DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL FACULTAD DE VETERINARIA UNIVERSIDAD DE LEÓN



PARANFISTOMOSIS BOVINA POR Calicophoron daubneyi EN EL NOROESTE DE CASTILLA Y LEÓN: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO, LESIONAL Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA LOCAL

Bovine Paramphistomosis by *Calicophoron daubneyi* in the Northwest of Castilla and León: a study of the epidemiological, pathological and local immune response

MEMORIA PRESENTADA POR D. MIGUEL FUERTES FRANCO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE LÉON

León, 2015

La realización de este estudio ha sido posible gracias a la financiación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León a través del proyecto de investigación referencia nº: LE023A10-2, titulado "Paranfistomosis natural y experimental en rumiantes. Caracterización de la respuesta inmune".

"XV solidos (...) duos boves cum suo loramne et cum suo karro." -Becerro de Sahagún. Año 877-

> A mis padres. A mi hermana. A Olaya y a Martín.

Agradecimientos

Finalizado este trabajo, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de los estudios expuestos en esta memoria.

En primer lugar, a las Directoras de esta tesis doctoral: Dra. D^a Yolanda Manga González, Dra. D^a Camino González Lanza y Dra. D^a Carmen Ferreras Estrada. Porque sin ellas este trabajo de tesis doctoral no habría sido posible, desde su concepción hasta su conclusión. Por haber confiado en mí. Y porque son un verdadero ejemplo de vocación, profesionalidad y dedicación a la Ciencia.

A "Embutidos Carracedo Llamas", en especial a su director técnico José Luis Carracedo, y a los inspectores veterinarios del citado matadero, Bernardino Prieto, Blanca Esther Postigo y Néstor Aller, por su desinteresada e inestimable cooperación en la toma de muestras de este trabajo. A los trabajadores del Matadero, sobre todo a los operarios de la zona de mondonguería, porque sin su ayuda y buena disposición en todo momento, el tamaño de la muestra poblacional habría sido mucho menor.

A los veterinarios de los Servicios Veterinarios Oficiales de la Unidad de León, Emilio Sevillano y Alfonso Sánchez Pedreira por facilitarnos el acceso a la información relativa a la trazabilidad de los animales.

A los técnicos de laboratorio del Departamento de Sanidad Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Carmen Espiniella, Mª Paz del Pozo, Mª Luz Carcedo y Gloria Belver, por su laborioso procesado de las muestras empleadas en este trabajo.

A los compañeros del grupo SALUVET de la Universidad Complutense de Madrid, dirigidos por el Dr. Ortega Mora, por la realización de las técnicas moleculares para la valoración de la expresión génica de las citoquinas y su análisis estadístico.

Al Dr. Giráldez (CSIC-ULE) por la realización e interpretación, siempre de manera didáctica, de los estudios estadísticos.

A la Dra. Elguezabal (Neiker-Tecnalia) y al Dr. Dagleish (Moredun Research Institute) por su revisión crítica de la redacción en lengua inglesa de los artículos componentes de este trabajo.

A todos los que, de una u otra manera, han colaborado en llegar a este momento.

Finalmente, a todos los ganaderos de vacuno porque sin ellos este trabajo carecería de sentido. Ellos continúan resistiendo, a pesar de todas las adversidades, en esta tierra que languidece a la espera de volver a rugir, aunque sea por una última vez.

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	. 11
3.1. Etiología	. 13
3.1.1. Clasificación taxonómica de los paramphistomoidea	13
3.1.2. El género <i>Calicophoron</i> Näsmark. 1937	18
3.1.2.1. Características morfológicas de <i>Calicophoron daubneyi</i>	19
3.1.2.2. Características moleculares de Calicophoron daubneyi	20
3.2. Epidemiología	. 20
3.2.1. Ciclo biológico de los Paranfistómidos	20
3.2.2. Distribución y prevalencia	23
3.2.2.1. Factores que influyen en la distribución y prevalencia de la infección	24
2.2 Datagonia	27
	. 27
3.3.1. Factores de patogenicidad de los paranfistómidos	27
3.3.1.1. Factores físicos	27
3.3.1.2. Factores químicos	27
3.3.2. Patogenia y clínica asociadas a las formas juveniles de paranfistómidos	29
3.3.3. Patogenia y clínica asociada a las formas adultas de paranfistómidos	30
3.4. Respuesta inmunitaria del hospedador	. 30
3.4.1. Respuesta inmunitaria innata	31
3.4.2. Respuesta inmunitaria adaptativa	32
3.4.3. Presentación de los antígenos parasitarios e inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa	33
3.4.4. La polarización Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria	34
3.4.4.1. Mediadores de la respuesta inmunitaria Th1 y Th2	35
3.4.5. Efectores de la respuesta inmunitaria en las parasitosis	36
3.4.5.1. Eosinotilos	36
3.4.5.2. Midstocitos alphularos intraonitolialos	37 20
3 4 5 4 Células reguladoras: los macrófagos alternativamente activados (AAM)	30 38
3.4.5.5. Células reguladoras: los linfocitos T reguladores (Treg)	39
3.4.5.6. Células reguladoras: los linfocitos B reguladores (Breg)	40
3.4.5.7. Anticuerpos	40
3.5. Lesiones	. 41
3 5 1 Lesiones macroscónicas	42
3.5.1.1. Lesiones macroscópicas asociadas a formas juveniles de paranfistómidos	42
3.5.1.2. Lesiones macroscópicas asociadas a formas adultas de paranfistómidos	42
3.5.2. Lesiones microscópicas	43
3.5.2.1. Lesiones microscópicas asociadas a formas juveniles de paranfistómidos	43
3.5.2.2. Lesiones microscópicas asociadas a formas adultas de paranfistómidos	44
3.6. Diagnóstico	. 44
3.6.1. Diagnóstico clínico	44
3.6.2. Estudios coprológicos	45
3.6.3. Inmunodiagnóstico	46
3.6.4. Diagnóstico morfológico del parásito	47
3.6.5. Diagnóstico molecular	47

4. PRIMER TRABAJO	
4.1. Calicophoron daubneyi (Paramphistomidae) in slaughtered ca	ttle in
Castilla y León (Spain)	51
4.1.1. Abstract	
4.1.2. Introduction	
4.1.3. Materials and methods	
4.1.3.1. Animals	52
4.1.3.2. Sampling	53
4.1.3.3. Parasite count and identification	
4.1.3.4. Statistical analysis	
4.1.4. Results	
4.1.4.1. Parasite identification	
4.1.4.2. Epidemiological maings	
4.1.5. Discussion	
4.1.6. Competing interests	
4.1.7. Acknowledgements	
4.1.8. References	57
5. SEGUNDO TRABAJO	61
E 1. Dethological changes in estile network infected by Colicente	r.o. 19
5.1. Pathological changes in cattle naturally infected by <i>Calicophol</i>	ron
daubneyi adult flukes	63
511 Abstract	63
5.1.2 Introduction	
5.1.3. Materials and methods	
5.1.3.1. Pathological studies	65
5.1.3.2. Statistical analysis	65
5.1.4. Results	
5.1.4.1. Gross pathology	66
5.1.4.2. Histopathological changes	67
5.1.5. Discussion	
5.1.6. Competing interests	
5.1.7. Acknowledgements	76
5.1.0. References	
6 TERCER TRABAIO	81
6.1. Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the	e local
immune response in cattle naturally infected with Calicophoron da	ubneyi. 83
	2
6.1.1. Abstract	
6.1.2. Introduction	
6.1.3. Materials and methods	85 05
6.1.3.1. Sampling	80 85
6.1.3.3. Quantification of cytokine mRNA expression levels in the rumen	85 86
6.1.3.4. Statistical analysis	
6.1.4. Results	
6.1.4.1. Immunohistochemical findings	
6.1.4.2. Cytokine mRNA expression levels in the ruminal tissues	
6.1.5. Discussion	91
6.1.6. Competing interests	94

6.1.7. Acknowledgements 6.1.8. References	94 94
7. DISCUSIÓN	
8. CONCLUSIONES	115
9. RESUMEN	119
10. SUMMARY	125
11. BIBLIOGRAFÍA	131
12. ANEXO DE PUBLICACIONES	154

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

AAM: alternatively activated macrophages o macrófagos alternativamente activados.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico.

Breg: (linfocito) B regulador.

CAM: classically activated macrophages o macrófagos clásicamente activados.

CPA: célula presentadora de antígenos.

DC: dendritic cell o célula dendrítica.

E/S: (productos de) excreción/secreción.

IFN-γ: interferón gamma.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleucina.

iNOS: *induced nitric oxide synthase* u óxido nítrico sintasa inducible.

ITS-2: *internal transcribed spacer* 2 o espaciador interno transcrito 2.

MHCII: *major histocompatibility complex II* o complejo mayor de histocompatibilidad tipo II.

NO: óxido nítrico.

PAMPs: *pathogen associated molecular patterns* o patrones moleculares asociados al patógeno.

PCR: polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

PRR: *pathogen recognition receptors* o receptores de reconocimiento de patógenos.

RELM-α: molécula "*resistin-like*" alfa.

RELM-β: molécula "*resistin-like*" beta.

RT-qPCR: reverse transcryptase quantitative polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa cuantitiva con transcriptasa inversa.

TCR: T cell receptor o receptor de los linfocitos T.

TGF-β: *transforming growth factor beta* o factor de crecimiento transformante beta.

Th: (linfocito) T colaborador o cooperador.

TNF-\alpha: *tumoral necrosis factor* α o factor de necrosis tumoral alfa.

TNF-\beta: *tumoral necrosis factor* β o factor de necrosis tumoral beta.

Treg: (linfocito) T regulador.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las paranfistomosis son parasitosis causadas por diferentes especies de trematodos (Digenea), pertenecientes al infraorden Paramphistomoidea, según Gibson (2000-2015), y a la familia Paramphistomidae Fischoeder, 1901. En dicha familia están incluidas las principales especies que poseen interés en medicina veterinaria, tales como: *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790); *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) y *Cotylophoron cotyloforum* (Fischoeder, *1901)*, entre otras. Estos parásitos viven principalmente en el aparato gastrointestinal y, ocasionalmente, en el hígado de los rumiantes domésticos y salvajes, que actúan como hospedadores definitivos (Muro & Ramajo, 1999; Tandom *et al.*, 2014).

Los trematodos que causan paranfistomosis en los rumiantes tienen un ciclo biológico indirecto (Dinnik, 1962; Manga-González, 1999), en el que participan, como hospedadores intermediarios, moluscos dulceacuícolas (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora) pertenecientes, principalmente, a las familias Planorbidae (Géneros: Anisus, Bulinus y Planorbis) y Lymnaeidae (Género Galba). Los trematodos adultos ponen huevos no embrionados en el rumen, que son excretados al medio ambiente a través de las heces de los hospedadores definitivos. Posteriormente, si las condiciones ambientales son propicias, en el interior del huevo se desarrolla el miracidio, fase ciliada que queda libre al eclosionar aquel. En este estado el parásito es muy poco resistente, por lo que necesita penetrar cuanto antes en el molusco, hospedador intermediario. En el interior del mismo, el parásito se multiplica asexualmente numerosas veces y prosigue su desarrollo larvario pasando por los estadios de esporocisto y redia madre, en cuyo interior se forman las cercarias y, a veces, redias hijas. Cuando las cercarias (de tipo anfistoma) están maduras abandonan el caracol, pierden la cola y se enquistan, primordialmente en la vegetación circundante o en la superficie del agua, transformándose en un quiste resistente denominado metacercaria. El ciclo continúa cuando el hospedador definitivo ingiere pasto o agua contaminados por las metacercarias, estado ya infectante para el hospedador definitivo. Una vez dentro de este, las metacercarias se fijan a la mucosa del duodeno, se desenguistan y migran, a través del abomaso, hacia el rumen y retículo para fijarse a su mucosa. En esta localización se convierten en parásitos adultos, que cuando maduran, ponen huevos no embrionados, completándose así el ciclo biológico.

Aunque se considera que la paranfistomosis es una enfermedad con escasos efectos patógenos en Europa (Rieu *et al.*, 2007), cada cierto tiempo se describen, tanto en ganado ovino como bovino, cuadros clínicos de apatía, diarrea sanguinolenta, deshidratación e incluso muerte (Toledo *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2012; Millar *et al.*, 2012). Esta sintomatología se asocia a la duodenitis hemorrágica originada por la migración de las formas juveniles de anfistómidos en infecciones masivas. Por lo que se refiere a los parásitos adultos, no existe aún acuerdo sobre sus posibles efectos patógenos para el hospedador definitivo (Sánchez *et al.*, 2009), aunque se han señalado efectos adversos como la pérdida de peso y descenso de la producción de leche en bovinos (Foster *et al.*, 2008).

En los últimos años se ha observado un incremento de la prevalencia de la paranfistomosis, posiblemente asociado, junto con otros factores, al control efectivo que se viene realizando de la fasciolosis. La disminución de la prevalencia de *Fasciola hepatica* facilita, al no existir competencia entre las formas larvarias de los trematodos, que los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios puedan ser infectados por miracidios de paranfistómidos (Mage *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2014).

Los recientes estudios sobre la importancia clínica de la paranfistomosis, que sugieren que esta patología debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de los procesos entéricos en bovinos (Murphy *et al.*, 2008), sus efectos adversos en la producción (Dorchies *et al.*, 2002), así como el incremento en la prevalencia de esta enfermedad (González-Warleta *et al.*, 2013), hacen que la paranfistomosis cobre importancia como proceso patológico y requiera investigaciones en el campo de la epidemiología y la patología.

La paranfistomosis, como se ha indicado, es una infección de distribución mundial con áreas endémicas en las regiones tropicales y subtropicales (Tandom *et al.*, 2014). En Europa Occidental y la Cuenca Mediterránea, las prevalencias de esta parasitosis en ganado bovino varían entre el 1,2% encontrado en ciertas regiones de Argelia (Titi *et al.*, 2010) y el 52% de Irlanda (Toolan *et al.*, 2015). Varios estudios epidemiológicos han demostrado que en este área geográfica los valores de prevalencia de la paranfistomosis se han incrementado considerablemente (Mage *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2014). En España, se ha constatado la presencia de paranfistómidos en ganado vacuno y poblaciones de ciervos silvestres de la provincia de Salamanca (Ramajo-Martín, 1992; Ramajo-Martín *et al.*, 2007). Los estudios epidemiológicos existentes destinados a determinar la prevalencia de la paranfistomosis bovina en España son escasos y están circunscritos principalmente al área de Galicia,

donde las investigaciones realizadas en matadero muestran unas incidencias variables entre el 12% (Arias *et al.*, 2011) y el 18,8% (González-Warleta *et al.*, 2013).

Como se ha comentado previamente, el ciclo biológico de estos trematodos se completa al ingerir el hospedador definitivo las metacercarias presentes en los pastos y el agua. En otras trematodosis, como la fasciolosis, se ha puesto de manifiesto la importancia del régimen de explotación de los animales sobre la prevalencia de la infección (Bennema *et al.*, 2011), ya que este determina el acceso que tienen los animales a las fuentes de infección. Además, existen factores endógenos del hospedador definitivo que condicionan su respuesta, innata y adaptativa, frente a la infección parasitaria (Ortega-Mora & Rojo-Vázquez, 1999), tales como: edad, sexo, constitución genética y estado fisiológico, entre otros.

Al tratarse de una parasitosis de distribución mundial, las especies causantes de la paranfistomosis varían ampliamente en función de la región geográfica que se estudie. En Europa Occidental y las áreas de la Cuenca Mediterránea, donde se han llevado a cabo estudios sistemáticos, el único agente etiológico observado en la paranfistomosis es *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) (Silvestre *et al.*, 2000; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Titi *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2013). En España existen referencias de la presencia de *Paramphistomum cervi* en ganado bovino y ciervos (Ramajo-Martín, 1992; Ramajo-Martín *et al.*, 2007). Sin embargo, en los estudios desarrollados en Galicia, tanto en ganado bovino (Diaz *et al.*, 2006, 2007a, 2007b; González-Warleta *et al.*, 2013), como en el molusco *Galba truncatula* (Müller, 1774) hospedador intermediario (Manga-González *et al.* 2009, Martínez-Ibeas *et al.*, 2013), la única especie de paranfistómidos detectada fue *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962).

Los estudios sobre las lesiones asociadas a la paranfistomosis natural son escasos. Frecuentemente, incluso en estudios experimentales, sólo se han valorado los efectos que sobre el hospedador definitivo ejercen las migraciones de las formas inmaduras, desde el intestino delgado hacia los preestómagos (Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005). En ellos se describe una duodenitis caracterizada por la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por células mononucleares y eosinófilos, junto con la hiperplasia de las glándulas de Brunner que persiste aún después de la migración del parásito al rumen y retículo. La frecuencia y significación de las lesiones que los trematodos adultos pueden ocasionar todavía no están definidas (Toledo *et al.*, 2006). La mayoría de los autores señalan que las formas adultas son relativamente inocuas (Brown *et al.*, 2007), si bien, en infecciones experimentales, se ha puesto en evidencia la capacidad del parásito para producir atrofia y cornificación de

las papilas ruminales (Rolfe *et al.*, 1994), y una reacción inflamatoria leve en el rumen (Mavenyengwa *et al.*, 2008).

Por otra parte, no se conocen los inmunofenotipos celulares que aparecen en la respuesta inmunitaria local producida por los paranfistómidos. En otras trematodosis, tales como, esquistosomosis, fasciolosis y dicroceliosis, se ha descrito un infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia de una población mixta de linfocitos T, en su mayoría T colaboradores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+), y linfocitos B, junto con macrófagos, leucocitos globulares, eosinófilos y células plasmáticas (Ferreras *et al.*, 2000, 2007; Pérez *et al.*, 2002; Molina & Skerrat, 2005; Zafra *et al.*, 2009).

Los hospedadores definitivos son capaces de desarrollar mecanismos de inmunidad adquirida frente a los parásitos mediados por los linfocitos T colaboradores (Th). Esta inmunidad puede estar polarizada hacia una reacción proinflamatoria (Th1) o inmunomoduladora (Th2). Así, se considera que los parásitos intracelulares desencadenan una respuesta Th1 caracterizada por la producción de mediadores proinflamatorios, tales como la IL-12 y el IFN-γ, mientras en el caso de los parásitos extracelulares, el perfil de citoquinas es Th2: IL-4, IL-5, IL-10. Sin embargo, esta polarización puede variar a lo largo del ciclo biológico e inclinarse hacia una respuesta proinflamatoria, moduladora o ambas, según el estadio de desarrollo y localización del parásito (Clery *et al.*, 1996; Jankovic *et al.*, 2001; McWilliam *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, y ante la falta de estudios sobre la paranfistomosis bovina en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, nos propusimos alcanzar los siguientes **objetivos**:

19 Estudio de la prevalencia de la paranfistomosis, en condiciones naturales, en ganado bovino del área geográfica de León y provincias limítrofes, mediante el examen de las distintas partes del rumen y retículo de animales sacrificados en un matadero de León, la extracción y el recuento de los paranfistómidos hallados en cada uno de los animales infectados.

