento en el número de cabezas de ganado. El incremento en la productividad agrícola contribuyó al desarrollo de los **sistemas de manejo intensivo**, ya que la mejora de la calidad de los forrajes permitía alimentar a un mayor número de animales durante los meses de invierno. Asimismo, surgieron los primeros tratados sobre **bienestar animal** que se centraban en el diseño de establos con condiciones adecuadas de temperatura, luz y aireación, lo que contribuyó a la mejorar la salud del ganado. Desde mediados del siglo XX hasta la actualidad, los sistemas de producción animal se han **intensificado y especializado**, lo que significa que una gran parte de las explotaciones estabulan a sus animales durante parte del año en espacios pequeños, con poca aireación y luz natural, criando únicamente una especie animal y adaptando y mecanizando las instalaciones, lo que permite obtener productos a muy bajo precio en el mercado. Sin embargo, en términos sociales, la ganadería intensiva ha adquirido connotaciones negativas, así como numerosos detractores, cada vez más preocupados por el bienestar animal, la reducción del uso de antibióticos y fármacos, la seguridad alimentaria, la contaminación ambiental y los sistemas ganaderos sostenibles. Después de la Primera Guerra Mundial y hasta 1970, el número de explotaciones y cabezas de ganado aumentó debido a la introducción de nuevos métodos de manejo, cría y producción intensiva. Desde principios del siglo XXI hasta el día de hoy, los informes evidencian una

reducción del número de explotaciones existentes, aunque señalan un incremento en el número de cabezas de ganado por explotación, es decir, hay menos explotaciones, pero son más grandes [6].

1.1. Producción ganadera ovina en España

La Organización de Naciones Unidas (ONU) estima que la población mundial alcanzará los 9.700 millones de personas en el año 2050 [7]. En las últimas décadas, la demanda de alimentos para satisfacer a una población mundial en pleno crecimiento ha obligado a la agricultura y a la ganadería a usar métodos de producción a gran escala, sin control y poco sostenibles para el medio ambiente [8,9]. La producción animal es inevitable y la ganadería de pequeños rumiantes es fundamental para cubrir la demanda mundial. Además, juega un papel clave en la sostenibilidad económica, especialmente en países en vías de desarrollo y en zonas rurales [10].

Tras la salida de Reino Unido de la Unión Europea, España se alza como el primer país en número de cabezas de ganado ovino con 15 millones de efectivos en el 2021, aportando un 25 % del censo total de la UE-27 [11–13]. En las últimas décadas, la evolución de la cabaña ovina ha ido en descenso, pasando de 24 millones de cabezas en 1999 a 15 millones en el año 2019, lo que supone un descenso del 37,5% aunque, desde el año 2014, el censo se mantiene relativamente estable (Figura 2) [12,13].



Figura 2. Distribución del censo ovino por países de la UE-27 en el año 2021. Fuente: MAGRAMA 2021.

La distribución del censo ovino en España es desigual, concentrándose principalmente en áreas desfavorecidas y contribuyendo significativamente a la economía de la zona. En el año 2022, el 80% del censo se localizaba en Extremadura (24,3%), Castilla y León (16,3%), Castilla-La Mancha (15,6%), Andalucía (15%) y Aragón (10,1%) [14]. Estos territorios cuentan con extensas superficies que permiten el máximo aprovechamiento de los recursos disponibles, especialmente de los pastos comunales, permitiendo la aplicación del **sistema de manejo semiextensivo** la mayor parte del año y siendo necesario administrar alimentación complementaria solamente durante los meses más fríos. Además, los efectivos son, en su mayoría, razas autóctona más adaptadas al entorno, lo que favorece el mantenimiento genético y el uso racional de los recursos, protegiendo el medio ambiente [12].

Durante el año 2022, el censo total ovino en Castilla y León fue de 2.2 millones de activos, siendo Zamora la provincia con un mayor número (537.513), seguido de León (381.086), Salamanca (311.470) y Valladolid (245.264) [15]. Desde el punto de vista económico, esta comunidad es líder nacional en ovino de leche y de carne, principalmente gracias a la Indicación Geográfica Protegida de lechazo de raza Churra. Por lo que se convierte en la segunda en cuanto a censo ovino total, que consolida al sector como un pilar fundamental para la sostenibilidad del medio rural (Figura 3).

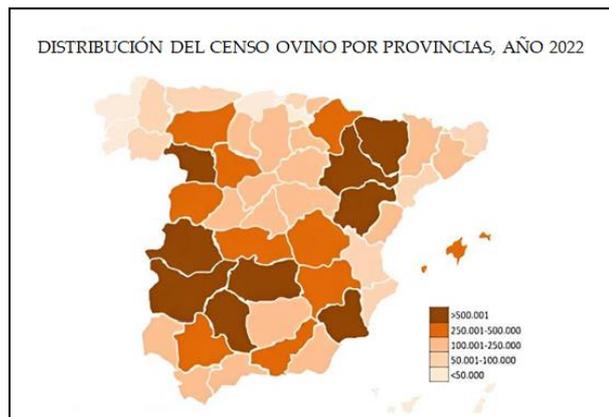


Figura 3. Distribución del censo ovino por provincias. Año 2022. Fuente MAGRAMA

1.2. La producción ovina en términos económicos

El sector ovino-caprino de carne y leche representó en el año 2021 el 4% de la Producción Final Agraria de España, con un valor estimado de 2.266,4 millones de euros. En términos de Producción Final Ganadera, el sector ovino-caprino representó el 10,8% de la producción [12].

El sector cárnico alcanzó los 1.359,9 millones de euros, experimentando un crecimiento económico del 14% respecto al año anterior [12]. Durante el año 2021, se sacrificaron 9,730.152 cabezas de ganado, generando 120.618 toneladas de carne. El 76% de los sacrificios se concentran en las CCAA de Castilla y León, Castilla-La Mancha, Cataluña, Aragón y Murcia. Del total de sacrificios, el 92% correspondían a corderos, mientras que el 8% fueron animales que habían finalizado su vida reproductiva [12].

El valor económico de la producción lechera de oveja se ha estimado en 524 millones de euros, suponiendo un 26% del valor de la producción láctea nacional (leche procedente de vaca, cabra y oveja) [13]. La modernización del sector ha provocado un aumento de la productividad, obteniendo mayor rendimiento de cada animal. A esto se le añade la introducción de razas mejoradas, sustituyendo a las autóctonas en sistemas intensivos con estabulación permanente. En el año 2021 se produjeron 529 millones de litros de leche de oveja. La distribución fue desigual, siendo Castilla y León (57%) y Castilla-La Mancha (28%) las CCAA con mayor número de explotaciones y producción lechera (Figura 4) [13].

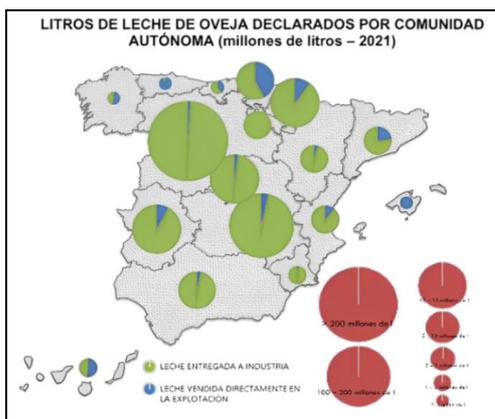


Figura 4. Litros de leche de oveja declarados por CCAA en el año 2021. Fuente MAGRAMA.

Los sistemas de manejo de las explotaciones ganaderas ovinas en España se pueden clasificar según el sistema de manejo en **sistemas de manejo intensivo, semiextensivo o extensivo**. El sistema de manejo intensivo es aquel en los que los animales están estabulados, no salen al exterior, necesitan aporte externo de alimento y lactancia artificial. Por ello, requieren de un nivel alto de mecanización para obtener una elevada productividad en el menor tiempo posible. El sistema de manejo extensivo se basa en la cría de especies ganaderas capaces de aprovechar eficazmente los recursos naturales mediante el pastoreo. Este sistema de manejo permite el aprovechamiento de unos recursos naturales que de otro modo se perderían, además de reducir al mínimo la mano de obra, lo que las convierte en explotaciones con elevada rentabilidad. En un punto intermedio se encuentran los sistemas de manejos semiextensivo, que aprovechan los recursos naturales disponibles, pero se apoyan en la administración de forrajes que se ponen a disposición del animal durante la estabulación. En los sistemas de manejo extensivos y semiextensivo, en los que los animales pastan, es habitual que los animales adquieran infecciones de etiología parasitaria, que disminuyen notablemente la productividad de la explotación [16,17].

2. Nematodosis gastrointestinales

Los nematodos gastrointestinales (NGI) son un grupo de **endoparásitos** que habitan a lo largo del tracto digestivo de su huésped. Se trata de una de las infecciones más frecuentes en ganado ovino en régimen de **pastoreo**, especialmente en individuos jóvenes [18]. Su distribución geográfica es **cosmopolita**, con mayor prevalencia en zonas tropicales y templadas donde puede alcanzar el 100 % de prevalencia [19,20].

En algunas áreas de Castilla y León se dan elevados niveles de prevalencia, aunque la carga parasitaria es variable y depende de la localización, el manejo de los pastos y el control veterinario [19–21].

2.1. Etiología de las nematodosis gastrointestinales

Aunque existe una gran variedad de especies de NGI que parasitan al ganado ovino, aquellos que causan problemas veterinarios son los pertenecientes a las superfamilias **Trichostrongylidae** y **Strongyloidea** [22]. Son parasitosis de curso crónico que producen trastornos digestivos y que presentan signos clínicos como inapetencia, pérdida de peso, retraso del crecimiento, diarrea, disminución en la producción de leche y lana o problemas de reproductibilidad [23,24].

Las especies de nematodos más frecuentes pertenecen a la Superfamilia Trichostrongyloidea, familia Trichostrongylidae compuesto por los géneros *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Marshallagia*, *Cooperia* y *Nematodirus*. La superfamilia Strongyloidea incluye los géneros *Chabertia* y *Oesophagostomum*. Otro género presente, aunque menos común, es el género *Ancylostoma*, perteneciente a la supefamilia Ancylostomatidae [21,25]. En la superfamilia Trichuridae se encuentra un género *Trichuris*, ampliamente distribuido en ovino [26].

Los géneros más importantes en términos de enfermedad y pérdidas de producción en ganado ovino son *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Haemonchus* y *Nematodirus*. Los géneros *Cooperia*, *Chabertia*, *Oesophagostomum* y *Marshallagia* también pueden llegar a ser importantes, pero como parte de una infección mixta [27]. *Trichuris ovis*, que parasita el intestino y colon de los rumiantes, es bastante frecuente, sin embargo, este no suele causar infecciones graves en animales adultos, aunque si en animales jóvenes [26]. Normalmente las infecciones naturales son **mixtas**, es decir, suelen estar producidas por diferentes especies que conviven dentro del hospedador, coincidiendo en ocasiones con otros parásitos helmintos como los Trematodos o Cestodos. En términos generales,

todas ellas reciben el nombre de **gastroenteritis parasitarias**, aunque las más frecuentes son las producidas por trichostrongídeos [18,28,29]. En la tabla 1 se expone la clasificación taxonómica de los géneros que parasitan a rumiantes.

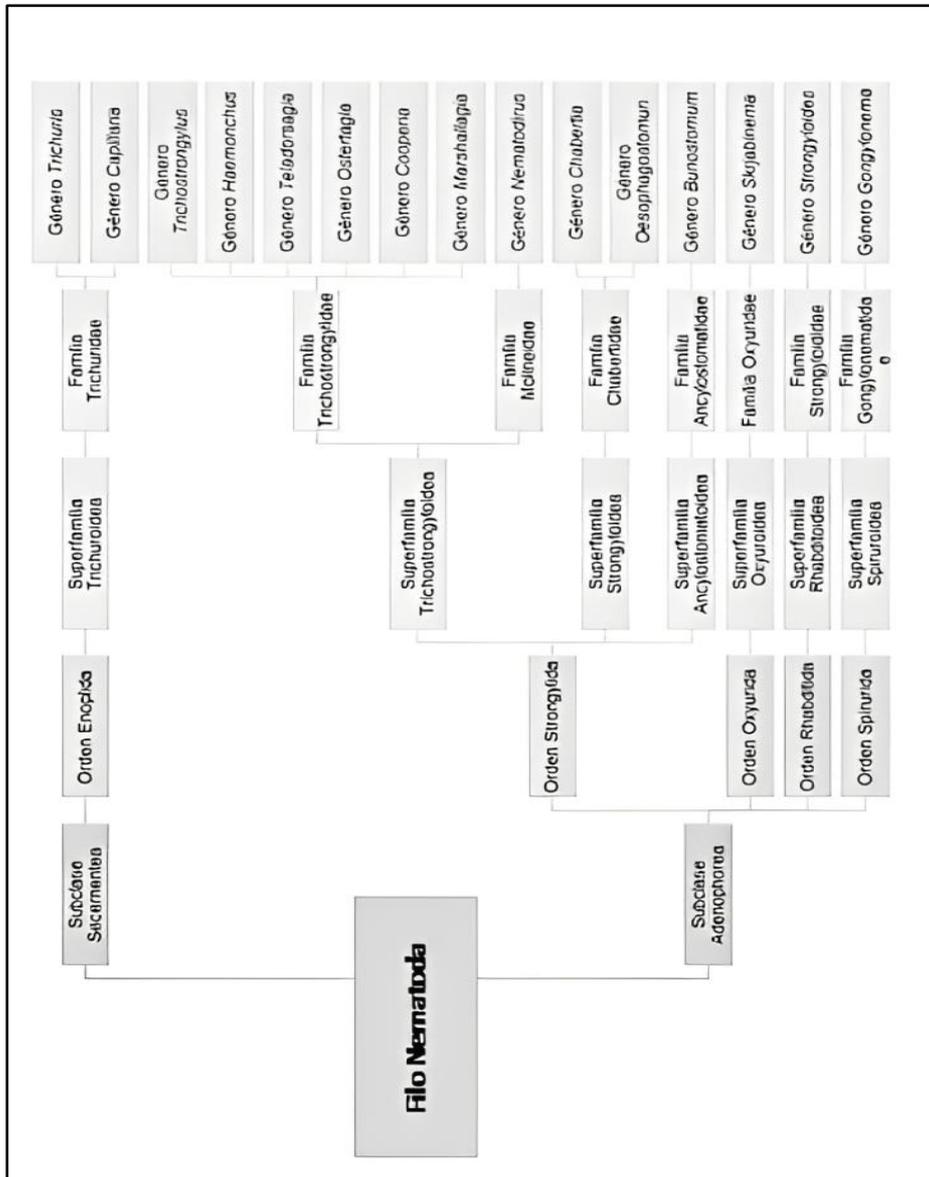


Tabla 1. Clasificación taxonómica de los géneros de nematodos gastrointestinales con mayor importancia veterinaria, según Cordero-Campillo y Rojo- Vázquez (2000).

3. Familia Trichostrongylidae

3.1. Morfología

Las especies que pertenecen a la familia Trichostrongylidae son largos y estrechos (variando entre 2-30 mm) con morfología filiforme, cilíndrica y con eutelia. La capa más externa es la **cutícula** (Figura 5.A), una capa celular flexible compuesta por fibras de colágeno entrecruzadas con función antagónica a la capa muscular y cuya función principal es la protección. Además, la cutícula de los trichostrongílidos presenta el **synlophe**, una estructura modificada y elevada que interviene en la locomoción (Figura 5.B) [30]. Bajo ésta se encuentra la **epidermis sincitial**, con cuatro invaginaciones donde se localizan los cordones nerviosos. A continuación, se encuentra la **capa muscular**, compuesta únicamente por fibras longitudinales, y tras ésta el **pseudocele**, que contiene el resto de órganos y un fluido con función hidrostática [31].

El aparato digestivo es completo, la apertura oral se encuentra en la parte anterior y presenta **cápsula bucal** que, en el caso de los trichostrongílidos, es pequeña, rudimentaria, en ocasiones ausente, y sin dientes. La apertura oral está seguida por el esófago, el intestino y el ano, ubicado en el extremo terminal [18,31].

Se trata de especies **dioicas** que presentan dimorfismo sexual; los machos son más pequeños que las hembras y tienen testículos, tubo deferente, conducto eyaculador y cloaca. Cabe destacar el extremo posterior curvado, con **espículas y bolsas copuladora** trilobuladas y cuya morfología se usa para la determinación morfológica (Figura 5.C). Las hembras poseen ovarios, oviducto, útero y vagina, que conecta al exterior a través de la vulva [18,31].

En general los **huevos** de trichostrongílidos son indiferenciables entre especies [32]. Presentan morfología elíptica, asimetría en los polos y cubierta externa muy delgada. Miden entre 70-98 x 30-50 μm . La excepción es el género *Nematodirus* que mide aproximadamente 150-180 x 67-77 μm y en su interior se puede observar la mórula bien definida [18].

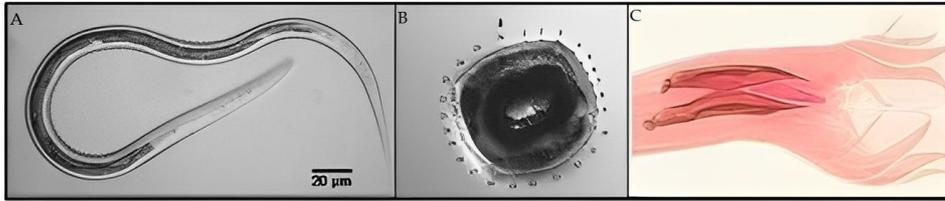


Figura 5: A) Fotografía de larvas de *T. circumcincta* donde puede observar la cutícula y los synlophes (Fuente: Brown et al. [33]. B) Sección transversal de un synlophe de *H. contortus* (Fuente: Vongnady et al. [34]. C) Bolsa copuladora y espícula de *T. circumcincta* (Fuente: Ashrafi et al. [35]).

3.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de los trichostrongílidos es **monoxeno** y está dividido en dos fases: una fase exógena de vida libre y otra fase endógena de vida parásita [18]. A pesar de la cercanía evolutiva y de las similitudes morfológicas, existen claras diferencias en los ciclos de vida de cada especie que influyen en la inmunidad y en la inmunopatología de cada especie. Estas diferencias están relacionadas principalmente con el nicho ambiental y con la alimentación de la forma adulta [22].

La **fase exógena** comienza con la eliminación de los huevos al medio junto con las heces de un hospedador infectado. El número de huevos eliminados con las heces depende de las condiciones del hospedador y de la prolificidad de la especie (*T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp tiene una prolificidad media de 100-200 huevos hembra/día, mientras que *H. contortus* tiene una prolificidad muchos más elevada, pudiendo alcanzar los 10.000 huevos hembra/día) [36]. En el suelo y en condiciones favorables de temperatura, humedad, y oxígeno, las larvas se desarrollan en el interior del huevo y eclosionan, saliendo al exterior el primer estadio larvario (L₁) que se alimenta de otros microorganismos que se encuentran en las heces. La L₁ muda y se convierte en larva de segundo estadio (L₂), que se convierte en larva de tercer estadio (L₃), siendo esta la **fase infectante** del parásito. Esta etapa retiene la cutícula de la fase anterior, lo que produce una doble cutícula que la hace muy resistente a las condiciones ambientales adversas,

pero la impide alimentarse [23]. Si las condiciones ambientales son óptimas, el tiempo de desarrollo desde huevo hasta L₃ oscila entre 5-14 días dependiendo de la especie. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas, este proceso puede demorarse hasta los 2-3 meses [23].

Tras la ingestión de las L₃ comienza la **fase endógena**. Las L₃ pierden su cutícula en respuesta a estímulos del hospedador, como cambios en el pH, temperatura o concentración de CO₂. El desenvainado es específico de especie y ocurre normalmente en la región del tracto gastrointestinal anterior a la localización final del adulto (*H. contortus* y *T. circumcincta* se desenvainan en rumen mientras que *Trichostrongylus axei* se desenvaina en el abomaso) [22]. Tras desenvainarse, entran en contacto con la mucosa digestiva, penetran profundamente en las glándulas o en las vellosidades intestinales y forman un nódulo donde se transforman en larvas de cuarto estadio (L₄); tras unos días emergen de la mucosa y mudan a formas juveniles conocidas como larvas de quinto estadio (L₅) o preadultos, que se convierten en adultos al madurar sexualmente. La reproducción es sexual y, tras la cópula, las hembras comienzan a eliminar huevos, cerrándose de esta manera el ciclo biológico (Figura 6). Al tiempo que transcurre desde la infección hasta que comienza la eliminación de huevos se le conoce como **periodo de prepatencia** y aunque es específico de cada especie, se sitúa alrededor de los 21 días de media [37].

Aunque la mayoría de las especies de NGI se ajustan a este ciclo, existen algunas excepciones, por ejemplo *Nematodirus* spp que se desarrolla completamente en el interior del huevo y es la L₃ quien lo abandona al eclosionar [38–40].

ambientales que más importancia presentan son la **temperatura, la humedad relativa y la radiación ultravioleta (UV)** [23,42,43].

Los huevos de la mayoría de las especies de tricostrongílidos inician su desarrollo por encima de los 4 °C, a excepción de *H. contortus* cuyo umbral de desarrollo se sitúa alrededor de los 8 °C [42]. Sin embargo, aunque un aumento de la **temperatura** supone un aumento en el desarrollo del número de huevos, temperaturas extremadamente altas (entre 30-36 °C según la especie) también suponen un aumento de la mortalidad larvaria. Cada especie tiene su rango óptimo de temperatura, por ejemplo *H. contortus* se desarrolla en zonas tropicales (25-38 °C), mientras que *T. circumcincta* o *Trichostrongylus* spp habitan zonas templadas (16-30 °C) [42]. Las etapas larvarias L₁ y L₂ son especialmente vulnerables a la temperatura y a la desecación, mientras que las L₃ soportan condiciones climáticas mucho más extremas gracias a la cutícula protectora que las envuelve, aunque no son resistentes a la congelación [42,44].

La **radiación UV** ha sido propuesta como otro factor determinante en la epidemiología de la infección, ya que a medida que aumenta la radiación también lo hace la mortalidad de la L₃ [43]. En consecuencia, los pastos con forrajes elevados protegen a las larvas de la radiación UV, mientras que los pastos bajos las dejan expuestas. En climas cálidos, como es el caso de España, a menudo se registran temperaturas elevadas y días soleados en épocas secas, lo que aumenta la tasa de mortalidad de las formas de vida libre, por lo que es importante considerar la temperatura y la radiación juntas para estimar la mortalidad.

Aunque menos estudiada, la **humedad** también es un factor importante en el desarrollo del huevo hasta L₃ de los NGI. Las L₁ y L₂ se desarrollan en el interior de las heces y el nivel de desarrollo larvario está en gran medida determinado por la humedad de la materia fecal, del suelo y de las precipitaciones [23]. Así, es razonable suponer que las épocas de sequía tienen impacto en el desarrollo del parásito, no obstante, en regiones secas con sistemas

de regadío se ha observado que *H. contortus* prolifera con facilidad [45]. La migración de las L₃ a través de las heces depende de la humedad y de la lluvia, que favorece la disgregación de las heces y por lo tanto la liberación de las larvas de la materia fecal [46,47]. Las L₃ presentan movimientos ondulatorios y pueden desplazarse vertical y horizontalmente, aunque su desplazamiento se ve afectado por la humedad relativa del ambiente. La mayoría de las larvas de *H. contortus* migran hasta 10 cm desde las heces, pero en condiciones ambientales favorables una pequeña parte pueden llegar a desplazarse hasta a 90 cm de distancia de la materia fecal en tan solo 24 horas. Las larvas de NGI también migran verticalmente, pero no pueden desplazarse a más de 5 cm del suelo. Esta limitación tiene importantes implicaciones en la epidemiología debido a que los animales que se ven forzados a pastar en pastos bajos presentan una mayor tasa de infección y, por consiguiente, una mayor eliminación de huevos [23]. Relacionar la supervivencia de las larvas con la exposición a la radiación UV, la temperatura y la humedad resulta interesante para diseñar un programa adecuado de manejo de pastos [43].

Las L₃ sobreviven en el pasto durante el invierno y comienzan su desarrollo al llegar la primavera, aumentando su abundancia en el pasto. Esta época coincide con el **periparto**, por lo que los corderos recién nacidos y especialmente susceptibles, son infectados más fácilmente. Además, los hospedadores adultos previamente infectados, eliminan más huevos junto con las heces, contribuyendo a la contaminación de los pastos [48]. Sin embargo, cuando las condiciones climáticas durante el invierno han sido adversas y la supervivencia de las L₃ se ha visto comprometida, las larvas entran en estado de hipobiosis –*ver apartado 3.4-* y adquieren un papel importante en la transmisión ya que las larvas reanudarán su desarrollo de forma sincrónica al llegar la primavera, contribuyendo de esta manera a la contaminación de los pastos, infectando a los corderos de poca edad y con el sistema inmune aún no desarrollado [23].

Dado que el desarrollo, la supervivencia y la dinámica poblacional de los NGI está vinculado al medio ambiente, el **cambio climático** puede tener un profundo impacto sobre la epidemiología de cada especie [49]. Se ha sugerido que el cambio climático puede alterar los patrones de desarrollo de las etapas de vida libre de los parásitos. Por ejemplo, *H. contortus*, puede verse beneficiado por el aumento de la temperatura en el norte de Europa, aumentando su presión de infección y ampliando su distribución [50,51]. Por otra parte, se esperan tasas de infección más elevadas para *T. circumcincta* debido a que el aumento de la temperatura en invierno favorecerá la supervivencia de L₃, aumentando su disponibilidad los primeros meses del año [48–50].

3.4. Hipobiosis

Bajo circunstancias aún desconocidas, una porción de larvas de determinadas especies de NGI cesan su desarrollo durante periodos de tiempo prologados para posteriormente reanudarlo. Durante este tiempo, el metabolismo de las larvas se encuentra reducido al mínimo, no se alimentan y tampoco se desplazan. Este fenómeno se conoce como **hipobiosis**, y puede ocurrir en diferentes estadios del ciclo biológico del parásito dependiendo de la especie. A pesar de que el momento en el que se produce la hipobiosis es característico de cada especie, la mayoría de los NGI que afectan a rumiantes entran en hipobiosis ya dentro del hospedador, como larva de estadio L₃, de estadio L₄ o de estadio L₅, dependiendo del género involucrado. Por ejemplo, *Trichostrongylus* spp entra en estado de hipobiosis en estadio L₃, mientras que en *T. circumcincta*, *H. contortus* y *Cooperia curticei* ocurre en estadio L₄ y *Dictyocaulus viviparus* como L₅ o preadulto. *Nematodirus battus* y *Nematodirus filicollis* son casos inusuales ya que pueden entrar en hipobiosis tanto en etapas parásitas como en la etapa de huevo [52,53].

Los mecanismos responsables de este fenómeno aún no se comprenden totalmente o no se han identificado. Se han propuesto varios factores que podrían influir en la detención del desarrollo. Las primeras hipótesis apuntaban

a la interacción parásito-hospedador, en particular a la resistencia que este presentaba a la infección. Sin embargo, esta hipótesis ha sido descartada debido a que hospedadores susceptibles presentan larvas que no habían continuado su desarrollo [54]. Actualmente, se reconoce que la hipobiosis es un fenómeno fundamentalmente relacionado con factores ambientales estacionales que actúan anticipándose a condiciones ambientales adversas y garantizando la supervivencia de las subsiguientes fases externas [52,53]. Existen varios factores que favorecen la hipobiosis y que se cree interaccionan entre ellos. Estos factores se tienden a clasificar en tres categorías diferentes; factores relacionados con el hospedador, factores ambientales que actúan sobre el hospedador y factores relacionados con el parásito [52,53].

Los mecanismos responsables de la reanudación del desarrollo que ponen fin al período de hipobiosis tampoco se conocen completamente. Este fenómeno parece ser sincrónico, y existen diversas hipótesis que tratan de explicar cuál es el estímulo principal que lo desencadena. Se ha detectado la reanudación del desarrollo larvario en ovejas gestantes y tras el parto, lo que apoyaría la hipótesis de que la hipobiosis es un fenómeno que facilita la transmisión cuando hay disponible un mayor número de hospedadores susceptibles, en este caso los corderos recién nacidos. Otro factor clave en la reanudación del desarrollo de las larvas en estado de hipobiosis parece ser la aplicación de fármacos antihelmínticos, ya que las larvas hipobióticas retomarían su desarrollo a medida que se reduce la densidad poblacional de parásitos adultos. La eliminación de las formas adultas, bien por eliminación natural o bien por uso de tratamientos, permitiría entonces el desarrollo de las larvas inhibidas [52,53].

Signos clínicos y patología

Las infecciones por NGI provocan alteraciones importantes en el sistema digestivo del hospedador. Los signos clínicos asociados varían según la carga parasitaria, la especie de parásito o el estado inmunitario del hospedador. La

forma aguda de la enfermedad es más común en animales jóvenes y cursa con gastroenteritis, diarrea, debilidad, deshidratación, pérdida del apetito e en casos extremos la muerte del animal [55,56]. Las infecciones **crónicas** son más comunes en animales adultos y se caracterizan por depresión voluntaria del consumo de alimento, pérdida de peso progresiva y desnutrición; cuando las cargas parasitarias son elevadas pueden llevar a la **muerte** del hospedador [31]. *H. contortus* es un parásito hematófago que cursa con anemia y edema submandibular, lo que lo convierte en una especie más patógena y con índices de mortalidad mayores [57].

Durante la necropsia de animales infectados se puede observar macroscópicamente un engrosamiento de la mucosa, hiperplasia de las glándulas gástricas, ulceración superficial y la presencia de parásitos [58]. En infecciones por *T. circumcincta* es común la presencia de lesiones superficiales ulcerosas de color violeta con unas erosiones más profundas y hemorrágicas que presentan una zona central deprimida, coincidiendo con el orificio por donde salió la larva al lumen [59]. Microscópicamente se evidencia la presencia de inflamación y células inmunitarias como eosinófilos, linfocitos, leucocitos globulares o mastocitos [60,61].

La fisiopatología de la infección va a diferir según la especie. Aquellas especies, como *T. circumcincta*, cuyas larvas penetran en las glándulas gástricas del abomaso, provocan hipertrofia e hiperplasia de las células productoras de moco, erosión de la mucosa y disminución del número de células parietales funcionales encargadas de la secreción de ácido clorhídrico (HCl). En contacto con el HCl del contenido gástrico, la proenzima **pepsinógeno** se activa transformándose en **pepsina activa**, una enzima que hidroliza las proteínas en péptidos de menor tamaño para su digestión. La disfuncionalidad en la producción de HCl provoca un aumento en el pH reduciendo la conversión a pepsina, lo que da como resultado niveles elevados de pepsinógeno en plasma y una reducción en la digestión proteica [61]. La disminución de la concentración

de HCl se ha asociado a un incremento de las poblaciones bacterianas, produciendo hipergastrinemia, lo que a su vez provoca un aumento de peristaltismo y afecta al proceso de activación del pepsinógeno [62]. Además, el aumento de gastrina frecuentemente se ha asociado con la inapetencia, posiblemente para evitar la ingesta de alimento durante la reparación de la mucosa [61].

Estas infecciones tienen consecuencias indirectas sobre el metabolismo del hospedador, principalmente relacionado con el metabolismo proteico. El hospedador debe reparar los daños producidos por el parásito y generar una respuesta inmunitaria que comporta significantes costes nutricionales y un aumento de demanda nutricional. Sin embargo, la respuesta a la infección es una reducción de la alimentación y por consiguiente la reducción de los niveles proteicos disponibles [63,64].

4. Respuesta inmunitaria frente a la infección por nematodos gastrointestinales

El desarrollo de nuevos métodos de control de las nematodosis gastrointestinales basados en la respuesta del hospedador, como las vacunas, parte de la necesidad de comprender en detalle los complejos mecanismos envueltos en la respuesta inmunitaria frente a los NGI. Los nematodos son parásitos obligados totalmente adaptados a su hospedador, cuya supervivencia depende de encontrar un equilibrio con la respuesta inmunitaria que les permita desarrollarse produciendo enfermedades subclínicas y crónicas [65]. Generalmente, estas infecciones no son graves, y solo unos pocos hospedadores presentan cargas parasitarias elevadas y compatibles con la muerte del animal [65]. Los nematodos representan un gran desafío para el sistema inmune del huésped al estar protegidos por una gruesa cutícula externa que el sistema del

complemento o los linfocitos T no pueden destruir. Para poder eliminar la infección, el sistema inmune debe utilizar células que puedan perforar y destruir la cutícula o bien atacar a través de los puntos débiles, como el tracto digestivo del parásito [65].

Cuando un parásito penetra en el organismo del hospedador, se desencadena la respuesta inmunitaria. Se trata de una respuesta compleja en la que tiene tanta importancia la **respuesta inmunitaria innata**, constituida por células de respuesta rápida que carecen de memoria, como la **respuesta inmunitaria adquirida**, que se hace efectiva tras varios días [65]. La tasa de desarrollo de la inmunidad es un proceso tan complejo como variable, que se basa en interacciones que involucran diversos factores intrínsecos como el nivel de nutrición, la edad, el sexo, la raza del hospedador, el estado hormonal o reproductivo, así como factores extrínsecos como la especie de NGI o la intensidad de la infección [61,66–68]. En corderos, la inmunidad empieza a desarrollarse a partir de los 2-3 meses de edad, momento en el cual comienzan a demostrar competencia inmunitaria tras ser expuestos regularmente a infecciones larvarias [69]. Sin embargo, esto ocurre de manera desigual para cada parásito, por ejemplo la capacidad de controlar la infección por *N. battus* se desarrolla durante los primeros meses de vida, mientras que la inmunidad frente a *T. circumcincta* se desarrolla lentamente y alcanza su punto máximo alrededor de los 12 meses de edad [70,71]. Las ovejas adultas permanecen relativamente resistentes a la infección, presentando cargas bajas, aunque requieren exposiciones regulares para conservar la inmunidad [72]. De especial interés es la capacidad que tienen algunas ovejas para resistir la infección por NGI o no sufrir signos clínicos graves. De hecho, se ha descrito en repetidas ocasiones la capacidad que presentan algunas razas ovinas de ser más resistentes a la infección que otras. Incluso, se ha sugerido que las razas de pelo, en vez de lana, presentan un mayor nivel de resistencia a infecciones por NGI [73,74]. La competencia inmunológica puede dirigirse de diferentes maneras; el hospedador puede presentar la capacidad de expulsar al parásito en sus etapas

más tempranas, puede provocar un acortamiento del tamaño del parásito y, por lo tanto afectar a su fecundidad, o puede tratarse de una combinación de ambas [68].

Cuando un parásito penetra en el organismo se desencadenan una serie de reacciones en el sistema inmune del huésped. Primero entran en juego los componentes de **la respuesta inmunitaria innata**, cuyo papel principal es la detección de los NGI, la evitación de su establecimiento y la orientación de la respuesta hacia **la respuesta inmunitaria adquirida** [68]. En el *apartado 4.1* se expondrán los componentes que intervienen en la respuesta inmunitaria frente a NGI más relevantes para esta Tesis Doctoral.

4.1. Componentes del sistema inmune

4.1.1. Eosinófilos

Los eosinófilos son células polimorfonucleares cuyas características más relevantes son su núcleo bilobulado y la presencia de unos gránulos en el citoplasma que se tiñen con colorantes ácidos, como la eosina [22,65]. Se trata de células efectoras del sistema inmune, que se originan en la médula ósea y permanecen en sangre periférica alrededor de 30 minutos antes de llegar a los tejidos, principalmente al tracto gastrointestinal, donde se establece una población relativamente uniforme [22,65]. Presentan dos tipos de gránulos; los gránulos primarios que contienen arilsulfatasa, peroxidasa y fosfatasa ácida, y los gránulos cristaloides, que contienen una proteína básica rodeada por una matriz que contiene la proteína catiónica del eosinófilo, peroxidasa del eosinófilo y neurotoxina derivada del eosinófilo [65]. Durante una infección causada por nematodos, el número de eosinófilos en sangre y en tejido aumenta drásticamente [75–77]. Estos presentan una migración direccional muy evidente, dirigiéndose hacia objetivos concretos del parásito, donde liberan el contenido de sus gránulos directamente sobre la cutícula de los vermes [22]. La proteína catiónica y la neurotoxina de los eosinófilos son letales para los helmintos.

Algunos parásitos de rumiantes como *H. contortus* y *T. circumcincta* producen factores quimiotácticos que atraen a los eosinófilos. Esto ha hecho cuestionarse la función protectora de los eosinófilos, sugiriendo que algunos NGI fomentan el reclutamiento celular porque el daño tisular que provocan estas células en la pared gastrointestinal facilita la invasión parasitaria (Figura 7) [65,78].

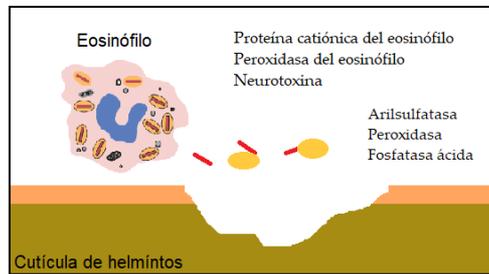


Figura 7. Algunas de las moléculas liberadas por los eosinófilos causan daño en la cutícula de los parásitos helmintos. Modificado de Tizard., (2009).

La movilización de los eosinófilos desde la médula ósea y su activación está estimulada por la presencia de varios factores quimiotácticos como la IL-5, producida por los linfocitos Th2 y los mastocitos, a la vez que son atraídos hacia el sitio de desgranulación de los estos últimos [65]. Los eosinófilos activados producen metabolitos tóxicos derivados del oxígeno y sintetizan una variedad de mediadores de lípidos, que incluyen prostaglandinas y leucotrienos, que causan daño a las larvas de los parásitos al producirse la desgranulación sobre su superficie [22]. Los eosinófilos también sintetizan muchas citoquinas distintas que inhiben la respuesta tipo Th1, y aseguran la respuesta Th2 en las zonas de acumulación de eosinófilos [65]. Aunque la principal función de los eosinófilos es citotóxica, estos también desempeñan un papel crucial en la recuperación del tejido dañado [22].

4.1.2. Mastocitos/ leucocitos globulares

Los mastocitos son una población de leucocitos que derivan de células hematopoyéticas y se encuentran en el tejido conjuntivo, mucosas, piel y alrededor de los nervios. Miden entre 15-20 μm de diámetro y presentan un

núcleo grande y arriñonado con un citoplasma repleto de gránulos. Se originan en la médula ósea y desde ahí migran a los tejidos donde maduran y sobreviven durante meses. Según el tejido donde se encuentran, se distinguen dos poblaciones diferentes: los mastocitos del tejido conjuntivo y los mastocitos de la mucosa, que difieren principalmente en su tamaño, vida media y composición de los gránulos. A su vez, los mastocitos de la mucosa pueden encontrarse en la lámina propia o bien en el epitelio. Son estos últimos los que reciben el nombre de **leucocitos globulares (LG)** [22,65].

La activación de los mastocitos/LG está estimulada predominantemente por la interacción de los antígenos helmintos con el anticuerpo IgE unido al mastocito a través de los receptores FcεRI (Figura 8), pero también existen otras vías de activación, por ejemplo a través de la vía alternativa del complemento o de los PRR [65,79]. Con la degranulación se libera al ambiente citoquinas, proteasas, moléculas vasoactivas y quinasas que estimulan la reacción de **hipersensibilidad tipo 1**. Esta reacción produce la degradación de la cutícula de la larvas, provoca el aumento de la contracción muscular del sistema digestivo, la permeabilidad vascular, el aumento del moco y el reclutamiento de células efectoras, lo que contribuye a la **eliminación temprana** del parásito, que ocurre antes de que las larvas se implanten en el tejido [22,65,68,80]. Los productos expulsados durante la desgranulación provocarán la polarización de los linfocitos T inmaduros hacia una respuesta Th2 que conducirá a la secreción de IL-4 y, en consecuencia, al aumento de los niveles de IgE, lo que derivará en la activación de más mastocitos. También es importante la producción de IL-10, que lleva a la proliferación de nuevos LG en la lámina propia [65,68,79].

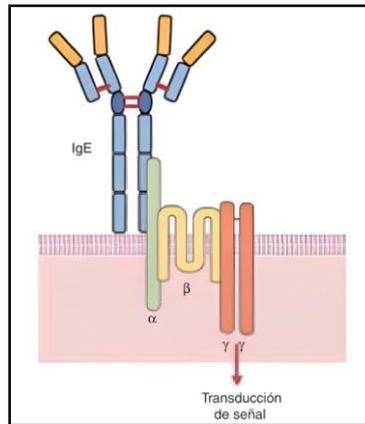


Figura 8. Unión del anticuerpo IgE con el receptor FcεRI en la superficie de los mastocitos/leucocitos globulares. Fuente: Tizard., (2009).

4.1.3. Linfocitos T CD4⁺ y T γδ

Los linfocitos T son células pequeñas con un núcleo redondo y de gran tamaño. Se localizan en todo el organismo (órganos linfáticos, sangre, y superficies mucosas), aunque se originan en la médula ósea y se diferencian en los órganos linfoides primarios como el timo [65,81]. Los vertebrados presentan una gran diversidad de subpoblaciones de linfocitos, conocido como inmunofenotipo, que se diferencian por las moléculas de su superficie [81]. La molécula CD4⁺ es uno de los receptores más comunes capaz de reconocer antígenos exógenos procesados a través de interacciones con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CHM)- tipo II de las células presentadoras de antígenos (CPA) [65].

Cabe destacar una subpoblación de linfocitos T que se caracteriza por expresar receptores TCR con cadenas γδ [81]. Las células T γδ circundantes representan entre el 30-60% de las células mononucleares en sangre periférica en rumiantes [82,83]. La elevada proporción de esta subpoblación en rumiantes respecto a otras especies, se atribuye a la expresión de la molécula *workshop cluster 1* (WC1+) [81]. Las células T γδ/WC1+ se encuentran principalmente entre

los enterocitos del abomaso y una de las principales características de esta población es la velocidad de respuesta ante una infección, ya que son las primeras en responder. Se ha observado que los linfocitos T $\gamma\delta$ /WC1+ de rumiantes directamente responden a los patrones moleculares asociados con patógenos (PMAP) a través de la expresión de estos receptores. Aunque su papel no se ha clarificado totalmente, se ha llegado a la hipótesis de que desempeñan una función relevante en la respuesta inmunitaria innata y se ha propuesto que pueden actuar como un ligando entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa [65,81,84,85].

4.1.4. Anticuerpos

Las infecciones por helmintos activan una respuesta protectora de tipo Th2 productora de anticuerpos. La inmunidad se ha asociado principalmente a elevados niveles del isotipo IgA, pero también a un incremento en los niveles de IgE e IgG1 [86]. Mientras que la IgA y la IgE suelen estar presentes en la superficie de las mucosas, la IgG1 se detecta predominantemente en el suero de animales infectados [68,87].

La **IgA** es el isotipo que predomina en la luz gastrointestinal de mamíferos y durante mucho tiempo ha sido reconocida como un importante componente en la defensa contra las nematodosis gastrointestinales [24,57,88]. Se sintetiza en las células plasmáticas de las mucosas y atraviesa las células epiteliales por difusión hacia las secreciones externas. Por esa razón se encuentra en cantidades significativas en saliva, líquido intestinal, secreciones nasales y traqueales, lágrimas, leche, calostro, orina y secreciones del tracto urogenital. En el sistema digestivo, la IgA migra a través de los enterocitos, donde se combina con los receptores *pIgR*. El complejo IgA-*pIgR* es transportado en vesículas hasta la superficie celular y una vez en el lumen, el receptor *pIgR* se escinde del enterocito y permanece unido a la IgA, protegiéndola de la degradación por parte de las proteasas. A este complejo se le denomina IgA secretora (IgAs) (Figura 9) [65].

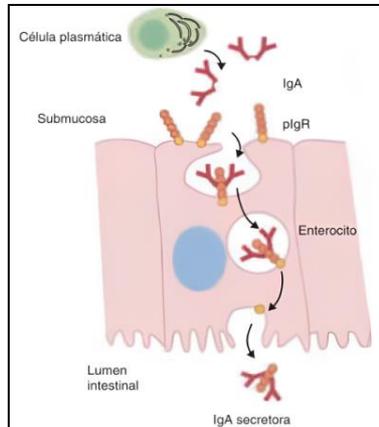


Figura 9. La inmunoglobulina A (IgA) es secretada por las células plasmáticas de las mucosas y se combina con los receptores *pIgR* en el interior de los enterocitos, formando el complejo *IgA-pIgR*. Fuente: Tizard et al. [65].

La mayor parte de la inmunoglobulina **IgE** se encuentra unida a los receptores $Fc\epsilon$ de los mastocitos, donde tienen una vida media de unos 11-14 días. La IgE es secretada por los linfocitos B previamente estimulados por las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 producidos por los linfocitos Th2. Esta inmunoglobulina presenta elevada afinidad por los receptores $Fc\epsilon RI$ presentes en la membrana de los mastocitos, a los que se une de manera irreversible. Cuando esto ocurre, el mastocito queda sensibilizado para poder responder ante un antígeno presente en el tejido. En ese momento, el mastocito se activa de inmediato eliminando el contenido de sus gránulos. A su vez, los mastocitos estimulados también producen IL-4, IL-5 e IL-13, incrementando la diferenciación de linfocitos Th2, que a su vez, estimularán la diferenciación de nuevos linfocitos que producirán IgE, dando lugar a una actividad inmunitaria excesiva, y generando la inflamación aguda característica de la reacción de hipersensibilidad tipo I [65].

La **IgG** se sintetiza en las células plasmáticas del bazo y de la médula ósea y se encuentra predominantemente en el suero sanguíneo, representando el 80% del total de inmunoglobulinas presentes en suero. Se trata de la inmunoglobulina de menor tamaño, y se extravasa fácilmente desde los vasos

sanguíneos a los tejidos y fluidos corporales, especialmente al calostro donde se encuentra en concentraciones muy elevadas. La IgG presenta una alta afinidad con los receptores Fc a los que se une irreversiblemente. La subclase IgG₁ es la más relacionada con la infección por helmintos y su secreción está regulada principalmente por las citoquinas IL-4 de la respuesta Th2 [68,87]. En infecciones por NGI, la concentración de IgG aumenta 14 días tras la infección [68].

4.2. Respuesta inmunitaria innata

La superficie interna del tracto gastrointestinal está cubierta por una capa de **moco** producido por las células del abomaso, y que actúa como la primera línea de defensa, junto con el **pH ácido** [68,89]. El moco está compuesto principalmente por mucina, pero tras un periodo de 3-5 días pi, se han detectado otras biomoléculas como la galectina-11 y la galectina-14. Estas lecitinas, presentes únicamente en rumiantes, modifican la densidad del moco haciéndolo más viscoso, lo que dificulta el desplazamiento y alimentación de las L₄ de *H. contortus* y *Trichostrongylus* spp [90–93]. La galectina-11 presenta la capacidad de fijarse sobre la superficie de las L₄ y de los adultos inhibiendo su crecimiento y desarrollo, mientras que la galectina-14, liberada por los eosinófilos, se relaciona con la expulsión de los vermes [91,94]. Otro mecanismo propio de la inmunidad innata es la contracción involuntaria del músculo liso, que facilita y la eliminación de los vermes [22].

En el caso de que el parásito supere estas primeras barreras, tratará de establecerse en la mucosa gastrointestinal. Entonces, adquieren gran importancia los **PRR**, que se expresan en las células **CPA**, **células dendríticas** y en los **macrófagos**, y que identifican patrones moleculares asociados a patógenos dando lugar a la respuesta inflamatoria [68,95].

En el lugar de la infección, las células de la respuesta inmunitaria innata reclutan y activan a los **mastocitos**. Tal y como se explicó anteriormente, los

mastocitos que se encuentran en el epitelio se denominan **leucocitos globulares-ver apartado 4.1.2-**. Esta población presenta gránulos de mayor tamaño y son considerados como el estadio efector final de los mastocitos [22,95,96]. Los LG se encuentran dispersos en el tejido y su activación se produce mediante la unión de IgE con el receptor de membrana FcεR1, aunque también presentan otra vía de activación a través de interacción directa con los PRR. El principal rasgo de los LG es la presencia de gránulos en su interior, los cuales contienen potentes mediadores como heparina, histamina y proteasas. Tras una estimulación primaria, también producen IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 que son liberados a los tejidos circundantes cuando se produce la desgranulación [22,68,92]. La liberación de estos mediadores tiene como propósito la eliminación del parásito y a reducción de la fecundidad mediante el reclutamiento de células efectoras como los eosinófilos, la síntesis de moco o incluso al aumento de contracciones musculares [22,65] .

El aumento en el número de **eosinófilos** también es característico en las infecciones provocadas por NGI. El desarrollo de los eosinófilos es promovido por la presencia de IL-3 e IL-5. Los eosinófilos maduros se activan a través de la unión de IgA o IgG a sus receptores de superficie y migran direccionalmente hacia dianas concretas del parásito [22,97]. Los eosinófilos producen daños en las larvas L₄ mediante la desgranulación y además participan en la recuperación del tejido dañado [68]. Aunque la información disponible parece indicar que los eosinófilos desempeñan un papel relevante en el mecanismo de resistencia a parásitos como *H. contortus* y *T. colubriformis*, parece que en las infecciones por *T. circumcincta* no hay consenso; hay autores que asocian una fuerte eosinofilia durante la infección por *T. circumcincta* con una mayor susceptibilidad por parte del hospedador [75,76,98,99]. De hecho, se ha comprobado que *T. circumcincta* produce factores quimiotácticos que atraen a los eosinófilos fomentando su reclutamiento, lo que sugiere que el daño tisular local provocado por estas células genera el ambiente adecuado para el establecimiento larvario [65].

4.3. Respuesta inmunitaria adaptativa

Paralelamente, las células CPA y los macrófagos tienen un papel fundamental en la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Estas células captan los antígenos del parásito, los procesan y migran a los ganglios linfáticos regionales para presentar los antígenos a las **células T inmaduras**, lo que inicia la respuesta inmunitaria adaptativa que tiene como resultado final la diferenciación de los linfocitos T y la proliferación de nuevos [68,95]. Existen diversos tipos de células T, entre los que se encuentran los **linfocitos Th**, que son los que más relevancia tienen en la respuesta inmunitaria frente a una infección por helmintos. Estas células expresan la proteína de superficie **CD4⁺** y generan señales que inician la maduración de los **linfocitos B**, linfocitos Tc y macrófagos. Asimismo, los linfocitos Th se pueden diferenciar en Th1, Th2, Th17 y T reguladores (T reg) según las citoquinas que producen [68,95].

Las células presentadoras de antígeno interactúan con los linfocitos T CD4⁺ a través de los receptores CMH-II, en ese momento la respuesta se dirige hacia Th1, Th2 o Th17 [68,95,100]. Las infecciones por helmintos desencadenan una fuerte respuesta protectora tipo Th2, caracterizada por la elevada producción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, produciendo el reclutamiento de los eosinófilos y mastocitos en la mucosa abomasal y la producción de las inmunoglobulinas IgA, IgE e IgG por parte de los linfocitos B activados [65,68,95]. Sin embargo, en determinadas ocasiones el hospedador desarrolla una respuesta de tipo Th1. Esto se ha estudiado extensamente en ratones infectados con *Trichuris trichura*. Los ratones que eran capaces de controlar la infección secundaria tras una primo infección presentaban una respuesta tipo Th2, mientras que los que no la pudieron controlar mostraron una respuesta tipo Th1 [65,101]. No se conoce completamente el motivo de que un animal desarrolla una respuesta tipo Th1 o Th2, pero parece estar determinado por la forma en que las células dendríticas procesan y presentan los antígenos [65]. La respuesta promovida por los linfocitos Th17 está relacionada con la respuesta a hongos y bacterias, aunque en los últimos años se han relacionado estos linfocitos con la

inflamación aguda promovida por el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección. Los linfocitos T reg suprimen la actividad de los otros linfocitos permitiendo la tolerancia inmunitaria y evitando la autoinmunidad [68,102].

La principal característica de la respuesta Th2 es la presencia de IL-4, que induce la activación de macrófagos que cicatrizan y reparan tejidos [92,103]. La IL-13 promueve la reparación de tejidos, induce la producción de moco y colabora junto con la IL-9 en el reclutamiento y activación de mastocitos [68]. Por su parte, la IL-5, además de desencadenar la eosinofilia, también fomenta la secreción de anticuerpos por parte de las **células B** [104]. Las señales químicas de los linfocitos Th2, junto con la unión de anticuerpos sobre la superficie de las células B inmaduras, estimula su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad contra la molécula específica que han reconocido [95]. En la respuesta inmune de ovejas a infecciones por NGI, se han detectado los anticuerpos IgA, IgE e IgG1. El anticuerpo IgA parece jugar un papel más importante en infecciones por NGI, especialmente en la resistencia a la infección por *T. circumcincta*, mediante la limitación del crecimiento de las L4 y su fecundidad [95,98,105–107] (Figura 10).

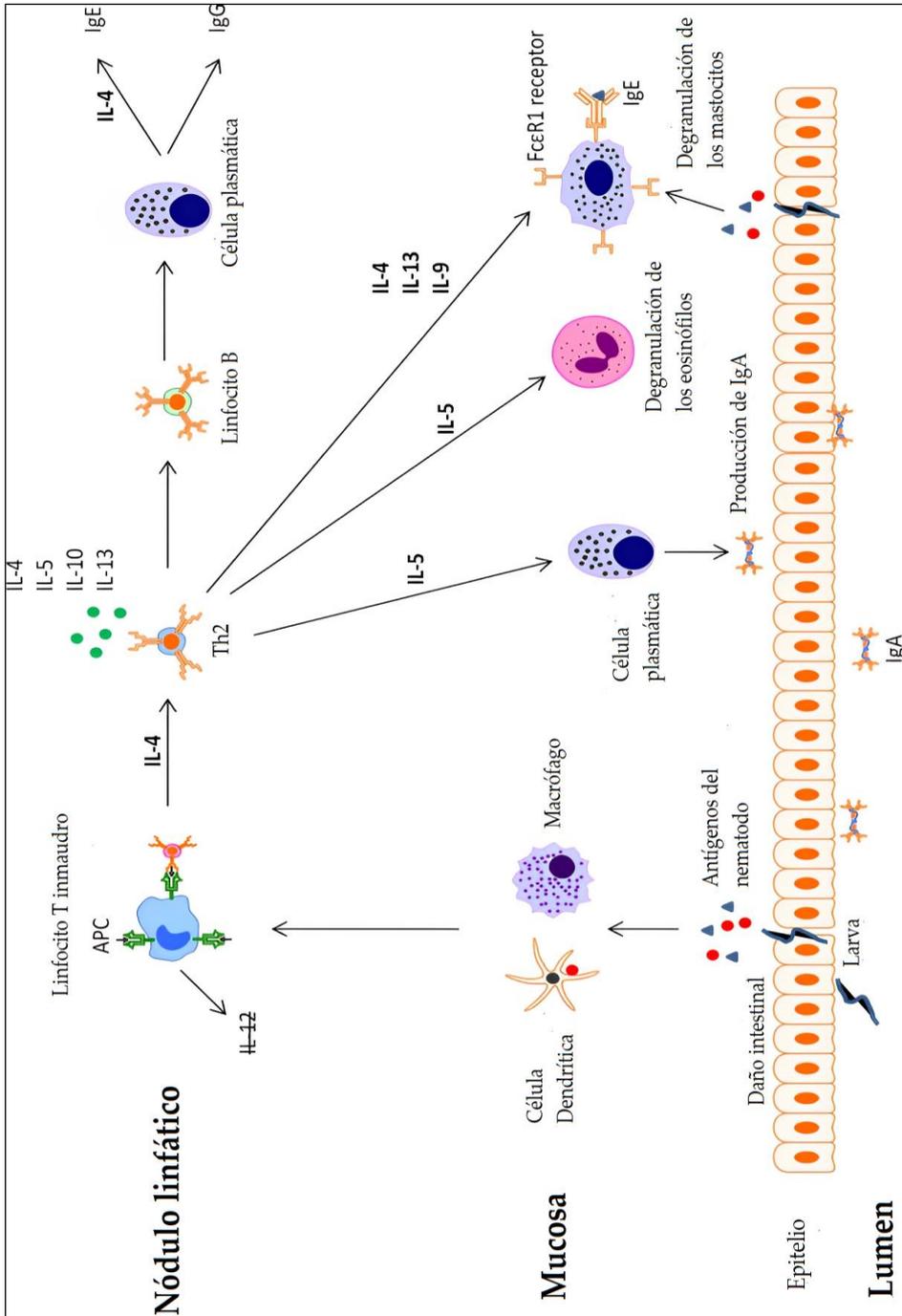


Figura 10. Respuesta inmune a la infección de nematodos gastrointestinales en oveja. Modificado de McRae et al. [68].

5. Métodos de control

5.1 Control químico

Entre las décadas de 1960 y 1980, se desarrollaron y salieron al mercado los primeros fármacos antihelmínticos (AH). Desde ese momento y a lo largo de los últimos sesenta años, han sido empleados como métodos de control con el fin de minimizar las pérdidas económicas [108,109]. Los primeros AH se aplicaban durante las épocas de pastoreo y se recomendaba repetir el tratamiento con relativa frecuencia, sobre todo para controlar a *H. contortus*, un NGI hematófago que provoca elevadas pérdidas productivas [23,110].

Los AH pueden definirse como fármacos que reducen la carga parasitaria en el huésped a un nivel tolerable; matan a los parásitos (vermicida), inhiben su crecimiento o los paralizan (vermífugo). También reducen la acumulación de huevos en el medio ambiente y la consecuente presencia de larvas [109].

Los AH más importantes que se encuentran actualmente en el mercado podemos agruparlos en las siguientes familias;

- **Benzimidazoles (BZD):** Fueron lanzados al mercado en la década de 1960. Los primeros BZD comercializados actuaban frente a formas adultas y larvianas. Con el tiempo se desarrollaron nuevos fármacos con mayor espectro de acción (albendazol, fenbendazol y oxfendazol), que también tienen efecto frente a larvas en hipobiosis y huevos. Además, se describió un aumento en la eficacia de estos nuevos fármacos, lo que se tradujo en una reducción de la dosis terapéutica [111,112]. Su mecanismo de acción consiste en la unión selectiva de los BZD a la subunidad β de la tubulina del parásito. Esto inhibe su polimerización y por lo tanto la formación de los microtúbulos que conforman una importante fracción proteica del citoesqueleto provocando la destrucción de la célula y la consiguiente muerte del parásito [25,111].