29 Estudio de la influencia de los factores exógenos, como el sistema de explotación, y endógenos, tales como edad, sexo y raza, en la prevalencia y la carga parasitaria de la paranfistomosis bovina en condiciones naturales.

39 Identificación genérica y especifica de los trematodos responsables de la paranfistomosis natural bovina en el área geográfica de estudio, mediante técnicas morfológicas y moleculares.

49 Evaluación y caracterización de las alteraciones macroscópicas e histológicas en casos naturales de paranfistomosis bovina y su relación con la carga parasitaria.

8

5% Estudio inmunofenotípico de las células implicadas en la respuesta inmunitaria local, producida por los paranfistómidos en la mucosa de los preestómagos de bovinos en infecciones naturales.

6% Análisis del perfil de expresión génica local de tres citoquinas en la mucosa del rumen de bovinos, para establecer el tipo de respuesta inmunitaria desarrollada frente a la presencia de paranfistómidos en infecciones naturales.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Etiología

Los Paramphistomoidea Fischoeder, 1901 (Tabla 1) son un grupo de trematodos (Digenea), de tamaño variable de 3 a 20 mm (según la familia, género o especie de que se trate), de color generalmente rosado, forma alargada, cónica o cilíndrica y algo aplanada dorso-ventralmente. Con frecuencia existen papilas tegumentarias, aunque el tegumento nunca tiene espinas. Muestran como característica común y diferencial, respecto a otros platelmintos, la disposición de la ventosa ventral, denominada acetábulo, en el extremo posterior del cuerpo o próximo al mismo, es decir, en el opuesto a aquel en el que se sitúa la boca, que está desprovista de ventosa oral. La faringe puede tener o no sacos faríngeos. El esófago con o sin bulbo esofágico. El intestino se bifurca en la parte anterior del cuerpo en dos ciegos, que se extienden hacia la parte posterior. Estos parásitos poseen dos testículos (excepcionalmente uno) que por lo general se sitúan entre los ciegos. El ovario es generalmente postesticular y la glándula de Mehlis está próxima al mismo. El útero normalmente está situado entre los ciegos, en la parte dorsal de los testículos. Las glándulas vitelógenas, por lo general foliculares, se extienden lateralmente con una longitud variable. Una descripción detallada con dibujos y fotos de ejemplares pertenecientes a las distintas, familias, géneros y especies de Paramphistomoidea pueden consultarse en las publicaciones de Näsmark (1937), Eduardo (1983, 1985), Jones (2005) y Tandon et al (2014), entre otras.

Poco se conoce de la biología nutricional de estos trematodos. Se supone que la absorción de nutrientes se realiza, a través del tegumento o mediante su aparato digestivo, captando los presentes en el contenido rumino-reticular como ya se ha señalado para otros parásitos (Muro & Ramajo, 1999) aunque también se han constatado la ingesta de células del epitelio y otros tejidos del hospedador en los ciegos de estos trematodos (Rieu, 2004; Millar *et al.*, 2012), e incluso, aunque de manera secundaria, sangre durante las fases juveniles (Alzieu & Dorchies, 2007). Algunos miembros del género *Paramphistomum* presentan la peculiaridad, a diferencia de otros helmintos, de ser capaces de sintetizar lípidos complejos usando sustratos endógenos. Así, producen fosfolípidos utilizando glucosa y acetato, lípidos neutros, al incorporar ácido oleico y palmítico, y colesterol de manera independiente (Muro & Ramajo, 1999, Ghosh & Misra, 2011).

3.1.1. Clasificación taxonómica de los paramphistomoidea

Näsmark realizó en 1937 un exhaustivo y extenso estudio de la familia Paramphistomidae Fischoeder, 1907, revisando abundante material guardado en numerosas colecciones helmintológicas, conservadas tanto en museos como en colecciones privadas. Estudió 2030 preparaciones de dichos parásitos, lo que le permitió observar que el acetábulo, la faringe y el atrio genital aportaban buenas posibilidades para distinguir importantes hechos anatómicos de estos parásitos. Basado en estos tres órganos, el autor pudo confirmar la exactitud de las descripciones realizadas por Fischoeder (1901-1904), así como los errores en las sinonimizaciones llevadas a cabo por varios autores (Maplestone, 1923; Fukui, 1929; Travassos, 1934). En su extenso estudio –constituido por una detallada descripción de las especies, acompañada de numerosos dibujos (104 figuras) y 13 láminas que contenían hasta 18 fotografías cada una de ellas– Näsmark (1937) distinguió 14 subfamilias, con sus respectivos géneros y especies. Algunos de dichos taxones fueron nuevos para la Ciencia, es el caso del género *Calicophoron* Näsmark, 1937, objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

Durante el siglo pasado y en el actual se han realizado numerosas propuestas para la clarificación taxonómica de los Paramphistomoidea Fischoeder, 1901, taxón que algunos autores, como Sey (1988, 1991), Jones (2005) y Tandon *et al* (2014) denominan "Superfamilia", mientras que Gibson (2013), en Fauna Europaea, denomina "Infraorden" (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las principales familias, géneros y especies de trematodos

Tabla 1 (cont.)

Género: Diplodiscus Diesing, 1836 Especie: D. subclavatus (Pallas, 1760) Familia: GASTRODISCIDAE Monticelli, 1892 Género: Gastrodiscoides Leiper, 1913 Especie: G. hominis (Lewis & McConnall, 1876) Familia: GASTROTHYLACIDAE Stiles & Goldberger, 1910 Género: Carmyerius Stiles & Goldberger, 1910 Especie: C. gregarius (Loos, 1896) Género: Fichoederius Stiles & Goldberger, 1910 Especie: F. elongatus (Poirier, 1883) Especie: F. skrjabini Kadenatsii, 1963 Género: Gastrothylax Poirier, 1883 Especie: G. crumenifer (Creplin, 1847) Género: Velasquezotrema Eduardo & Javellana, 1987 Especie: V. brevisaccum (Eduardo, 1981) Familia: OLVERIIDAE Yamaguti, 1958 Género: Olveria Thapar & Sinha, 1945 Especie: O. indica Thapar & Sinha, 1945. Familia: PARAMPHISTOMIDAE Fischoeder, 1901 Subfamilia: Paramphistominae Fischoeder, 1901 Género: Calicophoron Näsmark, 1937 Especie: C. daubneyi (Dinnik, 1962) Especie: C. microbothrioides (Price & McIntosh, 1949) Especie: C. microbothrium (Fischoeder, 1901) Género: Cotylophoron Stiles & Goldberger, 1910 Especie: C. cotylophorum (Fischoeder, 1901) Género: Explanatum Fukusi, 1929 Especie: E. explanatum (Creplin, 1847) Género: Gygantocotyle Näsmark, 1937 Especie: G. gigantocotyle (Brandes & Otto, 1896) Género: Paramphistomum Fischoeder, 1901 Especie: P. cervi (Zeder, 1790) Especie: P. gotoi Fukui, 1922 Especie: P. hiberniae Willmott, 1950 Especie: P. ichikawai Fukui, 1929 Especie: P. leydeni Näsmark, 1937 Género: Ugantocotyle Näsmark, 1937 Especie: U. pisum (Leiper, 1910)

Tabla 1 (cont.)

Subfamilia: Orthocoeliinae Price & McIntosh, 1953						
Género: Bilatorchis Eduardo, 1980						
Especie: B. papillogenitalis Eduardo, 1980						
Género: Buxifrons Fukui, 1929						
Especie: B. buxifrons (Leiper, 1919)						
Género: Gemellicotyle Prudhoe, 1975						
Especie: G. wallabicola Prudhoe, 1975						
Género: Gygantoatrium Yamaguti, 1958						
Especie: G. gigantoatrium (Näsmark, 1937)						
Género: Glyptamphistoma Yamaguti, 1958						
Especie: G. paradoxum (Näsmark, 1937)						
Género: Leiperocotyle Eduardo, 1980						
Especie: L. okapi (Leiper, 1935)						
Género: Nilocotyle Näsmark, 1937						
Especie: N. pygmaea Näsmark, 1937						
Género: Orthocoelium Stiles & Goldberger, 1910						
Especie: O. orthocoelium (Fischoeder, 1901)						
Género: Platyamphistoma Yamaguti, 1958						
Especie: P. polycladiforme (Näsmark, 1937)						
Familia: STEPHANOPHARYNGIDAE Stiles & Goldberger, 1910						
Género: Stephanoplarynx Fischoeder, 1901						
Especie: S. compactus Fischoeder, 1901						
Familia: ZONOCOTYLIDAE Yamaguti, 1963						
Género: Zonocotyle Stunkard, 1916						
Especie: Z. bicaecata Travassos, 1947						
Familia: ZYGOCOTYLIDAE Ward, 1917						
Género: Zygocotyle Stunkard, 1916						
Especie: Z. ceratosa Stunkard, 1916						
Género: Wardius Barrer & East, 1915						
Especie: W. zibethicus Barker & East, 1915						

Dentro de los Paramphistomoidea (Tabla 1) son las familias Gastrodiscidae, Gastrothylacidae, Olveriidae, Paramphistomidae y Stephanopharyngidae las que incluyen especies que afectan a los rumiantes. Comentamos a continuación algunos ejemplos. Así, especies del género *Gastrodiscus* infectan el intestino de équidos y bóvidos en Asia, Africa, Australia y Sudamérica. Especies de los géneros *Carmyerius*, *Fichoerius*, *Gastrothylax* y *Velasquezotrema* (Gastrothylidae) parasitan el rumen de bóvidos y cérvidos en África y Asia. *Olveria indica* (Olveriidae) infecta el rumen de bóvidos en India. *Calicophoron calicophorum* (Paramphistomidae) vive en los preestómagos (rumen y retículo) de rumiantes de África, Asia, Australia, América del Norte, América Central y Europa. Cotylophoron cotylophorum (Paramphistomidae) parasita los estómagos de rumiantes y, esporádicamente, los de otros mamíferos en África, América Central, Sudamérica V Asia. Paramphistomum cervi (Paramphistomidae), que infecta los preestómagos de rumiantes, es considerada la especie predominante en el Hemisferio Norte. Asimismo, queremos resaltar que varios géneros de la subfamilia Orthocoeliinae (Paramphistomoidea) infectan el rumen de bóvidos en África, así como el estómago de hipopótamos en África y marsupiales en Australia. Por otra los individuos del género Stephanopharynx parte. (Stephanopharyngidae) parasitan el estómago de rumiantes en África. El género Zygocotyle 1916 (Zygocotylidae) se ha encontrado, en raras ocasiones, infectando cérvidos y bóvidos en Norte América, América Central y Sudamérica.

Además, dentro de los Paramphistomoidea se incluyen otras familias cuyos miembros infectan diversas especies de hospedadores definitivos desde peces de agua dulce y salada hasta el hombre (Tabla 2).

Tabla 2. Principales hospedadores definitivos de trematodos Paramphistomoidea
Información obtenida principalmente del trabajo en Jones (2005).
FAMILIA: CLADORCHIIDAE
Género Cladorchis
C. pyriformis – Parasita el intestino de mamíferos Dasyproctidae y Tapiridae er
Sudamérica
Género: Schizamphistomum
S. scleroporum – Parásito de anfibios y reptiles
FAMILIA: GASTRODISCIDAE
Género: Gastrodiscus
G. aegyptiacus – Parasita el intestino de équidos, bóvidos, elefantes y
rinocerontes en Asia, Africa, Australia y Sudamérica
G. hominis – Parasita el intestino de primates, roedores y artiodáctilos en Asia
FAMILIA: GASTROTHYLACIDAE
Genero: Carmyerius – Parasita el rumen de bovidos y cervidos y el estomago de
hipopotámidos en Africa y Asia
Género: Fichoederius – Parasita el rumen de bóvidos y cérvidos en Africa y Asia
Género: Gastrothylax – Parasita el rumen de bóvidos y cérvidos en Africa, Asia e India
Genero: Velasquezotrema – Parasita el rumen de bovidos en Asia y Filipinas
FAMILIA: OLVERIIDAE
Genero: <i>Olveria</i> – Parasita el rumen de bovidos en India
FAMILIA: PARAMPHISTOMIDAE
SUBFAMILIA: PARAMPHISTOMINAE
Genero: Calicophoron – Parasita el estomago de rumiantes en Africa, Asia
Australia, America del Norte, America Central, America del Sur y Europa
Genero: Coylophoron – Parasita el estomago de rumiantes en Africa, America
del Norte, America Central y Asia
Genero: Explanatum – Parasita los conductos billares e nigado de rumlantes
en Africa, Asia e Indias Occidentales
Genero: Gygantocotyle – Parasita el estomago e intestino de Antiodactilos er
Africa y Asia
Genero: Parampnistomum – Parasita el estomago de rumiantes
preudinimalitemente en el nemisieno nonte Cónero: Urantegotulo - Deregito el estómoro o integtino de hinopótemos es
África
Género: Bilatorchis – Parasita el rumen de bóvidos en África
Género: Buvifrans - Parasita el estómara de hinonótamos en África
Genero. <i>Duxinons</i> – rarasita erestornago de hipopotátilos en Allica

Tabla 2 (cont.)						
Género: Gemellicotyle – Parasita el estómago de marsupiales en Australia						
Género: Gygantoatrium - Parasita el estómago de hipopótamos en África						
Género: Glyptamphistoma – Parasita el estómago de hipopótamos en África						
Género: <i>Leiperocotyle</i> – Parasita el rumen de las jirafas y bóvidos en África						
Género: Nilocotyle – Parasita el estómago de hipopótamos en África						
Género: Orthocoelium - Parasita el rumen de bóvidos y cérvidos en Asia y						
África						
Género: Platyamphistoma – Parasita el estómago de hipopótamos en África						
Familia: STEPHANOPHARYNGIDAE						
Género: Stephanoplarynx – Parasita el estómago de rumiantes en África						
Familia: ZONOCOTYLIDAE						
Género: Zonocotyle – Parasita el intestino de peces de agua dulce en Brasil						
Familia: ZYGOCOTYLIDAE						
Género: Zygocotyle – Parasita, principalmente, el intestino de aves acuáticas						
de varias familias y más raramente mamíferos (cérvidos y bóvidos) en Norte						
América, América Central y Sudamérica						
Género: Wardius – Parasita el intestino de roedores (Cricetidae) en Norte						
América						

3.1.2. El género Calicophoron Näsmark, 1937

Como ya comentamos con anterioridad, a principios del siglo XX, Näsmark (1937) realizó una amplia revisión de la clasificación taxonómica de la familia Paramphistomidae Fischoeder (1907), describiendo como nuevo el género *Calicophoron* Näsmark, 1937, tras el estudio de especímenes hasta ese momento denominados *Paramphistomum calicophorum* Fischoeder, 1901 y *Paramphistomum ijimai* Fukui, 1922. Näsmark, tomando como especie tipo *Calicophoron calicophorum*, incluyó en este nuevo género a especies tales como: *P. crassum* Stiles & Golberger (1910); *P. cauliochis* Stiles & Golberger (1910); *P. papillosum* Stiles & Golberger, 1910 y *P. microon* Railliet, 1924, además de describir una nueva especie, *Calicophoron raja* Näsmark, 1937, procedente de ganado bovino de Sudán. Este nuevo género fue, salvo en escasas excepciones, aceptado por la comunidad científica que siguió describiendo nuevas especies.

Posteriormente, Eduardo (1983) llevó a cabo una revisión crítica del trabajo de Näsmark (1937), como parte de su Tesis Doctoral, llegando a la conclusión de la conveniencia de mantener el género *Calicophoron*, si bien con una redefinición de los criterios establecidos, además de la inclusión de varias especies en él.

El género *Calicophoron* Näsmark, 1937, cuyos taxones superiores pueden consultarse en la Tabla 1, incluye, según Eduardo (1983), las siguientes especies, que afectan principalmente a rumiantes:

- C. calicophorum (Fischoeder, 1901)
- C. bothriophoron (Braun, 1892).
- C. microbotrium (Fischoeder, 1901)

C. papillosum (Stiles & Goldberger, 1910)

C. papilligerum (Stiles & Goldberger, 1910)

C. raja Näsmark, 1937

C. clavula (Näsmark, 1937)

C. microbothioides (Price & McIntosh, 1944)

C. sukari (Dinnik, 1954)

C. phillerouxi (Dinnik, 1961)

C. daubneyi (Dinnik, 1962)

C. sukumum (Dinnik, 1964)

Conviene destacar que *C. daubneyi* es la única especie identificada como causante de paranfistomosis en ganado bovino en Europa (Mage *et al.*, 2002; Rinaldi *et al.* 2005; Gordon *et al.*, 2013) y en España (Diaz *et al*, 2006, 2007a, 2007b; González-Warleta *et al.*, 2013; Martínez-Ibeas *et al.*, 2013).

3.1.2.1. Características morfológicas de Calicophoron daubneyi

La especie *Calicophoron daubneyi* Dinnik, 1962 (Trematoda, Paramphistomidae) fue descrita como nueva para la ciencia por Dinnik (1962), procedente de ganado vacuno de Kenya. Dicho autor incluyó esta nueva especie en el género *Paramphistomum* Fischoeder, 1901. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, Eduardo (1983) decidió que debía incluirse en el género *Calicophoron* Näsmark ,1937. Por tanto la correcta denominación de esta especie sería *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo, 1983, aunque también puede expresarse solo como *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962).

En su amplio trabajo, Eduardo (1983) realiza una descripción morfológica en especímenes procedentes de todo el mundo y de diferentes hospedadores definitivos, estableciendo los parámetros empleados a día de hoy para la identificación de *C. daubneyi*. Esta especie se caracteriza por poseer un cuerpo de forma cónica, de 3,50 a 10,21 mm de longitud y de 2,34 a 4,11 mm de anchura. La superficie de la apertura oral muestra papilas que son de menor tamaño y más dispersas que las de la apertura del acetábulo o ventosa ventral. El acetábulo es de tamaño medio y se dispone subterminalmente, en sentido dorso-ventral. Carece de ventosa genital y la *pars musculosa* se encuentra bien desarrollada.