- **Lactonas macrocíclicas (LM):** La primera LM comercializada fue la ivermectina, lanzada al mercado en 1981. Desde su aparición, esta familia de fármacos se popularizó siendo el grupo más utilizado en medicina veterinaria debido principalmente a la alta seguridad que ofrecen unido un amplio espectro de acción, que no solo incluye NGI sino también artrópodos, además de un efecto prolongado en el tiempo [109,113]. Las LM se dividen en avermectinas y mibemicinas. Las primeras son productos de fermentación de la bacteria *Streptomyces avermitilis* e incluyen la abemectina, la ivermectina, la doramectina y la eprinomectina. Al segundo grupo de fármacos pertenecen la mibemicina D, la moxidectina y la selemectina y se obtienen a partir de la fermentación de *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces cyanogrisum*. Dentro de este grupo, el fármaco más utilizado es la moxidectina, debido a que presenta larga persistencia en el organismo, por lo que es el fármaco de elección en formulaciones de acción prologada o frente a cepas resistentes [114]. Las LM son antagonistas selectivas e irreversibles de los canales de cloro (Cl^-) activados por glutamato, los cuales están presentes en nematodos y artrópodos, pero ausentes en mamíferos. Esta interacción provoca un incremento de la permeabilidad de Cl^- que da lugar a una hiperpolarización celular y a una parálisis de los músculos del parásito, entre ellos los faríngeos, por lo que el parásito muere de inanición [115].

- **Imidazotiazoles (IM):** Esta familia presenta su mecanismo de acción frente a adultos y larvas de NGI y nematodos pulmonares, pero pierden eficacia frente a larvas hipobióticas y carecen de actividad frente a huevos de cestodos y trematodos [109,116]. Los IM actúan como agonistas colinérgicos en los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) de las células neuromusculares del nematodo. El ligando biológico de estos receptores es la acetilcolina, que encarga de controlar el flujo de sodio (Na^{2+}) y potasio (K^+) al interior y exterior de la célula, para activar una cascada de reacciones que lleva a la contracción muscular. La acción de los IM despolariza el sistema neuromuscular del nematodo, provocando una contracción y parálisis muscular espástica. El

parásito, por lo tanto, no es capaz de moverse libremente, alimentarse, ni reproducirse, lo que conduce a su muerte y expulsión al medio externo [117,118].

- **Derivados de aminoacetoniitrilo (AAD):** Durante más de 25 años no se lanzó ningún fármaco AH al mercado, hasta que en el año 2010 la empresa *Novartis Animal Health* sacó al mercado australiano el monepantel, un nuevo fármaco antihelmíntico con acción nematocida frente a L₄ de *H. contortus*, *T. circumcincta*, *Trichostrongylus* spp, *Cooperia* spp, *Nematodirus* spp, *Chabertia ovina* y *Oesophagostomum venulosum* en una dosis única de 2,5 mg/kg [119]

Los AAD son compuestos sintéticos de bajo peso molecular que han demostrado tener actividad antihelmíntica efectiva contra NGI, incluyendo cepas resistentes a otros fármacos, motivo por el cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó su uso en estos casos [120]. Estos fármacos provocan hipercontracción de los músculos del parásito que conduce a parálisis corporal, contracciones espasmódicas de la faringe y finalmente la muerte. Esto se debe a que la subunidad Hco-MPTL-1, presente únicamente en los nematodos, se ve forzada a abrirse ante un estímulo, pero ha perdido la capacidad de cierre, lo que provoca un flujo constante de iones que llevan a la despolarización celular y la consecuente parálisis muscular [121].

- **Espiroindoles:** El derquantel fue el primer fármaco de esta familia lanzado al mercado bajo el nombre de STARTECT® en el año 2010. Se trata de un compuesto semisintético elaborado a partir de la parahercuamida, obtenida tras la fermentación de *Penicillium simplicissimum* [122]. Este fármaco no es efectivo frente a todos los géneros de NGI, por lo que se ha formulado en combinación con una LM, más concretamente la abamectina. Su aplicación individual como tratamiento antihelmíntico solo es eficaz frente adultos y L₄ de *Trichostrongylus* spp. y *C. curticei*, así como frente a adultos de *H. contortus* y *N. spathiger*. Presenta baja eficacia frente a *T. circumcincta* y escasa frente a *Oesophagostomum columbianum* y *T. ovis*. Sin embargo, en combinación con la abamectina (2 mg/kg derquantel + 0,2 mg/kg abamectina) su espectro de acción aumenta y es eficaz

frente a las L₄ y adultos de todos los géneros de NGI con importancia veterinaria. El derquantel actúa inhibiendo los canales 45-pS de los receptores de nAChRs del subtipo B, provocando la parálisis muscular del parásito y facilitando su expulsión al hospedador [123].

Aunque los BZD, LM e IM son los fármacos más utilizados para el control de las nematodosis gastrointestinales, existen otros de uso menos común como las tetrahidropirimidinas (pirantel), salicilanilidas (closantel), fenoles halogenados (nitroxinil). Estos fármacos presentan menor espectro de acción y efecto que los tres anteriores, por lo que se usan, generalmente en combinación con otros fármacos [122,124].

5.2 La resistencia antihelmíntica

Desde que comenzó su comercialización hasta la actualidad, los fármacos AH han sido la base para el control de las infecciones por NGI en medicina veterinaria y probablemente lo serán durante los próximos años debido a la falta de vacunas [125,126]. El control realizado mediante la aplicación de tratamientos con fármacos AH ha sido exitosa debido fundamentalmente a su elevada eficacia y su gran margen de seguridad. Sin embargo, en la mayor parte de los casos estos tratamientos se han aplicado sin la realización de un diagnóstico previo, de manera profiláctica, incorrecta, indiscriminada y/o subdosificada, lo que ha derivado en la aparición de parásitos resistentes [127]. El primer caso de **resistencia antihelmíntica (RA)** fue descrito en *H. contortus* frente a los BZD en 1964 y desde entonces se han publicado numerosos informes de resistencia a las diferentes familias de fármacos de varias especies de tricostrongídeos a lo largo del mundo [128–132]. Para 1990, la RA ya no era un potencial problema futuro y se convirtió en una preocupación real [133].

Los datos actuales muestran que la prevalencia de la RA es desigual y varía por regiones, siendo Australia una de las áreas geográficas más afectadas. En este país, se ha detectado resistencia a la ivermectina en el 91% de las

explotaciones muestreadas, y al fenbendazol en el 93%, en explotaciones donde *T. circumcincta* o *Trichostrongylus* spp. eran la especie predominante [134]. La RA a la avermectina también ha aumentado considerablemente en los últimos años en *T. circumcincta* y *H. contortus* llegando a valores cercanos al 80% [134]

En Europa, la prevalencia de la RA es menor que en otras áreas del mundo, aunque con tendencia alcista. Las especies comúnmente asociadas a la RA son *H. contortus* y *T. circumcincta*, aunque también se ha detectado en *Trichostrongylus* y *Nematodirus* [135]. En un estudio realizado entre 1980 y 2020, se ha confirmado la tendencia alcista de la RA para todas las clases de AH, describiendo un 48% de resistencia a los BZD, un 29% a las LM y hasta el 32% al Levamisol, aunque no de manera uniforme en todos los países. En países como Irlanda, Reino Unido, Eslovaquia y República Checa, se ha detectado la presencia de RA a los BZD hasta en el 98-100% de las explotaciones muestreadas [136–138]. A pesar de que en los países mediterráneos la prevalencia de la RA es menor, Italia ha informado de niveles de RA a los BZD cercanos al 80%, aunque la moxidectina sigue siendo eficaz [139,140]. Los datos recopilados en Grecia revelan un incremento significativo de la resistencia a los AH respecto a los estudios previos, que informaban de un 16% de explotaciones con RA a los BZD, en comparación al 96% de RA informado recientemente [141,142]. A pesar de que el monepantel y el derquantel han salido al mercado hace tan solo 15 años, ya se han detectado casos de resistencia a estos fármacos en algunos países como Suiza, Reino Unido, Brasil o Australia [134,143,144]. Sin embargo, la situación comenzó a ser verdaderamente crítica a comienzos del siglo XXI, cuando se detectaron las primeras especies que presentaban resistencia a múltiples familias de fármacos, denominadas cepas **multirresistentes**, principalmente *H. contortus*, *T. circumcincta* y *Trichostrongylus* spp [128,132,145–149].

En el caso de España, la situación no ha sido evaluada en todas las regiones y los estudios de prevalencia se enfocan principalmente en el norte de

la península (Figura 13), por lo que sería conveniente realizar una actualización de la situación.

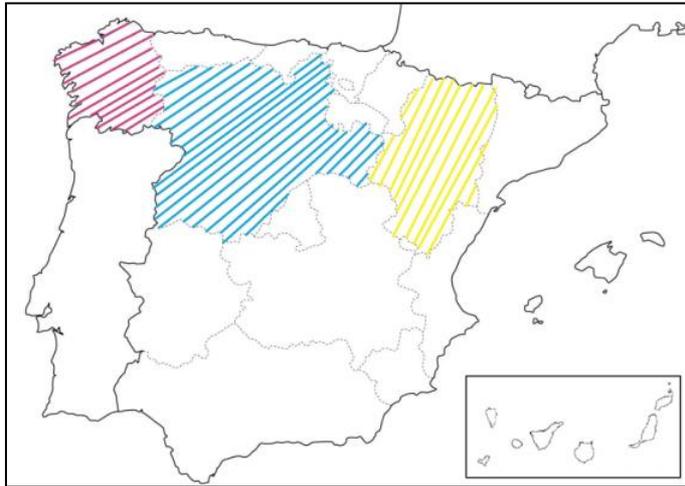


Figura 13. Mapa político del territorio español. Coloreado se muestran los territorios donde se han realizado estudios de resistencia.

En 2006 se publicó el primer informe de RA llevado a cabo por nuestro grupo de investigación entre los años 1999-2003 en Castilla y León, en el que se detectó un 12,7% de rebaños resistentes al albendazol, un 15,7% a la ivermectina y un 34,61% al levamisol. No se detectó multiresistencia en ningún caso [150]. En el año 2013, se repitió el estudio, con el fin de actualizar el estado de la RA en la zona, detectando resistencia al levamisol en el 59,0% de las explotaciones muestreadas, a la ivermectina en el 27,3% y albendazol en el 13,6%. Además, por primera vez en esta CCAA, se detectó un 27% de rebaños multiresistentes, es decir, resistentes a más de una familia de fármacos y siendo además uno de ellos resistente a todos los fármacos testados, incluyendo la moxidectina de acción prologada. Estos datos mostraron que la resistencia a los BZD y LM se mantuvo estable en el tiempo, mientras que la resistencia al levamisol aumentó significativamente [151]. En el año 2020, se publicaron los últimos datos disponibles hasta el momento, en un estudio realizado entre los años 2015-2016,

que reveló un porcentaje de resistencia al albendazol del 35%, lo que supone un incremento de más del doble en la misma área en 15 años [25].

En el año 2008, un informe realizado en Galicia detectó de un total de 72 rebaños un 18% de resistencia a los BZD y tan solo un 3% a las LM; sin embargo, no se encontró ningún rebaño con multirresistencia [152].

En la CCAA de Aragón, se publicó en el año 2012 un informe realizado sobre 107 rebaños comerciales, en el que se detectó la presencia de RA a BZD en el 11% de los rebaños mediante técnicas *in vitro*, aunque se sospechó de animales infectados por cepas resistentes en el 98% de los rebaños [153].

La **RA** ha sido descrita como *la capacidad que presenta un organismo para sobrevivir a una dosis de fármaco que normalmente mataría a todos los individuos de su misma especie y estadio* [118,127]. En términos prácticos, la RA está presente cuando la eficacia de un fármaco está por debajo de lo esperado, relativo al momento en el que se inició la comercialización del fármaco [23].

Los fármacos actuales tienen una eficacia cercana al 99% sobre cepas susceptibles [126]. Cuando en una población de parásitos hay individuos con genes de resistencia a una familia de fármacos, estos sobreviven al tratamiento y sus huevos serán eliminados junto con las heces. En consecuencia, la proporción de huevos con genotipo resistente disponibles en el medio será mayor, favoreciéndose su expansión en el rebaño [146]. Los parásitos nematodos presentan una serie de características biológicas que favorecen el desarrollo de la RA como sus cortos ciclos de vida, altas tasas de reproducción y poblaciones grandes que permiten tener una elevada diversidad genética [154]. Estas características hacen que el tiempo medio de desarrollo de la RA frente a un AH sea menor de 10 años [133]. La RA se desarrolla más rápido cuando el rebaño se somete a una **elevada frecuencia de tratamiento** [155,156]. La aplicación del tratamiento somete a los parásitos a una intensa presión de selección, sobreviviendo solo aquellos que presentan con genotipo resistente y eliminando aquellos con genotipo susceptible (Figura 11). Este hecho, ofrece a los parásitos

resistentes una ventaja reproductiva y de replicación sobre las cepas susceptibles de entre 2-3 semanas después de la administración del fármaco [126].

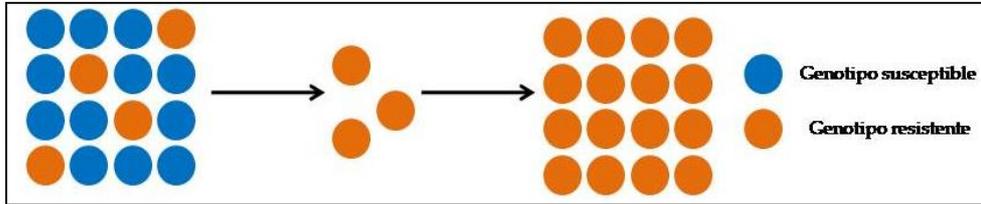


Figura 12. Selección de parásitos con genotipo resistente al ser tratado todo el rebaño con AH.

Otro factor que parece favorecer la selección de parásitos resistentes es la **administración** de una dosis **incorrecta** del fármaco, generalmente por subdosificación. Esto puede ocurrir por un cálculo incorrecto de la dosis, un mal uso/estado de los medios para realizar la desparasitación o por la presencia de infecciones mixtas con cepas resistentes a diferentes familias de fármacos AH [125]. La falta de alternancia en la aplicación de los fármacos también puede contribuir a la selección de parásitos resistentes.

Para evitar la transmisión de parásitos con genotipo resistente entre explotaciones hay autores que recomiendan mantener en **cuarentena** los animales recién adquiridos [125]. Sin embargo, esto entra en conflicto con el concepto **refugio** (*ver apartado 6.1*), que ha tomado fuerza en los últimos años y se ha reconocido como fundamental en el control de las cepas resistentes. Este concepto hace referencia al mantenimiento de ciertas poblaciones de parásitos, evitando tratar a todos los animales del rebaño, y por tanto reduciendo la presión de selección a la que están sometidos. Para ello, tan solo se tratan selectivamente los animales con mayores cargas parasitarias, es decir, lo que verían su productividad más afectada. De esta forma, el resto del rebaño se convierte en un reservorio de genes susceptibles que compiten con los resistentes por el mismo nicho, conservando los dos genotipos, y evitando la selección del genotipo resistente (Figura 12) [157,158].

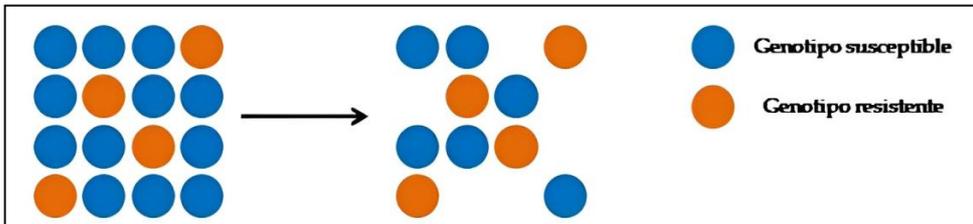


Figura 12. Concepto de refugio. Resultado de desparasitar la mitad del rebaño. Ambos genotipos se conservan.

El sistema de manejo y la época del tratamiento también son factores fundamentales. Comúnmente los animales eran desplazados a pastos no contaminados tras el tratamiento, lo que provocaba que, en el caso de rebaños resistentes, los pastos se contaminaran exclusivamente con huevos de parásitos con genotipo resistente [125]. Por esa razón, solamente se aconseja mover a los animales a “pastos limpios” en aquellos casos donde se haya confirmado la eficacia del fármaco.

6. Métodos alternativos de control

La evolución de la RA a lo largo del mundo ha hecho evidente la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control alternativos, enfocados no solo en eliminar nuestra dependencia de uso de AH, sino también de mantener la eficacia de los fármacos actuales. Los métodos alternativos se basan en tratamientos controlados (tratamiento selectivo/dirigido) o alternativos (control biológico), limitación del contacto del huésped con la fase infectante del parásito (manejo de pastos, rotación de pastos, uso alternativo de pastos) o selección de huéspedes capaces de controlar la infección (selección genética) [159]. Aunque todos ellos son métodos alternativos, la selección genética se tratará como un epígrafe individual al tener especial interés en esta Tesis Doctoral.

6.1. Tratamiento selectivo y dirigido

El tratamiento dirigido o *Targeted Treatment (TT)*, tiene como objetivo el uso sostenible de los fármacos AH y la reducción de la RA mediante la disminución de la frecuencia de desparasitación. El tratamiento se administra a todo el rebaño en el momento más adecuado en función de parámetros que cuantifican la infección, como puede ser la carga parasitaria, teniendo en cuenta la necesidad de mantener los refugios [160]. El enfoque de los *TT* es reducir la cantidad de tratamientos totales administrados a un rebaño, aumentando el tiempo entre tratamientos, y por lo tanto, minimizando la contaminación de los pastos únicamente con parásitos de genotipo resistente, ya que los parásitos con genotipo susceptible tienen tiempo suficiente para contaminar los pastos, diluir la población de larvas resistente en el ambiente, reproducirse dentro del hospedador y generar descendencia heterocigótica [158]. Los tratamientos dirigidos pueden mejorarse aplicando tratamientos selectivos dirigidos o *Targeted Selective Treatment (TST)*, que consisten en la desparasitación individual de los animales con, teóricamente, mayores cargas parasitarias según parámetros como la carga parasitaria, el rendimiento productivo, la ganancia de peso o una combinación de ambos, dejando parte del rebaño sin tratar. En pequeños rumiantes, tan solo el 20% de los animales de un lote presentan elevadas cargas parasitarias aportando más huevos al pasto que el resto del rebaño. El TST está dirigido a estos animales que contaminan más los pastos, y que se beneficiarían más del tratamiento, manteniendo al resto de NGI en **refugio** al no entrar en contacto con los AH [158,160].

6.2. Control biológico

El crecimiento de una especie está limitado tanto por factores abióticos (especialmente el clima, alimentación y disponibilidad de agua) como por factores **bióticos** (bacterias, virus, hongos y depredadores). Los nematodos son un grupo filogenético amplio con gran cantidad de depredadores [161,162]. De

entre sus depredadores, el hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* ha sido el candidato más prometedor para controlar la población de NGI gracias a su habilidad para reducir el número de larvas infectantes en el pasto [161,163]. Las esporas se suministran junto con el alimento, pasan a través del sistema digestivo del rumiante donde se activan, y una vez en el pasto tienen la capacidad de atrapar las L₃ en las heces evitando que estas migren a la vegetación [162]. La eficacia de este hongo ha sido demostrada en ovinos, bovinos y equinos con valores de reducción de L₃ *in vitro* entre el 60-99% [164,165]. En algunos estudios el efecto antihelmíntico mejora cuando se combina con otras especies como *Monacrosporium gephyropagum* o *Harposporium helicoides*, pero con resultados dispares [166,167]. Sin embargo, la aplicación en campo ha arrojado resultados variables y una serie de inconvenientes, como la necesidad de administrar esporas regularmente a los animales, ya que durante la digestión se pierde gran parte de estas. A pesar de ello, ya existe un producto comercializado en Australia, BioWorma®, que ha presentado resultados prometedores, con disminución del número de L₃ en el pasto, o una menor eliminación de huevos, en explotaciones caprinas, bovinas, ovinas y equinas, además de en animales salvajes como alpacas y ciervos.

6.3. Manejo de pastos

Las estrategias basadas en el manejo de pastos se han estudiado y descrito desde los años 60. Estos métodos pretenden reducir el contacto entre el ganado y las larvas infectantes presentes en la vegetación, intentando mermar el número de larvas presentes en el pasto [168]. Para poder aplicar estas estrategias es crucial conocer la epidemiología del parásito y sus interacciones con el hospedador, el clima y el tiempo de supervivencia de la larva en la vegetación [169].

Basándose en la tasa de muerte natural del parásito, se han diseñado diferentes métodos de manejo de pastos, uno de los más comunes es el **sistema de rotación de pastos**, que consiste en dividir el área total del pasto en diferentes

subdivisiones, de manera que el ganado irá rotando por cada parcela en periodos cortos de tiempo (alrededor de 7 días) evitando al máximo el contacto con la etapa infectante del parásito, ya que las larvas sobreviven durante un tiempo limitado [162,169]. A partir de este modelo se ha diseñado una variante denominada *cell grazing system*; en este sistema el área total se divide en celdas aún más pequeñas y un gran número de cabezas de ganado permanece en cada una como máximo 2 días. Así, el intervalo de tiempo de descanso de una celda es mucho mayor que en el sistema de rotación clásico (Figura 14) [162,170]. Estos métodos, además de ser costosos, no siempre logran disminuir el contacto entre las larvas y el ganado, especialmente en zonas templadas, donde las larvas infectantes sobreviven más tiempo en el pasto que en las zonas tropicales [169].

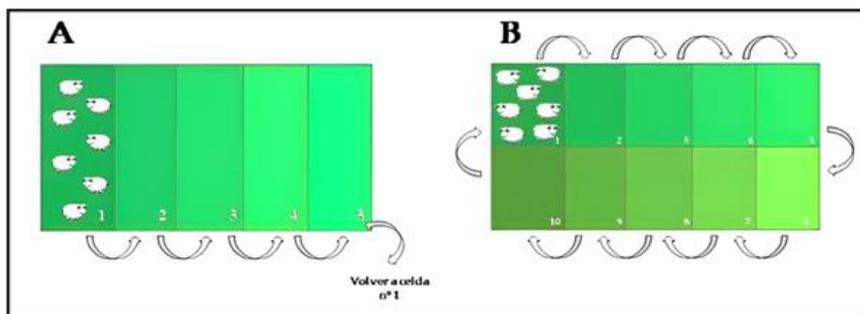


Figura 15. Esquema representativo de los sistemas de manejo de pastos. A) Representación del sistema de manejo convencional. B) Representación del sistema *cell grazing system*.

El **pastoreo mixto** es otro método cuyo fin es reducir las larvas presentes en la vegetación. Este método consiste en la alternancia de diferentes especies ganaderas basándose en la especificidad que presentan los NGI por ciertos hospedadores. No obstante, existen especies de nematodos que afectan a varias especies huésped, como *T. axei*, capaz de infectar a caballos, ovejas y vacas, por lo que es importante intentar prevenir la acumulación de estas larvas en el pasto [159,161,169].

7. Selección genética

La selección de animales genéticamente resistentes a la infección por NGI supone un enfoque atractivo para el control parasitario, ya que además de minimizar el uso de AH, también resulta una solución sostenible a largo plazo al seleccionar animales con rasgos heredables relacionados con la resistencia a las infecciones por NGI [74,171]. La respuesta del hospedador frente a una infección por NGI engloba dos mecanismos de protección, la **resistencia a la infección y la resiliencia a los efectos de la infección** [172]. Se considera que un animal es resistente cuando presenta la habilidad de controlar el desarrollo del parásito mediante mecanismos como la reducción del establecimiento larvario, el retraso del crecimiento del parásito en su interior, la disminución de la fecundidad de las hembras adultas y/o la expulsión de los parásitos adultos con las heces. En contraposición está la **resiliencia**, que se define como la capacidad del huésped para resistir o limitar los efectos patogénicos de la infección en el sistema digestivo, manteniendo los parámetros productivos durante la infección [19,162,173,174]. La resistencia a la infección es **hereditaria** y está determinada por numerosos genes (muchos de ellos aún no identificados), cada uno con un efecto relativamente pequeño, lo que supone una elevada variabilidad entre razas, así como entre individuos de la misma raza [171,175,176]. La **selección genética** se basa en la heredabilidad de los caracteres como herramienta en la selección de individuos [162]. En particular, las razas ovinas de pelo como la Red-Massai, Canaria de Pelo, Florida Native y la Barbados Blackbelly, han demostrado tener mayor resistencia a las infecciones por NGI bajo condiciones experimentales en comparación con las ovejas de lana como la raza Canaria, Ile de France y Suffolk [74,177–181].

La resistencia a los nematodos es un rasgo poligénico, lo que confiere una ventaja frente a los métodos de control químicos, ya que los parásitos se encuentran bajo una presión de selección menor al tener que adaptarse a un mayor número de *dianas*. Es por ello que la **selección genética** se convierte en

una alternativa interesante debido a que brinda una solución sostenible a largo plazo [74,171]. Por este motivo, se están implementando programas de selección genética basados en resistencia, resiliencia o una combinación de ambos según si el objetivo es reducir la transmisión o si es reducir los signos clínicos [182]. Aunque se han realizado varios estudios al respecto, aún no se han identificado claramente que gen o genes podrían ser de interés para la selección de animales resistentes a la infección, por lo que se ha recurrido a otras herramientas de selección que se expondrán a continuación.

Se han aplicado una serie de **valores fenotípicos** como indicadores de resistencia para estudiar la variabilidad entre razas y entre individuos dentro de la misma raza. Algunos de estos caracteres fenotípicos más utilizados son el número de huevos en heces, los niveles de anticuerpos específicos o el impacto en la productividad [182–184]. De todos ellos, el principal valor utilizado hasta el momento es el número de huevos por gramo de heces (HGH), ya que es un carácter con una heredabilidad moderada ($h^2= 0,2-0,35$), que puede evaluarse mediante métodos relativamente sencillos y que está relacionado con la carga parasitaria del hospedador, por lo que puede ser usado como indicativo del nivel de contaminación de los pastos [185]. Sin embargo, este carácter presenta considerables limitaciones, como la necesidad de que el huésped esté expuesto a los parásitos para poder manifestar la resistencia, y la influencia de factores como la raza, la edad o el tiempo de exposición del huésped al parásito durante el pasto, por lo que algunos autores han sugerido que no se utilice como método de selección de resistencia [74,182]. A pesar de todo, la selección de animales basándose en los HGH está ampliamente extendida y se ha incluido este rasgo para diseñar programas comerciales de cría [171].

Alternativamente, también se han estudiado **valores inmunitarios** como indicadores de resistencia en rumiantes, principalmente los niveles de anticuerpos, focalizándose en la IgA. Nueva Zelanda junto con Australia, son dos de los territorios donde la RA se ha convertido en un problema considerable,

y por ello han comenzado a implementar métodos de selección de animales capaces de controlar las nematodosis gastrointestinales [186–188]. Este método se basa en la detección de la IgA específica presente en la saliva de animales infectados frente a un antígeno de superficie que se encuentra únicamente las L₃ de *T. colubriformis* (*Carbohydrate Surface Larval Antigen, CarLA*). Niveles altos de IgA se han relacionado con la supresión del crecimiento de las L₄ que se desarrollarán como adultos de menor longitud, lo que afectará a su prolificidad, ya que cada hembra producirá menos huevos [22,106,189]. El test se comercializa en Nueva Zelanda, como un kit para la selección de corderos tras el destete, bajo el nombre de CARLA SALIVA TEST. Este test correlaciona negativamente una mayor reacción IgA-CarLA con una menor número de huevos en heces y positivamente con un mayor ganancia de peso [182]. Fairlie-Clarke et al. [190] demostró que, la respuesta de la IgA frente a CarLA presenta una heredabilidad del 0,16, mientras que frente a HGH fue de 0,08, por lo que podría ser un buen candidato para medir resistencia.

Además de los niveles de IgA, también se han estudiado otros marcadores basándose en los componentes clave de la respuesta inmunitaria frente NGI. Las poblaciones celulares estudiadas más profundamente han sido los eosinófilos, los leucocitos globulares, y los linfocitos T CD4⁺ y T $\gamma\delta$. En las razas resistentes a *H. contortus*, como la Canaria de Pelo, se ha descrito un incremento en el número de eosinófilos tisulares, por lo que se le ha otorgado un papel importante en la respuesta inmunitaria [68]. Sin embargo, esto no está tan claro en el caso de infecciones por *T. circumcincta*, ya que una marcada eosinofilia se ha relacionado con mayor susceptibilidad en ovejas Scottish Blackface infectadas experimentalmente [98]. La población de LG también ha sido estudiada detenidamente, especialmente en infecciones por *H. contortus*. A esta población se le ha otorgado un papel fundamental en la variación del número de adultos, ya que se han detectado correlaciones negativas entre el número de adultos presentes en el abomaso y en número de LG en infecciones por *T. circumcincta* y *H. contortus* [95,191]. Por otro lado, diversos estudios han detectado un aumento

de la población de linfocitos $T\gamma\delta/WC1+$ tras infecciones por diferentes especies de NGI como *T. colubriformis* y *H. contortus* en las razas Blackbelly, Merino y Canaria de Pelo. Estos estudios otorgan a los linfocitos $T\gamma\delta/WC1+$ un papel clave en el reclutamiento de células efectoras, como los eosinófilos, iniciando la respuesta inmunológica antes de que se dé el aumento del número de linfocitos $T CD4+$ [192–195].

Otro mecanismo utilizado ha sido la conservación de razas autóctonas, ya que están adaptadas a las características del entorno, entre ellas las infecciones por parásitos como los NGI [174]. Sin embargo, la elevada demanda de productos de origen animal en el mercado ha obligado a introducir nuevas razas ovinas más productivas, como la raza Assaf, aunque no están tan adaptadas al medio y por lo tanto tampoco a infecciones por NGI [162,171]. Estas razas, han sobrevivido gracias a los tratamientos con AH, por lo que han transmitido los genes de susceptibilidad a su descendencia [171]. Actualmente, se intenta evitar la introducción de razas no autóctonas y en muchos lugares se está considerando el cruce entre razas más productivas y las locales- como la raza Salz obtenida del cruce de hembras de raza Rasa Aragonesa y sementales Romanov- para mejorar los rendimientos productivos y la resistencia del rebaño a la infección [161,171]. A fin de preservar las razas autóctonas, también se están desarrollando métodos de selección de individuos resistentes dentro de una misma raza [162].

Identificar los **marcadores genéticos** asociados a la resistencia a la infección permitiría determinar el estado de un animal sin necesidad de una exposición previa [196]. Sin embargo, todo apunta a que el control genético de la resistencia a NGI es un sistema complejo que responde a un efecto poligénico, es decir está influenciado por una serie de genes en lugar de un único gen, que además varía entre razas. Por esa razón, un polimorfismo puede generar un efecto en una raza, mientras que en otra puede no tener efecto o presentar el efecto contrario. Hasta el momento se han realizado estudios de rasgos cuantitativos (*Quantitative trait locus- QTL*) y de secuencia (*Single-nucleotide*

polymorphism-SNP) para determinar que variaciones podrían contribuir a la resistencia a la infección [196,197]. De esta forma se han identificado gran variedad las regiones cromosómicas y QTL que contribuyen a la variación en la resistencia a la infección en numerosas razas, a diferentes especies de nematodos y bajo condiciones experimentales o naturales. Estos resultados resaltan la complejidad de estos caracteres y la dificultad de su identificación, aunque algunos estudios han destacado posibles regiones en los genes que codifican para el CMH-II y en los genes que codifican para el interferón, una citoquina clave en la diferenciación de los linfocitos T hacia fenotipo Th1 o Th2 [196,197]. En ovejas Churra resistentes y susceptibles a la infección por tricostrongídeos, se identificaron QTL que se expresaban de manera diferente y que influían en el recuento del número de HGH y en los niveles de IgA [73].

La transcriptómica se ha convertido en una herramienta clave en la identificación de mecanismos implicados en la resistencia frente a NGI, a través del estudio del nivel de expresión de ciertos genes en animales resistentes y susceptibles. Así, se han realizado estudios comparativos para determinar la expresión diferencial de genes entre grupos de individuos. Los genes de elección generalmente suelen estar relacionados con los mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se detectaron diferencias significativas de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria aguda y la activación del complemento en un estudio de transcriptómica de la mucosa abomasal en oveja Canaria de Pelo (resistente) y oveja Canaria (susceptible), tras una infección experimental con *H. contortus* [197]. En otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación, se analizó la transcriptómica de la mucosa abomasal de ovejas Churras resistentes y susceptibles infectadas con *T. circumcincta* detectándose diferencias significativas en la expresión de los genes TLN2, CLAC1 y galectinas, relacionados con los mecanismos de la respuesta inmunitaria contra el parásito [198]. Esta información podría ayudar a establecer perfiles asociados a la resistencia genética a la infección por NGI que

posteriormente se puedan aplicar a programas de selección dentro de una misma raza.

8. Microbiota gastrointestinal

8.1. El concepto de microbiota

El tracto gastrointestinal de los vertebrados está habitado por una gran variedad de organismos, **la macrobiota y la microbiota** [199,200]. El sistema digestivo de los mamíferos, y en particular de los rumiantes, constituye el hábitat natural de una amplia diversidad de microorganismos, mayoritariamente bacterias, que comparten el nicho con hongos, arqueas, virus, protozoos y ocasionalmente con helmintos [199]. La microbiota intestinal está compuesta por especies permanentes y otras especies variables que transitan temporalmente por el tracto digestivo, pudiendo llegar a ser peligrosos para el hospedador [201]. Millones de años de coevolución han llevado al desarrollo de una relación **mutualista** en la que la microbiota participa en los procesos fisiológicos del huésped, a la vez que el huésped le proporciona un entorno protegido y nutritivo [202]. Algunas de las funciones en las que participa la microbiota son la digestión y degradación de fibras vegetales, el metabolismo, la inmunidad del huésped o incluso actúan como barrera físico/química frente a las especies patógenas que puedan colonizar la superficie [203]. Por lo tanto, la microbiota es un componente imprescindible del sistema digestivo de los rumiantes y esencial para el bienestar del huésped [204].

Por el contrario, la **macrobiota**, como los parásitos helmintos que en ocasiones están presentes en el sistema digestivo, se consideran perjudiciales para la salud del huésped, ya que se benefician de los nutrientes, dañan tejidos, alteran el nicho ecológico y liberan productos tóxicos, comprometiendo la salud del hospedador [203,205]. Al compartir el mismo entorno, estos parásitos coexisten con la microbiota intestinal y es plausible que se presenten

interacciones entre ellos e incluso se han encontrado evidencias sobre la existencia de relaciones de **mutualismo** entre ambos grupos. Tal es así que, algunas especies de nematodos, como *Trichuris muris*, requieren de la presencia de ciertas especies bacterianas de la microbiota intestinal para que los huevos puedan eclosionar [206,207]. Durante mucho tiempo, las complejas relaciones entre la microbiota y los helmintos parásitos se han descuidado, pero esto ha cambiado y durante los últimos años se han establecido líneas de investigación que abordan este tema. A pesar de todo, el escaso conocimiento actual se basa en gran medida en estudios realizados en roedores y humanos [203,208].

8.2. Ecosistema microbiano abomasal

Los rumiantes se caracterizan por alimentarse de productos vegetales compuestos por carbohidratos como la celulosa. Esta característica está asociada a la estructura del aparato digestivo. Su estómago está dividido en cuatro compartimentos bien diferenciados tanto anatómicamente como funcionalmente; tres preestómagos (rumen, retículo y omaso) y un estómago glandular (abomaso) [209]. El abomaso presenta pliegues que aumentan la superficie de la mucosa; su mucosa es glandular y se encarga de la secreción de mucus, pepsinógeno y HCl, de manera similar al estómago de los animales monogástricos. Este compartimento se ocupa de la digestión ácida y enzimática del flujo continuo de alimentos que provienen de los compartimentos anteriores [210]. En cada uno de los compartimentos se dan las condiciones apropiadas para el desarrollo de una amplia gama de microorganismos, es por ello que la microbiota que habita en cada compartimento depende principalmente de sus propios requisitos y es muy diversa y variable [202]. Muchos de estos microorganismos participan en la digestión, aprovechando algunos productos y transformándolos en otros que constituyen una importante fuente nutricional. Además, la proteína microbiana puede ser utilizada por el huésped conformando una fuente de proteínas [211].

Hasta el momento, hay poca información disponible que describa el perfil

taxonómico de la microbiota presente en el abomaso de ovejas. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo estudios que han permitido identificar y clasificar una amplia diversidad microbiana aplicando técnicas moleculares basadas en la secuenciación y análisis del fragmento de ARNr 16S o mediante la técnica de pirosecuenciación 454 [212–215]. De acuerdo con la clasificación filogenética, la mayoría de las especies bacterianas del abomaso pertenecen, habitualmente, a los filos Bacteroidetes ($\approx 70\%$) y Firmicutes ($\approx 20\%$), que juntos pueden alcanzar el 90% del total de bacterias. El resto de filos se suelen encontrar en porcentajes menores al 2% y son Fibrobacteres ($\approx 2\%$), Proteobacteria ($\approx 1,5\%$), Actinobacteria ($\approx 1\%$) y Lentisphaerae ($\approx 1\%$) [216–218]. Con respecto al nivel de clase, Bacteroidia y Clostridia conforman aproximadamente el 88% del total bacteriano, seguido por Gammaproteobacteria, que presenta una abundancia menor al 2% [213]. Las abundancias relativas a nivel de género muestran a *Prevotella*, que pertenece al filo Bacteroidetes, como el más abundante ($\approx 20\text{-}30\%$), mientras que el resto representan porcentajes inferiores suelen ser *Lachnospiraceae* no clasificado ($\approx 10\%$), *Butyrivibrio* ($\approx 10\%$), *Ruminococcus* ($\approx 1\%$), *Fibrobacter* ($\approx 0,5\%$), *Clostridium* ($\approx 0,1\%$) [213,217]. Los datos publicados sobre la composición de la microbiota abomasal a nivel de especie son limitados, pero Wang et al. [213] identificó *Ruminococcus flavefaciens* ($\approx 3\%$), *Butyrivibrio fibrisolvens* (1,5%), *Selenomonas ruminantium* (0,7%) como las especies más abundantes en ovejas.

La unidad empleada para medir la riqueza y diversidad de un nicho ecológico es la **diversidad alfa** y depende tanto de la riqueza (número de especies que conforma una población) como de la uniformidad (abundancia relativa de una especie en comunidad) [219].

8.3. Relación parásito-hospedador-microbiota

Durante varias décadas, las investigaciones se han centrado en estudiar la relación parásito-hospedador. En estos estudios se ha prestado gran atención a los mecanismos inmunológicos del huésped, pero se han ignorado las

interacciones entre los nematodos y los microorganismos que habitan el tracto digestivo [220]. La infección por helmintos no solo altera la composición del microbioma, sino que indirectamente tiene como resultado la alteración de los productos derivados de su metabolismo [221]. A lo largo de los últimos años, diversos estudios han resaltado la importancia de la microbiota intestinal como posible factor determinante en la relación parásito-hospedador [222,223].

En el tracto gastrointestinal, la microbiota desempeña un importante papel en la resistencia a la presencia de otros patógenos mediante un fenómeno conocido como **resistencia a la colonización**, que involucra mecanismos de exclusión competitiva entre los microorganismo y los patógenos [224]. La relación microbiota-hospedador en animales sanos requiere de una constante regulación para evitar la ruptura del delicado equilibrio [225]. Cuando especies patógenas colonizan el tracto gastrointestinal, se desencadena una relación de competencia por los nutrientes y el nicho disponible, que puede llevar a la disfuncionalidad de la función gastrointestinal [226]. Las infecciones por helmintos causan una alteración en el equilibrio gastrointestinal que desemboca en la ruptura de la mucosa, inflamación y/o modulación de la respuesta inmunitaria, lo que da como resultado el ambiente adecuado que favorece el establecimiento del patógeno [225,226]. Los efectos de los parásitos gastrointestinales no se han estudiado de forma exhaustiva en mamíferos, y mucho menos en rumiantes, por lo que la mayoría de los datos disponibles se han obtenido a partir de modelos roedores o humanos. Se han publicado algunos estudios que informan sobre los efectos de infecciones por NGI, revelando una serie de alteraciones específicas en la composición de la microbiota gastrointestinal del hospedador, independientemente de la especie del huésped y del parásito [215,218,221,227,228][62,216]. Por ejemplo, en ratones infectados experimentalmente por los nematodos *Heligmosomoides polygyrus*, *T. muris* o *Nippostrongylus brasiliensis* se ha detectado un aumento en las poblaciones microbianas de la familia Lactobacillaceae; esta familia tiene un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, pero también se han descrito

funciones inmunomoduladoras en el huésped, principalmente al promover la diferenciación de células T reguladoras [229–232]. La presencia de *H. polygyrus* en ratones infectados experimentalmente también se ha asociado a un incremento en la abundancia de la familia Enterobacteriaceae. A pesar de que se desconoce el motivo de esta alteración, se cree que probablemente se deba a la aparición de la inflamación intestinal, ya que ambas familias toleran niveles de estrés oxidativo muy elevados [233]. Las modificaciones de la composición microbiana en el abomaso han sido poco estudiadas, probablemente debido a la dificultad técnica del acceso a las muestras y su elevado costo. Sin embargo, un estudio reciente ha revelado la disminución en la abundancia relativa de la clase *Clostridia* en el abomaso de cabras en la etapa temprana (7 días pi) de una infección experimental por *H. contortus* [234]. Curiosamente, esta clase de bacterias se ha asociado con el control de la inflamación a través de la liberación de butirato, un ácido graso de cadena corta resultado de la fermentación [235]. La alteración de la abundancia en el género *Prevotella* en abomaso y heces de ovejas es característica de las infecciones por *T. circumcincta*, *H. contortus* y *Trichostrongylus* spp., sin embargo, los resultados de los estudios son contradictorios, mientras que algunos autores describen un aumento en la abundancia, otros detallan una disminución de las poblaciones [62,216,218,228].

Hasta la fecha, los mecanismos que utilizan los helmintos para modificar la composición de la microbiota del huésped no se conocen en su totalidad, pero se sabe que están relacionados con algunos parámetros como la producción de metabolitos con acción antimicrobiana, la competición por los nutrientes intestinales como la glucosa, y la excesiva producción de moco que puede afectar al nicho de algunas especies bacterianas [236,237].

Durante la última década, cada vez más evidencias respaldan la hipótesis de que el microbioma del huésped puede representar un papel clave en la relación parásito-hospedador [238]. Las infecciones gastrointestinales por nematodos están asociadas a alteraciones en la composición y función de la microbiota del huésped, sin embargo, la importancia de estas alteraciones aún

debe de comprenderse totalmente. Si bien, algunas de dichas alteraciones se han relacionado con la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped, y la expulsión del parásito [239]. Por esa razón, existe la hipótesis de que la microbiota podría ser un componente prometedor para el desarrollo integrado de nuevas estrategias destinadas a reducir el impacto de las infecciones por NGI [238]. Sin embargo, para el desarrollo de aplicaciones prácticas, se necesitan avances significativos en el estudio de las interacciones parásito-hospedador-microbiota, empezando por la descripción de la microbiota en diferentes escenarios de infección.

Objetivos

La elevada prevalencia de las nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino ha generado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control más sostenibles con el medio ambiente y que constituyan una solución duradera a largo plazo. En consecuencia, el **Objetivo General** de la presente Tesis Doctoral ha sido explorar los mecanismos mediante los cuales el ganado ovino es capaz de controlar la infección por NGI tanto en condiciones experimentales como naturales. Para ello, se ha estudiado la respuesta inmunitaria de ovejas Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta* tras dos infecciones experimentales, así como el papel que juega la composición de la microbiota abomasal en el control de la infección. Asimismo, se han evaluado los niveles del anticuerpo específico IgA como posible indicador de control de la infección por NGI en condiciones naturales, medido en diferentes tipos de muestras biológicas.

Por lo tanto, los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- ☑ Estudio de la respuesta inmunitaria a nivel humoral y celular de ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta*.
- ☑ Estudio de la respuesta específica del anticuerpo IgA como marcador de control de la infección por NGI en ganado ovino infectado de forma natural y perteneciente a diferentes edades y a las razas Assaf, Castellana y Churra.
- ☑ Caracterización de la composición de la microbiota abomasal en ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta*.

Capítulo I:

Estudio de la respuesta inmunitaria a nivel humoral y celular de ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta*.

Doi: 10.1007/s00436-020-06953-4.

A lo largo del presente estudio, se han descrito algunos de los mecanismos inmunológicos que intervienen en la capacidad de resistencia a la infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovejas de raza Churra. Después de una primera infección experimental con 50 000 L₃, las ovejas fueron clasificadas según su recuento acumulado de huevos en heces (cFEC), donde seis ovejas fueron consideradas resistentes (GR) y otras seis como susceptibles (GS) a la infección. Durante la primera infección, se evaluó la actividad del anticuerpo IgA en suero sanguíneo frente al antígeno somático de L₄ de *T. circumcincta*. Como resultado, el GR mostró mayores niveles de IgA el día 3 post-infección (pi) ($p < 0,05$) y cercano al límite de significancia el día 21 pi ($p = 0,06$). Asimismo, se detectó una fuerte correlación negativa entre el cFEC y los niveles de IgA el día 3 pi ($r = -0,870$; $p < 0,05$) en el GR, que estaba ausente en el GS. Tras un período de 30 días de infección, las ovejas fueron tratadas con moxidectina, para ser infectadas de nuevo a los 21 días. En la segunda infección, se emplearon 70,000 L₃ de *T. circumcincta* y, tras 7 días de infección, los animales fueron sacrificados. Durante la necropsia, se tomaron muestras de mucosa gástrica y de sangre para medir los niveles de IgA, y se realizó el conteo de L₄ presentes en la mucosa. Los niveles de IgA específica medida en la mucosa gástrica y suero sanguíneo fueron similares entre ambos grupos y la carga de L₄, presentó un 68% de reducción en el GR que en el GS. Asimismo, se tomaron muestras de tejido abomasal, para realizar un estudio histológico y evaluar la respuesta celular inmune mediada por linfocitos T CD4, linfocitos T $\gamma\delta$, eosinófilos, y leucocitos globulares. El GR presentó mayor número de linfocitos T CD4, linfocitos T $\gamma\delta$ y leucocitos globulares que el GS, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, aunque el número de eosinófilos tampoco presentó diferencias significativas, el GS presentaba mayores niveles que el GR. Además, los eosinófilos mostraron una correlación positiva con los linfocitos T $\gamma\delta$ ($r = 0,900$; $p = 0,037$), tan solo en el GR. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis que sostiene que en ovejas de raza Churra existen dos fenotipos que presentan una capacidad diferente de respuesta inmune a la infección causada por *T. circumcincta*.

Capítulo II:

IgA secretora como biomarcador de la infección natural por nematodos gastrointestinales en ovejas de diferentes razas.

Doi: [org/10.3390/ani13132189](https://doi.org/10.3390/ani13132189)

Se ha demostrado que el anticuerpo IgA desempeña un papel importante en la resistencia a las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) en ovejas, particularmente en infecciones provocadas por *Teladorsagia circumcincta*. Algunas razas ovinas presentan asociaciones negativas entre los niveles de IgA y la carga parasitaria en infecciones experimentales. En el presente estudio, se ha estudiado la relación entre los niveles de IgA en ovejas infectadas de forma natural (582 ovejas en total; 193 menores de un año y 389 mayores de un año) y el recuento de huevos en heces (HGH) en ovejas de raza Assaf, Castellana, y Churra. Se realizaron ensayos ELISA para medir los niveles de IgA contra el antígeno somático de *T. circumcincta* tercer estadio larvario (L₃) y contra un fragmento de 203 aminoácidos de la proteína disulfuro isomerasa de la misma especie de NGI en suero sanguíneo, saliva y secreciones nasales. Además, se desarrolló un modelo de intercepción aleatoria multinivel para predecir el riesgo de infección según la edad o la raza. Para el análisis estadístico se utilizó el rango de correlación de Spearman. El modelo de predicción mostró que estas razas no constituyen un factor influyente en este estudio, aunque la raza Castellana podría considerarse ligeramente más susceptible que las demás. La edad influyó en el riesgo de infección, siendo las ovejas jóvenes más susceptibles a la infección que los adultos, excepto en la raza Castellana, cuyo riesgo de infección fue similar en todas las edades. La asociación positiva más significativa se encontró entre los HGH y la IgA medidas en las secreciones nasales de ovejas jóvenes utilizando ambos antígenos ($Rho = 0,5$; $p = 0,00$); la correlación de HGH con IgA en suero fue moderadamente significativa ($Rho = 0,306$; $p = 0,00$). La proteína disulfuro isomerasa presentó menos reactividad, en comparación con el antígeno somático de L₃. En conclusión, en condiciones naturales, la IgA específica contra NGI se asoció positivamente con la FEC en ovinos, siendo las secreciones nasales de animales jóvenes la muestra donde esta asociación es más fuerte, por lo tanto, podría usarse como marcador de infección en futuros estudios.

Capítulo III:

Caracterización de la composición de la microbiota abomasal en ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección por *T. circumcincta*.

Doi: 10.1038/s41598-022-21058-x

Los nematodos gastrointestinales (NGI) son una gran amenaza para la salud y el bienestar de los pequeños rumiantes en todo el mundo. *Teladorsagia circumcincta* parasita el abomaso de pequeños rumiantes, especialmente en regiones templadas, provocando importantes pérdidas económicas. Debido a que *T. circumcincta* y el microbioma del huésped comparten el mismo nicho, se espera la existencia de interacciones entre ellos y el huésped. Aunque se sabe que, dentro de cada raza ovina, algunos animales son más resistentes que otros a la infección por NGI, no se conoce si el microbioma influye en el fenotipo de estos animales. Bajo esta condición, 12 ovejas fueron clasificadas según su recuento acumulado de huevos en heces (cFEC) al final de una primera infección experimental, 6 como grupo resistente (RG) y 6 como grupo susceptible (SG) a la infección por *T. circumcincta*. Posteriormente, todas las ovejas se infectaron experimentalmente con 70.000 L₃ de *T. circumcincta* y el día 7 después de la infección se sacrificaron. En la necropsia, se recogieron muestras de mucosa gástrica y el contenido gástrico del abomaso con el fin de extraer ADN bacteriano y secuenciar la región V3-V4 del gen 16S rRNA utilizando tecnología Illumina. Tras realizar el bioanálisis, los resultados mostraron que la diversidad α y la diversidad β se mantuvieron similares en ambos grupos. Sin embargo, las ovejas con fenotipo resistente presentaron un mayor número de especies bacterianas fermentadoras de butirato como *Clostridium sensu stricto 1* (abundancia en RG: 1,29% y en SG: 0,069%; $p = 0,05$), y *Turicibacter* (abundancia en RG: 0,31% y en SG: 0,027% $p = 0,07$) en contenido gástrico, pero también *Serratia* spp en mucosa gástrica (abundancia en RG: 0,12% y en SG: 0,041%; $p = 0,07$), una especie productora de compuestos con actividad nematocida. También se observó una tendencia hacia la correlación negativa entre cFEC y la abundancia de *C. sensu stricto 1* en el contenido gástrico ($r = -0,537$; $p = 0,08$). Estos datos sugieren que la composición del microbioma podría ser otro factor asociado al desarrollo del fenotipo resistente mediante interacciones con el huésped y afectando, en última instancia al riesgo individual de infección.

Discusión

Las nematodosis gastrointestinales son una de las parasitosis con mayor prevalencia que afectan a los sistemas agropecuarios alrededor del mundo [18,285]. Estas infecciones generan un impacto negativo en el bienestar animal y contribuyen significativamente a la merma en la producción de leche, lana y carne, a la disminución de la fertilidad y de la ingesta de alimentos, y al aumento de los costes derivados de los tratamientos veterinarios (cercaos al 20%) [135,294,321]. Se estima que la UE experimenta pérdidas económicas anuales por valor de 2,1 millones de euros en rumiantes y que ascienden a 357 millones de euros solamente en el ganado ovino [294]. Debido a que España es el país que más cabezas de ganado aporta a la UE, los gastos derivados de las nematodosis son de suma importancia [12,19,21]. Por otra parte, el abuso de los fármacos AH ha resultado en la aparición de la RA, por lo que la comunidad científica se ha visto obligada a diseñar métodos alternativos de control más sostenibles y duraderos en el tiempo [68,131,149]. Se han evaluado diversas estrategias con el fin de ofrecer opciones alternativas a los fármacos AH. De todos ellos, uno de los más prometedores es la selección de razas o individuos capaces de resistir la infección, lo que reduciría la frecuencia y costes de los tratamientos veterinarios y retrasaría la evolución de la RA [61,74,193]. Bajo este contexto se enmarca la presente Tesis Doctoral, que se ha enfocado en explorar diferentes mecanismos mediante los cuales el ganado ovino es capaz de controlar la infección por NGI tanto en condiciones experimentales como naturales. Para ello, se ha estudiado la respuesta inmunitaria que presentan las ovejas adultas pertenecientes a la raza autóctona Churra, con fenotipo resistente y susceptible a la infección por *T. circumcincta*, así como en la posible influencia de la microbiota abomasal en el control de la infección.

Asimismo, se han evaluado los niveles de inmunoglobulina IgA como marcador de la infección por NGI en ovejas de diferente edad y raza bajo condiciones naturales de infección.

Los efectos clínicos observados en el hospedador están determinados por diversos factores que pueden estar relacionados con el ambiente, la especie de parásito y/o con el huésped. Para poder identificar estos factores, es esencial una mejor comprensión de la relación parásito-hospedador entre las ovejas y los NGI [168]. En el **Capítulo I** de la presente Tesis Doctoral se ha tratado de identificar los factores inmunitarios que determinan la resistencia o susceptibilidad a la infección en ovejas adultas de raza Churra infectadas experimentalmente por *T. circumcincta*. El desarrollo de la inmunidad completa es un proceso lento, complejo y variable que se alcanza tras el contacto repetido con los parásitos presentes en el pasto y que se manifiesta tanto con la reducción del número de larvas establecidas en el tejido, como con el número de larvas que evolucionan hasta su etapa adulta [322]. Por esta razón, los corderos tienden a presentar mayor susceptibilidad a la infección por NGI que los animales adultos, que son capaces de controlarla de manera más eficiente [91]. En el presente estudio se seleccionaron hembras adultas que habían permanecido bajo un sistema de manejo semiextensivo, y, por consiguiente, habían sido expuestas a la infección por NGI en repetidas ocasiones a lo largo de su vida productiva, de modo que su sistema inmune estaría completamente desarrollado. A pesar de que los mecanismos a través de los cuales algunos individuos controlan la infección de manera más eficiente que otros no están del todo claros, la resistencia a la infección por NGI se ha asociado con una respuesta humoral más intensa y temprana en comparación con los animales

susceptibles [323]. En ovejas Texel, una raza considerada resistente a la infección por *T. circumcincta*, la respuesta de la IgA medida en suero y en mucosa gástrica fue más intensa y temprana que en los animales de raza Suffolks, considerada susceptible [301]. El aumento de la IgA en suero también fue descrito por McRae *et al.*, [251], que observaron un aumento de la actividad de la IgA específica en corderos de raza Scottish Blackface con fenotipo resistente, pero no en el fenotipo susceptible tras una infección experimental con *T. circumcincta*. Estos mismos autores describieron que los genes implicados en la respuesta inflamatoria, principalmente genes relacionados con los linfocitos T, se expresaban alrededor del día 7 pi en el fenotipo resistente, mientras que en fenotipo susceptible la expresión se retrasaba hasta el día 14 pi. En nuestro estudio, se infectó a un grupo de ovejas adultas de raza Churra en dos ocasiones con el parásito *T. circumcincta*; a lo largo de la primera infección experimental se tomaron periódicamente muestras individuales de heces con el fin de clasificar a los animales en resistentes o susceptibles de acuerdo al número de HGH. Durante este periodo, también se tomaron muestras de sangre para medir los niveles de IgA frente al antígeno somático de L₄. Durante toda la primera infección, los animales con fenotipo resistente mostraron valores de IgA más elevados que el grupo con fenotipo susceptible, aunque con diferencias significativas tan solo el día 3 pi ($p < 0,05$). En condiciones experimentales, los niveles elevados de IgA se han asociado con variables parasitológicas más bajas, tales como el número de HGH, el tamaño de los parásitos, la fertilidad de las hembras o la expulsión de los vermes, especialmente en las razas clasificadas como resistentes [24,324]. Además, los valores de las IgA el día 3 después de la primera infección, correlacionaron negativamente con

el valor acumulado de los HGH en el grupo resistente pero no en el susceptible ($Rho = -0,870$; $p < 005$). Esto nos sugiere que la respuesta inmunitaria de los animales con fenotipo resistente es más temprana que la de los animales con fenotipo susceptible.

Los animales fueron desparasitados el día 30 tras la primer infección y 21 días después del tratamiento fueron de nuevo infectados experimentalmente con 70.000 L₃ de *T. circumcincta*. El día 7 después de la segunda infección, los animales fueron sacrificados de forma humanitaria y se tomaron muestras de suero sanguíneo y mucosa abomasal para medir los niveles de IgA frente a antígeno somático de L₄; también se tomaron muestras de tejido abomasal para evaluar las poblaciones de leucocitos globulares, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ y de eosinófilos, y se contó el número de larvas en estadio L₄ presentes en la mucosa. En este caso no se observaron diferencias significativas entre los dos fenotipos en el momento del sacrificio en cuanto al título de las IgA en mucosa gástrica, aunque se aproximaban a la significancia en suero sanguíneo ($p = 0,1$), siendo mayor el título de IgA en el grupo resistente que en el susceptible. Por otra parte, el grupo resistente también presentó mayores niveles en el número de leucocitos globulares, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$ aunque sin diferencias significativas. A los linfocitos T CD4⁺ se les ha atribuido un papel clave en la modulación de la respuesta inmunitaria contra los NGL, fundamentalmente debido a la evitación del establecimiento del parásito [325]. De hecho, los corderos de raza Gulf Coast Native resistentes a *H. contortus*, a los que se les había provocado una depleción de linfocitos T CD4⁺, mostraron eliminaciones de huevos en heces significativamente más elevadas que el grupo control, lo que demuestra el importante papel protector de esta población celular

[326]. Acorde a los estudios realizados por Balic *et al.* [327], los linfocitos T CD4⁺ están estrechamente relacionados con el reclutamiento de eosinófilos a partir del día 3 pi. Esta función también se ha descrito para los linfocitos T $\gamma\delta$ en infecciones experimentales con *H. contortus* y *T. colubriformis*, pero el mecanismo es más rápido y posiblemente ocurra en las primeras horas post infección (1 dpi) [193,328]. Nuestro análisis de correlaciones entre parámetros inmunitarios reveló una asociación positiva entre el número de linfocitos T $\gamma\delta$ y de eosinófilos presentes en la mucosa gástrica tan solo en las ovejas de fenotipo resistente (Rho= 0,900; $p = 0,04$); esta correlación también ha sido descrita en ovejas de raza Canaria de Pelo, consideradas resistentes a la infección, y en ovejas de raza Merina, ambas tras una infección experimental por *H. contortus* [193,249]. Los autores de este último trabajo sugirieron que los linfocitos T reclutaban eosinófilos tisulares a través de la producción local de IL-5, seguida de la destrucción de las larvas por eosinófilos a través de una respuesta mediada por anticuerpos [193]. Durante el sacrificio de las ovejas de nuestro estudio se tomaron muestras de nódulos linfáticos abomasales para realizar un análisis transcriptómico, y se determinó que el gen que codifica para la síntesis de IL-5 estaba sobreexpresado en el fenotipo resistente pero no en el susceptible, hecho que se relaciona con la observaciones fenotípicas de la presente Tesis [198]. Sin embargo, Henderson y Stear [98] propusieron que el mecanismo inmunológico que regula las infecciones provocadas por *T. circumcincta* podría ser diferente a otras especies de parásitos y sugirieron que elevados niveles de eosinófilos en las primeras etapas de la infección estaban relacionados con la susceptibilidad [98]. Esta hipótesis coincide con los datos obtenidos en el presente trabajo, en el que el grupo con fenotipo resistente

presentó menor número de eosinófilos (30 ± 24) que el grupo susceptible (40 ± 31) aunque no de forma significativa (datos no publicados). Asimismo, Henderson and Stear [29] señalaron que la variación en el tamaño de los vermes adultos de *T. circumcincta* se explica mejor cuando se analiza la cooperación eosinófilos-IgA, que estudiando cada rasgo de forma independiente. En cuanto al recuento de L4 reflejaron, se detectó una reducción del 68% en las ovejas de fenotipo resistente a la infección.