3.1.2.2. Características moleculares de Calicophoron daubneyi

Para la identificación de las diferentes especies de trematodos se han utilizado, principalmente, técnicas para la valoración de las características morfológicas de los parásitos. Sin embargo, estas técnicas presentan una serie de limitaciones en su empleo. Por un lado, requieren experiencia en la valoración de los parámetros morfológicos (Dorchies, 1989) y, por otro, muestran una escasa sensibilidad principalmente en la identificación de las fases larvarias del parásito (Martínez-Ibeas *et al.,* 2013). Es por ello, en los últimos años, el desarrollo de las técnicas de caracterización molecular ha permitido la generalización de su uso en la identificación de las diferentes especies de trematodos.

Así, varios autores han diseñado técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de la secuencia del segundo espaciador interno transcrito 2 (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr) de los helmintos de la familia Paramphistomidae (Lotfy *et al.*, 2010; Sanabria *et al.*, 2011). Así, se ha logrado conocer la secuencia completa del ITS-2 en *Paramphistomum cervi* (Bazsalovicsová *et al.*, 2010). Este fragmento de ADN nuclear, muy conservado entre especies, es muy útil para la determinación de las divisorias entre los diferentes grupos de trematodos digenea (Nolan & Cribb, 2005).

Siguiendo esta metodología, Rinaldi *et al.* (2005) identificaron la secuencia de nucleótidos del ITS-2 de *C. daubneyi* en especímenes recogidos en el sur de Italia. En sus estudios demostraron la nula variabilidad de este fragmento dentro de la especie, hecho que sí se evidenció al comparar varias especies del mismo género.

Recientemente, las investigaciones llevadas a cabo por Martínez-Ibeas *et al.* (2013) han permitido desarrollar una nueva metodología para la identificación de *C. daubneyi*, utilizando el ADN mitocondrial (ADNmt), en lugar del ADNr que forma parte del material genético del núcleo celular. Esta PCR múltiple fue usada para detectar fases larvarias dentro de los hospedadores intermediarios demostrando una alta sensibilidad como herramienta destinada a estudios epidemiológicos.

3.2. Epidemiología

3.2.1. Ciclo biológico de los Paranfistómidos

Debido a la gran diversidad de familias, subfamilias, géneros y especies incluidas en los Paramphistomoidea (Tabla 1), así como a la amplia variedad de hospedadores, tanto definitivos (Tabla 2) como intermediarios, implicados en su ciclo biológico, nos referiremos, en términos generales al ciclo de los Paranfistómidos, y más concretamente al de *Calicophoron daubneyi*, especie objeto de estudio en la presente memoria.

El ciclo biológico de estos trematodos es indirecto, pues en el intervienen además de vertebrados, que actúan como hospedadores definitivos, diversas especies de moluscos dulceaquícolas (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora) pertenecientes, principalmente, a las familias Lymnaeidae (*Galba truncatula* = Lymnaea) y Planorbidae (Géneros: *Anisus, Bulinus y Planorbis*, entre otros) que actúan como hospedador intermediario (Manga-González 1997, 1999; Manga-González *et al.* 2009; Martínez-Ibeas *et al.*, 2013). Los animales infectados eliminan los huevos no embrionados con las heces al medio ambiente. Estos huevos tienen un tamaño aproximado de 160x90µm, con una cubierta delgada. En el exterior del hospedador, el desarrollo del embrión continúa, si las condiciones ambientales son propicias, liberando posteriormente el miracidio al medio ambiente.

El miracidio nada en el agua y busca de forma activa, probablemente mediante mecanismos de quimiotaxis, a los caracoles acuáticos que actúan como hospedadores intermediarios. Generalmente, son los caracoles jóvenes los más susceptibles a la penetración de esta fase de desarrollo.

Una vez en el interior de los moluscos hospedadores intermediarios, el parásito continúa su evolución hasta esporocisto en el tejido del manto, si bien ocasionalmente esta etapa puede completarse en el aparato digestivo o en el órgano podocefálico. A medida que el esporocisto crece, se va formando en su interior la siguiente fase larvaria, las redias, que son liberadas en los tejidos del caracol. A partir de las células germinales del interior de las redias se desarrollan las cercarias que, tras madurar, salen del caracol por la cavidad pulmonar al medio ambiente acuático. Los caracoles infectados pueden sobrevivir y continuar la liberación de cercarias durante más de un año. Además, se ha demostrado el efecto de factores externos ambientales en la cantidad de cercarias liberadas al medio, de manera que una temperatura media y escasa luminosidad permiten la excreción de un mayor número de parásitos (Rondelaud *et al.,* 2013; Titi *et al.,* 2014). Las cercarias poseen un corto periodo de vida en el medio acuático, de unos minutos a unas pocas horas, por lo que nadan de manera activa hacia la vegetación acuática, donde se enquistan en forma de metacercaria, llegando a sobrevivir viables en este estadio durante periodos de tiempo de más de seis meses.

El hospedador definitivo se infecta al ingerir plantas acuáticas con metacercarias infectantes del parásito a ellas adheridas, o bien al beber agua contaminada con dichas metacercarias. En el hospedador definitivo, las metacercarias se desenquistan en las primeras porciones de su intestino delgado, y se fijan en forma de trematodos juveniles en la mucosa de este órgano. Después de un periodo de tiempo comprendido entre tres y seis semanas, los parásitos migran por la luz del intestino y abomaso, para fijarse en las papilas del rumen y retículo. En esta localización maduran sexualmente y comienza la puesta de huevos, completándose así el ciclo vital (Tandom *et al.*, 2014).

En lo que se refiere a la especie *Calicophoron daubneyi*, conviene recordar que fue descrita como nueva para la ciencia por Dinnik (1962), con el nombre de *Paramphistomum daubneyi*, sobre parásitos adultos recolectados de ganado vacuno (*Bos taurus*) de Kenya, siendo este autor quien completó su ciclo biológico por primera vez, utilizando la especie de molusco *Galba truncatula* (= Lymnaea truncatula; Lymnaeidae). Posteriormente, Eduardo (1983) revisó el género *Paramphistomum* Fischoeder, 1901 y decidió incluir la especie *daubneyi* en el género *Calicophoron* Näsmark, 1937. Además de *Galba truncatula*, Dinnik (1962) probó en el laboratorio especies de otros géneros de moluscos que viven en Kenia (*Bulinus, Physopsis, Physa, Biomphalaria, Anisus*), pero ninguna llegó a infectarse.

Posteriormente, se han realizado diversos estudios en Europa tanto en condiciones naturales como experimentales. Degueurce *et al.* (1999) estudió la prevalencia de infección, tanto en condiciones naturales como experimentales, de *C. daubneyi* y *F. hepatica* en *Lymnaea truncatula*, *Lymnaea palustris*, *Lymnaea ovata* y *Physa acuta* en el este de Francia. Por otra parte, Abrous *et al.* (2000a) estudiaron la producción de redias y cercarias en una infección simple de *G. truncatula* con un miracidio de *C. daubneyi* o *F. hepatica.* Martínez-Ibeas *et al* (2013) realizaron infecciones experimentales simples en *Galba truncatula* con *Calicophoron daubneyi* y *Fasciola hepatica.* Sanabria *et al.* (2012) infectaron *Lymnaea neotropica*, *Lymnaea viatrix* var. *ventricosa* y *G. truncatula* experimentalmente con *C. daubneyi* obteniendo resultados positivos en las 3 especies probadas, aunque el porcentaje más alto de la emisión de cercarias correspondió a *L. viatrix* var. *ventricosa* (91,4%).

Como ya se ha indicado, el ciclo biológico de los paranfistómidos requiere la participación de moluscos dulceacuícolas pertenecientes a las familias Planorbidae y Lymnaeidae (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora) como hospedadores intermediarios.

Al tratarse de parasitosis de distribución mundial, los agentes etiológicos emplean como hospedadores intermediarios una gran variedad de especies de caracol. En Europa únicamente se ha podido identificar *Galba truncatula* (Müller, 1774) como hospedador intermediario dentro del ciclo biológico de *C. daubneyi* (Dinnik, 1962).

El hábitat natural preferido por *Galba truncatula* consiste en medios húmedos con suelos arcillosos, principalmente lisos y firmes: aguas someras de acequias, orillas de cursos fluviales con escasa corriente de agua, charcas primaverales, humedales con abundante vegetación. Además de estos medios naturales, pueden desarrollarse y vivir en pozos y abrevaderos artificiales (Knubber-Schweizer *et al.,* 2015).

Esta especie de caracol también puede participar en el ciclo biológico de otros trematodos tales como *Fasciola hepatica* (Manga-González *et al.*, 1991; Abrous *et al.*, 1999; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000) así como miembros de las familias Plagiorchiidae, Notocotylidae (Manga-González *et al.*, 1994) y Echinostomatidae (Skovronskii *et al.*, 1985). Incluso se han descrito infecciones por más de una especie de trematodo en el mismo individuo (Abrous *et al.*, 2000b; Martínez-Ibeas *et al.*, 2013). Este hecho tiene una especial relevancia en la epidemiología, diagnóstico y terapéutica de la paranfistomosis.

3.2.2. Distribución y prevalencia

La paranfistomosis de los rumiantes es una parasitosis de distribución mundial tanto en fauna silvestre como en las especies domésticas (Tabla 2) (Boray, 1969; Muro & Ramajo, 1999; Tandon *et al.*, 2014) con una alta prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales (Singh *et al.*, 1984; Rolfe *et al.*, 1991; Rangel-Ruiz *et al.*, 2003; Phiri *et al.* 2007; Dorny *et al.*, 2011).

En Europa y la Cuenca Mediterránea la prevalencia de esta parasitosis en ganado bovino varía desde el 1,2% observado en ciertas regiones de Argelia hasta el 52% constatado en un estudio realizado en la República de Irlanda (Tabla 3). Estos datos de prevalencia varían si, en lugar de individuos, se analizan explotaciones completas llegando a observarse prevalencias del 61% (Tabla 3).

La paranfistomosis en España se ha descrito en el ganado vacuno y en poblaciones de ciervos silvestres en la provincia de Salamanca (Ramajo-Martín, 1992; Ramajo-Martín *et al.*, 2007). En los últimos años se han realizado estudios destinados a establecer la prevalencia de la paranfistomosis bovina en España (Díaz *et al*, 2006, 2007a, 2007b; Arias *et al.*, 2011; González-Warleta *et al.*, 2013; Sanchís *et al.*, 2013). Todos ellos se han llevado a cabo en ganado vacuno del área geográfica de Galicia y arrojan unas prevalencias variables entre el 10 y el 26% (Tabla 3) en función de la metodología empleada.

En los últimos años, se ha observado que la prevalencia de la paranfistomosis, tanto en ganado bovino como ovino, ha ido incrementándose. Así, en Francia durante

la pasada década, Mage *et al.* (2002) han puesto en relieve el incremento que a lo largo de 9 años ha tenido la prevalencia de la paranfistomosis bovina (Tabla 3). De manera similar, este aumento se apreció en la República de Irlanda (Zintl *et al.*, 2014; Toolan *et al.*, 2015). Los autores atribuyen este fenómeno a tres hechos. Primero, el desarrollo de las técnicas de diagnóstico que evitan su confusión con otros trematodos, como *F. hepatica* cuyos huevos muestran una morfología similar (Dorchies, 1989; Sanchís *et al.*, 2013). Asimismo, el empleo generalizado de terapias farmacológicas para controlar la fasciolosis tal vez haya permitido que el acceso al molusco intermediario por parte de los paranfistómidos, no esté imposibilitado por los fenómenos de antagonismo generados, entre diferentes especies de trematodos (Samnaliev *et al.*, 1978). Finalmente, otra posible explicación del incremento en la prevalencia de la paranfistomosis en Europa puede ser la inexistencia de un tratamiento farmacológico efectivo frente a esta enfermedad y que pueda ser empleado legalmente (Mage *et al.*, 2015).

Estado	Área geográfica	Prevalencia	Prevalencia por rebaños	Método de diagnóstico	Referencia
Argelia	Noreste	1,2 - 12,1%	-	Matadero	Titi <i>et al.</i> , 2010
Argelia	Noreste	14,6 - 45,7%	-	Matadero	Titi et al., 2014
Bélgica	Flandes	28%	22%	Matadero y coprológico	Malrait <i>et al.</i> , 2015
España	Galicia	61,8% - 10%	-	Serológico - Coprológico	Díaz et al., 2006
España	Galicia	13%	26%	Coprológico	Díaz <i>et al.</i> , 2007a
España	Galicia	19%	36%	Coprológico	Díaz <i>et al.</i> , 2007b
España	Galicia	18,8%	-	Matadero	González- Warleta <i>et al.</i> , 2013
España	Galicia	26%	61%	Coprológico	Sanchís <i>et al.</i> , 2013
España/Portugal	Noroeste/Norte	12%	-	Matadero	Arias et al., 2011
Francia	-	5,5%	-	Matadero	Casset, 1989
Francia	Lorena	29,34%		Matadero	Loock, 2003
Francia	Centro (Corrèze)	5,23-44,72%	-	Coprológico	Mage et al., 2002
Francia	Noroeste (Vendée)	14,5%	-	Matadero	Postal, 1984
Francia	Champaña- Ardenas	50,97%		Matadero	Rieu, 2004
Francia	Centro (Limoges)	8-46%	-	Matadero	Szmidt-Adjide et al., 2000
Italia	Norte (Milán)	17%	-	-	Agosti <i>et al.</i> , 1980
Rep. de Irlanda	Sudeste	52%	-	Coprológico y matadero	Toolan <i>et al.</i> , 2015
Rep. de Irlanda	Toda	9-32%	-	Coprológico	Zintl et al., 2014

3.2.2.1. Factores que influyen en la distribución y prevalencia de la infección

Debido a la complejidad de su ciclo vital y la participación de un molusco dulceacuícola como hospedador intermediario, la prevalencia de la paranfistomosis en diferentes áreas geográficas viene condicionada por diversos factores exógenos. Tanto la propia distribución de la especie de molusco, como el desarrollo y supervivencia de las fases larvarias del parásito dentro de la misma o libres en el medio ambiente, están determinadas por estos factores externos (Manga-González *et al.*, 2009; González-Warleta *et al.*, 2013).

El principal factor que influye en la prevalencia de la paranfistomosis es la presencia de zonas húmedas que constituyan un hábitat apropiado para el hospedador intermediario la cual, principalmente, depende del régimen de precipitaciones de la zona. De esta manera, se ha demostrado que la prevalencia es mayor en zonas de pluviometría media por encima de aquellas en las que el clima es seco (Díaz *et al.*, 2007; Titi *et al.*, 2010). Sin embargo, no puede descartarse un efecto negativo del exceso de lluvias sobre la prevalencia de la paranfistomosis. En las infecciones por *F. hepatica*, cuyo hospedador intermediario es la misma especie de molusco que en la paranfistomosis, se ha podido demostrar que un exceso de precipitación (>210mm/mes) puede tener un efecto de dilución, e incluso evacuación por arrastre, de las formas larvarias libres del trematodo (Raspch *et al.*, 2008). También se ha señalado que un índice pluviométrico por debajo de este rango disminuye la prevalencia de *F. hepatica*, aunque, si se producen las condiciones adecuadas de alta humedad ambiental, el ciclo biológico del trematodo se completa independientemente de las precipitaciones (Bennema *et al.*, 2011).

En las zonas de clima templado, tanto la frecuencia como la cantidad de precipitación va cambiando a lo largo del año. Así se pueden establecer periodos de riesgo de la infección por paranfistómidos en la Europa atlántica, en los que se producen las condiciones óptimas para el desarrollo del ciclo biológico del parásito, coincidiendo con el comienzo de la primavera y el otoño (Alzieu & Dorchies, 2007). Tras el periodo de prepatencia, la prevalencia de la parasitosis alcanza valores máximos en el verano y el invierno (Szmidt-Adjide *et al.*, 2000; Toolan *et al.*, 2015). En el Noroeste de la Península Ibérica se sigue este patrón de prevalencia de la paranfistomosis (Díaz *et al.*, 2007), aunque en un estudio más amplio, que incluía zonas de clima más cálido, no se apreciaron variaciones mensuales significativas de la prevalencia, por lo que los autores concluyeron que el periodo de riesgo de infección puede extenderse a lo largo de todo el año (Arias *et al.*, 2011).

La temperatura es otro factor ambiental que influye en la prevalencia de la paranfistomosis, tanto por el efecto que sobre la actividad del hospedador intermediario tiene, como por la influencia en la liberación de cercarias al medio ambiente. Se ha demostrado en estudios experimentales, que la cantidad de cercarias de *C. daubneyi,* que son liberadas de los hospedadores intermediarios al medio ambiente, es mayor cuando se somete a los caracoles a variaciones de temperatura, que cuando esta se

mantiene constante (Rondelaud *et al.*, 2013). Aunque las bajas temperaturas ambientales alarguen el periodo de prepatencia dentro del hospedador intermediario, la cantidad de caracoles excretores y de cercarias liberadas de paranfistómidos es mucho mayor que en rangos térmicos templados, cuando se comparan con los resultados obtenidos en *F. hepatica* (Abrous *et al.*, 1999). Este hecho hace que el periodo de riesgo de infección sea más largo en comparación con otros trematodos como *F. hepatica* (Alzieu & Dorchies, 2007).

Además de los agentes exógenos anteriormente indicados, existen varios factores endógenos del hospedador definitivo que condicionan la epidemiología de la paranfistomosis. Estos factores endógenos, no pueden ser en muchas ocasiones valorados de manera independiente entre ellos ni en relación a los exógenos.

El éxito de la transmisión de la infección depende del establecimiento del parásito en el hospedador definitivo, que a su vez está condicionado por la ingestión de metacercarias infectantes durante el pastoreo. Esta práctica se encuentra íntimamente relacionada con el sistema de producción que, a su vez, está unido a la aptitud del ganado y su raza. Así, los bovinos que son explotados en regímenes extensivos o semiextensivos para la producción de carne, en los que el acceso al pasto se produce durante casi todo el año a lo largo de la vida del animal, la prevalencia de la paranfistomosis es mayor (29,2%) que en el vacuno de leche (13,9%), que suele estar explotado en sistemas intensivos o semiintensivos (González-Warleta *et al.*, 2013).