El presente estudio revela la existencia de patrones distintos en la respuesta inmunitaria entre diferentes individuos de raza Churra en infecciones experimentales con *T. circumcincta*. Por lo tanto, la identificación y cría podrían resultar útiles como estrategia para controlar la infección de manera más sostenible, apoyando a su vez la conservación de esta raza autóctona. Por otro lado, el papel que ejerce la IgA como mediador en la protección parcial contra las infecciones por helmintos todavía no se ha dilucidado completamente, principalmente cuando se trata de infecciones naturales. Sin embargo, su asociación con los parámetros inmunitarios ha llevado a proponer los niveles de IgA como un buen mecanismo de detección de la resistencia a la infección por NGI [86,323].

Por ello, durante el **Capítulo II** de la presente Tesis Doctoral se evaluó el nivel de IgA presente en diferentes muestras biológicas (suero sanguíneo, saliva y secreciones nasales) de ovejas de diferentes razas y edades que se encontraban bajo un sistema semiextensivo de pastoreo con el fin de determinar su relación con la carga parasitaria. En este estudio se compararon los niveles de infección con el título de IgA secretora en animales jóvenes, menores de un año de edad, y adultos, todos ellos pertenecientes a las razas Assaf, Castellana y Churra. La IgA

secretora es el principal componente humoral de la mucosa gastrointestinal y actúa como primera línea de defensa frente a posibles patógenos entrantes [329]. Es producida por los linfocitos B de la lámina propia y aunque la mayor parte se excreta al lumen intestinal, una pequeña proporción se extravasa y viaja a través de la sangre hasta llegar a los diferentes fluidos biológicos, como saliva, calostro, secreciones nasales o lágrimas, donde puede ser detectada. [267,268]. El desarrollo de métodos capaces de detectar la IgA secretora en estos fluidos ofrece una serie de ventajas en comparación con los métodos tradicionales, por ejemplo, se trata de procedimientos menos invasivos, más rápidos y que requieren una menor manipulación del animal, por lo que se reduce su estrés. Sin embargo, aunque la asociación entre los niveles de IgA y los parámetros parasitológicos se ha estudiado en profundidad en infecciones experimentales, en infecciones naturales no está completamente clara su asociación y los resultados son contradictorios [188].

La resistencia a la infección por NGI ha sido descrita en diferentes razas ovinas, aunque con variaciones fenotípicas [266]. Existen fuertes evidencias que sugieren que las razas de pelo presentan mayor resistencia a la infección que las razas de lana [74]. Esta segregación se ha comprobado mediante estudios que comparaban los niveles de infección en corderos de diferentes razas, como por ejemplo la raza Canaria de Pelo frente a la raza Canaria, la raza Santa Inés en comparación con la raza Suffolk, Blackbelly frente a Columbia o Pelibuey con Katahdin [177,179,330]. A pesar de que las diferencias entre razas de pelo y lana han sido ampliamente descritas, también se ha observado diferente grado de resistencia en cada raza [179]. Según los datos proporcionados por el

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en Castilla y León predominan las razas Assaf, Castellana y Churra, de las cuales no hay estudios sobre cómo controlan la infección, excepto de la raza Churra, sobre la que nuestro grupo de investigación ha realizado estudios para determinar diferencias en la resistencia a nivel individual [106,198,271]. En este segundo capítulo de la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado como marcador fenotípico de resistencia el número de HGH, y tras el análisis comparativo entre las tres razas, los datos revelaron que todas ellas presentaban el mismo patrón de eliminación de huevos en heces. Para ello se utilizó un modelo de intersección aleatoria multinivel que demostró que, a pesar de no haber diferencias significativas entre las razas en cuanto al número de HGH, había diferentes niveles de susceptibilidad entre ellas, siendo la raza Castellana la más susceptible a la infección por NGI. Además de la raza, es bien conocido que la edad juega un papel importante en el control de las infecciones por NGI [70]. Diversos estudios han demostrado que la protección inmunitaria de los corderos expuestos a una infección por *H. contortus* o *T. colubriformis*, no es igual que la respuesta que presentan los animales adultos [70]. Esto se debe a que el desarrollo de la inmunidad comienza a partir de los 2-3 meses de edad y finaliza a los 12 meses tras la exposición regular a los parásitos, permitiendo que la respuesta inmunitaria desarrolle la capacidad protectora y que los individuos adultos se mantengan relativamente resistentes a la infección [69,331]. Además, se ha sugerido que los corderos que presentan mayor resistencia a la infección mantienen esta condición en su edad adulta [322]. El modelo estadístico de intersección aleatoria multinivel demostró que había diferencias significativas entre los animales jóvenes y adultos en estas tres razas, ya

que los animales jóvenes presentaban mayores cargas parasitarias, aunque no de igual manera; la raza Assaf y Churra presentaban menores cargas parasitarias que la raza Castellana, que a su vez no presentó diferencias significativas en la eliminación de huevos entre animales jóvenes y adultos.

En condiciones naturales, los animales están expuestos a infecciones mixtas, es decir, pueden estar infectados por diferentes especies de NGI [18,28]. Por esta razón, la elección de un antígeno que presente reactividad cruzada entre diferentes especies de NGI podría ser una ventaja en condiciones naturales de infección. Uno de los antígenos utilizados con más frecuencia para medir el título de IgA en infecciones por NGI, ha sido el antígeno somático de L₄. Sin embargo, la producción de este antígeno es costoso, complejo y conlleva el sacrificio de varios animales infectados experimentalmente para la obtención de las L₄ [105,264]. Por esa razón, se ha extendido el uso del antígeno somático de L₃ ya que se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre las respuesta de IgA plasmática medidas frente al antígeno somático de L₄ y el antígeno somático de L₃ [189,246]. Además, el antígeno somático de L₃ es más sencillo de producir y para ello no es necesario el sacrificio del hospedador [190]. A su vez, el extracto somático es rico en una gran variedad de componentes antigénicos, como la PDI. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se aisló y produjo un fragmento recombinante de 203 aminoácidos de la PDI de *T. circumcincta* con capacidad antigénica, presente en los estadios L₃, L₄ y adulto. Además, presentó reacciones cruzada con antígenos de *T. colubriformis*. En estos trabajos previos, se utilizó tanto la proteína recombinante PDI-Tc como el antígeno somático de L₄ para medir los niveles de IgA en

suero, secreciones nasales y saliva en ovejas adultas de raza Churra con fenotipo resistente o susceptible a la infección. Se detectaron diferencias significativas entre grupos, siendo mayores al utilizar la proteína PDI-Tc [271,274]. En esta Tesis Doctoral, se usó el antígeno somático de L₃ y el mismo fragmento recombinante de 203 aminoácidos de la proteína PDI-Tc para medir los niveles de IgA en el mismo tipo de muestras, pero en animales infectados bajo condiciones naturales. La finalidad de este estudio fue asociar los niveles de la IgA específica con la carga parasitaria medida como HGH en animales en jóvenes y adultos. A diferencia de lo esperado, todas las asociaciones significativas entre los HGH y los niveles de IgA fueron positivas, al contrario de lo que se ha descrito en condiciones experimentales de infección [106,332]. Además, las asociaciones más fuertes se obtuvieron en secreciones nasales de animales jóvenes para ambos antígenos. Es por ello que, proponemos los niveles de IgA secretora medidos en las secreciones nasales como posible indicador de infecciones por NGI bajo condiciones naturales.

La comprensión de las interacciones **parásito-hospedador** son clave para la identificación de los potenciales puntos de desarrollo de técnicas novedosas y sostenibles para el control de las infecciones por NGI. Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio del helminto y del sistema inmune del hospedador para tratar de comprender las complejas relaciones que se dan entre ellos [72,105,181,195,249]. Sin embargo, en las últimas décadas, ha aumentado la evidencia de un tercer miembro en la ecuación, **la microbiota gastrointestinal**, añadiendo mayor complejidad a la intrincada red de interacciones **parásito-hospedador-microbiota** [218,239,333]. A lo largo de millones de años, los helmintos gastrointestinales han compartido su

hábitat con comunidades microbianas, estableciendo estrechas relaciones con el hospedador, incluso desempeñando un papel activo en varios procesos biológicos clave como el procesamiento de nutrientes y el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa. Los últimos estudios evidencian el posible papel de la microbiota gastrointestinal en la regulación del sistema inmune del huésped e incluso que su composición puede evitar o favorecer el establecimiento del parásito [221,334]. Es por ello, que en el **Capítulo III** se ha estudiado la diversidad y composición de la microbiota gastrointestinal de ovejas de raza Churra clasificadas según su fenotipo en resistentes o susceptibles a la infección por *T. circumcincta*. Este estudio se llevó a cabo con los animales incluidos en el Capítulo I y cuyas muestras se tomaron tras el sacrificio el día 7 pi, tras una segunda infección experimental con *T. circumcincta*.

Los índices de α -diversidad y β -diversidad usados para evaluar la riqueza y las disimilitudes entre el grupo con fenotipo resistente y el grupo con fenotipo susceptible revelaron la ausencia de diferencias significativas en nuestro trabajo. Aunque no hay demasiada información publicada sobre los posibles cambios en la microbiota gastrointestinal de rumiantes tras una infección por NGI, los datos disponibles describen la ausencia de cambios en la diversidad microbiana post-infección. Por ejemplo, Li *et al.*, [62] y Xiang *et al.*, [335] describieron la ausencia de cambios en la diversidad abomasal entre un grupo infectado y otro grupo control en un estudio realizado en cabras Alpinas y corderos Ujimqiun, tras una infección experimental con *H. contortus*. La composición de la microbiota de ovejas infectadas por *T. circumcincta* no ha sido ampliamente estudiada, aunque Cortés *et al.*, [218] tampoco detectó cambios en la diversidad microbiana tras la infección de corderos Texel

con este parásito. Sin embargo, a pesar de la falta de cambios en la diversidad, si se han detectado alteraciones en la abundancia de varios taxones, en particular en el género *Prevotella*, que se ve aumentado durante las infecciones por NGI en cabras y ovejas [62,218]. A diferencia de estos trabajos, en la presente Tesis Doctoral no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de este género, probablemente porque ambos grupos fueron infectados con el mismo número de larvas. En otro estudio, se encontró una reducción de la abundancia del género *Butyrivibrio*, productor de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en animales infectados por NGI o en animales susceptibles a la infección por NGI [336,337]. Los AGCC son metabolitos conocidos por tener potentes propiedades antiinflamatorias, por lo que una reducción de la abundancia de estos compuestos puede agravar la inflamación de la mucosa, aunque esta hipótesis aún no se ha demostrado [336,337]. Si bien, nosotros no hemos detectado diferencias significativas en la abundancia de este género, sí hemos detectado diferencias significativas en la abundancia otras bacterias productoras de butirato, como *Clostridium sensu-stricto-1*, que era más abundante en el grupo resistente que en el susceptible. Aunque no se han encontrado muchos datos al respecto, se sabe que las bacterias de la clase Clostridia contribuyen al mantenimiento de la homeostasis gastrointestinal a través de la producción de AGCC [338]. Además, en nuestro estudio, se detectó una correlación negativa entre el número de HGH y la abundancia de *C. sensu-stricto-1*, es decir a mayor abundancia de este microorganismo, menor es el la carga parasitaria, lo que parece apoyar su papel en el control de la infección a nivel del abomaso. También se detectaron

diferencias cercanas a la significancia ($p= 0.07$) en el género *Turicibacter*, productor de AGCC, siendo mayor su presencia en el grupo resistente.

El uso de compuestos de origen microbiano con actividad nematocida ha sido foco de estudio en los últimos años. Gu *et al.* [314] han demostrado que las bacterias del género *Serratia*, concretamente *Serratia marcescens*, son productoras de compuestos volátiles con una actividad nematocida de hasta el 100% en ensayos *in vitro* frente a adultos del nematodo *Bursaphelenchus xylophilus*. Más recientemente, Méndez-Santiago *et al.*, [315] identificaron y testaron enzimas quitinasas producidas por *Serratia* spp., que provocaban una mortalidad del 100% en L₃ de *H. contortus*, posiblemente debido a que tanto las larvas como los huevos de los nematodos están recubiertos por una película protectora compuesta principalmente por quitina [316]. En la presente Tesis Doctoral, se demostró una mayor abundancia relativa del género *Serratia* en la mucosa gástrica del grupo resistente que del susceptible ($p 0,07$). Estos datos respaldan nuestra hipótesis de que *Serratia* podría participar en el control de la infección por NGI a través de la producción de compuestos nematocidas, aunque sería necesario más estudios para confirmar esta hipótesis.

En resumen, un mejor conocimiento de las relaciones parásito-hospedador-microbiota es fundamental, ya que estas interacciones podrían ser clave para el desarrollo de nuevos métodos de control más sostenibles, a través de la selección de animales o razas que presenten mayor resistencia a la infección. La posibilidad de manipular las estas relaciones en beneficio del hospedador, por ejemplo modulando la composición de la microbiota gastrointestinal a través del uso de probióticos, podría ser beneficiosa para fortalecer la respuesta

inmunitaria o establecer un entorno hostil para los parásitos [236]. Los suplementos dietéticos que promueven el crecimiento microbiano, conocidos como prebióticos, también han demostrado tener efectos significativos en las infecciones por helmintos [339]. La administración de prebióticos con propiedades antihelmínticas es una opción plausible para mejorar la resiliencia del huésped o incluso la resistencia a la infección. Dada que la resistencia antihelmíntica es una importante amenaza global, la manipulación de la dieta, combinada con prácticas de manejo o incluso con un control químico más responsable, podrían representar nuevas líneas alternativas de control de la infección por NGI [236].

Conclusions

The conclusions obtained in the chapters carried out during the Doctoral Thesis are presented below:

1. “Differences within Churra breed sheep in the early immune response to the infection by *Teladorsagia circumcincta*”.

Resistant phenotype Churra sheep experimental infected by *T. circumcincta* are characterized by higher levels of IgA in serum than susceptible phenotype after an experimental infection. Besides IgA levels are negatively correlated with cumulative faecal egg count only in the resistant group at the early onset of infection.

The cell population of the immune response against gastrointestinal nematodes, globule leukocytes, $\gamma\delta$ T cells, and CD4⁺ T cells, showed a higher count in the resistant group than in the susceptible group, but without significant differences. Besides, a positive correlation was found between $\gamma\delta$ T cells and eosinophils only in the resistant group. These results support the hypothesis that these cell populations have an important role in the immune control of the infection.

The multivariable regression linear model highlights the role of IgA in gastric mucosa and $\gamma\delta$ T cells in the L₄ burden variation.

2. “Secretory IgA as biomarker for gastrointestinal nematodes natural infection in different breed sheep”.

Specific IgA against gastrointestinal nematodes was positively associated with faecal egg count in naturally infected sheep, with the nasal secretions from young animals providing the samples where this association was stronger, which could therefore be used as markers of infection.

The predictive model explained that variation in the risk of infection is not influenced by any of the breeds included in this study—Assaf, Castellana, and Churra. However, as expected, the model showed that age was a key factor and young animals have a greater risk of infection than adult ewes, except for the Castellana breed, where all animals showed the same risk regardless of age.

3. “Microbial Community in Resistant and Susceptible Churra Sheep Infected by *Teladorsagia circumcincta*”.

Experimental infection with *T. circumcincta* in adult Churra sheep with resistant and susceptible phenotypes did not cause differences in richness and diversity in the microbiota of gastric content and gastric mucosa.

The resistant or susceptible phenotype to *T. circumcincta* infection could influence the microbiome composition, modifying the interaction with the host and in the last instance affecting the individual risk of infection.

In the resistant phenotype a higher abundance of genera such as *Clostridium sensu stricto-1* and *Turicibacter* spp, which are short-chain fatty acids producers, and *Serratia* spp, a nematicidal compound producer, were described as possible components of infections control.

Bibliografía

1. Zeder, M.A. Domestication and Early Agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, Diffusion, and Impact. *PNAS*. **2008**, *105*, 11597–11604, doi:10.1073/pnas.0801317105.
2. Hancock, J.F. *World Agriculture Before and After 1492*; Springer nature: Gewerbestrasse, 2022; ISBN 9783031155222.
3. Baales, M. *Der Mensch Und Seine. Haustiere Die Geschichte Einer Jahrtausendealten Beziehung*, 1994. vol 20 (1). 147-149.
4. Cooper, E.J. Warmer Shorter Winters Disrupt Arctic Terrestrial Ecosystems. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. **2014**, *45*, 271–295, doi:10.1146/annurev-ecolsys-120213-091620.
5. Hartung, J. A short history of livestock production. En *Livestock housing: Modern management to ensure optimal health and welfare of farm animals. Wageningen Academic Publisher*. **2013**, 81-146.
6. Hammer, H.F.H. Zur Geschichte Und Kultur Der Schweinezucht Und -haltung 5. Mitt.: Die Nutzung von Schweinen Durch Die Menschen. **2009**, 190–206.
7. Vázquez, A.P.; Trinidad, D.A.L.; Merino, F.C.G. Desafíos y Propuestas Para Lograr La Seguridad Alimentaria Hacia El Año 2050. *REMEXCA*. **2018**, *9*, 175–189.
8. El estado y la agricultura mundial de la alimentación. *FAO*; **2009**; ISBN 978-92-5-306215-7.
9. Lorente Saiz, A. Ganadería y Cambio Climático: Una Influencia Recíproca. *GGeoGraphos*. **2010**, *1*, 1–22, doi:10.14198/geogra2010.1.03.
10. Adesogan, A.T.; Havelaar, A.H.; McKune, S.L.; Eilittä, M.; Dahl, G.E. Animal Source Foods: Sustainability Problem or Malnutrition and Sustainability Solution? Perspective Matters. *gFSC*. **2020**, *25*, 100325, doi:10.1016/j.gfs.2019.100325.
11. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe Sectorial. Ovino y Caprino. 2020.
12. MAPA. Caracterización Del Sector Ovino y Caprino En España. *MAGRAMA* **2021**, 1–25.
13. MAPA. Caracterización Del Sector Ovino y Caprino de Carne En España. *MAGRAMA* **2021**.
14. MAPA. Resultados de las encuestas de ganado ovino y caprino. *MAGRAMA* **2022**.
15. MAPA. Efectivos ganaderos. *MAGRAMA*. **2021**, 1–2.
16. Castel, J.M.; Mena, Y.; Delgado-Pertíñez, M.; Camúñez, J.; Basulto, J.; Caravaca, F.; Guzmán-Guerrero, J.L.; Alcalde, M.J. Characterization of Semi-Extensive Goat Production Systems in Southern Spain. *Small Rumin. Res*. **2003**, *47*, 133–143, doi:10.1016/S0921-4488(02)00250-X.
17. Tobergte, D.R.; Curtis, S. Sistemas de Produccion Animal. *J. Chem. Inf*. **2013**, *53*, 1689–1699.

18. Habela, M.; Sevilla, R.G.; Corchero, E.; Fruto, J.M.; Peña, J. Nematodos Gastrointestinales En Ovino. *Mundo Ganadero* **2002**, 1–6.
19. Domke, A.V.M.; Chartier, C.; Gjerde, B.; Leine, N.; Vatn, S.; Stuen, S. Prevalence of Gastrointestinal Helminths, Lungworms and Liver Fluke in Sheep and Goats in Norway. *Vet. Parasitol.* **2013**, *194*, 40–48, doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.023.
20. Kyriánová, I.A.; Vadlejch, J.; Kopecký, O.; Langrová, I. Seasonal Dynamics of Endoparasitic Infections at an Organic Goat Farm and the Impact of Detected Infections on Milk Production. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 3211–3219, doi:10.1007/s00436-017-5643-3.
21. Martínez-Valladares, M.; Robles-Pérez, D.; Martínez-Pérez, J.M.; Cordero-Pérez, C.; Famularo, M.D.R.; Fernández-Pato, N.; González-Lanza, C.; Castañón-Ordóñez, L.; Rojo-Vázquez, F.A. Prevalence of Gastrointestinal Nematodes and *Fasciola hepatica* in Sheep in the Northwest of Spain: Relation to Climatic Conditions and/or Man-Made Environmental Modifications. *Parasites Vectors.* **2013**, *6*, 1–9, doi:10.1186/1756-3305-6-282.
22. Balic, A.; Bowles, V.M.; Meeusen, E.N.T. The Immunobiology of Gastrointestinal Nematode Infections in Ruminants. *Adv. Parasitol.* **2000**, *45*, 181–241, doi:10.1016/s0065-308x(00)45005-0.
23. Zajac, A.M.; Garza, J. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet. Clin. N. Am. - Food Anim. Pract.* **2020**, *36* (1), 73–87, doi:10.1016/j.cvfa.2019.12.005.
24. Ramos, A.C.S.; Oliveira, L.M.; Santos, Y.L.D.C.O.; Dantas, M.C.S.; Walker, C.I.B.; Faria, A.M.C.; Bueno, L.L.; Dolabella, S.S.; Fujiwara, R.T. The Role of IgA in Gastrointestinal Helminthiasis: A Systematic Review. *Immunol. Lett.* **2022**, *249*, 12–22, doi:10.1016/j.imlet.2022.08.003.
25. Martínez-Valladares, M.; Valderas-García, E.; Gandasegui, J.; Skuce, P.; Morrison, A.; Castilla Gómez De Agüero, V.; Cambra-Pellejà, M.; Balaña-Fouce, R.; Rojo-Vázquez, F.A. *Teladorsagia circumcincta* Beta Tubulin: The Presence of the E198L Polymorphism on Its Own Is Associated with Benzimidazole Resistance. *Parasites Vectors.* **2020**, *13*, 1–12, doi:10.1186/s13071-020-04320-x.
26. Bulbul, K.; Akand, A.; Hussain, J.; Parbin, S.; Hasin, D. A Brief Understanding of *Trichuris ovis* in Ruminants. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* **2020**, *5*, 72–74.
27. Morgan, E.R.; Van Dijk, J. Climate and the Epidemiology of Gastrointestinal Nematode Infections of Sheep in Europe. *Vet. Parasitol.* **2012**, *189*, 8–14, doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.028.
28. Bishop, S.C.; Stear, M.J. Inheritance of Faecal Egg Counts during Early Lactation in Scottish Blackface Ewes Facing Mixed, Natural Nematode Infections. *Anim. Sci.* **2001**, *73*, 389–395, doi:10.1017/S1357729800058355.
29. Suárez, V.H.; Olaechea, F. V.; Rossanigo, C.E.; Romero, J.R. Ovinos y Otros Rumiantes Menores Enfermedades Parasitarias de Los En El Cono Sur de América. *Publicacion técnica.* 2007; Vol. 70;.
30. Hoberg, E.P.; Abrams, A.; Piliitt, P.A. Synlophe Structure for Species of

Longistrongylus (Nematoda: Trichostrongyloidea), Abomasal Parasites among Ungulates from Sub-Saharan Africa, with Comparisons to the Global Ostertagiine Fauna. *J. Parasitol.* **2009**, *95*, 1468–1478, doi:10.1645/GE-2102.1.

31. Fabiana B. Drago *Macroparásitos: Diversidad y Biología*; Libros de Catedra, Ed.; 2017; ISBN 978-950-34-1521-4.
32. Jelinski, M.; Lanigan, E.; Gilleard, J.; Waldner, C.; Royan, G. Survey of Gastrointestinal Nematode Parasites in Saskatchewan Beef Herds. *Can. Vet. J.* **2016**, *57*, 160–163.
33. Brown, S.; Simcock, D.C.; Neale, J.D.; Simpson, H. V The Thermotolerance of Some Parasitic Nematodes of Sheep and the Role of the Sheath. *Veterinary Parasitol.* **2010**, *24*, 17–24.
34. Vongnady, K.; Rucksaken, R.; Mangkit, B. Morphological Identification of Adult Male *Haemonchus* Species in Goats from Thailand and Lao PDR. *Trop. Biomed.* **2020**, *37*, 691–712, doi:10.47665/tb.37.3.691.
35. Keyhan, A.; Sharifdini, M.; Heidari, Z.; Rahmati, B.; Kia, E.B. Zoonotic Transmission of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus* Species in Guilan Province, Northern Iran: Molecular and Morphological Characterizations. *BMC J. Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1–9, doi:10.1186/s12879-020-4762-0.
36. Hansen, J.; Perry, B. *The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants*; 2nd ed.; International Laboratory for Research on Animal Diseases: Kenya, 1994; ISBN 92-9055-703-1.
37. Quiroz Romero, H.; Figueroa Castillo, J.A.; Ibarra Velarde, F.; López-arellano, M.E. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*; Mexico, 2014; ISBN 9786070040153.
38. Thomas, B.Y.R.J. A Comparative Study of the Life Histories of *Nematodirus battus* and *Nematodirus filicollis*, Nematode Parasites of Sheep. *Parasitol.* **1957**, *49*, 374–386, doi:10.1017/S0031182000026925.
39. Van Dijk, J.; Morgan, E.R. Hatching Behaviour of *Nematodirus filicollis* in a Flock Co-Infected with *Nematodirus battus*. *Parasitol.* **2009**, *136*, 805–811, doi:10.1017/S003118200900609X.
40. Alomar, D.; Ruiz, P.; Balocchi, O.; Valenzuela, G.; Goic, D. Finishing Lambs on a Chicory-Plantain Mixture or a Temperate Grass-Based Pasture: Live Weight Gain and Gastrointestinal Parasitism. *Cienc. Investig. Agrar.* **2018**, *45*, 11–20, doi:10.7764/rcia.v45i1.1874.
41. Besier, R.B.; Kahn, L.P.; Sargison, N.D.; Wyk, J.A. Van The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv. Parasitol.* **2016**, *93* 95-143. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.022
42. O'Connor, L.J.; Walkden-Brown, S.W.; Kahn, L.P. Ecology of the Free-Living Stages of Major Trichostrongylid Parasites of Sheep. *Vet. Parasitol.* **2006**, *142*, 1–15, doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.035.
43. Dijk, J. van; Louw, M.D.E. d.; Kalis, L.P.A.; Morgan, E.R. Ultraviolet Light Increases Mortality of Nematode Larvae and Can Explain Patterns of Larval

- Availability at Pasture. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1151–1156, doi:10.1016/j.ijpara.2009.03.004.
44. Jasmer, D.P.; Wescott, R.B.; Crane, J.W. Survival of Third-Stage Larvae of Washington Isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* Exposed to Cold Temperatures. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **1986**, *53*, 244–247.
 45. Andersen, G.R.B. and F.L. Effect of Irrigation on Survival of Third-Stage *Haemonchus contortus* Larvae (Nematoda: Trichostrongylidae). *Great Basin nat.* **1978**, *38*, 369–378.
 46. O'Connor, L.J.; Kahn, L.P.; Walkden-Brown, S.W. Interaction between the Effects of Evaporation Rate and Amount of Simulated Rainfall on Development of the Free-Living Stages of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **2008**, *155*, 223–234, doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.010.
 47. Van Dijk, J.; Morgan, E.R. The Influence of Water on the Migration of Infective Trichostrongyloid Larvae onto Grass. *Parasitol.* **2011**, *138*, 780–788, doi:10.1017/S0031182011000308.
 48. Van Dijk, J.; David, G.P.; Baird, G.; Morgan, E.R. Back to the Future: Developing Hypotheses on the Effects of Climate Change on Ovine Parasitic Gastroenteritis from Historical Data. *Vet. Parasitol.* **2008**, *158*, 73–84, doi:10.1016/j.vetpar.2008.08.006.
 49. Van Dijk, J.; Sargison, N.D.; Kenyon, F.; Skuce, P.J. Climate Change and Infectious Disease: Helminthological Challenges to Farmed Ruminants in Temperate Regions. *Anim.* **2010**, *4*, 377–392, doi:10.1017/S1751731109990991.
 50. Rose, H.; Caminade, C.; Bolajoko, M.B.; Phelan, P.; van Dijk, J.; Baylis, M.; Williams, D.; Morgan, E.R. Climate-Driven Changes to the Spatio-Temporal Distribution of the Parasitic Nematode, *Haemonchus contortus*, in Sheep in Europe. *Glob. Chang. Biol.* **2016**, *22*, 1271–1285, doi:10.1111/gcb.13132.
 51. Bautista-Garfias, C.R.; Castañeda-Ramírez, G.S.; Estrada-Reyes, Z.M.; Soares, F.E. de F.; Ventura-Cordero, J.; González-Pech, P.G.; Morgan, E.R.; Soria-Ruiz, J.; López-Guillén, G.; Aguilar-Marcelino, L. A Review of the Impact of Climate Change on the Epidemiology of Gastrointestinal Nematode Infections in Small Ruminants and Wildlife in Tropical Conditions. *Pathogens.* **2022**, *11*, 148, doi:10.3390/pathogens11020148.
 52. Márquez Lara, D. Control Sostenible de Los Nematodos Gastrointestinales En Rumiantes; 2014; ISBN 9789587401912.
 53. Cunha, D.H. Hipobiosis En Nematodos Gastrointestinales de Rumiantes Con Especial Referencia a *Haemonchus contortus* y *Ostertagia Ostertagi*, Universidad de Montevideo. Uruguay. 2018.
 54. Al-Shaibani, I.R.M.; Phulan, M.S.; Arioand, A.; Qureshi, T.A. Contamination of Infective Larvae of Gastrointestinal Nematodes of Sheep on Communal Pasture. *Int. J. Agric. Biol.* **2008**, *10*, 653–657.
 55. McNeilly, T.N.; Devaney, E.; Matthews, J.B. *Teladorsagia circumcincta* in the Sheep Abomasum: Defining the Role of Dendritic Cells in T Cell Regulation and

- Protective Immunity. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 347–356, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01110.x.
56. Dicker, A.J.; Nisbet, A.J.; Skuce, P.J. Gene Expression Changes in a P-Glycoprotein (Tci-Pgp-9) Putatively Associated with Ivermectin Resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 935–942, doi:10.1016/j.ijpara.2011.03.015.
 57. Escribano, C.; Saravia, A.; Costa, M.; Castells, D.; Ciappesoni, G.; Riet-Correa, F.; Freire, T. Resistance to *Haemonchus contortus* in Corriedale Sheep Is Associated to High Parasite-Specific IgA Titer and a Systemic Th2 Immune Response. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41598-019-55447-6.
 58. Farshid, A.A.; Naem, S.; Alipour, R.B. Pathological Changes of Abomasum in Naturally Infected Makoyee Sheep with *Teladorsagia circumcincta*. *Pak. J. Biol. Sci.* **2006**, *9*, 2145–2148.
 59. Khodakaram-Tafti, A.; Hajimohammadi, A.; Amiri, F. Prevalence and Pathology of Abomasal Abnormalities in Sheep in Southern Iran. *Bulg. J. Vet. Med.* **2015**, *18*, 270–276, doi:10.15547/bjvm.802.
 60. Bishop, S.C.; Stear, M.J. The Use of a Gamma-Type Function to Assess the Relationship between the Number of Adult *Teladorsagia circumcincta* and Total Egg Output. *Parasitol.* **2000**, *121*, 435–440, doi:10.1017/S0031182099006526.
 61. Stear, M.J.; Bishop, S.C.; Henderson, N.G.; Scott, I. A Key Mechanism of Pathogenesis in Sheep Infected with the Nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Anim. Health Res. Rev.* **2003**, *4*, 45–52, doi:10.1079/ahrr200351.
 62. Li, R.W.; Li, W.; Sun, J.; Yu, P.; Baldwin, R.L.; Urban, J.F. The Effect of Helminth Infection on the Microbial Composition and Structure of the Caprine Abomasal Microbiome. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10, doi:10.1038/srep20606.
 63. Sykes, A.R.; Coop, R.L. Interaction between Nutrition and Gastrointestinal Parasitism in Sheep. *NZVJ.* **2001**, *49*, 222–226, doi:10.1080/00480169.2001.36236.
 64. Moreau, E.; Chauvin, A. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. *J. Biotechnol. Biomed.* **2010**, doi:10.1155/2010/428593.
 65. Tizard. *Introducción a La Inmunología Veterinaria*; 8ª edición.; 2009; ISBN 9781416049890.
 66. Saddiqi, H.A.; Jabbar, A.; Sarwar, M.; Iqbal, Z.; Muhammad, G.; Nisa, M.; Shahzad, A. Small Ruminant Resistance against Gastrointestinal Nematodes: A Case of *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 1483–1500, doi:10.1007/s00436-011-2576-0.
 67. Hayward, A.D. Causes and Consequences of Intra- and Inter-Host Heterogeneity in Defence against Nematodes. *Parasite Immunol.* **2013**, *35*, 362–373, doi:10.1111/pim.12054.
 68. Mcrae, K.M.; Stear, M.J.; Good, B.; Keane, O.M. The Host Immune Response to Gastrointestinal Nematode Infection in Sheep. *Parasite Immunol.* **2015**, *37*, 605–613, doi:10.1111/pim.12290.

69. Bishop, S.C.; Bairden, K.; McKellar, Q.A.; Park, M.; Stear, M.J. Genetic Parameters for Faecal Egg Count Following Mixed, Natural, Predominantly *Ostertagia circumcincta* Infection and Relationships with Live Weight in Young Lambs. *Anim. Sci.* **1996**, *63*, 423–428, doi:10.1017/S1357729800015319.
70. Smith, W.; Jackson, F.; Jackson, E.; Williams, J. Age Immunity to *Ostertagia circumcincta*: Comparison of the Local Immune Response of L₄ and 10 Months Old Lambs. *J. Comp. Pathol.* **1985**, *9*, 235–245.
71. Seaton, D.S.; Jackson, F.; Smith, W.D.; Angus, K.W. Development of Immunity to Incoming Radiolabelled Larvae in Lambs Continuously Infected with *Ostertagia circumcincta*. *Res. Vet. Sci.* **1989**, *46*, 241–246, doi:10.1016/s0034-5288(18)31152-4.
72. Stear, M.J.; Strain, S.; Bishop, S.C. Mechanisms Underlying Resistance to Nematode Infection. *Int. J. Parasitol. I.* **1999**, *29*, 51–56, doi:10.1016/S0020-7519(98)00179-9.
73. Gutiérrez-Gil, B.; Pérez, J.; Álvarez, L.; Martínez-Valladares, M.; De La Fuente, L.F.; Bayán, Y.; Meana, A.; Primitivo, F.S.; Rojo-Vázquez, F.A.; Arranz, J.J. Quantitative Trait Loci for Resistance to Trichostrongylid Infection in Spanish Churra Sheep. *Genet. Sel. Evol.* **2009**, *41*, 1–10, doi:10.1186/1297-9686-41-46.
74. Bishop, S.C. Possibilities to Breed for Resistance to Nematode Parasite Infections in Small Ruminants in Tropical Production Systems. *Animal.* **2012**, *6*, 741–747, doi:10.1017/S1751731111000681.
75. Dawkins, H.J.S.; Windon, R.G.; Eagleson, G.K. Eosinophil Responses in Sheep Selected for High and Low Responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* **1989**, *19*, 199–205, doi:10.1016/0020-7519(89)90008-8.
76. Balic, A.; Cunningham, C.P.; Meeusen, E.N.T. Eosinophil Interactions with *Haemonchus contortus* Larvae in the Ovine Gastrointestinal Tract. *Parasite Immunol.* **2006**, *28*, 107–115, doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00816.x.
77. Kemp, J.M.; Robinson, N.A.; Meeusen, E.N.T.; Piedrafita, D.M. The Relationship between the Rapid Rejection of *Haemonchus contortus* Larvae with Cells and Mediators in Abomasal Tissues in Immune Sheep. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1589–1594, doi:10.1016/j.ijpara.2009.05.015.
78. Wildblood, L.A.; Kerr, K.; Clark, D.A.S.; Cameron, A.; Turner, D.G.; Jones, D.G. Production of Eosinophil Chemoattractant Activity by Ovine Gastrointestinal Nematodes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2005**, *107*, 57–65, doi:10.1016/j.vetimm.2005.03.010.
79. Urb, M.; Sheppard, D.C. The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, 2–4, doi:10.1371/journal.ppat.1002619.
80. Nisbet, A.J.; Meeusen, E.N.; González, J.F.; Piedrafita, D.M. Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Adv. Parasitol.* **2016**, *93*, 353–396, doi:10.1016/bs.apar.2016.02.011.
81. Bautista-Garfias, C.R. Importance of $\Gamma\delta$ T Lymphocytes in the Bovine Immune Response. *Vet. Mex.* **2011**, *42*, 65–75.
82. Mackay, C.R.; Beya, M. -F; Matzinger, P. γ/δ T Cells Express a Unique Surface

- Molecule Appearing Late during Thymic Development. *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 1477–1483, doi:10.1002/eji.1830190820.
83. Rogers, A.N.; VanBuren, D.G.; Hedblom, E.E.; Tilahun, M.E.; Telfer, J.C.; Baldwin, C.L. $\Gamma\delta$ T Cell Function Varies with the Expressed WC1 Coreceptor. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3386–3393, doi:10.4049/jimmunol.174.6.3386.
 84. Modlin, R.L.; Sieling, P.A. Now Presenting: $\Gamma\delta$ T Cells. *Sci.* **2005**, *309*, 252–253, doi:10.1126/science.1115264.
 85. Baldwin, C.L.; Damani-Yokota, P.; Yirsaw, A.; Loonie, K.; Teixeira, A.F.; Gillespie, A. Special Features of $\gamma\delta$ T Cells in Ruminants. *Mol. Immunol.* **2021**, *134*, 161–169, doi:10.1016/j.molimm.2021.02.028.
 86. Aboshady, H.M.; Stear, M.J.; J, A.; J, E.; Bambou, J.C. Immunoglobulins as Biomarkers for Gastrointestinal Nematodes Resistance in Small Ruminants : A Systematic Review. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41598-020-64775-x.
 87. Kandil, O.M.; Hendawy, S.H.M.; El Namaky, A.H.; Gabrashanska, M.P.; Nanev, V.N. Evaluation of Different *Haemonchus contortus* Antigens for Diagnosis of Sheep Haemonchosis by ELISA and Their Cross Reactivity with Other Helminthes. *J Parasit Dis.* **2017**, *41*, 678–683, doi:10.1007/s12639-016-0865-3.
 88. Mantis, N.J.; Rol, N.; Corthésy, B. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 603–611, doi:10.1038/mi.2011.41.
 89. Deplancke, B.; Gaskins, H.R. Microbial Modulation of Innate Defense: Goblet Cells and the Intestinal Mucus Layer. *A.J.C.N.* **2001**, *73*, 1131–1141, doi:10.1093/ajcn/73.6.1131s.
 90. Young, A.R.; Barcham, G.J.; Kemp, J.M.; Dunphy, J.L.; Nash, A.; Meeusen, E.N. Functional Characterization of an Eosinophil-Specific Galectin, Ovine Galectin-14. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 423–432, doi:10.1007/s10719-008-9190-0.
 91. Robinson, N.; Pleasance, J.; Piedrafita, D.; Meeusen, E.N. The Kinetics of Local Cytokine and Galectin Expression after Challenge Infection with the Gastrointestinal Nematode, *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 487–493, doi:10.1016/j.ijpara.2010.11.006.
 92. Hendawy, S.H.M. Immunity to Gastrointestinal Nematodes in Ruminants: Effector Cell Mechanisms and Cytokines. *J Parasit Dis.* **2018**, *42*, 471–482, doi:10.1007/s12639-018-1023-x.
 93. Donskow-Łysoniewska, K.; Maruszewska-Cheruiyot, M.; Stear, M. The Interaction of Host and Nematode Galectins Influences the Outcome of Gastrointestinal Nematode Infections. *Parasitol.* **2021**, *148*, 648–654, doi:10.1017/S003118202100007X.
 94. Preston, S.; Dunphy, J.; Beddoe, T.; Meeusen, E.; Young, A. Evaluation of the Role of Galectins in Parasite Immunity. *Methods mol. biol.* **2014**, *1207*, 371–395, doi:10.1007/978-1-4939-1396-1_25.
 95. Stear, M.; Preston, S.; Piedrafita, D.; Donskow-Łysoniewska, K. The Immune Response to Nematode Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1–18,

doi:10.3390/ijms24032283.

96. Silva, S.R.; Sacarrão-Birrento, L.; Almeida, M.; Ribeiro, D.M.; Guedes, C.; Montaña, J.R.G.; Pereira, A.F.; Zaralis, K.; Geraldo, A.; Tzamaloukas, O.; et al. Extensive Sheep and Goat Production: The Role of Novel Technologies towards Sustainability and Animal Welfare. *Anim.* **2022**, *12*, 1–28, doi:10.3390/ani12070885.
97. Jenvey, C.J.; Alenizi, D.; Almasi, F.; Cairns, C.; Holmes, A.; Sloan, S.; Stear, M.J. Bioinformatic Analysis of Eosinophil Activity and Its Implications for Model and Target Species. *Parasitol.* **2020**, *147*, 393–400, doi:10.1017/S0031182019001768.
98. Henderson, N.G.; Stear, M.J. Eosinophil and IgA Responses in Sheep Infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *112*, 62–66, doi:10.1016/j.vetimm.2006.03.012.
99. Cruz-Tamayo, A.A.; López-Arellano, M.E.; González-Garduño, R.; Torres-Hernández, G.; de la Mora-Valle, A.; Becerril-Pérez, C.; Hernández-Mendo, O.; Ramírez-Briebesca, E.; Huchin-Cab, M. *Haemonchus contortus* Infection Induces a Variable Immune Response in Resistant and Susceptible Pelibuey Sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2021**, *234*, doi:10.1016/j.vetimm.2021.110218.
100. Schallig, H.D.F.H. Immunological Responses of Sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* **2000**, *120*, doi:10.1017/s003118209900579x. PMID: 10874710.
101. McNeilly, T.N.; Rocchi, M.; Bartley, Y.; Brown, J.K.; Frew, D.; Longhi, C.; McLean, L.; McIntyre, J.; Nisbet, A.J.; Wattedgedera, S.; et al. Suppression of Ovine Lymphocyte Activation by *Teladorsagia circumcincta* Larval Excretory-Secretory Products. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 1, doi:10.1186/1297-9716-44-70.
102. Alba-Hurtado, F.; Muñoz-Guzmán, M.A. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *Biomed Res. Int.* **2013**, doi:10.1155/2013/162158.
103. Finkelman, F.D.; Katona, I.M.; Urban, J.F.; Holmes, J.; Ohara, J.; Tung, A.S.; Sample, J. V.; Paul, W.E. IL-4 Is Required to Generate and Sustain *in Vivo* IgE Responses. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 2335–2341, doi:10.4049/jimmunol.141.7.2335.
104. Fulkerson, P.C.; Schollaert, K.L.; Bouffi, C.; Rothenberg, M.E. IL-5 Triggers a Cooperative Cytokine Network That Promotes Eosinophil Precursor Maturation. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 4043–4052, doi:10.4049/jimmunol.1400732.
105. Strain, S.A.J.; Bishop, S.C.; Henderson, N.G.; Kerr, A.; McKellar, Q.A.; Mitchell, S.; Stear, M.J. The Genetic Control of IgA Activity against *Teladorsagia circumcincta* and Its Association with Parasite Resistance in Naturally Infected Sheep. *Parasitol.* **2002**, *124*, 545–552, doi:10.1017/S0031182002001531.
106. Martínez-Valladares, M.; Vara-Del Río, M.P.; Cruz-Rojo, M.A.; Rojo-Vázquez, F.A. Genetic Resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and Parameters at Slaughter in Churra Sheep. *Parasite Immunol.* **2005**, *27*, 213–218, doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00769.x.
107. Motran, C.C.; Silvane, L.; Chiapello, L.S.; Theumer, M.G.; Ambrosio, L.F.; Volpini, X.; Celas, D.P.; Cervi, L. Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1–12,

doi:10.3389/fimmu.2018.00664.

108. Prichard, R.K.; Hall, C.A.; Kelly, J.D.; Martin, I.C.A.; Donald, A.D. The Problem of Anthelmintic Resistance in Nematodes. *Aust. Vet. J.* **1980**, *56*, 239–250, doi:10.1111/j.1751-0813.1980.tb15983.x.
109. Enejoh, O. S. & Suleiman, M. Anthelmintics and Their Application in Veterinary Medicine. *Med Eng Phys* **2017**, *2*, 117–126, doi:10.31031/RMES.2017.02.000536.
110. Kearney, P.E.; Murray, P.J.; Hoy, J.M.; Hohenhaus, M.; Kotze, A. The 'Toolbox' of Strategies for Managing *Haemonchus contortus* in Goats : What's in and What's out. *Vet. Parasitol.* **2016**, *220*, 93–107, doi:10.1016/j.vetpar.2016.02.028.
111. Port, I.; Wiley, J.; Lacey, E. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology.* **1990**, *6*, 2–5.
112. Abongwa, M.; Martin, R.J.; Robertson, A. P. A Brief Review on the Mode of Action of Antinematodal Drugs. *Acta Vet.* **2018**, *67*, 137–152, doi:10.1515/acve-2017-0013.A.
113. Mckellar, Q.A.; Benchaoui, H.A. Avermectins and Milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1996**, *19*, 331–351.
114. Takiguchi Y, Ono M, Muramatsu S, Ide J, Mishima H, T.M. Milbemycins, a New Family of Macrolide Antibiotics Fermentation, Isolation and Physico-Chemical Properties of Milbemycins d, e, f, g and H. *J. Antibiot* **1983**, *36*, 502–508.
115. Wolstenholme, A.J.; Rogers, A.T. Glutamate-Gated Chloride Channels and the Mode of Action of the Avermectin / Milbemycin Anthelmintics. *Parasitol.* **2005**, *131*, 85–95, doi:10.1017/S0031182005008218.
116. Lecová, L.; Stuchlíková, L.; Prchal, L.; Skálová, L. Monepantel : The Most Studied New Anthelmintic Drug of Recent Years. *Parasitology* **2014**, *141*, 1686–1698, doi:10.1017/S0031182014001401.
117. Robertson, S.J.; Martin, R.J. Levamisole-Activated Single-Channel Currents from Muscle of the Nematode Parasite *Ascaris Suum*. *British Journal of Pharmacology* **1993**, *108*, 170–178.
118. Kotze, A.C.; Prichard, R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv. Parasitol.*; Elsevier Ltd, 2016; Vol. 93; ISBN 9780128103951.
119. Kaminsky, R.; Ducray, P.; Jung, M.; Clover, R.; Rufener, L.; Bouvier, J.; Weber, S.S.; Wenger, A.; Wieland-Berghausen, S.; Goebel, T.; et al. A New Class of Anthelmintics Effective against Drug-Resistant Nematodes. *Nature* **2008**, *452*, 176–180, doi:10.1038/nature06722.
120. Kaminsky, R.; Gauvry, N.; Schorderet Weber, S.; Skripsky, T.; Bouvier, J.; Wenger, A.; Schroeder, F.; Desaules, Y.; Hotz, R.; Goebel, T.; et al. Identification of the Amino-Acetonitrile Derivative Monepantel (AAD 1566) as a New Anthelmintic Drug Development Candidate. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 931–939, doi:10.1007/s00436-008-1080-7.
121. Rufener, L.; Keiser, J.; Kaminsky, R.; Mäser, P.; Nilsson, D. Phylogenomics of

- Ligand-Gated Ion Channels Predicts Monepantel Effect. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, doi:10.1371/journal.ppat.1001091.
122. Little, P.R.; Hodge, A.; Watson, T.G.; Seed, J.A.; Maeder, S.J. Field Efficacy and Safety of an Oral Formulation of the Novel Combination Anthelmintic, Derquantel- Abamectin, in Sheep in New Zealand Anthelmintic, Derquantel-Abamectin, in Sheep in New Zealand. *N.Z.J.V.* **2010**, *58*, 121–129, doi:10.1080/00480169.2010.67513.
 123. Woods, D.J.; Maeder, S.J.; Robertson, A.P.; Martin, R.J.; Geary, T.G.; Thompson, D.P.; Johnson, S.S.; Conder, G.A. Discovery, Mode of Action, and Commercialization of Derquantel. *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines* **2012**, 297–307, doi:10.1002/9783527652969.ch18.
 124. Rahman, M.M.; Kabir, A.; Ahmed, S.; Islam, M.K.; Rahman, M.S.; Alam, M.; Mubeen, M.A.A.; Yasmin, M.S.; Haque, M.W.U.; Mia, M.T.; et al. Nitroxynil Uncouples Oxidative Phosphorylation in the Cell Mitochondria and a Drug Wherever Injectables Are Preferred over Drenches. *J. Vet. Med.* **2017**, *15*, 45–49. doi: 10.3329/bjvm.v15i1.34054
 125. Shalaby, H.A. Anthelmintics Resistance; How to Overcome It? *Iran. J. Parasitol.* **2013**, *8*, 18–32.
 126. Fissiha, W.; Kinde, M.Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infect. Drug. Resist.* **2021**, *14*, 5403–5410, doi:10.2147/IDR.S332378.
 127. Wolstenholme, A.J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; Von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N.C. Drug Resistance in Veterinary Helminths. *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 469–476, doi:10.1016/j.pt.2004.07.010.
 128. Waller, P.J.; Echevarria, F.; Eddi, C.; Maciel, S.; Nari, A.; Hansen, J.W. The Prevalence of Anthelmintic Resistance in Nematode Parasites of Sheep in Southern Latin America: General Overview. *Vet. Parasitol.* **1996**, *62*, 181–187, doi:10.1016/0304-4017(95)00909-4.
 129. Leathwick, D.M.; Heath, A.C.G. Anthelmintic Resistance in New Zealand. *N.Z.V.J.* **2001**, *49*, 227–235, doi:10.1080/00480169.2001.36237.
 130. Sani, R.A.; Gray, G.D.; Baker, R.L. Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia Worm Control for Small Ruminants in Tropical Asia. *ACIAR Monograph* **2004**, 113.
 131. Papadopoulos, E.; Gallidis, E.; Ptochos, S. Anthelmintic Resistance in Sheep in Europe: A Selected Review. *Vet. Parasitol.* **2012**, *189*, 85–88, doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.036.
 132. Van Den Brom, R.; Moll, L.; Borgsteede, F.H.M.; Van Doorn, D.C.K.; Lievaart-Peterson, K.; Dercksen, D.P.; Vellema, P. Multiple Anthelmintic Resistance of *Haemonchus contortus*, Including a Case of Moxidectin Resistance, in a Dutch Sheep Flock. *Vet. Rec.* **2013**, *173*, 552, doi:10.1136/vr.101700.
 133. Kaplan, R.M. Drug Resistance in Nematodes of Veterinary Importance: A Status Report. *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 477–481, doi:10.1016/j.pt.2004.08.001.
 134. Preston, S.; Piedrafita, D.; Sandeman, M.; Cotton, S. The Current Status of

- Anthelmintic Resistance in a Temperate Region of Australia; Implications for Small Ruminant Farm Management. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2019**, *17*, 100313, doi:10.1016/j.vprsr.2019.100313.
135. Rose Vineer, H.; Morgan, E.R.; Hertzberg, H.; Bartley, D.J.; Bosco, A.; Charlier, J.; Chartier, C.; Claerebout, E.; De Waal, T.; Hendrickx, G.; Hinney, B.; Höglund, J.; Jez Ek, J.I.; Kašný, M.; Keane, O.M.; Martínez -Valladares, M.; Mateus, T.L.; McIntyre, J.; Mickiewicz, M.; Muñoz, A.M.; Phythian, C.J.; Ploeger, H.W.; Rataj, A.V.; Skuce, P.J.; Stanislav, S.; Sotiraki, S.; Spinu, M.; Stuen, S.; Thamsborg, S.M.; Vadlejch, J.; Varady, M.; Von Samson-Himmelstjerna, G.; Rinaldi, L. Increasing Importance of Anthelmintic Resistance in European Livestock: Creation and Meta-Analysis of an Open Database. *Parasite.* **2020**, *27*, doi:10.1051/parasite/2020062.
136. Burgess, C.G.S.; Bartley, Y.; Redman, E.; Skuce, P.J.; Nath, M.; Whitelaw, F.; Tait, A.; Gilleard, J.S.; Jackson, F. A Survey of the Trichostrongylid Nematode Species Present on UK Sheep Farms and Associated Anthelmintic Control Practices. *Vet. Parasitol.* **2012**, *189*, 299–307, doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.009.
137. Vernerova, E.; Vondrova, R.; Kisova, H.; Svobodova, V.; Hera, A. Detection of Benzimidazole Resistance in Gastrointestinal Nematode Parasites of Sheep in the Czech Republic. *Vet. Med.* **2009**, *54*, 467–472, doi:10.17221/2935-VETMED.
138. Dolinská, M.; Ivanišínová, O.; Königová, A.; Várady, M. Anthelmintic Resistance in Sheep Gastrointestinal Nematodes in Slovakia Detected by *In-Vitro* Methods. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*, 1–5, doi:10.1186/s12917-014-0233-4.
139. Lambertz, C.; Pouloupoulou, I.; Wuthijaree, K.; Gauly, M. Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes in Sheep Raised under Mountain Farming Conditions in Northern Italy. *Vet. Rec. Open.* **2019**, *6*, 1–6, doi:10.1136/vetreco-2018-000332.
140. Cassini, R.; Frangipane, A.; Regalbono, D.I.; Cesare, A.D.I.; Torre, F.L.A.; Mauti, A.; Paoletti, B. Efficacia Antielmintica Della Moxidectina Orale Contro Gli Strongili Gastrointestinali in Allevamenti Ovini Del Centro Italia. *Large Anim. Rev.* **2019**, *25*, 49–52.
141. Papadopoulos, E.; Himonas, C.; Coles, G.C. Drought and Flock Isolation May Enhance the Development of Anthelmintic Resistance in Nematodes. *Vet. Parasitol.* **2001**, *97*, 253–259, doi:10.1016/S0304-4017(01)00435-6.
142. Arsenopoulos, K.; Minoudi, S.; Symeonidou, I.; Triantafyllidis, A.; Katsafadou, A.I.; Lianou, D.T.; Fthenakis, G.C.; Papadopoulos, E. Frequency of Resistance to Benzimidazoles of *Haemonchus contortus* Helminths from Dairy Sheep, Goats, Cattle and Buffaloes in Greece. *Pathogens.* **2020**, *9*, 347, doi:10.3390/pathogens9050347.
143. Niciura, S.C.M.; Cruvinel, G.G.; Moraes, C. V.; Chagas, A.C.S.; Esteves, S.N.; Benavides, M. V.; Amarante, A.F.T. In Vivo Selection for *Haemonchus contortus* Resistance to Monepantel. *J. Helminthol.* **2020**, *94*, 10–14, doi:10.1017/S0022149X19000221.
144. Viana, M.V.G.; da Silva, Y.H.; Martins, I.V.F.; Scott, F.B. Resistance of *Haemonchus contortus* to Monepantel in Sheep: First Report in Espírito Santo, Brazil. *Rev. Bras.*

Parasitol. **2021**, *30*, 3–7, doi:10.1590/S1984-29612021089.

145. Nari, A.; Salles, J.; Gil, A.; Waller, P.J.; Hansen, J.W. The Prevalence of Anthelmintic Resistance in Nematode Parasites of Sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet. Parasitol.* **1996**, *62*, 213–222, doi:10.1016/0304-4017(95)00908-6.
146. Jabbar, A.; Iqbal, Z.; Kerboeuf, D.; Muhammad, G.; Khan, M.N.; Afaq, M. Anthelmintic Resistance: The State of Play Revisited. *Life Sci.* **2006**, *79*, 2413–2431, doi:10.1016/j.lfs.2006.08.010.
147. Taylor, M.A.; Learmount, J.; Lunn, E.; Morgan, C.; Craig, B.H. Multiple Resistance to Anthelmintics in Sheep Nematodes and Comparison of Methods Used for Their Detection. *Small Rumin. Res.* **2009**, *86*, 67–70, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.09.020.
148. Torres-Acosta, J.F.J.; Mendoza-de-Gives, P.; Aguilar-Caballero, A.J.; Cuéllar-Ordaz, J.A. Anthelmintic Resistance in Sheep Farms: Update of the Situation in the American Continent. *Vet. Parasitol* **2012**, *189*, 89–96, doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.037.
149. Dey, A.R.; Begum, N.; Anisuzzaman; Alim, M.A.; Alam, M.Z. Multiple Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants in Bangladesh. *Parasitol. Int.* **2020**, *77*, 102105, doi:10.1016/j.parint.2020.102105.
150. Álvarez-Sánchez, M.A.; Pérez-García, J.; Cruz-Rojo, M.A.; Rojo-Vázquez, F.A. Anthelmintic Resistance in Trichostrongylid Nematodes of Sheep Farms in Northwest Spain. *Parasitol. Res.* **2006**, *99*, 78–83, doi:10.1007/s00436-006-0130-2.
151. Martínez-Valladares, M.; Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Cordero-Pérez, C.; Famularo, M.R.; Fernández-Pato, N.; Castañón-Ordóñez, L.; Rojo-Vázquez, F.A. The Present Status of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematode Infections of Sheep in the Northwest of Spain by *in Vivo* and *in Vitro* Techniques. *Vet. Parasitol* **2013**, *191*, 177–181, doi:10.1016/j.vetpar.2012.08.009.
152. Díez-Baños, P.; Pedreira, J.; Sánchez-Andrade, R.; Francisco, I.; Suárez, J.L.; Díaz, P.; Panadero, R.; Arias, M.; Panceira, A.; Paz-Silva, A.; Morrundo, P. Field Evaluation for Anthelmintic-Resistant Ovine Gastrointestinal Nematodes by *in vitro* and *in vivo* Assays. *J. Parasitol.* **2008**, *94*, 925–928, doi:10.1645/GE-1366.1.
153. Calvete, C.; Calavia, R.; Ferrer, L.M.; Ramos, J.J.; Lacasta, D.; Uriarte, J. Management and Environmental Factors Related to Benzimidazole Resistance in Sheep Nematodes in Northeast Spain. *Vet. Parasitol.* **2012**, *184*, 193–203, doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.020.
154. T.J.C. Anderson, M.S.B. and R.N.B. Population Biology of Parasitic Nematodes: Applications of Genetic Markers. *Adv. Parasitol.* **1998**, *41*, 219–283, doi:10.3138/jcfs.32.1.127.
155. Sangste, N.C. Anthelmintic Resistance: Past, Present and Future. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 115–124, doi:10.1016/S0020-7519(98)00188-X.
156. Morgan, E.R.; Coles, G.C. Nematode Control Practices on Sheep Farms Following an Information Campaign Aiming to Delay Anthelmintic Resistance. *Vet. Rec.*

2010, 166, 301–303, doi:10.1136/vr.b4772.