La edad del hospedador definitivo también se relaciona estrechamente con la infección. A pesar de la aparente resistencia del ganado bovino a la reinfección por paranfistómidos (Toledo *et al.*, 2006), que resultaría en una mayor prevalencia en los animales jóvenes (Díaz *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008), las observaciones de la mayoría de los autores coinciden en que los animales de mayor edad tienen unas tasas de prevalencia más altas. Además en estos animales la carga parasitaria es mayor y más elevados son los porcentajes de animales que excretan huevos (Arias *et al.*, 2011; González-Warleta *et al.*, 2013; Sanchís *et al.*, 2013; Titi *et al.*, 2014).

El sexo parece ser otro factor endógeno que influye en la infección por paranfistómidos aunque no está claramente definido. Ciertos estudios demuestran que la paranfistomosis adquiere una mayor prevalencia en los machos que en las hembras (Khan *et al.*, 2008), mientras que otros indican la situación inversa (Szmidt-Adjide *et al.*, 2000). No obstante, estas diferencias en la incidencia de la parasitosis pueden estar relacionadas con el diferente manejo de cría de un sexo en comparación con el otro,
más que con la interferencia de factores genéticos u hormonales. (Szmidt-Adjide *et al.*, 2000; Toolan *et al.*, 2015).

3.3. Patogenia

En áreas endémicas tropicales y subtropicales, la paranfistomosis es un proceso altamente patógeno en los rumiantes ya que infecciones intensas, principalmente en animales jóvenes, pueden causar una elevada morbilidad e incluso mortalidad (Dorny *et al.*, 2011). En Europa se ha considerado que esta parasitosis era prácticamente inofensiva para el hospedador definitivo (Alzieu & Dorchies, 2007). Sin embargo, el incremento de la prevalencia observado durante los últimos años (Mage *et al.*, 2002; Zintl *et al.*, 2014; Toolan *et al.*, 2015) junto con la aparición de brotes de enfermedad clínica, con alta mortalidad en algún caso, tanto en ganado ovino (Mason *et al.*, 2012) como en bovino (Foster *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2012), han variado la visión general de la paranfistomosis. En la actualidad, se considera necesario tanto su inclusión dentro del diagnóstico diferencial de los procesos entéricos en rumiantes (Foster *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2008) como la realización de nuevos estudios sobre sus aspectos patogénicos y clínicos.

3.3.1. Factores de patogenicidad de los paranfistómidos

3.3.1.1. Factores físicos

Debido al complejo ciclo biológico de los paranfistómidos, la cronología de las alteraciones morfológicas asociadas a la parasitosis está estrechamente relacionada con el desarrollo del parásito en el hospedador definitivo. Así, las formas juveniles del parásito inducen lesiones en el intestino delgado mientras que los adultos afectan a los preestómagos (Toledo *et al.,* 2006). El efecto patógeno de los paranfistómidos se ejerce a través de dos vías mecánicas: 1/ una acción de estrangulación de los tejidos, tanto por parte de los vermes adultos como de las formas juveniles y 2/ un efecto traumático asociado a las migraciones retrógradas que las fases juveniles realizan hacia los preestómagos (Rieu, 2004).

3.3.1.2. Factores químicos

Junto con los factores físicos implicados en la patogenia de la paranfistomosis, existen otros de naturaleza antigénica que condicionan la capacidad de los parásitos para completar su ciclo biológico y la respuesta del hospedador. Por un lado, el grueso tegumento del parásito dificulta la actividad citotóxica de las células efectoras de la respuesta inmunitaria y, por otro, su glucocálix que capta macromoléculas del hospedador para mimetizarse con él y evitar el reconocimiento antigénico del sistema inmunitario (Rieu, 2004).

Además, los paranfistómidos, como otros helmintos, liberan al medio externo una serie de moléculas de diverso origen y función agrupadas en la denominación genérica de productos de excreción/secreción (E/S) (Harnett, 2014). El conocimiento de las funciones y de la actividad biológica que, en la familia Paramphistomidae, tienen estos productos de E/S dentro del hospedador es escaso. Sin embargo, en otros trematodos sí se han descrito las funciones de algunos componentes de la fracción de E/S. Así, por ejemplo, se sabe que diversas moléculas de los productos de E/S de *Dicrocoelium dendriticum* están involucradas en varios procesos fundamentales del parásito tales como el metabolismo, la detoxificación, el transporte o en funciones estructurales (Martínez-Ibeas, 2013). En el caso de *Fasciola hepatica* se ha señalado que el parásito segrega catepsinas cuya función principal es proteolítica, lo que facilita la migración de las formas larvarias de este helminto a través de los tejidos (Wilson *et al.*, 1998).

Aparte de este efecto, los productos de E/S y las moléculas presentes en el tegumento de los trematodos permiten que el parásito evada la respuesta inmunitaria del hospedador, mediante una serie de complejos y variados mecanismos. En los paranfistómidos se ha señalado la existencia de glucoproteínas las cuales, al ser liberadas al medio, se unen a anticuerpos específicos produciendo un agotamiento de estos y, por lo tanto, una menor cantidad de inmunoglobulinas capaces de afectar al trematodo (Joly, 1991). En otras trematodosis, donde estos fenómenos han sido ampliamente estudiados, varias fracciones de E/S ejercen un efecto directo sobre la respuesta inmunitaria innata del hospedador, en concreto sobre la actividad y la capacidad fagocítica de las células dendríticas (DC), como se ha puesto en evidencia en la fasciolosis (Hamilton et al., 2009; Morphew et al., 2013). Uno de los mecanismos intrínsecos de esta alteración de la función de las DC ha sido establecido en infecciones por Schistosoma mansoni, donde se ha demostrado que una ARNasa (ω -1), componente de los productos de E/S, es capaz de inhibir la producción proteica de las DC al degradar el ARN intracelular (Everts et al., 2009; Steinfelder et al., 2009). En otras helmintosis se han señalado también otros posibles modos de acción en la interferencia sobre la respuesta inmunitaria del hospedador, como son la inducción de la apoptosis de las DC (Nono et al., 2012), la apoptosis de los macrófagos (Guasconi et al., 2012) y de los linfocitos T (Carneiro-Santos et al., 2000). Todas ellas son funciones de los productos de E/S de los helmintos destinadas a modular la respuesta inmunitaria del hospedador, aunque existen muchas otras que han sido revisadas por McSorley *et al.* (2013) y Harnett (2014).

No se ha establecido aún la participación de los productos de E/S de los paranfistómidos en los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del parásito. Si bien se han definido los perfiles antigénicos de estos productos E/S, los esfuerzos en su estudio se han centrado en la capacidad antigénica de los mismos y en sus aplicaciones para el diagnóstico de la parasitosis (Anuracpreeda *et al.*, 2008; 2013; Saifullah *et al*, 2011; 2013; Jyoti *et al.*, 2014).

3.3.2. Patogenia y clínica asociadas a las formas juveniles de paranfistómidos

Como ya se ha comentado anteriormente, las metacercarias, tras ser ingeridas por el hospedador definitivo, viajan por las luces de los preestómagos y del abomaso para desenquistarse en las primeras porciones del intestino delgado, principalmente el duodeno. En esta localización, se fijan a la mucosa mediante su ventosa ventral e incluso penetran parcialmente en la lámina propia intestinal, crecen de manera rápida y, tras un periodo de tiempo de tres a seis semanas, continúan su ciclo vital con una migración hacia los preestómagos (Tandon *et al.*, 2014).

El efecto mecánico que las formas larvarias de paranfistómidos producen en el intestino es consecuencia de su fijación mediante su ventosa ventral, que es capaz de interrumpir el aporte sanguíneo y, por tanto, producir necrosis de esa porción de la mucosa, la cual finalmente se desprende produciendo hemorragias puntiformes (petequias) (Rieu, 2004).

Mucho más relevante, que la necrosis focal de la mucosa intestinal, es otro efecto mecánico que ejercen las larvas de paranfistómidos y que es consecuencia de la fijación y las migraciones masivas a través de la mucosa intestinal. La migración que llevan a cabo estos trematodos a través de la luz gastrointestinal para llegar a los preestómagos, donde las formas adultas se asientan y maduran, conlleva que algunos de los individuos penetren de forma traumática en la mucosa intestinal. Este fenómeno adquiere relevancia clínica cuando la cantidad de trematodos, consecuencia de una infección masiva, es tan grande que el número de larvas que atraviesa la mucosa intestinal es capaz de producir una enteritis hemorrágica grave (Horak, 1971; Rolfe *et al.*, 1994). De hecho, en un estudio en ganado ovino, se ha estimado en 11.000 la cantidad mínima de trematodos necesaria para producir enfermedad clínica intestinal (Boray, 1969), elevándose a 30.000 en el ganado bovino (Rolfe & Boray, 1993).

La gravedad y persistencia del daño que las formas juveniles de los paranfistómidos producen en el intestino delgado de los hospedadores definitivos dependen, por tanto, del número de metacercarias que ingieren en un tiempo determinado. Una excesiva cantidad de parásitos en un espacio tan limitado como la luz intestinal hace que la maduración de los trematodos se retrase (Horak, 1971) y, además, permite que el daño de la mucosa intestinal persista durante más tiempo (Boray, 1969; Rolfe *et al.,* 1994).

Las manifestaciones clínicas de estas infecciones masivas consisten en diarrea profusa, la cual puede ser sanguinolenta además de no responder a los tratamientos habituales, pérdida de condición corporal, edema submandibular, postración e incluso la muerte del animal (Dorchies *et al.*, 2000; Mavenyengwa *et al.*, 2005; Alzieu & Dorchies, 2007; Dorny *et al.*, 2011; Mason *et al.*, 2012; Millar *et al.*, 2012; Tandon *et al.*, 2014).

Si la carga infectante de paranfistómidos es baja, los signos clínicos y las lesiones producidas en el intestino son escasos o nulos (Alzieu & Dorchies, 2007).

3.3.3. Patogenia y clínica asociada a las formas adultas de paranfistómidos

Una vez establecidos en los preestómagos del hospedador definitivo, las formas adultas, del mismo modo que las fases juveniles, ejercen, mediante el acetábulo (ventosa ventral), una acción mecánica directa de succión sobre la mucosa, que impide el aporte local de riego sanguíneo y, por tanto, se produce una necrosis focal del punto de fijación (Rieu, 2004). Este efecto patógeno parece ser escaso o nulo por lo que no se observan signos clínicos asociados a la enfermedad (Toledo *et al.*, 2006; Tandon *et al.*, 2014).

Sin embargo, varios autores han señalado la aparición de sintomatología clínica asociada a la presencia de formas adultas, principalmente en infecciones masivas y que consiste en atonía ruminal, timpanismo y descenso de las producciones (Alzieu & Dorchies, 2007; Anuracpreeda *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2008).

3.4. Respuesta inmunitaria del hospedador

Los mecanismos inmunitarios que se desencadenan dentro del hospedador ante la presencia de un agente patógeno son de dos tipos (Janeway, 2001; Tosi, 2005):

1. **Respuesta inmunitaria innata**. Se caracteriza por la rápida puesta en marcha de mecanismos no específicos frente al agente patógeno.

Habitualmente no es capaz de eliminar el patógeno por sí sola, aunque es indispensable como primera defensa hasta que la otra respuesta inmunitaria se ponga en marcha.

 Respuesta inmunitaria adaptativa. Su actividad es más tardía pero establece una defensa con un alto grado de especificidad además de poseer "memoria", la cual permite que, tras la exposición de nuevo al mismo antígeno, la respuesta sea más rápida y eficiente.

3.4.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata representa la primera línea de defensa del hospedador frente a un agente patógeno. En el tracto gastrointestinal, esta línea de defensa está asegurada, por una parte, gracias a mecanismos no inmunológicos. El epitelio del tubo digestivo representa una barrera física que puede prevenir la invasión de organismos patógenos. Esta barrera está reforzada igualmente por la renovación rápida de dicho epitelio, las secreciones mucosas presentes en la superficie del mismo (mucinas principalmente) y el peristaltismo intestinal que colabora en la expulsión de los agentes patógenos (Béné & Faure, 2000; Basset *et al.*, 2003; Sansonetti, 2004). Por otro lado, existen mecanismos inmunitarios complejos, tales como los fenómenos inflamatorios, que constituyen la base de la inmunidad innata (Lacroux, 2006).

El sistema inmunitario innato se fundamenta en una serie de receptores, denominados PRR (pattern recognition receptors), entre los que se encuentran los receptores Toll-like, que reconocen los patrones moleculares conservados que se encuentran en las superficies de los microorganismos (PAMPs o pathogen-associated molecular patterns) (Uematsu & Akira, 2006; Kawai & Akira, 2007). Los PRR no sólo han sido definidos como receptores de superficie de las células de la respuesta inmunitaria innata, sino también como moléculas secretadas o producidas de manera local que inician los mecanismos de inflamación (Janeway & Medzhitov, 2002). El hecho de que los PAMPs estén únicamente presentes en los microorganismos y no en el hospedador hace que su reconocimiento por los PRR sea indicativo de la presencia de patógenos. Este reconocimiento permite así activar directamente mecanismos de la respuesta inmunitaria innata como son: la fagocitosis, la activación del sistema del complemento, la inducción de la síntesis de péptidos antimicrobianos, la producción de la óxido nitroso sintasa (iNOS) por los macrófagos, la liberación de citoquinas y la activación de las células NK (natural killer), entre otros. Todos estos mecanismos permiten la destrucción de las células infectadas o del propio organismo patógeno (Medzhitov & Janeway, 1998).

En el caso de las parasitosis por metazoos, los mecanismos de la inmunidad innata no están bien definidos. Los parásitos que habitan en la luz intestinal desencadenan una reacción de hipersensibilidad tipo I, en la que la degranulación de los mastocitos, inducida por las inmunoglobulinas E (IgE), es responsable de cambios en la fisiología y arquitectura del epitelio del tubo digestivo así como de la estimulación de la secreción de fluidos, electrolitos y mucus. Además, se produce un aumento de la contracción intestinal y la quimiotaxis de eosinófilos y mastocitos (Farthing, 2003). Estos fenómenos, que se manifiestan clínicamente en un cuadro de diarrea, están destinados a la eliminación de las formas juveniles gastrointestinales, antes de la llegada a su nicho ecológico, y a la expulsión de los adultos (Balic *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2006; Moreau & Chauvin, 2010).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos es otro mecanismo de la inmunidad innata destinado a la destrucción directa del agente parasitario y que tiene como células efectoras a los eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y plaquetas y, como anticuerpos, a las IgE, IgG e IgA. Los anticuerpos se unen a los PAMPs de la superficie del parásito donde permiten la adhesión de las células efectoras a la vez que las estimulan para liberar una amplia batería de productos tóxicos para el parásito, tales como quitinasas, proteínas catiónicas de los eosinófilos, compuestos nitrogenados reactivos, etc. (Meeusen *et al.*, 2005; Moreau & Chauvin, 2010).

Por otro lado, la IgA, presente en la mucosa digestiva, es capaz de neutralizar enzimas metabólicas interfiriendo de esta manera en la capacidad nutricional de los parásitos, como se ha demostrado en nematodosis gastrointestinales (Smith, 1988; Gill *et al.*, 1993).

3.4.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

No se conocen los mecanismos específicos de la respuesta inmunitaria adaptativa en la paranfistomosis. Sin embargo, si existen diferentes estudios sobre la respuesta inmunitaria adaptativa en nematodos gastrointestinales, que podrían ser extrapolables a la infección por paranfistómidos puesto que el nicho ecológico que parasitan es el mismo y que serán revisados en este apartado. Asimismo, se hará referencia a la respuesta inmunitaria local que se establece en otras trematodosis, principalmente fasciolosis, dicroceliosis y esquistosomiasis.

En los modelos experimentales de infecciones por helmintos se determinan cuatro etapas o fases de la respuesta inmunitaria adaptativa (Lacroux, 2006):

1.- Presentación de los antígenos parasitarios a los linfocitos T CD4+.

32

- 2.- Polarización de la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2.
- 3.- Acción de las células y anticuerpos.
- 4.- Consecuencias sobre el parásito.

3.4.3. Presentación de los antígenos parasitarios e inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta inmunitaria adaptativa se desencadena en el momento en que las células presentadoras de antígenos (CPA), las células dendríticas (DC) en el intestino y las células de Langerhans en los epitelios, captan, procesan y exponen el antígeno, ligado al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) de su superficie, a los receptores de los linfocitos T CD4+ (Lacroux, 2006; McSorley *et al.*, 2013; Mbongue *et al.*, 2014). Además de esta acción directa, la respuesta se refuerza mediante señales de coestimulación producidas por las CPA (Jenkins et *al.*, 1987; Liu & Janeway, 1991), que son imprescindibles para la expansión clonal de los linfocitos T CD4+, dado que en su ausencia los linfocitos T CD4+ entran en un estado de anergia o directamente mueren por apoptosis (Medzhitov & Janeway, 1998).

La primera etapa de esta iniciación consiste en la captura de los antígenos parasitarios por parte de las CPA de la mucosa intestinal. Sin embargo, tanto el epitelio del intestino como el mucus presente en su superficie constituyen una barrera física para la captación de los antígenos desde la luz gastrointestinal. En el epitelio intestinal, se encuentran unas células especializadas, las células M, las cuales permiten el transporte de los antígenos hacia las CPA del tejido linfoide asociado al intestino (placas de Peyer) donde tiene lugar la interacción inicial entre las CPA y los linfocitos T (Owen, 1994; Onah & Nawa, 2000). En estudios experimentales sobre dicroceliosis ovina, se ha observado un incremento en el número de células MHCII, posiblemente macrófagos y linfocitos T y B activados en relación con las lesiones biliares en hígado, así como de células dendríticas activadas en nódulos linfáticos hepáticos, probablemente en respuesta a una continua estimulación de antígenos parasitarios (Ferreras *et al.,* 2007).

Sin embargo, está aún por definir el modo de presentación de los antígenos de los helmintos dentro de la respuesta inmunitaria adaptativa (Maizels *et al.*, 2004) y tampoco se conoce exactamente cuáles son las moléculas parasitarias capaces de iniciar la respuesta inmunitaria, aunque entre otras estarían antígenos del tegumento, productos de E/S, proteínas de adultos o de formas juveniles (Onah & Nawa, 2000).

3.4.4. La polarización Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria

Los linfocitos T intervienen en la respuesta inmunitaria de base celular. Estas células poseen un receptor específico de antígeno, denominado TCR, que reconoce antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad y tiene un conjunto de proteínas, denominado CD3, que participa en la transmisión de señales de activación de los linfocitos tras la unión del antígeno. Los linfocitos T se dividen en dos poblaciones: linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores. Los primeros expresan la proteína CD8 que reconoce péptidos MCH clase I, mientras que los linfocitos T colaboradores (células Th) expresan la proteína CD4 en su superficie y reconocen moléculas MHCII. Estos linfocitos Th se subdividen en dos subpoblaciones: los Th1 y los Th2 (Tizard, 2009).

La participación de los linfocitos T en la respuesta inmunitaria local frente a trematodos en rumiantes, concretamente frente a *Fasciola hepatica y Dicrocoelium dendriticum*, se ha descrito en diferentes estudios experimentales (Pérez *et al.*, 2002; Ferreras *et al.*, 2007; Zafra *et al.*, 2009; 2010). La presencia principalmente de linfocitos T CD4+ en relación con las lesiones hepáticas inducidas por estos parásitos, sugieren que esta subpoblación de linfocitos T juegan un papel importante en la defensa local frente a trematodos (Tliba et al., 2002; Chauvin & Boulard, 1996; Ferreras *et al.*, 2007).

A pesar de la distancia filogenética que les separa, debido a la cual las características biológicas de estos metazoos difieren de manera sustancial, en general, todos los helmintos activan una respuesta inmunitaria polarizada hacia Th2. Sin embargo, como se comentará posteriormente, las características filogenéticas, el ciclo biológico y el nicho ecológico donde se asienta el parásito hacen que la respuesta inmunitaria se mueva en un equilibrio más o menos polarizado entre Th1 y Th2 (Jenkins & Allen, 2010).

La interacción inicial establecida entre las CPA y los linfocitos T CD4+ no sólo determina la reacción inmunitaria en sí, sino también la naturaleza de esta, por ejemplo hacia una respuesta Th1 o Th2 (Moser & Murphy, 2000; Jankovic *et al.*, 2001) o hacia una vía reguladora mediada por las células Foxp3+ T reguladoras (Treg) (Yamazaki *et al.*, 2006). El paradigma de las respuestas inmunitarias Th1/Th2 fue establecido por Mosmann & Coffmann (1989) en función de las citoquinas producidas por un panel de diferentes clones de linfocitos TCD4+ en la especie murina. Estas son, por un lado, el interferón gamma (IFN-γ) y la interleucina 2 (IL-2) para la Th1, y por otro, la interleucina 4 para la respuesta Th2. Típicamente, la respuesta Th1 se activa frente a los parásitos intracelulares (protozoos) y para otros agentes como virus y bacterias, mientras que la

Th2 se relaciona con los agentes infecciosos extracelulares (Paul & Seder, 1994). No obstante, este esquema es flexible en las parasitosis, ya que ciertos parásitos extracelulares (*Trichuris muris*) y algunos protozoos intracelulares (*Leishmania major*) son capaces de inducir tanto una respuesta Th1 como Th2 (Jankovic *et al.,* 2001). Incluso la fase de desarrollo del agente parasitario determina la polarización de la respuesta inmunitaria. Así, por ejemplo, en la esquistosomosis en fases tempranas de la infección, caracterizada por la migración de las larvas, la respuesta obtenida es del tipo Th1, mientras que una vez establecido el parásito e iniciada la puesta de huevos, la polarización hacia los mecanismos inmunitarios Th2 es muy pronunciada (Pearce & McDonald, 2002; Chuah *et al.,* 2014).

3.4.4.1. Mediadores de la respuesta inmunitaria Th1 y Th2

Aunque, en la respuesta inmunitaria Th1, se hayan determinado otras moléculas tales como la IL-18 o IL-23, el mediador celular clave en el desarrollo de la misma es la IL-12, producida por las DC tras su estimulación por diferentes antígenos, tal como se ha señalado para diversos agentes patógenos como *Toxoplasma gondii*, bacterias Gram negativas o *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (Jankovic *et al.*, 2001). El efecto de estas citoquinas sobre los linfocitos TCD4+ consiste en estimular la síntesis y liberación, no sólo de IL-2, sino también IFN- γ , TNF- α y TNF- β . La IL-2 es capaz de activar a los linfocitos T, los linfocitos B, los linfocitos T NK y los macrófagos hacia la respuesta Th1. Por su parte, el IFN- γ inhibe la acción de los linfocitos Th2 y se retroestimula al activar a los linfocitos Th1 para amplificar la respuesta Th1 (Tizard, 2009).

Durante la respuesta inmunitaria Th2, los linfocitos T CD4+ producen IL-4, citoquina que determina la polarización hacia Th2, así como otras citoquinas ligadas a este tipo de respuesta: IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Tizard, 2009). La IL-4 es producida principalmente por los linfocitos T CD4+, si bien son también capaces de sintetizarla otros tipos celulares como los eosinófilos, basófilos, linfocitos T NK, linfocitos T γδ y mastocitos (Brown *et al.*, 1987; Yoshimoto & Paul, 1994; Voehringer *et al.*, 2004). La mayoría de estas células sintetizan también IL-13 que, debido a que emplea los mismos receptores de señalización, posee la misma actividad que la IL-4 (Jenkins & Allen, 2010). Ambas interleucinas son capaces por sí mismas de iniciar una respuesta inmunitaria Th2 incluso en ausencia de IL-5, IL-9 o IL-13 (Fallon *et al.*, 2002). La diferenciación de los clones nativos (no polarizados) de linfocitos T CD4+ a células productoras de IL-4 es la determinante para la creación de un microambiente de citoquinas en una localización anatómica determinada, hecho indispensable en el desarrollo de una respuesta inmunitaria Th2 (Kourilsky & Truffa-Bachi, 2001).

Las citoquinas del tipo Th2 tienen numerosas actividades biológicas, tanto sobre los linfocitos T como sobre los precursores de las células hematopoyéticas. Así, por un lado favorecen la diferenciación, activación y reclutamiento de los eosinófilos y mastocitos a los tejidos infectados y, por otro, tienen un efecto directo sobre los linfocitos B para la síntesis de IgG1, IgA e IgE (Lacroux, 2006). Las principales funciones de las diferentes citoquinas de tipo Th2 se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales citoquinas involucradas en la respuesta inmunitaria T	h2 y su acción biológica
(recopilado por Lacroux, 2006).	

Citoquina	Acción biológica
IL-3	Factor de crecimiento para las células de origen hematopoyético. Mastocitosis.
IL-4	Inhibición de la producción de IFN-γ y de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF) por parte de los macrófagos. Crecimiento, supervivencia y conmutación isotípica de los linfocitos B para la producción de IgE e IgG1. Contracción de los músculos lisos. Hiperplasia de las células caliciformes.
IL-5	Diferenciación de los linfocitos B y producción de IgA. Crecimiento, diferenciación, supervivencia, migración y activación de los eosinófilos. Hiperplasia de las células caliciformes.
IL-6	Diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas.
IL-9	Estimulación de la producción de IgE. Eosinofilia, mastocitosis e hiperplasia de las células caliciformes.
IL-10	Inhibición de los linfocitos T para la vía Th1. Inhibición de la liberación de citoquinas por parte de los macrófagos. Crecimiento de los mastocitos.
IL-13	Producción de IgE. Hiperplasia de las células caliciformes. Contracción de la musculatura lisa.
Eotaxina	Quimiotaxis de los eosinófilos a los tejidos.

3.4.5. Efectores de la respuesta inmunitaria en las parasitosis

En el apartado anterior se han expuesto las funciones de los linfocitos T y B en la respuesta inmunitaria que se desencadena ante la presencia de los helmintos. En esta sección se realiza la revisión de las funciones de otros tipos celulares implicados en dicha respuesta inmunitaria, entre los que se incluyen los siguientes:

- Células efectoras: eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares.
- Células reguladoras: macrófagos alternativamente activados y linfocitos T y B reguladores.
- Anticuerpos.

3.4.5.1. Eosinófilos

La presencia de infiltrados inflamatorios de eosinófílos tisulares es una característica común de las helmintosis y concretamente de las infecciones por

trematodos (Manga-González *et al.,* 2004; Zafra *et al.,* 2013). En la respuesta inmunitaria Th2, las IL-3 e IL-5 así como las IgE, IgG, la eotaxina y el factor C3b del sistema del complemento activan a los eosinófilos (Rainbird *et al.,* 1998). Estas células se fijan a la superficie del parásito donde se desgranulan y liberan varias moléculas de acción biológica potente (proteína básica principal y neurotoxina derivada de eosinófilos, entre otras) y productos tóxicos del metabolismo del oxígeno (McLaren *et al.,* 1981; Butterworth, 1984; Behm *et al.,* 2000; Falcone *et al.,* 2001). Estas sustancias tienen una acción citolítica directa sobre el tegumento del parásito y forman parte de la citotoxicidad celular dependiente de los antígenos.

Junto con esta actividad citotóxica, los eosinófilos son capaces de producir citoquinas, en concreto las IL-3 e IL-5 (Kita *et al.*, 1991; Desreumaux *et al.*, 1992), las cuales inducen una mayor presencia de mastocitos y eosinófilos a nivel local en las infecciones helmínticas (Weller, 1994). Esta interacción explicaría las observaciones realizadas en infecciones experimentales por *Calicophoron microbothrium* en bovino, donde la carga parasitaria es menor cuanto mayor es la presencia de eosinófilos y mastocitos (Mavenyengwa *et al.*, 2008).

3.4.5.2. Mastocitos

Además de los eosinófilos, los mastocitos son células implicadas en la respuesta inmunitaria frente a infecciones por helmintos, concretamente en la paranfistomosis (Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005; 2008). Este tipo celular se activa tras la interacción con las interleucinas 3 y 5 de la respuesta inmunitaria Th2 y las IgE unidas a los antígenos parasitarios (Lee *et al.*, 1986; Falcone *et al.*, 2001; Kawakami & Galli, 2002). Como consecuencia de esta activación se liberan aminas vasoactivas (histamina y serotonina), proteasas y factores quimiotácticos. La desgranulación de los mastocitos produce una reacción de hipersensibilidad tipo I, caracterizada por la contracción de la musculatura lisa, y una extravasación de fluidos desde los vasos sanguíneos, lo que provoca que el ambiente gastrointestinal sea hostil para el asentamiento y desarrollo del parásito (Falcone *et al.*, 2001; Farthing *et al.*, 2003). Los mastocitos son capaces de agredir, mediante la descarga de los productos de sus gránulos, directamente a los parásitos aunque por sí solos no son capaces de su eliminación. Por ello, estas células liberan una serie de factores quimiotácticos que atraen a otras, tales como eosinófilos, neutrófilos y plaquetas para la expulsión del parásito (Lee *et al.*, 1986).

3.4.5.3. Leucocitos globulares intraepiteliales

Otra población celular que aparece de manera constante en las infecciones por helmintos y, cuyo origen y función no está dilucidado, son los leucocitos globulares. Algunos autores han comprobado que estas células expresan perforina, proteína lítica de los linfocitos T, por lo que sugieren que pueden tener un origen linfocítico y ser similares a los linfocitos T $\gamma\delta$ de la mucosa intestinal de ratones (Konno *et al.*, 1994, 2005). Sin embargo, otros investigadores señalan que derivan de los mastocitos subepiteliales de la mucosa digestiva (Murray *et al.*, 1968; Huntley *et al.*, 1984), e incluso los consideran mastocitos activados (Van Meulder *et al.*, 2013).

Aunque los leucocitos globulares intraepiteliales se encuentran presentes en las infecciones por helmintos de los rumiantes (Douch *et al.*, 1986; Stankiewicz *et al.*, 1993), sus funciones inmunitarias no están aún esclarecidas. Su presencia es constante y son numerosos en el infiltrado inflamatorio en infecciones experimentales por *F. hepatica*, *Schistosoma bovis* y *D. dendriticum* en la especie ovina (Ferreras *et al.*, 2000; Manga-González *et al.*, 2004) o se encuentran en un número variable en infecciones experimentales con *F. hepatica* en la especie caprina (Zafra *et al.*, 2013). También se han descrito en infecciones por paranfistómidos (Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005). La similitud que se observa entre la composición del contenido de los gránulos de los leucocitos globulares y la de los mastocitos sugiere una posible participación de estas células en la reacción de hipersensibilidad tipo I (Stankiewicz *et al.*, 1993) e incluso una acción directa sobre los parásitos mediante la acción lítica de la granulisina (Van Meulder *et al.*, 2013).

3.4.5.4. Células reguladoras: los macrófagos alternativamente activados (AAM)

Los macrófagos alternativamente activados (AAM) son efectores claves de la respuesta inmunitaria Th2 en casi todas las helmintosis. En algunas especies de cestodos, la acción antiparasitaria se debe a otra población activada de macrófagos, los clásicamente activados (CAM) (Alonso-Trujillo *et al.*, 2007). El concepto de la activación alternativa de los macrófagos fue propuesto para describir la respuesta de este tipo celular frente a las citoquinas que rigen la respuesta Th2, es decir la IL-4 e IL-13 (Stein *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1994). El término AAM se establece para poner en evidencia el estado activado de estas células, que no sólo las diferencia de los CAM, cuya activación está estimulada por productos microbianos y las citoquinas de la respuesta inmunitaria Th1, sino también de los macrófagos desactivados cuya funcionalidad se halla suprimida por citoquinas inmunomoduladoras tales como la IL-10.

Las principales características biológicas de estos AAM son la producción, inducida por la IL-4, de arginasa-1, de quitinasa Ym1 y una molécula tipo resistina (RELM-α), así como la expresión de receptores de manosa y CD163 entre otros (Kreider et al., 2007; Jenkins & Allen, 2010). La arginasa-1 es el principal marcador de la actividad de los AAM cuyas funciones más relevantes son: 1/ regular la producción de óxido nítrico (NO) mediante la competición por el sustrato común con la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) de los CAM; 2/ inhibir la respuesta de los linfocitos T al actuar sobre la L-arginina y 3/ promover la fibrosis y la reparación de los tejidos, ya que favorecen la biosíntesis de prolina y poliaminas por degradación de la L-arginina (Kreider et al., 2007; Jenkins & Allen, 2010). Por su parte, la guitinasa Ym1 parece ser que carece de función quitinolítica, aunque sí puede fijarse a la superficie del parásito para facilitar la acción citotóxica de los eosinófilos. Finalmente, el tercer efector producido por los AAM es RELM-α, una molécula de la familia de la resistina cuya función principal, aunque no bien establecida, podría estar relacionada con la fijación al tegumento parasitario (Jenkins & Allen, 2010) de manera similar a lo observado en otra proteína de la misma familia (RELM- β), la cual parece ser capaz de unirse a las estructuras quimiosensoriales de los parásitos (Artis et al., 2004). Paradójicamente, también se ha demostrado que RELM-α es capaz de inducir la reducción de la actividad inmunitaria Th2 (Nair et al., 2009).

La presencia de este fenotipo de macrófagos, además de en las helmintosis, se ha observado en infecciones por protozoos (Raes *et al.*, 2007) y en ciertos procesos bacterianos (El Kasmi *et al.*, 2008). Las funciones biológicas de los AAM en las helmintosis son varias. Una de ellas es la coordinación y establecimiento de la respuesta inmunitaria Th2 mediante la presentación de antígenos y la producción de mediadores que estimulan a los linfocitos Th2. Por otro lado, y en relación con la inmunomodulación de la respuesta inmunitaria que promueven, los AAM son necesarios para la reparación del daño tisular causado por los helmintos, fenómeno que ha sido estudiado en infecciones por *Schistosoma mansoni* (Maizels *et al.*, 2004).

3.4.5.5. Células reguladoras: los linfocitos T reguladores (Treg)

Para contener el daño tisular, que un exceso de citoquinas proinflamatorias podría producir a nivel local, el hospedador dispone de una población de linfocitos T con funciones inmunosupresoras denominadas células T reguladoras (Treg). Estas células se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD4+ y CD25+, además del factor de transcripción *forkhead box 3* (FoxP3) (Hori *et al.*, 2003). Los linfocitos T CD4+ inducidos a diferenciarse a Treg tras la exposición a antígenos, producen principalmente

IL-10 y TGF-β (Beissert *et al.*, 2006). Se han propuesto multitud de mecanismos de acción de las células Treg que pueden encuadrarse en dos modelos básicos de inmunosupresión en función del microambiente del medio (no inflamatorio o en zonas de inflamación), pero que tienen como resultado el bloqueo de la activación de los linfocitos T hacia células efectoras, la destrucción de los linfocitos T activados y de las CPA (Pandiyan & Zhou, 2015). Estudios llevados a cabo en modelos murinos, han demostrado una gran proliferación de células Treg en las placas de Peyer en contacto directo con parásitos, en comparación con otras placas de Peyer. En dichos trabajos se sugiere que los helmintos podrían secretar productos que actuarían de manera local para promover la expansión de las células Treg (Mosconi *et al.*, 2015). Este fenómeno podría estar asociado a los mecanismos del parásito para la evasión de la respuesta inmunitaria. Por otra parte, se ha comprobado que la depleción de las células Treg conlleva una mayor resistencia al parásito por parte del hospedador y una menor carga parasitaria, pero también mayores daños tisulares causados por la respuesta inmunitaria (Taylor *et al.*, 2012).

3.4.5.6. Células reguladoras: los linfocitos B reguladores (Breg)

El papel fundamental y típico de los linfocitos B se encuadra dentro de la respuesta inmunitaria humoral, en la que estas células liberan anticuerpos específicos que se unen a los antígenos para su eliminación. Sin embargo, se ha demostrado que además son capaces de generar una serie de citoquinas inflamatorias e inmunorreguladoras de la respuesta inmunitaria en las infecciones por helmintos (Hussaarts *et al.,* 2011; McSorley & Maizels, 2012).

La acción reguladora de los linfocitos Breg, iniciada tras la activación de estas células por la IL-10 (Smits, 2007), se lleva a cabo por la acción de esta misma interleucina. Sus efectos se manifiestan a través de la supresión de la actividad de los linfocitos Th1, el reclutamiento de linfocitos Treg Foxp3+ (Amu *et al.*, 2010), el cambio en los isotipos de los anticuerpos que producen (McSorley & Maizels, 2012) y la acción supresora de la función de las DC (Hussaarts *et al.*, 2011).