157. Van Wyk, J.A. Refugia-Overlooked as Perhaps the Most Potent Factor Concerning the Development of Anthelmintic Resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **2001**, *68*, 55–67.
158. Kenyon, F.; Greer, A.W.; Coles, G.C.; Cringoli, G.; Papadopoulos, E.; Cabaret, J.; Berrag, B.; Varady, M.; Van Wyk, J.A.; Thomas, E.; et al. The Role of Targeted Selective Treatments in the Development of Refugia-Based Approaches to the Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet. Parasitol.* **2009**, *164*, 3–11, doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.015.
159. Jackson, F.; Miller, J. Alternative Approaches to Control-Quo Vadit? *Vet. Parasitol.* **2006**, *139*, 371–384, doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.025.
160. Charlier, J.; Thamsborg, S.M.; Bartley, D.J.; Skuce, P.J.; Kenyon, F.; Geurden, T.; Hoste, H.; Williams, A.R.; Sotiraki, S.; Höglund, J.; Charlier, C.; Geldhof, P.; van Dijk, J.; Rinaldi, L.; Morgan, E.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Vercruyse, J.; Claerebout, E. Mind the Gaps in Research on the Control of Gastrointestinal Nematodes of Farmed Ruminants and Pigs. *Transbound Emerg Dis.* **2018**, *65*, 217–234, doi:10.1111/tbed.12707.
161. Stear, M.J.; Doligalska, M.; Donskow-Schmelter, K. Alternatives to Anthelmintics for the Control of Nematodes in Livestock. *Parasitol.* **2007**, *134*, 139–151, doi:10.1017/S0031182006001557.
162. Torres-Acosta, J.F.J.; Hoste, H. Alternative or Improved Methods to Limit Gastro-Intestinal Parasitism in Grazing Sheep and Goats. *Small Rumin. Res.* **2008**, *77*, 159–173, doi:10.1016/j.smallrumres.2008.03.009.
163. Waller, P.J.; Schwan, O.; Ljungström, B.L.; Rydzik, A.; Yeates, G.W. Evaluation of Biological Control of Sheep Parasites Using *Duddingtonia* Flagrans under Commercial Farming Conditions on the Island of Gotland, Sweden. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 299–315, doi:10.1016/j.vetpar.2004.08.008.
164. Da Silva, M.E.; Braga, F.R.; Mendoza-De-Gives, P.; Mercado Uriostegui, M.A.; Manuela, R.; Soares, F.E. de F.; Millena de Carvalho, L.; Bosi Rodrigues, F.; Araújo, J.V. De Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in Reducing the *Haemonchus contortus* Infective Larvae. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 10–14, doi:10.1155/2015/474879.
165. Luns, F.D.; Carolina, R.; Assis, L.; Pinheiro, L.; Silva, C.; Ferraz, C.M.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. De Coadministration of Nematophagous Fungi for Biological Control over Nematodes in Bovine in the South-Eastern Brazil. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*.
166. Waghorn, T.S.; Leathwick, D.M.; Chen, L.; Gray, R.A.J.; Skipp, R.A. Influence of Nematophagous Fungi, Earthworms and Dung Burial on Development of the Free-Living Stages of *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* in New Zealand. *Vet. Parasitol.* **2002**, *104*, 119–129.
167. Szewc, M.; De Waal, T.; Zintl, A. Biological Methods for the Control of Gastrointestinal Nematodes. *Vet. J.* **2021**, *268*, 105602, doi:10.1016/j.tvjl.2020.105602.

168. Hoste, H.; Torres-Acosta, J.F.J. Non Chemical Control of Helminths in Ruminants: Adapting Solutions for Changing Worms in a Changing World. *Vet. Parasitol.* **2011**, *180*, 144–154, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.035.
169. Barger, I.A. The Role of Epidemiological Knowledge and Grazing Management for Helminth Control in Small Ruminants. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29*, 41–47, doi:10.1016/S0020-7519(98)00176-3.
170. Ruiz-Huidobro, C.; Sagot, L.; Lugagne, S.; Huang, Y.; Milhes, M.; Bordes, L.; Prévot, F.; Grisez, C.; Gautier, D.; Valadier, C.; Sautier, M.; Jacquiet, P.; Cell Grazing and *Haemonchus contortus* Control in Sheep: Lessons from a Two-Year Study in Temperate Western Europe. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9, doi:10.1038/s41598-019-49034-y.
171. Piedrafita, D.; Raadsma, H.W.; Gonzalez, J.; Meeusen, E. Increased Production through Parasite Control: Can Ancient Breeds of Sheep Teach Us New Lessons? *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 568–573, doi:10.1016/j.pt.2010.08.002.
172. Gunia, M.; Phocas, F.; Gourdine, J.L.; Bijma, P.; Mandonnet, N. Simulated Selection Responses for Breeding Programs Including Resistance and Resilience to Parasites in Creole Goats. *J. Anim. Sci.* **2013**, *91*, 572–581, doi:10.2527/jas.2011-5071.
173. Bisset, S.A.; Morris, C.A. Feasibility and Implications of Breeding Sheep for Resilience to Nematode Challenge. *Int. J. Parasitol.* **1996**, *26*, 857–868, doi:10.1016/S0020-7519(96)80056-7.
174. Gibson, J.P.; Bishop, S.C. Use of Molecular Markers to Enhance Resistance of Livestock to Disease: A Global Approach Utilising and Improving Genetic Resistance to Disease. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **2005**, *24*, 343–353.
175. Dominik, S. Quantitative Trait Loci for Internal Nematode Resistance in Sheep: A Review. *Genet. Sel. Evol.* **2005**, *37*, 83–96, doi:10.1051/gse:2004027.
176. Womack, J.E. Advances in Livestock Genomics: Opening the Barn Door. *Genome Res.* **2005**, *15*, 1699–1705, doi:10.1101/gr.3809105.
177. Rocha, R.A.; Amarante, A.F.T.; Bricarello, P.A. Comparison of the Susceptibility of Santa Inês and Ile de France Ewes to Nematode Parasitism around Parturition and during Lactation. *Small Rumin. Res.* **2004**, *55*, 65–75, doi:10.1016/j.smallrumres.2003.12.004.
178. Terefe, G.; Lacroux, C.; Andreoletti, O.; Grisez, C.; Prevot, F.; Bergeaud, J.P.; Penicaud, J.; Rouillon, V.; Gruner, L.; Brunel, J.C.; Francois, D.; Boux, J.; Dorchies, P.; Jacquiet, P. Immune Response to *Haemonchus contortus* Infection in Susceptible (INRA 401) and Resistant (Barbados Black Belly) Breeds of Lambs. *Parasite Immunol.* **2007**, *29*, 415–424, doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x.
179. González, J.F.; Hernández, A.; Molina, J.M.; Fernández, A.; Raadsma, H.W.; Meeusen, E.N.T.; Piedrafita, D. Comparative Experimental *Haemonchus contortus* Infection of Two Sheep Breeds Native to the Canary Islands. *Vet. Parasitol.* **2008**, *153*, 374–378, doi:10.1016/j.vetpar.2008.02.019.
180. Zaros, L.G.; Neves, M.R.M.; Benvenuti, C.L.; Navarro, A.M.C.; Sider, L.H.;

- Coutinho, L.L.; Vieira, L.S. Response of Resistant and Susceptible Brazilian Somalis Crossbreed Sheep Naturally Infected by *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1155–1161, doi:10.1007/s00436-014-3753-8.
181. Zaragoza-Vera, C. V.; Aguilar-Caballero, A.J.; González-Garduño, R.; Arjona-Jiménez, G.; Zaragoza-Vera, M.; Torres-Acosta, J.F.J.; Medina-Reynés, J.U.; Berumen-Alatorre, A.C. Variation in Phenotypic Resistance to Gastrointestinal Nematodes in Hair Sheep in the Humid Tropics of Mexico. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 567–573, doi:10.1007/s00436-018-06201-w.
182. McManus, C.; Paim, T.D.P.; De Melo, C.B.; Brasil, B.S.A.F.; Paiva, S.R. Selection Methods for Resistance to and Tolerance of Helminths in Livestock. *Parasite*. **2014**, *21*, 56, doi:10.1051/parasite/2014055.
183. Shaw, R.J.; Morris, C.A.; Wheeler, M. Genetic and Phenotypic Relationships between Carbohydrate Larval Antigen (CarLA) IgA, Parasite Resistance and Productivity in Serial Samples Taken from Lambs after Weaning. *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43*, 661–667, doi:10.1016/j.ijpara.2013.03.003.
184. Zhao, Z.; Wang, M.; Liu, S.; Palmer, D.; Shaw, R.; Karlsson, J.; Vercoe, P.E.; Martin, G.B.; Greeff, J. Heritabilities of IgA and IgE Activities against *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* L3 Larval Antigens Correlated with Traits for Faecal Worm Egg Count, Health and Productivity in Merino Sheep. *Anim. Prod. Sci.* **2019**, *59*, 1792–1802, doi:10.1071/AN18630.
185. Aguerre, S.; Jacquet, P.; Brodier, H.; Bournazel, J.P.; Grisez, C.; Prévot, F.; Michot, L.; Fidelle, F.; Astruc, J.M.; Moreno, C.R. Resistance to Gastrointestinal Nematodes in Dairy Sheep: Genetic Variability and Relevance of Artificial Infection of Nucleus Rams to Select for Resistant Ewes on Farms. *Vet. Parasitol.* **2018**, *256*, 16–23, doi:10.1016/j.vetpar.2018.04.004.
186. Harrison, G.B.L.; Pulford, H.D.; Hein, W.R.; Severn, W.B.; Shoemaker, C.B. Characterization of a 35-KDA Carbohydrate Larval Antigen (CarLA) from *Trichostrongylus colubriformis*; a Potential Target for Host Immunity. *Parasite Immunol.* **2003**, *25*, 79–86, doi:10.1046/j.1365-3024.2003.00606.x.
187. Harrison, G.B.L.; Pulford, H.D.; Doolin, E.E.; Pernthaner, A.; Shoemaker, C.B.; Hein, W.R. Antibodies to Surface Epitopes of the Carbohydrate Larval Antigen CarLA Are Associated with Passive Protection in Strongylid Nematode Challenge Infections. *Parasite Immunol.* **2008**, *30*, 577–584, doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01058.x.
188. Shaw, R.J.; Morris, C.A.; Wheeler, M.; Tate, M.; Sutherland, I.A. Salivary IgA: A Suitable Measure of Immunity to Gastrointestinal Nematodes in Sheep. *Vet. Parasitol.* **2012**, *186*, 109–117, doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.051.
189. Sinski, E.; Bairden, K.; Duncan, J.L.; Eisler, M.C.; Holmes, P.H.; McKellar, Q.A.; Murray, M.; Stear, M.J. Local and Plasma Antibody Responses to the Parasitic Larval Stages of the Abomasal Nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* **1995**, *59*, 107–118, doi:10.1016/0304-4017(94)00761-Z.
190. Fairlie-Clarke, K.; Kaseja, K.; Sotomaior, C.; Brady, N.; Moore, K.; Stear, M. Salivary IgA: A Biomarker for Resistance to *Teladorsagia circumcincta* and a New Estimated Breeding Value. *Vet. Parasitol.* **2019**, *269*, 16–20,

doi:10.1016/j.vetpar.2019.04.005.

191. González, J.F.; Hernández, J.N.; Machín, C.; Pérez-Hernández, T.; Wright, H.W.; Corripio-miyar, Y.; Price, D.R.G.; Matthews, J.B.; McNelly, T.M.; Nisbet, A.J. Immune Response of Canaria Hair Breed and Canaria Sheep Vaccinated against *Teladorsagia circumcincta*, 2022, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Arucas.Gran Canaria. Tesis.
192. Bao, S.; McClure, S.J.; Emery, D.I.; Husband, A.J. Interleukin-5 mRNA expressed by eosinophils and gamma delta T cells in parasite-immune sheep. *J. Immunol.* **2006**, *26*, 552–556. doi: 10.1002/eji.1830260308.
193. Robinson, N.; Piedrafita, D.; Snibson, K.; Harrison, P.; Meeusen, E.N. Immune Cell Kinetics in the Ovine Abomasal Mucosa Following Hyperimmunization and Challenge with *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 1–10, doi:10.1051/vetres/2010009.
194. Muñoz-Guzmán, M.A.; Cuenca-Verde, C.; Valdivia-Anda, G.; Cuéllar-Ordaz, J.A.; Alba-Hurtado, F. Differential Immune Response between Fundic and Pyloric Abomasal Regions upon Experimental Ovine Infection with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **2012**, *185*, 175–180, doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.001.
195. Hernández, J.N.; Meeusen, E.; Stear, M.; Rodríguez, F.; Piedrafita, D.; González, J.F. Modulation of *Haemonchus contortus* Infection by Depletion of $\gamma\delta$ T Cells in Parasite Resistant Canaria Hair Breed Sheep. *Vet. Parasitol.* **2017**, *237*, 57–62, doi:10.1016/j.vetpar.2017.02.021.
196. Sweeney, T.; Hanrahan, J.P.; Ryan, M.T.; Good, B. Immunogenomics of Gastrointestinal Nematode Infection in Ruminants - Breeding for Resistance to Produce Food Sustainably and Safely. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 569–586, doi:10.1111/pim.12347.
197. Stear, M.J.; Boag, B.; Cattadori, I.; Murphy, L. Genetic Variation in Resistance to Mixed, Predominantly *Teladorsagia circumcincta* Nematode Infections of Sheep: From Heritabilities to Gene Identification. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 274–282, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01105.x.
198. Chitneedi, P.K.; Suárez-Vega, A.; Martínez-Valladares, M.; Arranz, J.J.; Gutiérrez-Gil, B. Exploring the Mechanisms of Resistance to *Teladorsagia circumcincta* Infection in Sheep through Transcriptome Analysis of Abomasal Mucosa and Abomasal Lymph Nodes. *Vet. Res.* **2018**, *49*, 1–11, doi:10.1186/s13567-018-0534-x.
199. Glendinning, L.; Nausch, N.; Free, A.; Taylor, D.W.; Mutapi, F. The Microbiota and Helminths: Sharing the Same Niche in the Human Host. *Parasitol.* **2014**, *141*, 1255–1271, doi:10.1017/S0031182014000699.
200. Li, J.; Jia, H.; Cai, X.; Zhong, H.; Feng, Q.; Sunagawa, S.; Arumugam, M.; Kultima, J.R.; Pifti, E.; Nielsen, T.; et al. An Integrated Catalog of Reference Genes in the Human Gut Microbiome. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 834–841, doi:10.1038/nbt.2942.
201. Polanco Allué, I. Microbiota y Enfermedades Gastrointestinales. *An. Pediatr.* **2015**, *83*, 443.e1-443.e5, doi:10.1016/j.anpedi.2015.07.034.
202. Pickard, J.M.; Zeng, M.Y.; Caruso, R.; Núñez, G. Gut Microbiota: Role in

- Pathogen Colonization, Immune Responses, and Inflammatory Disease. *Immunol. Rev.* **2017**, 279, 70–89, doi:10.1111/imr.12567.
203. Kreisinger, J.; Bastien, G.; Hauffe, H.C.; Marchesi, J.; Perkins, S.E. Interactions between Multiple Helminths and the Gut Microbiota in Wild Rodents. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2015**, 370, doi:10.1098/rstb.2014.0295.
 204. Mizrahi, I.; Jami, E. Review: The Compositional Variation of the Rumen Microbiome and Its Effect on Host Performance and Methane Emission. *Animal*. **2018**, 12, S220–S232, doi:10.1017/S1751731118001957.
 205. McCarty, T.R.; Turkeltaub, J.A.; Hotez, P.J. Global Progress towards Eliminating Gastrointestinal Helminth Infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2014**, 30, 18–24, doi:10.1097/MOG.0000000000000025.
 206. Leibold, M.A.; Storch, D.; Gaston, K.J.; Davies, K.F.; Stafford, H.D.; Viers, J.H.; Gonzalez, A.; Newson, S.E.; Storch, D.; Greenwood, J.J.D.; et al. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Sci.* **2010**, 328, 1391–1394.
 207. Reynolds, L.A.; Finlay, B.B.; Maizels, R.M. Cohabitation in the Intestine: Interactions among Helminth Parasites, Bacterial Microbiota, and Host Immunity. *J. Immunol.* **2020**, 195, 4059–4066, doi:10.4049/jimmunol.1501432.
 208. Cattadori, I.M.; Sebastian, A.; Hao, H.; Katani, R.; Albert, I.; Eilertson, K.E.; Kapur, V.; Pathak, A. Impact of Helminth Infections and Nutritional Constraints on the Small Intestine Microbiota. *PLoS ONE*. **2016**, 11, 1–23, doi:10.5061/dryad.52qk8.
 209. Roa, I.; Meruane, M. Desarrollo Del Aparato Digestivo. *Int. J. Morphol.* **2012**, 30, 1285–1294.
 210. Al-Masaudi, S.; El Kaoutari, A.; Drula, E.; Al-Mehdar, H.; Redwan, E.M.; Lombard, V.; Henrissat, B. A Metagenomics Investigation of Carbohydrate-Active Enzymes along the Gastrointestinal Tract of Saudi Sheep. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 666, doi:10.3389/fmicb.2017.00666.
 211. Kay, B. Digestion of Protein in the Intestines of Adult Ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* **1969**, 28, 140–151, doi:10.1079/PNS19690025.
 212. El-Ashram, S.; Suo, X. Exploring the Microbial Community (Microflora) Associated with Ovine *Haemonchus contortus* (Macroflora) Field Strains. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–13, doi:10.1038/s41598-017-00171-2.
 213. Wang, J.; Fan, H.; Han, Y.; Zhao, J.; Zhou, Z. Characterization of the Microbial Communities along the Gastrointestinal Tract of Sheep by 454 Pyrosequencing Analysis. *AJAS*. **2017**, 30, 100–110, doi:10.5713/ajas.16.0166.
 214. Sinnathamby, G.; Henderson, G.; Umair, S.; Janssen, P.; Bland, R.; Simpson, H. The Bacterial Community Associated with the Sheep Gastrointestinal Nematode Parasite *Haemonchus contortus*. *PLoS ONE*. **2018**, 13 (2), 1–25, doi: 10.1371/journal.pone.0192164
 215. Mamun, M.A. Al; Sandeman, M.; Rayment, P.; Brook-Carter, P.; Scholes, E.; Kasinadhuni, N.; Piedrafita, D.; Greenhill, A.R. Variation in Gut Bacterial Composition Is Associated with *Haemonchus contortus* Parasite Infection of Sheep.

Animal. Microb. **2020**, *2*, 1–14, doi:10.1186/s42523-020-0021-3.

216. El-Ashram, S.; Al Nasr, I.; Abouhajer, F.; El-Kemary, M.; Huang, G.; Dinçel, G.; Mehmood, R.; Hu, M.; Suo, X. Microbial Community and Ovine Host Response Varies with Early and Late Stages of *Haemonchus contortus* Infection. *Vet. Res. Commun.* **2017**, *41*, 263–277, doi:10.1007/s11259-017-9698-5.
217. Zeng, Y.; Zeng, D.; Ni, X.; Zhu, H.; Jian, P.; Zhou, Y.; Xu, S.; Lin, Y.; Li, Y.; Yin, Z.; Li, Yang.; Yin, Z.; Pan, K.; Jing, B. Microbial Community Compositions in the Gastrointestinal Tract of Chinese Mongolian Sheep Using Illumina MiSeq Sequencing Revealed High Microbial Diversity. *AMB Express.* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1186/s13568-017-0378-1.
218. Cortés, A.; Wills, J.; Su, X.; Hewitt, R.E.; Robertson, J.; Scotti, R.; Price, D.R.G.; Bartley, Y.; McNeilly, T.N.; Krause, L. Powell, J.J.; Nisvet, A.J.; Cantacessi, C. Infection with the Sheep Gastrointestinal Nematode *Teladorsagia circumcincta* Increases Luminal Pathobionts. *Microbiome.* **2020**, *8*, 1–15, doi:10.1186/s40168-020-00818-9.
219. Tuomisto, H. A Diversity of Beta Diversities : Straightening up a Concept Gone Awry. Part 1. Defining Beta Diversity as a Function of Alpha and Gamma Diversity. *Ecography.* **2010**, *33*, 2–22, doi:10.1111/j.1600-0587.2009.05880.x.
220. Midha, A.; Schlosser, J.; Hartmann, S. Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments. *Front. cell. infect.* **2017**, *7*, 144, doi:10.3389/fcimb.2017.00144.
221. Brosschot, T.P.; Reynolds, L.A. The Impact of a Helminth-Modified Microbiome on Host Immunity Review-Article. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 1039–1046, doi:10.1038/s41385-018-0008-5.
222. Abt, M.C.; Pamer, E.G. Commensal Bacteria Mediated Defenses against Pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *29*, 16–22, doi:10.1016/j.coi.2014.03.003.
223. Donaldson, G.P.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. Gut Biogeography of the Bacterial Microbiota. *Nature Publishing Group* **2016**, *14*, 20–32, doi:10.1038/nrmicro3552.
224. Lawley, T.D.; Alan, W. Intestinal Colonization Resistance. *Immunol.* **2013**, *138*, 1–11, doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03616.x.
225. Kamada, N.; Chen, G.Y.; Inohara, N.; Núñez, G. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 685–690, doi:10.1038/ni.2608.
226. Buffie, C.G.; Pamer, E.G. Microbiota-Mediated Colonization Resistance against Intestinal Pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 790–801, doi:10.1038/nri3535.
227. Mafuna, T.; Soma, P.; Tsoetsi-Khambule, A.M.; Hefer, C.A.; Muchadeyi, F.C.; Thekiso, O.M.M.; Pierneef, R.E. Bacterial Profiling of *Haemonchus contortus* Gut Microbiome Infecting Dohne Merino Sheep in South Africa. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41598-021-85282-7.
228. Corrêa, P.S.; Mendes, L.W.; Lemos, L.N.; Sampaio, A.C.K.; Issakowicz, J.; McManus, C.M.; Tsai, S.M.; Faciola, A.P.; Abdalla, A.L.; Louvandini, H. The Effect of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* Infection on the

- Ruminal Microbiome of Lambs. *Exp. Parasitol.* **2021**, 231, doi:10.1016/j.exppara.2021.108175.
229. Wells, J.M. Immunomodulatory Mechanisms of Lactobacilli. *Microb. Cell Factories.* **2011**, 10, 1–15, doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S17.
230. Reynolds, L.A.; Reynolds, L.A.; Harcus, Y.; Smith, K.A.; Webb, L.M.; Hewitson, J.P.; Ross, E.A.; Brown, S.; Uematsu, S.; Akira, S.; Gray, D.; Gray, M.; McDonald, A.S.; Cunningham, A.F.; Maizels, R.M. MyD88 Signaling Inhibits Protective Immunity to the Gastrointestinal Helminth Parasite. *J. Immunol.* **2014**, 193, 2984–2993, doi:10.4049/jimmunol.1401056.
231. Fricke, W.F.; Song, Y.; Wang, A.J.; Smith, A.; Grinchuk, V.; Mongodin, E.; Pei, C.; Ma, B.; Lu, N.; Urban, J.F.; Shea-Donohue, T.; Zhao, A. Type 2 Immunity-Dependent Reduction of Segmented Filamentous Bacteria in Mice Infected with the Helminthic Parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Microbiome* **2015**, 3, 1–12, doi:10.1186/s40168-015-0103-8.
232. Holm, J.B.; Sorobetea, D.; Kiilerich, P.; Ramayo-Caldas, Y.; Estellé, J.; Ma, T.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Svensson-Frej, M. Chronic *Trichuris muris* Infection Decreases Diversity of the Intestinal Microbiota and Concomitantly Increases the Abundance of Lactobacilli. *PLoS ONE.* **2015**, 10, 1–22, doi:10.1371/journal.pone.0125495.
233. Reynolds, L.A.; Smith, K.A.; Filbey, K.J.; Harcus, Y.; Hewitson, J.P.; Redpath, S.A.; Valdez, Y.; Yebra, M.J.; Brett Finlay, B.; Maizels, R.M. Commensal-Pathogen Interactions in the Intestinal Tract Lactobacilli Promote Infection with, and Are Promoted by, Helminth Parasites. *Gut. Microbes.* **2014**, 5, 522–532, doi:10.4161/gmic.32155.
234. Aboshady, H.M.; Choury, A.; Montout, L.; Félicité, Y.; Godard, X.; Bambou, J.C. Metagenome Reveals Caprine Abomasal Microbiota Diversity at Early and Late Stages of *Haemonchus contortus* Infection. *Sci. Rep.* **2023**, 13, 1–8, doi:10.1038/s41598-023-29096-9.
235. Appert, O.; Garcia, A.R.; Frei, R.; Roduit, C.; Constancias, F.; Neuzil-Bunesova, V.; Ferstl, R.; Zhang, J.; Akdis, C.; Lauener, R.; et al. Initial Butyrate Producers during Infant Gut Microbiota Development Are Endospore Formers. *Environ. Microbiol.* **2020**, 22, 3909–3921, doi:10.1111/1462-2920.15167.
236. Peachey, L.E.; Jenkins, T.P.; Cantacessi, C. This Gut Ain't Big Enough for Both of Us. Or Is It? Helminth–Microbiota Interactions in Veterinary Species. *Trends Parasitol.* **2017**, 33, 619–632, doi:10.1016/j.pt.2017.04.004.
237. Rausch, S.; Midha, A.; Kuhring, M.; Affinass, N.; Radonic, A.; Köhl, A.A.; Bleich, A.; Renard, B.Y.; Hartmann, S. Parasitic Nematodes Exert Antimicrobial Activity and Benefit from Microbiota-Driven Support for Host Immune Regulation. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 1–12, doi:10.3389/fimmu.2018.02282.
238. Cortés, A.; Rooney, J.; Bartley, D.J.; Nisbet, A.J.; Cantacessi, C. Helminths, Hosts, and Their Microbiota: New Avenues for Managing Gastrointestinal Helminthiasis in Ruminants. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2020**, 18, 977–985, doi:10.1080/14787210.2020.1782188.

239. Rooney, J.; Cantacessi, C.; Sotillo, J.; Cortés, A. Gastrointestinal Worms and Bacteria: From Association to Intervention. *Parasite Immunol.* **2022**, 1–11, doi:10.1111/pim.12955.
240. Hamel, D.; Bosco, A.; Rinaldi, L.; Cringoli, G.; Kaulfuß, K.H.; Kellermann, M.; Fischer, J.; Wang, H.; Kley, K.; Mayr, S.; Rauh, J.R.; Vissser, M.; Weifel, R.; Frankhauser, B.; Rhbein, S.. Eprinomectin Pour-on (EPRINEX® Pour-on, Merial): Efficacy against Gastrointestinal and Pulmonary Nematodes and Pharmacokinetics in Sheep. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 1–12, doi:10.1186/s12917-017-1075-7.
241. Martínez-Valladares, M.; Geurden, T.; Bartram, D.J.; Martínez-Pérez, J.M.; Robles-Pérez, D.; Bohórquez, A.; Florez, E.; Meana, A.; Rojo-Vázquez, F.A. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to the Most Commonly Used Anthelmintics in Sheep, Cattle and Horses in Spain. *Vet. Parasitol.* **2015**, *211*, 228–233, doi:10.1016/j.vetpar.2015.05.024.
242. Traversa, D.; von Samson-Himmelstjerna, G. Anthelmintic Resistance in Sheep Gastro-Intestinal Strongyles in Europe. *Small Rumin. Res* **2016**, *135*, 75–80, doi:10.1016/j.smallrumres.2015.12.014.
243. Nagata, W.B.; da Cruz Panegossi, M.F.; Bresciani, K.D.S.; Gomes, J.F.; Kaneto, C.N.; Perri, S.H.V. Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Five Different Active Principles in Sheep Infected Naturally in São Paulo State, Brazil. *Small Rumin. Res.* **2019**, *172*, 48–50, doi:10.1016/j.smallrumres.2018.10.001.
244. Notter, D.R.; Burke, J.M.; Miller, J.E.; Morgan, J.L.M. Factors Affecting Fecal Egg Counts in Periparturient Katahdin Ewes and Their Lambs. *J. Anim. Sci.* **2017**, *95*, 103–112, doi:10.2527/jas2016.0955.
245. Halliday, A.M.; Morrison, W.I.; Smith, W.D. Kinetics of the Local Cellular Response in the Gastric Lymph of Immune and Susceptible Sheep to Infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 402–411, doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01119.x.
246. McRae, K.M.; Good, B.; Hanrahan, J.P.; Glynn, A.; O’Connell, M.J.; Keane, O.M. Response to *Teladorsagia circumcincta* Infection in Scottish Blackface Lambs with Divergent Phenotypes for Nematode Resistance. *Vet. Parasitol.* **2014**, *206*, 200–207, doi:10.1016/j.vetpar.2014.10.023.
247. Atlija, M.; Prada, J.M.; Gutiérrez-Gil, B.; Rojo-Vázquez, F.A.; Stear, M.J.; Arranz, J.J.; Martínez-Valladares, M. Implementation of an Extended ZINB Model in the Study of Low Levels of Natural Gastrointestinal Nematode Infections in Adult Sheep. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 1–9, doi:10.1186/s12917-016-0723-7.
248. Strain, S.A.J.; Stear, M.J. The Recognition of Molecules from Fourth-Stage Larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from Infected Sheep. *Parasite Immunol.* **1999**, *21*, 163–168, doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00225.x.
249. González, J.F.; Hernández, Á.; Meeusen, E.N.T.; Rodríguez, F.; Molina, J.M.; Jaber, J.R.; Raadsma, H.W.; Piedrafita, D. Fecundity in Adult *Haemonchus contortus* Parasites Is Correlated with Abomasal Tissue Eosinophils and $\gamma\delta$ T Cells in Resistant Canaria Hair Breed Sheep. *Vet. Parasitol.* **2011**, *178*, 286–292, doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.005.

250. Palomo-Couoh, J.G.; Aguilar-Caballero, A.J.; Torres-Acosta, J.F. de J.; Magaña-Monforte, J.G. Evaluation of Different Models to Segregate Pelibuey and Katahdin Ewes into Resistant or Susceptible to Gastrointestinal Nematodes. *Trop. Anim. Health Prod.* **2016**, *48*, 1517–1524, doi:10.1007/s11250-016-1122-6.
251. McRae, K.M.; Good, B.; Hanrahan, J.P.; McCabe, M.S.; Cormican, P.; Sweeney, T.; O'Connell, M.J.; Keane, O.M. Transcriptional Profiling of the Ovine Abomasal Lymph Node Reveals a Role for Timing of the Immune Response in Gastrointestinal Nematode Resistance. *Vet. Parasitol.* **2016**, *224*, 96–108, doi:10.1016/j.vetpar.2016.05.014.
252. Hernández, J.N.; Hernández, A.; Stear, M.J.; Conde-Felipe, M.; Rodríguez, E.; Piedrafita, D.; González, J.F. Potential Role for Mucosal IgA in Modulating *Haemonchus contortus* Adult Worm Infection in Sheep. *Vet. Parasitol.* **2016**, *223*, 153–158, doi:10.1016/j.vetpar.2016.04.022.
253. Terrill, T.H.; Miller, J.E.; Burke, J.M.; Mosjidis, J.A.; Kaplan, R.M. Experiences with Integrated Concepts for the Control of *Haemonchus contortus* in Sheep and Goats in the United States. *Vet. Parasitol.* **2012**, *186*, 28–37, doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.043.
254. Gossner, A.G.; Venturina, V.M.; Shaw, D.J.; Pemberton, J.M.; Hopkins, J. Relationship between Susceptibility of Blackface Sheep to *Teladorsagia circumcincta* Infection and an Inflammatory Mucosal T Cell Response. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 1–11, doi:10.1186/1297-9716-43-26.
255. Venturina, V.M.; Gossner, A.G.; Hopkins, J. The Immunology and Genetics of Resistance of Sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res. Commun.* **2013**, *37*, 171–181, doi:10.1007/s11259-013-9559-9.
256. Scott, I.; Pomroy, W.E.; Kenyon, P.R.; Smith, G.; Adlington, B.; Moss, A. Lack of Efficacy of Monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **2013**, *198*, 166–171, doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.037.
257. Mederos, A.E.; Ramos, Z.; Banchemo, G.E. First Report of Monepantel *Haemonchus contortus* Resistance on Sheep Farms in Uruguay. *Parasites Vectors.* **2014**, *7*, 1–4, doi:10.1186/s13071-014-0598-z.
258. Charlier, J.; Morgan, E.R.; Rinaldi, L.; Van Dijk, J.; Demeler, J.; Höglund, J.; Hertzberg, H.; Van Ranst, B.; Hendrickx, G.; Vercruyse, J.; et al. Practices to Optimise Gastrointestinal Nematode Control on Sheep, Goat and Cattle Farms in Europe Using Targeted (Selective) Treatments. *Vet. Rec.* **2014**, *175*, 250–255.
259. Eady, S.J.; Woolaston, R.R.; Mortimer, S.I.; Lewer, R.P.; Raadsma, H.W.; Swan, A.A.; Ponzoni, R.W. Resistance to Nematode Parasites in Merino Sheep: Sources of Genetic Variation. *Aust. J. Agric. Res.* **1996**, *47*, 895–915, doi:10.1071/AR9960895.
260. Pollott, G.E.; Karlsson, L.J.E.; Eady, S.; Greeff, J.C. Genetic Parameters for Indicators of Host Resistance to Parasites from Weaning to Hogget Age in Merino Sheep. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 2852–2864, doi:10.2527/2004.82102852x.
261. McKenna, P.B. Faecal Egg Counts as a Guide for Drench Use. *N.Z.V.J.* **2002**, *50*, 123–124, doi:10.1080/00480169.2002.36295.

262. Stear, M.J.; Strain, S.; Bishop, S.C. How Lambs Control Infection with *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1999**, *72*, 213–218, doi:10.1016/S0165-2427(99)00134-8.
263. Stear, M.J.; Abuagob, O.; Benothman, M.; Bishop, S.C.; Innocent, G.; Kerr, A.; Mitchell, S. Variation among Faecal Egg Counts Following Natural Nematode Infection in Scottish Blackface Lambs. *Parasitol.* **2006**, *132*, 275–280, doi:10.1017/S0031182005009029.
264. De Cisneros, J.P.J.; Stear, M.J.; Mair, C.; Singleton, D.; Stefan, T.; Stear, A.; Marion, G.; Matthews, L. An Explicit Immunogenetic Model of Gastrointestinal Nematode Infection in Sheep. *J. R. Soc. Interface.* **2014**, *11*, doi:10.1098/rsif.2014.0416.
265. Stear, M.J.; Bairden, K.; Innocent, G.T.; Mitchell, S.; Strain, S.; Bishop, S.C. The Relationship between IgA Activity against 4th-Stage Larvae and Density-Dependent Effects on the Number of 4th-Stage Larvae of *Teladorsagia circumcincta* in Naturally Infected Sheep. *Parasitol.* **2004**, *129*, 363–369, doi:10.1017/S0031182004005736.
266. Palomo-Couoh, J.G.; Aguilar-Caballero, A.J.; Torres-Acosta, J.F.J.; González-Garduño, R. Comparing the Phenotypic Susceptibility of Pelibuey and Katahdin Female Lambs against Natural Gastrointestinal Nematode Infections under Hot Humid Tropical Conditions. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 1627–1636, doi:10.1007/s00436-017-5437-7.
267. Meek, B.; Back, J.W.; Klaren, V.N.A.; Speijer, D.; Peek, R. Conserved Regions of Protein Disulfide Isomerase Are Targeted by Natural IgA Antibodies in Humans. *Int. Immunol.* **2002**, *14*, 1291–1301, doi:10.1093/intimm/dxf091.
268. Brandtzaeg, P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front. immunol.* **2013**, *4*, 1–17, doi:10.3389/fimmu.2013.00222.
269. Bowdridge, S.; MacKinnon, K.; McCann, J.C.; Zajac, A.M.; Notter, D.R. Hair-Type Sheep Generate an Accelerated and Longer-Lived Humoral Immune Response to *Haemonchus contortus* Infection. *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 172–178, doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.008.
270. Craig, H.; Wastling, J.M.; Knox, D.P. A Preliminary Proteomic Survey of the in Vitro Excretory/Secretory Products of Fourth-Stage Larval and Adult *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol.* **2006**, *132*, 535–543, doi:10.1017/S0031182005009510.
271. Martínez-Valladares, M.; Godio-Fernández, R.; Vara-Del Río, M.P.; Martín, J.F.; Rojo-Vázquez, F.A. Expression of the Recombinant Protein Disulphide Isomerase of *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* **2007**, *29*, 47–56, doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00922.x.
272. Freedman, R.B.; Hirst, T.R.; Tuite, M.F. Protein Disulphide Isomerase: Building Bridges in Protein Folding. *T.I.B.S* **1994**, *19*, 331–336, doi:10.1016/0968-0004(94)90072-8.
273. Quan, C.P.; Berneman, A.; Pires, R.; Avrameas, S.; Bouvet, J.P. Natural Polyreactive Secretory Immunoglobulin A Autoantibodies as a Possible Barrier to Infection in Humans. *Infect Immun.* **1997**, *65*, 3997–4004,

doi:10.1128/iai.65.10.3997-4004.1997.

274. Martínez-Valladares, M.; Vara-Del Río, M. P.; Rojo-Vázquez, F.A. Use of a 203 Aa Fragment of Tc-PDI to Detect IgA Activity during Infection by *Teladorsagia circumcincta* in Sheep. *Parasitol. Res.* **2007**, *100*, 1213–1220, doi:10.1007/s00436-006-0393-7.
275. Emami Bistgani, Z.; Siadat, S.A.; Bakhshandeh, A.; Ghasemi Pirbalouti, A.; Hashemi, M. Interactive Effects of Drought Stress and Chitosan Application on Physiological Characteristics and Essential Oil Yield of *Thymus Daenensis* Celak. *Crop J.* **2017**, *5*, 407–415, doi:10.1016/j.cj.2017.04.003.
276. Pérez-Hernández, T.; Corripio-Miyar, Y.; Hernández, J.N.; Machín, C.; Paz-Sánchez, Y.; Hayward, A.D.; Wright, H.W.; Price, D.R.G.; Matthews, J.B.; McNeilly, T.N.; et al. Differences in the Protection Elicited by a Recombinant *Teladorsagia circumcincta* Vaccine in Weaned Lambs of Two Canarian Sheep Breeds. *Vet. Parasitol.* **2022**, *306*, 109722, doi:10.1016/j.vetpar.2022.109722.
277. Woolaston, R. R. and Baker, R.. Prospects of Breeding Small Ruminants for Resistance to Internal Parasites. *Int. J. Parasitol.* **1996**, *26*, 845–855.
278. Amarante, A.F.T.; Bricarello, P.A.; Rocha, R.A.; Gennari, S.M. Resistance of Santa Ines , Suffolk and Ile de France Sheep to Naturally Acquired Gastrointestinal Nematode Infections. *Vet. Parasitol.* **2004**, *120*, 91–106, doi:10.1016/j.vetpar.2003.12.004.
279. Vanimisetti, H.B.; Greiner, S.P.; Zajac, A.M.; Notter, D.R. Performance of Hair Sheep Composite Breeds : Resistance of Lambs to *Haemonchus contortus*. *Journal of Animal Science* **2003**, *82*, 595–604, doi:10.2527/2004.822595x.
280. Ojeda-Robertos, N.F.; Torres-Acosta, J.F.J.; González-Garduño, R.; Notter, D.R. Phenotypic Expression of Parasite Susceptibility to *Haemonchus contortus* in Pelibuey Sheep. *Vet. Parasitol.* **2017**, *239*, 57–61, doi:10.1016/j.vetpar.2017.04.015.
281. Shakya, K.P.; Miller, J.E.; Lomax, L.G.; Burnett, D.D. Evaluation of Immune Response to Artificial Infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native Compared with Suffolk Lambs. *Vet. Parasitol.* **2011**, *181*, 239–247, doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.051.
282. Watt, K.A.; Nussey, D.H.; Maclellan, R.; Pilkington, J.G.; Mcneilly, T.N. Fecal Antibody Levels as a Noninvasive Method for Measuring Immunity to Gastrointestinal Nematodes in Ecological Studies. *Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 57–67. doi:10.1002/ece3.1858.
283. Castilla-Gómez de Agüero, V.; González, J.F.; Hernández, J.N.; Valderas-García, E.; Rojo Vázquez, F.A.; Arranz, J.J.; Gutiérrez-Gil, B.; Martínez-Valladares, M. Differences within Churra Breed Sheep in the Early Immune Response to the Infection by *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 1115–1120, doi:10.1007/s00436-020-06953-4.
284. De la Chevrotère, C.; Bambou, J.C.; Arquet, R.; Jacquiet, P. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. *Vet. Parasitol.* **2011**, *186*, 337–343, doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.071.

285. Idris, A.; Moors, E.; Sohnrey, B.; Gauly, M. Gastrointestinal Nematode Infections in German Sheep. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 1453–1459, doi:10.1007/s00436-011-2648-1.
286. Schallig, H.D.F.H.; Hornok, S.; Cornelissen, J.B.W.J. Comparison of Two Enzyme Immunoassays for the Detection of *Haemonchus contortus* Infections in Sheep. *Vet. Parasitol.* **1995**, *57*, 329–338, doi:10.1016/0304-4017(94)00693-7.
287. Aliabadi, J.; Rakhshandehroo, E.; Yektaseresht, A. Development and Evaluation of an Indirect ELISA for Detection of *Teladorsagia circumcincta* Infection in Sheep. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 1–9, doi:10.1186/s12917-021-03042-1.
288. Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M.T.; Carrera, L.; de la Fuente, C.; Alunda, J.M. Cross Antigenicity among Ovine Trichostrongyloidea. Preliminary Report. *Vet. Parasitol.* **1994**, *53*, 243–251, doi:10.1016/0304-4017(94)90187-2.
289. Smith, W.D.; Pettit, D.; Smith, S.K. Cross-Protection Studies with Gut Membrane Glycoprotein Antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* **2001**, *23*, 203–211, doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00375.x.
290. Brandtzaeg, P. Induction of Secretory Immunity and Memory at Mucosal Surfaces. *Vaccine.* **2007**, *25*, 5467–5484, doi:10.1016/j.vaccine.2006.12.001.
291. Halliday, A.M.; Smith, W.D. Attempts to Immunize Sheep against *Teladorsagia circumcincta* Using Fourth-Stage Larval Extracts. *Parasite Immunol.* **2011**, *33*, 554–560, doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01323.x.
292. Mavrot, F.; Hertzberg, H.; Torgerson, P. Effect of Gastro-Intestinal Nematode Infection on Sheep Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Parasites Vectors.* **2015**, *8*, 1–11, doi:10.1186/s13071-015-1164-z.
293. Charlier, J.; Van der Voort, M.; Kenyon, F.; Skuce, P.; Vercruyse, J. Chasing Helminths and Their Economic Impact on Farmed Ruminants. *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 361–367, doi:10.1016/j.pt.2014.04.009.
294. Charlier, J.; Rinaldi, L.; Musella, V.; Ploeger, H.W.; Chartier, C.; Vineer, H.R.; Hinney, B.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Băcescu, B.; Mickiewicz, M.; et al. Initial Assessment of the Economic Burden of Major Parasitic Helminth Infections to the Ruminant Livestock Industry in Europe. *Prev. Vet. Med.* **2020**, *182*, 105103, doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105103.
295. Waller, P.J. From Discovery to Development: Current Industry Perspectives for the Development of Novel Methods of Helminth Control in Livestock. *Vet. Parasitol.* **2006**, *139*, 1–14, doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.036.
296. Cezar, A.S.; Toscan, G.; Camillo, G.; Sangioni, L.A.; Ribas, H.O.; Vogel, F.S.F. Multiple Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Nine Different Drugs in a Sheep Flock in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* **2010**, *173*, 157–160, doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.013.
297. Kaplan, R.M.; Vidyashankar, A.N. An Inconvenient Truth: Global Worming and Anthelmintic Resistance. *Vet. Parasitol.* **2012**, *186*, 70–78, doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.048.
298. Leathwick, D.M.; Miller, C.M.; Atkinson, D.S.; Haack, N.A.; Waghorn, T.S.;

- Oliver, A.M. Managing Anthelmintic Resistance: Untreated Adult Ewes as a Source of Unselected Parasites, and Their Role in Reducing Parasite Populations. *NZVJ*. **2008**, *56*, 184–195, doi:10.1080/00480169.2008.36832.
299. Matthews, J.B.; Geldhof, P.; Tzelos, T.; Claerebout, E. Progress in the Development of Subunit Vaccines for Gastrointestinal Nematodes of Ruminants. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 744–753, doi:10.1111/pim.12391.
300. Bisset, S.A.; Morris, C.A.; McEwan, J.C.; Vlassof, A. Breeding Sheep in New Zealand That Are Less Reliant on Anthelmintics to Maintain Health and Productivity. *NZVJ*. **2001**, *49*, 236–246, doi:10.1080/00480169.2001.36238.
301. Ahmed, A.M.; Sebastiano, S.R.; Sweeney, T.; Hanrahan, J.P.; Glynn, A.; Keane, O.M.; Mukhopadhyaya, A.; Thornton, K.; Good, B. Breed Differences in Humoral and Cellular Responses of Lambs to Experimental Infection with the Gastrointestinal Nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Res.* **2015**, *46*, 1–9, doi:10.1186/s13567-014-0137-0.
302. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 313–323, doi:10.1038/nri2515.
303. Jenkins, T.P.; Rathnayaka, Y.; Perera, P.K.; Peachey, L.E.; Nolan, M.J.; Krause, L.; Rajakaruna, R.S.; Cantacessi, C. Infections by Human Gastrointestinal Helminths Are Associated with Changes in Faecal Microbiota Diversity and Composition. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–18, doi:10.1371/journal.pone.0184719.
304. Liu, F.; Xie, Y.; Zajac, A.M.; Hu, Y.; Aroian, R. V.; Urban, J.F.; Li, R.W. Gut Microbial Signatures Associated with Moxidectin Treatment Efficacy of *Haemonchus contortus* in Infected Goats. *Vet. Microbiol.* **2020**, *242*, doi:10.1016/j.vetmic.2020.108607.
305. Li, R.W.; Wu, S.; Li, W.; Huang, Y.; Gasbarre, L.C. Metagenome Plasticity of the Bovine Abomasal Microbiota in Immune Animals in Response to *Ostertagia ostertagi* Infection. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0024417.
306. Mckenney, E.A.; Williamson, L.; Yoder, A.D.; Rawls, J.F.; Staci, D.; Parker, W. Alteration of the Rat Cecal Microbiome during Colonization with the Helminth *Hymenolepis diminuta*. *Gut microbes.* **2015**, *6*, 182–193, doi:10.1080/19490976.2015.1047128.
307. Argüello, H.; Estellé, J.; Zaldívar-López, S.; Jiménez-Marín, Á.; Carvajal, A.; López-Bascón, M.A.; Crispie, F.; O'Sullivan, O.; Cotter, P.D.; Priego-Capote, F.; Morera, L.; Garrido, J.J. Early *Salmonella typhimurium* Infection in Pigs Disrupts Microbiome Composition and Functionality Principally at the Ileum Mucosa. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-26083-3.
308. Li, R.W.; Wu, S.; Li, W.; Navarro, K.; Couch, R.D.; Hill, D.; Urban, J.F. Alterations in the Porcine Colon Microbiota Induced by the Gastrointestinal Nematode *Trichuris suis*. *Infect Immun.* **2012**, *80*, 2150–2157, doi:10.1128/IAI.00141-12.
309. Houlden, A.; Hayes, K.S.; Bancroft, A.J.; Worthington, J.J.; Wang, P.; Grecnis, R.K.; Roberts, I.S. Chronic *Trichuris muris* Infection in C57BL/6 Mice Causes Significant Changes in Host Microbiota and Metabolome: Effects Reversed by

Pathogen Clearance. *PLoS ONE* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0125945.

310. Peachey, L.E.; Molena, R.A.; Jenkins, T.P.; Di Cesare, A.; Traversa, D.; Hodgkinson, J.E.; Cantacessi, C. The Relationships between Faecal Egg Counts and Gut Microbial Composition in UK Thoroughbreds Infected by Cyathostomins. *Int. J. Parasitol.* **2018**, *48*, 403–412, doi:10.1016/j.ijpara.2017.11.003.
311. Afrin, T.; Murase, K.; Kounosu, A.; Hunt, V.L.; Bligh, M.; Maeda, Y.; Hino, A.; Maruyama, H.; Tsai, I.J.; Kikuchi, T. Sequential Changes in the Host Gut Microbiota during Infection with the Intestinal Parasitic Nematode *Strongyloides venezuelensis*. *Front. cell. infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.3389/fcimb.2019.00217.
312. Corrêa, P.S.; Mendes, L.W.; Lemos, L.N.; Crouzoulon, P.; Niderkorn, V.; Hoste, H.; Costa-Júnior, L.M.; Tsai, S.M.; Faciola, A.P.; Abdalla, A.L.; et al. Tannin Supplementation Modulates the Composition and Function of Ruminal Microbiome in Lambs Infected with Gastrointestinal Nematodes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2020**, *96*, doi:10.1093/FEMSEC/FIAA024.
313. Jouany, J.P. Conference : Altering Ruminant Nitrogen Metabolism to Improve Protein Utilization Effect of Rumen Protozoa on Nitrogen Utilization by Ruminants. *Nutr.* **1996**, 1335–1346.
314. Gu, Y.Q.; Mo, M.H.; Zhou, J.P.; Zou, C.S.; Zhang, K.Q. Evaluation and Identification of Potential Organic Nematicidal Volatiles from Soil Bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **2007**, *39*, 2567–2575, doi:10.1016/j.soilbio.2007.05.011.
315. Méndez-Santiago, E.W.; Gómez-Rodríguez, O.; Sánchez-Cruz, R.; Folch-Mallol, J.L.; Hernández-Velázquez, V.M.; Villar-Luna, E.; Aguilar-Marcelino, L.; Wong-Villarreal, A. *Serratia* Sp., an Endophyte of Mimosa Pudica Nodules with Nematicidal, Antifungal Activity and Growth-Promoting Characteristics. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 549–559, doi:10.1007/s00203-020-02051-2.
316. Veronico, P.; Gray, L.J.; Jones, J.T.; Bazzicalupo, P.; Arbucci, S.; Cortese, M.R.; Di Vito, M.; De Giorgi, C. Nematode Chitin Synthases: Gene Structure, Expression and Function in *Caenorhabditis elegans* and the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne artiellia*. *Mol. Genet. Genom.* **2001**, *266*, 28–34, doi:10.1007/s004380100513.
317. Walshe, N.; Mulcahy, G.; Crispie, F.; Cabrera-Rubio, R.; Cotter, P.; Jahns, H.; Duggan, V. Outbreak of Acute Larval Cyathostomiasis – A “Perfect Storm” of Inflammation and Dysbiosis. *EVJ.* **2021**, *53*, 727–739, doi:10.1111/evj.13350.
318. Maeda, H.; Fujimoto, C.; Haruki, Y.; Maeda, T.; Koikeguchi, S.; Petelin, M.; Arai, H.; Tanimoto, I.; Nishimura, F.; Takashiba, S. Quantitative Real-Time PCR Using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, TetQ Gene and Total Bacteria. *FEMS Microbiol. Immunol.* **2003**, *39*, 81–86, doi:10.1016/S0928-8244(03)00224-4.
319. Ombrello, A.K. Dada2. *Encyclopedia of Medical Immunology* **2020**, *13*, 1–7, doi:10.1007/978-1-4614-9209-2_118-1.
320. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved

- Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 590–596, doi:10.1093/nar/gks1219.
321. Roeber, F.; Jex, A.R.; Gasser, R.B. Impact of Gastrointestinal Parasitic Nematodes of Sheep, and the Role of Advanced Molecular Tools for Exploring Epidemiology and Drug Resistance - An Australian Perspective. *Parasites Vectors.* **2013**, *6*, 1–13, doi:10.1186/1756-3305-6-153.
322. Stear, M.J.; Mitchell, S.; Strain, S.; Bishop, S.C.; Mckellar, Q.A. The Influence of Age on the Variation among Sheep in Susceptibility to Natural Nematode Infection. *Vet. Parasitol.* **2000**, *89*, 31–36.
323. Barbosa Toscano, J.H.; Okino, C.H.; Barbosa dos Santos, I.; Giraldeho, L.A.; Borsch von Haehling, M.; Novita Esteves, S.; Bassetto, C.C.; Talamini do Amarante, A.F.; de Souza Chagas, A.C. Local and Systemic Immune Mediators of Morada Nova Lambs with Divergent *Haemonchus contortus* Resistance Phenotypes. *Parasite Immunol.* **2020**, *42*, 1–10, doi:10.1111/pim.12790.
324. Figueroa Castillo, J.A.; Medina, R.D.M.; Villalobos, J.M.B.; Gayosso-Vázquez, A.; Ulloa-Arvizu, R.; Rodríguez, R.A.; Ramírez, H.P.; Alonso Morales, R.A. Association between Major Histocompatibility Complex Microsatellites, Fecal Egg Count, Blood Packed Cell Volume and Blood Eosinophilia in Pelibuey Sheep Infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **2011**, *177*, 339–344, doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.056.
325. Gill, H.S.; Watson, D.L.; Brandon, M.R. Monoclonal Antibody to CD4⁺ T Cells Abrogates Genetic Resistance to *Haemonchus contortus* in Sheep. *Immunol.* **1993**, *78*, 43–49.
326. Peña, M.T.; Miller, J.E.; Horohov, D.W. Effect of CD4⁺ T Lymphocyte Depletion on Resistance of Gulf Coast Native Lambs to *Haemonchus contortus* Infection. *Vet. Parasitol.* **2006**, *138*, 240–246, doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.026.
327. Balic, A.; Bowles, V.M.; Meeusen, E.N.T. Mechanisms of Immunity to *Haemonchus contortus* Infection in Sheep. *Parasite Immunol.* **2002**, *24*, 39–46, doi:10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x.
328. Bao, S.; McClure, S.J.; Emery, D.L.; Husband, A.J. Interleukin-5 mRNA Expressed by Eosinophils and Gamma/Delta T Cells in Parasite Immune Sheep. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 552–556.
329. Brandtzaeg, P.; Halstensen, T.S.; Kett, K.; Krajči, P.; Kvale, D.; Rognum, T.O.; Scott, H.; Sollid, L.M. Immunobiology and Immunopathology of Human Gut Mucosa: Humoral Immunity and Intraepithelial Lymphocytes. *J. Gastroenterol.* **1989**, *97*, 1562–1584, doi:10.1016/0016-5085(89)90406-X.
330. Muñoz-Guzmán, M.A.; Cuéllar-Ordaz, J.A.; Valdivia-Anda, A.G.; Buendía-Jiménez, J.A.; Alba-Hurtado, F. Correlation of Parasitological and Immunological Parameters in Sheep with High and Low Resistance to Haemonchosis. *Can. J. Anim. Sci.* **2006**, *86*, 363–371, doi:10.4141/A06-010.
331. McKenna, P.B. The Diagnostic Value and Interpretation of Faecal Egg Counts in Sheep. *NZVJ.* **1981**, *29*, 129–132, doi:10.1080/00480169.1981.34821.

332. Ellis, S.; Matthews, J.B.; Shaw, D.J.; Paterson, S.; McWilliam, H.E.G.; Inglis, N.F.; Nisbet, A.J. Ovine IgA-Reactive Proteins from *Teladorsagia circumcincta* Infective Larvae. *Int. J. Parasitol.* **2014**, *44*, 743–750, doi:10.1016/j.ijpara.2014.05.007.
333. Hodžić, A.; Dheilly, N.M.; Cabezas-Cruz, A.; Berry, D. The Helminth Holobiont: A Multidimensional Host–Parasite–Microbiota Interaction. *Trends Parasitol.* **2023**, *39*, 91–100, doi:10.1016/j.pt.2022.11.012.
334. Cortés, A.; Toledo, R.; Cantacessi, C. Classic Models for New Perspectives: Delving into Helminth–Microbiota–Immune System Interactions. *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 640–654, doi:10.1016/j.pt.2018.05.009.
335. Xiang, H.; Fang, Y.; Tan, Z.; Zhong, R. *Haemonchus contortus* Infection Alters Gastrointestinal Microbial Community Composition, Protein Digestion and Amino Acid Allocations in Lambs. *Front Microbiol.* **2022**, *12*, 1–15, doi:10.3389/fmicb.2021.797746.
336. Säemann, M.D.; Böhmig, G.A.; Österreicher, C.H.; Burtscher, H.; Parolini, O.; Diakos, C.; Stöckl, J.; Hörl, W.H.; Zlabinger, G.J. Anti-inflammatory Effects of Sodium Butyrate on Human Monocytes: Potent Inhibition of IL-12 and Up-regulation of IL-10 Production. *FASEB J.* **2000**, *14*, 2380–2382, doi:10.1096/fj.00-0359fje.
337. Cortés, A.; Peachey, L.; Scotti, R.; Jenkins, T.P.; Cantacessi, C. Helminth-Microbiota Cross-Talk – A Journey through the Vertebrate Digestive System. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2019**, *233*, doi:10.1016/j.molbiopara.2019.111222.
338. Lopetuso, L.R.; Scaldaferrri, F.; Petito, V.; Gasbarrini, A. Commensal Clostridia: Leading Players in the Maintenance of Gut Homeostasis. *Gut Pathog.* **2013**, *5*, 1–8, doi:10.1186/1757-4749-5-23.
339. Hutkins, R.W.; Krumbeck, J.A.; Bindels, L.B.; Cani, P.D.; Fahey, G.; Goh, Y.J.; Hamaker, B.; Martens, E.C.; Mills, D.A.; Rastal, R.A.; Vaughan, E.; Sander, M.E. Prebiotics: Why Definitions Matter. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 1–7, doi:10.1016/j.copbio.2015.09.001.