3.4.5.7. Anticuerpos

Las citoquinas de la respuesta inmunitaria Th2 tienen, además de los efectos anteriormente indicados, la capacidad de favorecer la síntesis y liberación de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Tabla 4). Estos anticuerpos son característicamente IgG, IgA e IGM en todas las helmintosis, tanto en las nematodosis (Lacroux *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2001) como en las parasitosis causadas por

trematodos (van Remoortere *et al.*, 2001; Hoyle *et al.*, 2003; Chuah *et al.*, 2014). En ovinos infectados experimentalmente con *F. hepática* y *S. bovis* se ha descrito la presencia de numerosas células plasmáticas IgA+, pero también IgG+ e IgM+ en relación con granulomas de huevos de *S. bovis* en intestino (Ferreras *et al.*, 2000). Asimismo, los infiltrados difusos de células plasmáticas IgG+, en relación con conductos biliares lesionados observados en infecciones por *D. dendriticum*, sugieren una respuesta inmune humoral a nivel local y periférico (González-Lanza *et al.*, 2000; Ferreras *et al.*, 2007). En infecciones experimentales con *F. hepática* en animales caprinos también se observan infiltrados de células plasmáticas IgG+ significadamente elevados (Zafra *et al.*, 2010).

Dos de los efectos que ejercen las inmunoglobulinas en la defensa frente a una infección parasitaria son los siguientes:

- Acción directa sobre el parásito. Se ha evidenciado que en las nematodosis intestinales, tanto la IgG como la IgA interfieren bien en el metabolismo de los parásitos, al neutralizar o inactivar sus enzimas metabólicas, o bien directamente en su nutrición.

 Acción indirecta a través de la unión de las IgM a antígenos del parásito que desencadena una reacción de hipersensibilidad o de citotoxicidad asociada a anticuerpos por parte de los mastocitos y los eosinófilos.

El conocimiento actual sobre la respuesta humoral frente a los paranfistómidos es escaso y, el que existe, se ha conseguido de manera indirecta en investigaciones para la caracterización de los factores antigénicos del parásito o bien en estudios epidemiológicos (Anuracpreeda *et al.*, 2008; Saifullah *et al*, 2011; Jyoti *et al.*, 2014). En estos estudios se constata la producción de anticuerpos IgG específicos frente a paranfistómidos en sangre periférica de animales infectados (Díaz *et al.*, 2006; Jyoti *et al.*, 2014). Recientemente, un modelo experimental en ratones infectados con *Pygidiopsis summa* (Trematoda: Digenea) ha puesto en evidencia la presencia de IgA frente a estos parásitos en la mucosa intestinal (Chai *et al.*, 2014).

3.5. Lesiones

Las alteraciones macroscópicas provocadas por los paranfistómidos se han descrito principalmente en el intestino delgado, localización temporal de las formas juveniles, y en los preestómagos, donde se asientan de manera definitiva los adultos.

3.5.1. Lesiones macroscópicas

3.5.1.1. Lesiones macroscópicas asociadas a formas juveniles de paranfistómidos

Debido a su ciclo biológico, la acción patógena y, por tanto, las lesiones que las formas juveniles de paranfistómidos producen en el hospedador definitivo se localizan en el intestino delgado (aproximadamente en los primeros cinco metros), principalmente duodeno (Boray, 1969; Rolfe *et al.*, 1994). La intensidad de las lesiones macroscópicas producidas en el intestino delgado por la fijación de dichas formas juveniles está en estrecha relación con la carga parasitaria (Horak, 1971; Rolfe *et al.*, 1994).

Cuando son sacrificados los animales presentan claros signos de caquexia, como son: escasa condición corporal; atrofia serosa del tejido adiposo y atrofia muscular; edema subcutáneo en la región intermandibular, cuello y región torácica; ascitis; hidrotórax e hidropericardias, entre otras (Boray, 1969; Singh *et al.*, 1971; Tandon *et al.*, 2014).

La serosa intestinal muestra signos de hiperemia. A la apertura del intestino se constata un engrosamiento y congestión de la mucosa que le da un aspecto corrugado. Se aprecian petequias en la mucosa con úlceras esporádicas. Sobre la mucosa se observa un exudado mucoide de coloración variable, de blanco a trasparente, con abundantes hemorragias (Boray, 1969; Singh *et al.*, 1971; Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005; 2008; Tandon *et al.*, 2014). Algunos autores han observado otras alteraciones como linfadenopatía mesentérica (Millar *et al.*, 2012) y lesiones en el hígado y vías biliares (Rolfe *et al.*, 1994; Khatoon *et al.*, 2003).

Los paranfistómidos se encuentran fijados a la mucosa intestinal mediante su ventosa ventral y, en casos de infecciones masivas, llegan a penetrar en la misma, de manera que para su extracción no basta con realizar lavados sino que es necesario un raspado de la mucosa (Boray, 1969).

3.5.1.2. Lesiones macroscópicas asociadas a formas adultas de paranfistómidos

Las formas adultas se fijan a la pared del rumen y retículo mediante su acetábulo. La importancia de las lesiones causadas en el rumen por las formas adultas de paranfistómidos no está suficientemente esclarecida. La mayoría de los autores consideran que estos trematodos no causan alteraciones que se traduzcan en cuadros clínicos o subclínicos (Horak, 1971; Singh *et al.*, 1971). Sin embargo, estudios con altas dosis infectantes, en un modelo experimental desarrollado en ganado ovino, han demostrado que las papilas ruminales pueden llegar a fusionarse y formar agregados de un centímetro de diámetro y 0,5 centímetros de largo con el contenido ruminal firmemente adherido a ellos. Cuando este material digestivo se retiraba, las papilas subyacentes tenían una coloración roja y mostraban un acortamiento en su longitud. En el retículo, a pesar de constatarse la presencia de formas adultas de paranfistómidos, no se han descrito lesiones macroscópicas (Rolfe *et al.*, 1994).

3.5.2. Lesiones microscópicas

El conocimiento que actualmente existe de las lesiones microscópicas provocadas por los paranfistómidos en el hospedador definitivo es bastante escaso. Los únicos intentos de descripción histopatológica se han realizado en estudios de los brotes de enfermedad clínica y en infecciones experimentales, por lo que han tenido un enfoque más clínico de la parasitación que anatomopatológico.

3.5.2.1. Lesiones microscópicas asociadas a formas juveniles de paranfistómidos

Las lesiones causadas por los paranfistómidos inmaduros se observan en el intestino delgado y su intensidad está ligada a la dosis infectante. Como ya se indicó, una gran cantidad de metacercarias desenquistándose en esta localización producen lesiones de mayor gravedad debido a su fijación. Además, cuanto mayor sea la dosis infectante, la maduración a formas adultas se retrasa, por lo que su efecto patógeno perdura durante más tiempo (Boray, 1969; Horak, 1971; Rolfe *et al.*, 1994).

En estudios experimentales, llevados a cabo por Singh *et al.* (1984) en cabras infectadas con *Paramphistomum cervi*, por Rolfe *et al.* (1994) en ovinos con metacercarias de *Paramphistomum ichikawai* y por Mavenyengwa *et al.* (2005) en bovinos con *Calicophoron microbothrium*, se observó que las alteraciones histológicas en el intestino se caracterizaban por atrofia y degeneración de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las células caliciformes, dilatación quística de las glándulas de Brunner e hiperplasia de las placas de Peyer. En la lámina propia, fue evidente un infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos, mastocitos y, en menor cantidad, leucocitos globulares, basófilos y linfocitos. La hiperplasia de las glándulas de Brunner es otra alteración observada en esta parasitosis (Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005). La presencia de formas juveniles de paranfistómidos únicamente se observó en el experimento con ganado ovino y caprino. En estos animales, los trematodos se fijaban mediante el acetábulo a las vellosidades intestinales o penetraban hasta la capa muscular de la mucosa (Singh *et al.*, 1984; Rolfe *et al.*, 1994). Asimismo, se ha

comprobado la desaparición paulatina del infiltrado inflamatorio y el comienzo de fenómenos de reparación tisular coincidiendo con la migración de los trematodos hacia los preestómagos. Estos cambios morfológicos coinciden con lo descrito en brotes clínicos de paranfistomosis (Singh *et al.*, 1971; Mason *et al.*, 2012; Millar *et al.*, 2012). También se ha indicado que las lesiones microscópicas en el duodeno pueden observarse aún en ausencia de dichos parásitos, incluso a los 60 y 80 días postinfección (Singh *et al.*, 1984; Mavenyengwa *et al.*, 2005).

3.5.2.2. Lesiones microscópicas asociadas a formas adultas de paranfistómidos

Las alteraciones microscópicas producidas por los paranfistómidos adultos consisten en un engrosamiento y vacuolización del estrato córneo del epitelio ruminal. En las zonas en las que la papila se ha necrosado por la acción del acetábulo del parásito, se observan microabscesos en el estrato córneo. En la unión dermoepidérmica de estas áreas afectadas, se aprecia un ligero infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos, escasos linfocitos y células plasmáticas (Singh *et al.*, 1984; Rolfe *et al.*, 199; Mavenyengwa *et al.*, 2005; Mason *et al.*, 2012).

3.6. Diagnóstico

3.6.1. Diagnóstico clínico

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el desarrollo de la paranfistomosis se pueden identificar claramente dos fases en el progreso de la infección que determinan la aparición del correspondiente cuadro clínico: una forma aguda asociada a las migraciones de las formas juveniles y una crónica asociada a la localización de los paranfistómidos adultos en los preestómagos.

Los cuadros clínicos agudos causados por infecciones masivas de metacercarias cursan con apatía y anorexia. Al cabo de unos días comienzan los signos de diarrea sanguinolenta profusa que no responde a los tratamientos antibióticos y en la que pueden llegar a identificarse formas juveniles de paranfistómidos que han sido evacuados. A medida que evoluciona el proceso, las manifestaciones de caquexia son evidentes (edema submandibular, pérdida de condición corporal, entre otras). En los casos más graves, el animal muere por los desequilibrios metabólicos (Dorchies *et al.,* 2000; Mavenyengwa *et al.,* 2005; Alzieu & Dorchies, 2007; Dorny *et al.,* 2011; Mason *et al.,* 2012; Millar *et al.,* 2012; Tandon *et al.,* 2014).

Para poder realizar un diagnóstico de paranfistomosis la sintomatología ha de apoyarse también en datos epidemiológicos como son: estación del año, sistema de explotación, pluviometría de la zona y la presencia de antecedentes de paranfistomosis en la región, principalmente. En los países templados, la aparición al final de la primavera o del otoño de signos digestivos manifestados en una diarrea fétida de color marrón-verdoso en animales que muestran clara apatía, anorexia y polidipsia, y que se han alimentado en pastos húmedos o inundados, dirigen el diagnóstico clínico hacia una paranfistomosis (Rieu, 2004).

El establecimiento de las formas adultas en los preestómagos no suele tener repercusiones clínicas. No obstante, en infecciones masivas, el cuadro clínico que se puede evidenciar se caracteriza por una serie de signos escasamente específicos, como son atonía ruminal, timpanismo y descenso de las producciones (Alzieu & Dorchies, 2007; Anuracpreeda *et al*, 2008; Foster *et al.*, 2008). La aparición de estos signos al final del verano y en el otoño, junto con la ausencia de cambios en la dieta del animal, permiten sospechar de una paranfistomosis.

Dado que los signos clínicos apreciados en la paranfistomosis son compartidos por otros procesos morbosos, es necesario realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades caquectizantes tales como la paratuberculosis, la fasciolosis y la estrongilosis. En el caso de cuadros clínicos con manifestaciones ruminales, el diagnóstico diferencial ha de llevarse a cabo con la retículo-pericarditis traumática y la sobrecarga ruminal (Rieu, 2004).

3.6.2. Estudios coprológicos

El diagnóstico coprológico se basa en la puesta en evidencia en las heces de las formas inmaduras de los parásitos, en las fases tempranas de la infección, o de los huevos, cuando el parásito completa su ciclo biológico (Rieu, 2004).

El hallazgo de formas inmaduras se lleva a cabo mediante la tamización de las heces diarreicas en una malla de 200µm de diámetro de criba. No obstante, la relación existente entre la cantidad de paranfistómidos recuperados en heces y la carga parasitaria es muy variable y, por tanto, poco fiable. Un resultado negativo no se relaciona necesariamente con la ausencia de parasitación (Butler & Yeoman, 1962).

Como en otras parasitosis, el método de diagnóstico de la paranfistomosis más empleado es el recuento de huevos en heces. Para el aislamiento de los huevos de paranfistómidos es necesario el empleo de medios líquidos de alta densidad o técnicas de sedimentación debido a que los huevos de esta familia no flotan en el agua a causa de su gran peso, por lo que es la técnica de McMaster la más utilizada (Dorchies, 2006).

Los huevos de los paranfistómidos miden, en general, entre 160 y 180µm, presentan una cubierta operculada característica y son de color claro (Sanabria *et al.*, 2011; Tandon *et al.*, 2014). Morfológicamente son similares a los huevos de *Fasciola hepatica*, si bien la coloración amarillo-parduzca de estos últimos permiten la diferenciación entre ambos (Rieu *et al.*, 2007).

Mage y Dorchies (1998) fueron los primeros en relacionar la carga parasitaria con la excreción de huevos en las heces de ganado bovino infectado por paranfistómidos. Así, observaron que a mayor carga parasitaria en los preestómagos, mayor es la cantidad de huevos por gramo de heces. Sin embargo, a partir de 100 huevos/g, la relación entre el número de huevos eliminado y el número de formas adultas en los preestómagos no es directa (Rieu *et al.,* 2007). Según Horak (1971) este hecho puede explicarse por los fenómenos de sobrepoblación parasitaria que disminuyen la tasa de puesta. La sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos de diagnóstico coproscópicos varían entre el 82-94% y el 90-98% respectivamente (Rieu *et al.,* 2007; Malrait *et al.,* 2015).

La principal limitación, como método diagnóstico, que tiene el recuento de huevos en heces, es consecuencia del propio ciclo biológico de los paranfistómidos. Dado que la excreción de los huevos comienza tras el periodo de prepatencia (7 a 10 semanas), la detección de los mismos no es posible en las primeras fases de la parasitosis, precisamente cuando se describen cuadros clínicos graves.

3.6.3. Inmunodiagnóstico

Dadas las limitaciones que tienen las pruebas coprológicas en la detección de la infección durante el periodo de prepatencia, se han desarrollado en los últimos años técnicas inmunológicas tanto para la detección de anticuerpos parasitarios en sangre periférica como, en menor medida, para la detección de coproantígenos (Tandon *et al.,* 2014). Mediante estos procedimientos se han obtenido resultados prometedores en la detección de las infecciones subclínicas puesto que, los métodos inmunológicos presentan mayor especificidad y sensibilidad que las técnicas coprológicas convencionales, así como ausencia de reacciones cruzadas con otras trematodosis (Díaz *et al.,* 2006; Jyoti *et al.,* 2014).

La técnica de inmunoadsorción **ELISA** se fundamenta en la fijación de anticuerpos específicos a antígenos que son puestos en evidencia mediante una reacción

enzimática coloreada. En los últimos años, y ante las posibilidades que tiene este método de diagnóstico, varios autores han caracterizado diferentes moléculas antigénicas de los paranfistómidos que podrían ser de utilidad para el desarrollo del ELISA (Anuracpreeda *et al.,* 2008; 2013; Saifullah *et al.,* 2011).

Otro método inmunológico evaluado en la paranfistomosis ha consistido en la **evaluación clínica de una respuesta inmunitaria local de hipersensibilidad tipo l** frente a antígenos inyectados **en la piel**. El efecto que se produce es consecuencia de la degranulación de los mastocitos tras la interacción con las IgE unidas al antígeno, en aquellos animales que ya hayan estado en contacto con esta molécula alergénica. Las pruebas de este método diagnóstico que se han llevado a cabo en paranfistomosis de pequeños rumiantes no han generado resultados satisfactorios, bien por la producción de reacciones cruzadas con otras trematodosis (Horak, 1967) o porque directamente han resultado fallidas (Singh *et al.,* 1983). En ganado bovino no hay ningún estudio de evaluación de esta prueba.

Otra técnica de fundamento inmunológico, la **prueba de fijación del complemento,** tiene una serie de limitaciones que hace complicada la interpretación de los resultados y que tampoco permite ni la diferenciación entre animales infectados e inmunizados ni la detección de las formas agudas (Horak, 1967).

3.6.4. Diagnóstico morfológico del parásito

Los métodos morfoanatómicos, previa fijación en etanol y tinción con carmín borácico, así como el empleo de técnicas histológicas, permiten la identificación de los paranfistómidos, y por lo tanto, su diagnóstico.

Sin embargo, la identificación morfológica requiere un cierto entrenamiento en la valoración de los parámetros morfológicos (Dorchies, 1989) y tiene una escasa sensibilidad principalmente en la identificación de las fases larvarias del parásito (Martínez-Ibeas *et al.,* 2013).

3.6.5. Diagnóstico molecular

Los métodos diagnósticos basados en la técnica PCR se han desarrollado en los últimos años en la medida que se ha obtenido un mayor conocimiento del genoma de los paranfistómidos. El estudio del material genético, tanto mitocondrial como nuclear, y el almacenamiento de las secuencias en bases de datos (como el NCBI GenBank) permiten el diseño rápido de *primers* y la adaptación de los propios procedimientos. Además, las nuevas técnicas de PCR múltiple o en tiempo real son muy útiles para la identificación de varias especies de parásito dentro del mismo hospedador.

Como ya se ha indicado previamente en esta memoria, en el caso de los paranfistómidos la secuencia que ha sido objeto de la mayoría de los estudios es la ITS-2, la cual está completamente secuenciada en la especie *P. cervi* (Bazsalovicsová *et al.*, 2010; Lotfy *et al.*, 2010; Sanabria *et al.*, 2011). Recientemente, Martínez-Ibeas *et al.* (2013) han desarrollado un método de PCR múltiple sobre ADNmt que permite la identificación de *C. daubneyi* y *F. hepatica* dentro del mismo molusco intermediario. Este trabajo diseña una herramienta muy útil para los estudios epidemiológicos puesto que ambas especies de trematodos comparten el mismo hospedador intermediario.

4. PRIMER TRABAJO

Ferreras, M.C, González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L., Fernández, M., Manga-González, M.Y., 2014. *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Vet. Parasitol.* 199 (3-4), 268-271.

4.1. *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain)

M Carmen Ferreras^{a*}, Camino González-Lanza^a, Valentín Pérez^a, Miguel Fuertes^a, Julio Benavides^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Javier Giráldez^a, Ana María Martínez-Ibeas^a, Laetitia Delgado^a, Miguel Fernández^a, M Yolanda Manga-González^a

^(a) Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE. Finca Marzanas. Grulleros. León, Spain

^(b) Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia. Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7. 15318 Abegondo, A Coruña, Spain *Corresponding autor:

M^a del Carmen Ferreras, Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24071 León, Spain Phone: +34 987291326 Fax: +34 987291194 E-mail: <u>mcfere@unileon.es</u>

4.1.1. Abstract

The prevalence and aetiology of natural paramphistomosis was investigated in cattle slaughtered in the Castilla y León region (Spain) over a 3 year-period. The overall prevalence of positive animals was 6.20%. The parasite burden per animal ranged from 8 to 8005 (median = 144) and the ruminal atrium had the highest parasite burden whereas the ruminal dorsal sac the lowest. The prevalence and parasite burden increased with age while these parameters were lower in cattle under intensive management. *Calicophoron daubneyi* was the only Paramphistomidae species identified using morphoanatomical, histological and molecular methods in the studied animals.

Keywords

Paramphistomosis, Calicophoron daubneyi, cattle, epidemiology

4.1.2. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitism caused by different species of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), belonging to several genera (*Paramphistomum*, *Calicophoron* and *Cotylophoron*). It has a worldwide distribution and in tropical and sub-tropical regions is regarded as a highly pathogenic disease (Dorny *et al.*, 2011). In Europe, this parasitism is generally considered as clinically irrelevant, although occasionally weight loss and decreased milk production (Spence *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2008), or even mortality in adult sheep, has been described (Mason *et al.*, 2012).

Castilla y León region, in the northwest of Spain, has the largest cattle population in Spain (over one million). Nevertheless, there is a lack of information about paramphistomosis in domestic ruminants of this area. In Galicia, a geographically close region, *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) was the only paramphistome found in slaughtered cattle (González-Warleta *et al.,* 2013).

The aim of this study was to investigate the prevalence of Paramphistomidae species in abattoir slaughtered cattle in Castilla y León, and determine which species were present.

4.1.3. Materials and methods

4.1.3.1. Animals

Cattle sampled (total n = 790) were from both mountainous and arable areas, primarily from León, Zamora, Valladolid and Palencia provinces (Northwestern Spain), during the spring-summer seasons of 2010, 2011 and 2012 from an abattoir located in the city of León (Year 1: n = 481; Year 2: n = 173; Year 3: n = 136). Ages ranged from 10 months to 19 years and belonged to both sexes (61.3% females; 38.6% males). The cattle came from 184 farms, 93 of them (50.5%) managed intensively (animals kept indoors and with no access to pasture) and the remaining 91 (49.4%) in a semi-intensive system (at pasture for variable periods of time during the grazing season). Herds were classified, according to their primary purpose, as beef (81.6%) or dairy (18.3%). Detailed information of all the animals and farms was provided by the slaughterhouse and the Livestock Section of the Castilla y León Government.

4.1.3.2. Sampling

At the slaughterhouse, the rumen, reticulum, omasum, abomasum and proximal duodenum from each animal were examined for the presence of parasites. The rumen and reticulum of all the parasitized cattle were processed for worm recovery (Fig. 1).



Figure 1. Adults of C. daubneyi present on the reticulum mucosa from an adult cow. Bar= 1 cm.

4.1.3.3. Parasite count and identification

For each bovid, the presence and number of the parasites in the reticulum and their location(s) in the different anatomical parts of the rumen (rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ventral sac and dorsal sac) was evaluated. A representative number of paramphistomes from each parasitized cattle were fixed in 70% ethanol and 10% neutral-buffered formalin for subsequent identification, while other specimens were frozen individually and stored at -85 °C until DNA extraction.

A total of 472 randomly selected alcohol-fixed paramphistomes were stained with borax carmine and microscopically evaluated as reported previously (Eduardo, 1983). Additionally, a total of 200 formalin-fixed paramphistomes were processed for histological examination. Species specific Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) intergene zone and mitochondrial DNA were amplified for molecular identification of *C. daubneyi* (González-Warleta *et al.*, 2013; Martínez-Ibeas *et al.*, 2013).

4.1.3.4. Statistical analysis

Animals were classified according to farm intensification level (semi-intensive *vs.* intensive systems), dairy or beef farms and age (<12 months, 12 - 30 months and >30 months). Effects of these variables on prevalence and parasite burden (logarithmically transformed) were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The strength of the relationship between prevalence and the above mentioned independent variables were estimated through logistic regression. Proportion of the total worms localized in the reticulum and different anatomical parts of the rumen was subjected to analysis of variance. All statistical procedures were carried out using SAS package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 9.1).

4.1.4. Results

4.1.4.1. Parasite identification

All the adult parasite specimens studied from the reticula and rumina of infected cattle were identified morphoanatomically and histologically as *C. daubneyi*. The molecular study by ITS-2 confirmed, in all the worms examined, a 410 b fragment with a nucleotide composition identical (100% homology) to that published for *C. daubneyi* in GenBankTM (Access No. AY790883). Moreover, the studied specimens showed 100% homology with the mtDNA fragment 885 pb of *C. daubneyi* (Gen Bank, Access No. JQ815200).

4.1.4.2. Epidemiological findings

Overall, 49 out of the 790 cattle examined (6.20%) had adult flukes in the rumen and reticulum, and number of parasites per animal ranged from 8 to 8005 (median = 144).

Neither prevalence of natural paramphistomosis nor fluke burden were significantly affected by the production purpose of the animal (beef *vs* dairy), or the breed. However, prevalence rate and fluke burden were significantly higher (P<0.05) in semi-intensive (10.04% and 253 respectively) than intensive systems (4.22% and 58).

The age of the animal also showed a significant influence (P<0.05) over both the prevalence of infection, from 2.62% (<12 months) to 17.88% (>30 months) and the median worm burden (25 at <12 months; 253 at >30 months). Significant differences (P=0.001) were observed also between females (8.71%; n=42) and males (2.27%; n=7).

However, when all the factors were studied together, age was the only independent variable that was significantly correlated with the prevalence of *C. daubneyi* infection (Odds ratio=2.49; 1.55 to 4.902; P=<0.001). The average slaughter age was greater for cattle from semi-intensive than intensive systems (51.4 \pm 3.49 vs 18.9 \pm 1.08 months) and for females compared to males (41.4 \pm 2.38 vs 12.0 \pm 0.16 months).

When considering the production purpose of the animal, it is worth noting that 417 of the 790 cattle examined (52.7%) came from feedlots and *C. daubneyi* was detected in only 19 of them (4.5%). It should also be mentioned that these feedlot cattle were breeding on pastures during different periods of time.

4.1.4.3. Parasite burden

The number of fluke was significantly (P<0.01) higher in the rumen than in the reticulum (90.81±1.71% vs 9.19±1.71%). Within the rumen, they were more numerous in the ruminal atrium (62.93±3.31%) and the ventral sac (16.53±2.15%). Animals from the semi-intensive management system had significantly less parasites in their ruminal atria (P<0.005, Table 1). Older animals (>30 months) had the highest fluke burden (P<0.05), with an increased number of parasites in the rumino-reticular fold compared to the other groups (Table 1).

	Locali	ization	Intraruminal localization				
	Reticulum	Rumen	Orifice	Ruminal-reticulum fold	Atrium	Ventral sac	Dorsal sac
Туре							
Dairy	9.6±4.20	90.4±4.20	2.8±1.028	15.4±4.41	63.2±6.18	16.3±2.52	2.3±1.22
Beef	9.1±1.88	90.9±1.88	9.6±3.08	8.9±2.01	62.9±3.92	16.6±2.69	2.0±0.56
Management system	_						
Semi-intensive	11.5±2.51	88.5±2.51	6.8±2.34	13.3±3.01	57.1±4.25	19.9±3.22	2.8±0.83
Intensive	6.3±2.16	93.6±2.16	9.6±4.64	6.7±1.64	70.1±4.88	12.3±2.52	1.2±0.44
Age							
< 12 months	3.4±1.76 ^a	96.6±1.76 ^a	4.8±4.83	5.9 ± 1.96^{a}	72.5±6.30 ^b	15.5±5.37	1.2±1.23
12 - 30 months	4.1±1.32 ^a	95.9±1.32 ^a	3.2±1.60	3.4±1.34ª	76.6±4.00 ^b	14.5±4.60	2.2±0.84
> 30 months	12.6±2.54b	87.4±2.54 ^b	10.7±3.63	14.0±2.76 ^b	55.5±4.44 ^a	17.5±2.83	2.3±0.70

 Table 1. Effect of farm characteristics and age of animals on distribution of parasites in the rumen-reticulum (mean value ± standard error).

Within the same factor and column, means with different letters (a and b) are significantly different (P<0.05).

4.1.5. Discussion

The present study is the first report of the prevalence and aetiology of naturally acquired paramphistomosis *by C. daubneyi* in slaughtered cattle from the Castilla y León region (Spain).

The overall prevalence (6.20%) was lower than those reported in other areas of Spain or France (González-Warleta *et al.*, 2013; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000), but similar to that observed in Algeria (Titi *et al.*, 2010). Climate has been proposed to influence infection rate in cattle (Titi *et al.*, 2010) and as Castilla y León has a temperate to cold, dry climate this may hinder the speed of the parasite life-cycle. An unexpected finding of this study was the presence of naturally acquired paramphistomosis in cattle from feedlots. This finding, not recorded in other Spanish territories (Arias *et al.*, 2011; González-Warleta *et al.*, 2013), has been also observed in Irish store cattle (Murphy *et al.*, 2008). Possible explanations are if that these animals were infected while grazing at pasture before their confinement in feedlots or ingestion of contaminated fodder while in the feedlot.

Paramphistomosis infection was found in animals of all age categories, although the prevalence was significantly higher in cattle older than 30 months, suggesting that repeated exposures to the parasite do not confer protection against re-infections. This is in contrast to other studies (Dorny *et al.*, 2011). A higher percentage of females animals were infected which is in agreement with the suggested genetic or hormonal predisposition of females to paramphistomosis (Szmidt-Adjidé *et al.* 2000; Titi *et al.*, 2010). However, it has to be considered that, in this study, sex was closely related to the age of the animal.

The climate of the region may have contributed to an individual parasite burden lower than those reported in other areas with a more humid and less extreme climates (Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2011; González-Warleta *et al.*, 2013). Differences observed according to the management system are probably related to the maintenance at pasture for longer periods of time of animals under a semi-intensive than an intensive system and consequently more exposure to the infective form of the parasite.

The mean worm count was the highest in the ruminal atrium and the lowest in the dorsal sac, in agreement with the findings of González-Warleta *et al.* (2013). The lower burden in the latter may be related to its scarce mucosal papillae which is due, in turn, to the gas dome of CO_2 and methane present in the area (Tschuor and Clauss, 2008).

The long leaf-shaped papillae of the atrium may have had a protective effect for the flukes and the presence of a fluid layer may favour the intake of nutrients by the parasite.

Our results showed that *C. daubneyi* is the only Paramphistomidae species found in naturally infected cattle in the Castilla y León region. This species, although considered as one of the less widespread (Silvestre *et al.*, 2000), has also been found in other regions of Spain (González-Warleta *et al.* 2013; Martínez-Ibeas *et al.* 2013), across Europe (Silvestre *et al.*, 2000; Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000;Gordon *et al.*, 2013) and Algeria (Titi *et al.*, 2010).

In conclusion, this is the first study of the prevalence of cattle paramphistomosis in Castilla y León region of Spain, and the only species identified was *C. daubneyi*. Data provided may be helpful to devise further studies about seasonality of infection, habitat of the intermediate host, interactions with other trematodes and appropriate control strategies for paramphistomosis.

4.1.6. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

4.1.7. Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León (JCyL). The authors wish to thank Dr. Dagleish (Moredun Research Institute) for proofreading of the manuscript, and Mses. Del-Pozo, Espiniella and Carcedo of the IGM for technical assistance. The cooperation of the managing director (J.L. Carracedo) and the veterinary inspectors (B.E. Postigo, B. Prieto, N. Aller) of the slaughterhouse and E. Sevillano and A. Sánchez-Pedreira of the Agriculture and Livestock Service (JCyL) is also acknowledged. A. M. Martínez-Ibeas was supported by the JCyL and the European Social Funds (ESF) and J. Benavides by the JAE-Doc program (CSIC-ESF).

4.1.8. References

Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet. Rec.* 168, 408-412.

Dinnik, J.A., 1962. Paramphistomum daubneyi sp. Nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highlands. *Parasitology* 52, 143-151.

Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet. Parasitol.* 175, 293-299.

Eduardo, S.L., 1983. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901 with species reference to the morphology of species occurring in ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Syst. Parasitol.* 5, 25-79.

Foster, A.P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M.P., Twomey, D.F., Millar, M.F. Taylor, M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *Vet. Rec.* 162, 528.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Vet. Parasitol.* 191, 252-263.

Gordon, D.K., Roberts, L.C.P., Lean, N., Zadoks, R.N., Sargison, N.D., Skuce, P.J., 2013. Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Vet. Parasitol.* 195, 65-71.

Martínez-Ibeas, A.M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-González, M.Y., 2013. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Vet. Parasitol.* 195, 57-64.

Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *Vet. Rec.* 170, 343-344.

Murphy, T.M., Power, E.P., Sánchez-Miguel, C., Casey, M.J., Toolan, D.P., Fagan, J.G., 2008. Paramphistomosis in Irish cattle. *Vet. Rec.* 162, 831.

Silvestre, A., Sauvé, C., Cabaret, J., 2000. Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet. Rec.* 146, 674-675.

Spence, S.A., Fraser, G.C., Chang, S., 1996. Response in milk production to the control of gastro-intestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Aust. Vet. J.* 74, 456-459.

Szmidt-Adjidé, V., Abrous, M., Adjidé, C.C., Dreyfuss, G., Lecompte, A., Cabaret, J., Rondelaud, D., 2000. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Vet. Parasitol.* 87, 133-138.

Titi, A., Mekroud, A., Sedraoui, S., Vignoles, P., Rodelaud, D., 2010. Prevalence and intensity of *Paramphistomum daubneyi* infections in cattle from northeastern Algeria. *J. Helminthol.* 84, 177-181.

Tschuor, A., Clauss, M., 2008. Investigations on the stratification of forestomach contents in ruminants: an ultrasonographic approach. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 627-633.

5. SEGUNDO TRABAJO

Fuertes, M., Pérez, V., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, F.J., Fernández, M., Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., 2015. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Vet. Parasitol.* 209 (3-4), 188-196.
5.1. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes

Miguel Fuertes^a, Valentín Pérez^a, Julio Benavides^a, M Camino González-Lanza^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Francisco Javier Giráldez^a, Miguel Fernández^a, M Yolanda Manga-González^a, M Carmen Ferreras^{a*}

^(a) Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

^(b) Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia. Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7, 15318 Abegondo, A Coruña, Spain

*Corresponding author: mcfere@unileon.es

5.1.1. Abstract

Local host response and parasite distribution were studied in the forestomachs, abomasum, duodenum and regional lymph nodes of cattle suffering from bovine paramphistomosis. The parasites were found attached, by its ventral sucker, to small conical papillae of the rumen and reticulum. Affected papillae, showed morphological changes denoted by very narrow stalks and expanded heads. Histologically, these changes were characterized by epithelial acanthosis-hyperkeratosis of the epithelium. Infiltration of inflammatory cells was often related with the epithelial changes, although it was also found in the duodenal mucosa and submucosa. These cells were arranged as aggregates or follicles but sparse infiltration of eosinophils, globule leukocytes, mast cells or macrophages was also observed in the lamina propria. Tissue damage and inflammatory reaction were more severe in the ruminal atrium, where the largest number of flukes and affected papillae were observed. In contrast, lesions in the ruminal dorsal sac were absent or mild. Statistical correlation between lesion severity and parasite burden was confirmed.

Keywords

Paramphistomosis, Calicophoron daubneyi, cattle, pathology.

5.1.2. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitosis caused by different species of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), with several genera (i. e.

Paramphistomum, *Calicophoron* and *Cotylophoron*) described. Recent epidemiological studies carried out in the North West of Spain have reported that *Calicophoron daubneyi* is the only paramphistomid found in slaughtered cattle, with prevalences between 6.2% and 18.8% (González-Warleta *et al.*, 2013; Ferreras *et al.*, 2014).

While in tropical regions this parasitosis has been regarded as a very pathogenic disease (Dorny *et al.*, 2011), in Europe it is considered a harmless entity although the prevalence of paramphistomiasis has increased in this area since 2008 (Foster *et al.*, 2008, Zintl *et al.*, 2014). The most serious clinical consequences have been associated with severe haemorrhagic enteritis, produced by the immature paramphistomes before migration to the forestomachs (Toledo *et al.*, 2006; Millar *et al.*, 2012), that occasionally has been reported as the cause of severe outbreaks with relevant mortality (Mason *et al.*, 2012). Loss of weight and a decrease in milk production are the most common clinical signs associated with paramphistomosis (Foster *et al.*, 2008).

Pathological changes related to natural paramphistomosis have not been studied in detail. In several experimental studies, it has been shown that immature parasites cause a duodenitis characterized by a mononuclear and eosinophilic infiltrate together with Brunner's gland hyperplasia that persist even when the paramphistomes have migrated to the forestomachs (Rolfe *et al.*, 1994; Mavenyengwa *et al.*, 2005). The frequency and significance of lesions caused by the adult worms is unclear (Toledo *et al.*, 2006). Most authors have suggested that the adult paramphistomes are relatively harmless (Brown *et al.*, 2007) but experimental infections have shown that they can cause atrophy and severe cornification of ruminal papillae (Rolfe *et al.*, 1994) with a slight inflammatory reaction in the rumen (Mavenyengwa *et al.*, 2008).

The post-mortem examination of the forestomachs in cattle suffering from natural paramphistomosis has shown that the greatest parasite burden can be found in the ruminal atrium and that *Calicophorum daubneyi* was the only species of the Paramphistomidae family identified in these animals (Ferreras *et al.*, 2014). Due to the absence of systematic studies on pathological changes in cattle naturally infected by *C. daubneyi*, the aim of the current study was to evaluate and characterize the gross and microscopic lesions caused by adult flukes in natural paramphistomosis and their relation to the parasite burden in different gastrointestinal compartments and regional lymph nodes.

5.1.3. Materials and methods

5.1.3.1. Pathological studies

The rumen, reticulum, omasum, abomasum and proximal duodenum of 64 slaughtered cattle were examined for the presence of parasites and gross pathological changes. In all the parasitized animals, the rumen and reticulum were removed and brought to the laboratory for worm recovery and detailed macroscopic examination. Samples from the different anatomical parts of the reticulum, rumen (rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ventral sac, dorsal sac; at least 12 per animal) and any other location showing macroscopic lesions were fixed in 10% neutral-buffered formalin. The total number of parasites identified at the reticulum and different anatomical areas of the rumen was estimated as explained in a previous study (Ferreras *et al.*, 2014). Representative samples from the remaining non parasitized organs (omasum, abomasum, duodenum and regional lymph nodes) of these animals were also recovered and fixed in 10% neutral-buffered formalin. Identical samples were taken and fixed from the non-parasitized animals (n=15).

Fixed samples were dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax following conventional processing for histological examination. Microtome sections (4 µm) were cut, mounted on glass microscope slides and stained with haematoxylin and eosin (HE), Toluidine blue for mast cell identification, Congo red for amyloid staining, Masson-Goldner thricrome, periodic-acid-Schiff (PAS), alcian blue and Perls' Prusian blue stains for mucins and ferric pigments identification. Finally, the slides were dehydrated and mounted for the histological examination.

The severity of the lesions in the reticulum, rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ruminal ventral sac and ruminal dorsal sac was subjectively evaluated for each section. This was graded on a scale from - to ++++: - = no lesion; + = minimal; ++ = mild; +++ = moderate; ++++ = marked.

5.1.3.2. Statistical analysis

Chi-square procedure was used to study the association between fluke attachment and severity of lesions in the digestive mucosa. In the parasitized animals, correlation between parasite burden and severity of lesions in each digestive compartment was evaluated using Spearman test. Data of parasite burden were log transformed, adding 1 to each data point before transforming. Statistical analysis was performed using FREQ and CORR procedures of SAS package (SAS Institute, 1999).

5.1.4. Results

5.1.4.1. Gross pathology

Macroscopically, adult flukes of *C. daubneyi* were attached to conical ruminal and reticular papillae by the ventral sucker. They were mainly located amongst the leaf-shaped papillae of the rumen and at the deeper part of the honeycomb cells of the reticulum. After the parasites were removed, those papillae showed a shortened mushroom shape with occasional necrosis and ulceration of the tips (Fig. 1). In some parasitized areas of the forestomachs, focal loss of papillae was observed. The mucosa of the rumen, reticulum and omasum of 9 parasitized and 4 control cattle presented a parakeratotic hyperkeratosis characterized by a diffuse darkening of the surface.



Figure 1. *C. daubneyi* adult flukes on the mucosa of the rumino-reticular fold. Note the distinct conical papillae in which parasites were attached (arrowheads). Parasite burden = 719 (349 worms recovered from the rumino-reticular fold). Bar= 0.5 cm.

Abomasal mucosae was congested and showed punctuate haemorrhages and ulcers in the pyloric region of 12 parasitized cattle. Widespread multifocal, small (1-2 mm) white foci were seen in the abomasal mucosae in 5 parasitized and 2 control cattle.

In the duodenum of 15 parasitized animals, variable degree of mucous secretion, congestion and small haemorrhagic areas were observed. At opening of the duodenum, three of them also showed small (1-2 mm) whitish nodules in the mucosal surface and several small ulcers were found in another one. No gross changes were seen in the control animals. Adult flukes of *Fasciola hepatica* were found in the duodenal mucosa of the cow with the highest paramphistome burden.

Frequently, the regional lymph nodes in all digestive locations examined were elarged.

5.1.4.2. Histopathological changes

Reticulum and rumen

Microscopically the most evident changes were found in the mucosa of those areas parasitized by adult flukes. These lesions involved the epithelium and the core (an extension of the lamina propria-submucosa) of the conical papillae encircled by the ventral sucker of the adult parasite (Fig. 2a and b).



Figure 2. a) Rumino-reticular orifice. Only the short conical papillae located between the large ruminal papillae were affected. Parasite burden = 8005 (206 worms recovered from the rumino-reticular orifice). H-E. Bar = 500 μ m. b) Ruminal atrium. Encircling of the ruminal conical papilla by the ventral sucker of the adult parasite. Parasite burden = 20 (20 worms recovered from the ruminal atrium). H-E. Bar = 600 μ m. c) Reticulum. Reticular papilla with narrow stalk and expanded head. Parasite burden = 258 (14 worms recovered from the reticulum). H-E. Bar = 300 μ m. d) High-magnification view of Fig. 2c. Erosive effect of the parasite ventral sucker at the site of attachment. The lamina propria was covered by the basal and corneum layers. H-E. Bar= 100 μ m.

Conical papillae in which the adults of *C. daubneyi* were attached became mushroom-shaped, with narrow stalks and expanded heads (Fig. 2b and c). They were covered by a thickened keratinized stratified squamous epithelium showing variable degree of acanthosis, hyperkeratosis and evident rete pegs (Figs.2c and 3a). At the site of attachment, mainly the base of the papillae, the lining epithelium was markedly

narrowed (Figs.2c and 3a). The stratum squamous was thinned (1-3 cell layers) or absent; and the stratum granulosum and corneum were very thinned (2-3 cell layers) or eroded. The basal stratum was generally intact, although it was occasionally flattened. In the latter, the basal lamina was disrupted and the lamina propria was covered only by the stratum corneum (Fig. 2d). In the parasitized samples, inflammatory cells were found within the epithelium, usually in low amounts: intraepithelial lymphocytes (IELs), usually at suprabasal location and with irregular nuclear contours ("squiggle cells"); intraepithelial globule leukocytes (GLs) characterized by the presence of large acidophilic PAS-positive, Alcian blue-negative and Toluidine blue-negative (no metachromasia) cytoplasmic granules, occasionally in high amount, amongst the basal and squamous cells; intraepithelial eosinophils (IEEs) in the same location of IGLs but also forming isolated infiltrates in the stratum corneum; and an increase in the number of Langerhans cells (LCs), characterized by dark elongated nuclei surrounded by a clear space, located preferentially in the squamous cell layer (Fig. 3b-d). These inflammatory cells were not found in the samples from the control, non-parasitized animals.

The lamina propria of the parasitized papillae showed a moderate inflammatory infiltrate. It was formed by lymphocytes, macrophages, eosinophils, plasma cells, GLs and mast cells scattered throughout the connective tissue and predominantly located in the subepithelial areas, around the capillaries and venules that showed hypertrophied (reactive) endothelial cells (Fig. 3a and b). Only in damaged papillae Toluidine blue staining allowed detection of mucosal mast cells intermingled with other cell types in the lamina propria (Fig. 3d). Mast cell granules stained positive also with Alcian blue. GLs were present in lower number in the lamina propria and their granules lacked metachromasia when stained with the Toluidine blue dye and were negative for Alcian blue method. A constant finding in all the parasitized cattle was the presence of lymphocyte aggregates, with follicles formation, within the lamina propria adjacent to the areas of parasite attachment (Fig. 3a).

In two parasitized cattle, small granulomas composed of a central area of necrotic debris, surrounded by numerous eosinophils, macrophages, giant cells, lymphocytes and an external layer of fibrous tissue were observed. They were present in the lamina propria of the dorsal sac and rumino-reticular fold.

Intact trematodes, identified as *C. daubneyi* (Ferreras *et al.*, 2014) were observed attached to the damaged papillae. The pharynx and oesophagus of some observed flukes contained numerous ciliate protozoa with ovoid shape and a large and dense macronucleus, consistent with *Ciliophora*, together with some bacteria and hyaline

drops. Similar protozoa were also observed forming rows in the lumen of the forestomachs, chiefly in parasitized animals.



In the reticulum, lesions were similar to those described for the rumen.

Figure 3. a) Rumino-reticular orifice. Mushroom-shaped papilla with hyperkeratosis/acanthosis of the stratified squamous epithelium and presence of rete pegs. The lamina propria is filled by an inflammatory infiltrate. Parasite burden = 253 (79 worms recovered from the rumino-reticular orifice). H-E. Bar = $300 \,\mu$ m. b) High-magnification view of Fig. 3a. Numerous GLs were recruited in the papilla were the parasite was present. Note the presence of abundant subepithelial lymphocytes and eosinophils. H-E. Bar = $50 \,\mu$ m. c) Serial section of the same rumino-reticular orifice sample of Fig. 3a. GLs contain granules that stained positive for PAS. PAS stain. Bar = $20 \,\mu$ m. d) Serial section of the same rumino-reticular orifice sample of Fig. 3a. The cytoplasmic granules of GLs were negative (no metachromatic) for Toluidine blue stain (arrowheads) in contrast to those of subepithelial mast cells (arrows). Toluidine blue stain. Bar = $20 \,\mu$ m.

The statistical study on association between parasite burden and severity of lesions in each anatomical location is showed in Table 1. The severity of the lesions was directly related to the fluke burden with a variable statistical significance (between p<0.05 and p<0.001) depending on the area (Fig. 4). The ventral sac was the forestomach compartment where this correlation was stronger. The ruminal atrium, with the highest parasite burden, showed the greatest degree of inflammation although statistical analysis was not possible, as all the parasitized animals showed flukes on this location.

	-	+	++	+++	++++	X ²	P-value ^b
Orifice							
No parasites	10 (90.9)	10 (50.0)	4 (26.7)	0	0	13.61	**
Parasites	1 (9.1)	10 (50.0)	11 (73.3)	1 (100)	2 (100)		
Reticulum							
No parasites	7 (77.8)	4 (26.7)	2 (13.3)	0	0	17.08	**
Parasites	2 (22.2)	11 (73.3)	13 (86.7)	5 (100)	5 (100)		
Rumino- reticular fold							
No parasites	6 (60.0)	3 (25.0)	5 (29.4)	0	-	8.92	*
Parasites	4 (40.0)	9 (75.0)	12 (70.6)	10 (100)	-		
Atrium							
No parasites	0	0	0	0	0	С	с
Parasites	0	9 (100)	21 (100)	14 (100)	5 (100)		
Ventral sac							
No parasites	7 (70.0)	2 (11.1)	0	1 (14.3)	0	19.85	***
Parasites	3 (30.0)	16 (88.9)	13 (100)	6 (85.7)	1 (100)		
Dorsal sac							
No parasites	11 (84.6)	16 (50.0)	1 (25.0)	-	-	6.36	*
Parasites	2 (15.4)	16 (50.0)	3 (75.0)	-	-		

Table 1. Number (and percentage) of infected animals showing mucosal lesions of different severity, and the presence of *C. daubneyi* in each studied locations.

^a -: no lesion; +: minimal lesion; ++: mild; +++: moderate; ++++: marked.

^b Probability: * P<0.05; ** P<0.01; *** P< 0.001.

[°] No statistical study could be carried out in atrium due to the constant presence of parasites in this anatomical area.

In addition to the lesions associated with the parasites, other histological changes were found in the rumen and reticulum of these animals. In the 13 cattle showing a darkened ruminal and reticular mucosa and coming from feed lot, lining epithelium was parakeratotic and, in 4 of them, keratinocytes showed ballooning degeneration leading to vesiculation, focal necrosis, ulceration and microabscesses formation in some areas. Amyloidosis, hyalinosis of the vessels walls and cartilaginous metaplastic change were also found each in three adult cows respectively.



Figure 4. Relationship between parasite burden (log transformed) and severity of mucosal lesions in each digestive compartment.

Abomasum

Mild to moderate superficial abomasitis, characterized by the presence of infiltrates composed of esoinophils, mast cells, lymphocytes, plasma cells and macrophages in the lamina propria between the gastric pits, was observed in 19 cattle (14 parasitized and 5 control). Focally, the gastric glands were ectatic, with numerous IGLs, and contained nematode sections morphologically compatible with *Ostertagia* spp.

Proximal duodenum

Twenty eight (57%) out of 49 parasitized cattle showed microscopic lesions in the duodenum, including all those that had gross changes. No *C. daubneyi* flukes were detected in the duodenum.

Lesions were only observed in parasitized cattle and consisted of changes in the glands and adjacent connective tissue. The epithelium of the crypts in the lamina propria showed goblet cell hyperplasia and increased number of intraepithelial GLs and IELs. There was diffuse proliferation of the submucosal Brunner's glands where Alcian blue/PAS-positive mucins were seen in the secretory cells and in the lumen of ectatic excretory ducts. GLs were common within the glandular epithelium.

Lymphoid aggregates and follicles, isolated or in groups (up to 15), were seen in the mucosal lamina propria and, in some cases, extended to the adjacent submucosa, causing distortion of the Brunner's gland architecture. Besides, numerous plasma cells, eosinophils, GLs, moderate number of mast cells and a smaller number of macrophages (occasionally with granular brown pigment) were observed not only in the lamina propria but also infiltrating the submucousal Brunner's glands.

Duodenal GLs and mast cells showed similar histochemical features that both cell types found in the rumen and reticulum. Ciliate protozoa were identified occasionally in the duodenal lumen.

Regional lymph nodes

Most of the lymph nodes showed lymphoid hyperplasia together with abundant eosinophils and macrophages in the sinuses and plasma cells in medullary cords. The presence of parasitic granulomas, megakaryocytes, and vessel wall hyalinosis were occasionally observed.

In the rest of the examined organs, no significant lesions or worms were found. Only hyperkeratosis was present in the omasum of those cows with the same change in the rumen and reticulum.

5.1.5. Discussion

While there is scarce information on the pathological changes caused by *C. daubneyi* in cattle, this study shows significant gross and histological changes directly associated with the parasitic burden of the affected organs. Paramphistomosis is considered harmless conditions in temperate regions. However, several studies have pointed out natural acute clinical cases chiefly related to the migration along alimentary tract of immature parasites (Toledo *et al.*, 2006; Millar *et al.*, 2012). Such acute lesions were not found in the present study and all studied animals were considered suitable for human consumption, since they showed no clinical or productive alterations despite of high parasitic burden in several individuals. Thus, and similarly to the observations described in Irish cattle (Zintl *et al.*, 2014), no direct correlation could be established between *C. daubneyi* infection and clinical signs of illness.

However, positive correlation between fluke burden and severity of lesions was demonstrated by statistical analysis. Tissue damage and inflammatory reaction were more pronounced in the ruminal atrium, location with the most intense fluke burden and higher number of affected papillae, although, the constant presence of adult trematodes in every parasitized animal made impossible the determination of statistical correlation in this anatomical region. In contrast, in the ruminal dorsal sac lesions were absent or mild and the fluke burden the lowest in all parasitized animals. No adult flukes were either observed in the omasum, in contrast to data provided by experimental challenge of cattle with C. microbotrium, where 10.4% of flukes were recovered from this forestomach (Mavenyengwa et al., 2005). The absence of histological lesions in the omasum suggests that this location was never parasitized or, if so, the burden was very low. In this regard, although no immature flukes were seen in the proximal duodenum, inflammatory infiltration in the lamina propria and submucosa was found at this location. It was characterized by the presence of solitary or associated lymphoid follicles and numerous eosinophils, GLs and mast cells. This organized lymphoid tissue was a constant feature in experimental trematodosis related with the chronicity of infection (Manga-González et al., 2004). It has been demonstrated in experimental paramphistome infections that these lesions persisted even when no flukes can be recovered from the duodenum (Mavenyengwa et al., 2008) and were more consistent at 60 and 80 days postinfection when the parasite was not present (Shing et al., 1984; Mavenyengwa et al., 2005). Therefore, the duodenitis found in some animals of the current study is likely a consequence of acquired the infection in early spring, since the prepatent period of paramphistomosis is between three and five weeks (Brown et al., 2007) and the tissue samples were collected at late spring and early summer. Besides, in some cattle the Brunner's glands were hyperplastic with abundant mucin in the ectatic excretory ducts. Similar changes were described in caprine (Singh et al., 1984), ovine (Rolfe et al., 1994; Mason et al., 2012) and bovine (Mavenyengwa et al., 2005; Millar et al., 2012) paramphistomosis. Brunner's glands are considered to be an optimal environment for fluke growth, and their cystic dilatation suggests previous occupation by the parasites (Mavenyengwa et al., 2005).

Macroscopic lesions could be found in those locations where the parasites were more frequent, like the atrium and ventral sac of the rumen, where focal papillary necrosis, even lack of papillae were found, specially in the most parasitized animal (8005 worms). Similar lesions have been previously described after experimental infection of cattle (Mavenyengwa *et al.* 2005). Besides these lesions, the anchoring of the parasite caused morphological changes, like narrowing of the base, enlarging of the apex plus acanthosis and hyperkeratosis, of ruminal and reticular papillae affected. The mechanical irritating effect of the ventral sucker was more pronounced in the base of papillae with a variable degree of epithelial atrophy or even ulceration foci. Epithelial thinness in this site has been observed in sheep experimentally infected with *Paramphistomum ichikawai* (Rolfe *et al.*, 1994). It is noteworthy that the direct mechanical irritation due to the ventral sucker of *C. daubneyi* did not to induce fibrosis, a constant finding in hepatic trematodosis (Ferreras *et al.*, 2000; Manga-González *et al.*, 2004).

The inflammatory response to C. daubneyi found in this study was characterized by a mucosal infiltration of lymphocytes, eosinophils, macrophages, GLs and mast cells at the site of parasite attachment in the ruminal and reticular papillae. These cell populations are commonly observed in experimental trematodosis of ruminants, such as fasciolosis or dicroceliasis (Ferreras et al., 2000; Pérez et al., 2002; Manga-González et al., 2004; Molina and Skerratt, 2005) and in animals suffering paramphistomiasis (Singh et al., 1984; Rolfe et al., 1994; Mavenyengwa et al., 2005; Mason et al., 2012). The infiltration of eosinophils, mast cells and globule leukocytes, typically associated with helminth infections, could be induced by the superficial antigens in contact with ruminal mucosa but also by a excretion-secretion fraction recently demonstrated to be released by paramphistomes (Anuracpreeda et al., 2013), similarly as described in other trematodosis (Molina and Skerratt, 2005). These cells may have a role in delaying the development of the parasite, decreasing the faecal egg output (Lacroux et al., 2006) and in the resistance to parasite infection (Shakya et al., 2009). In Haemonchus contortus infection mucosal mast cells are also regarded to increase the epithelial permeability and thus facilitate the infiltration of the inflammatory cells. The secretion of cellular products by these cells into the abomasal lumen could promote an abomasal environment unsuitable for parasite survival (Shakya et al., 2009). Although the significance of in vivo eosinophilic infiltration in trematode infections is yet unknown, it has been described how these cells are responsible for in vitro elimination of shistosomules (Butterworth et al., 1975). However, no dead flukes of C. daubneyi surrounded by these cells were observed in the present study, similarly to the observations in previous studies on cattle fasciolosis (Molina and Skerratt, 2005). On the other hand, the high number of GLs found in the duodenal, ruminal and reticular mucosa in the studied cases suggests that they may play an important role in the immune response against C. daubneyi. These cells have been also found in previous descriptions of ovine experimental trematodosis (Ferreras et al., 2000; Manga-González et al., 2004).

GLs and mast cells have been considered two of the major types of effector cells participating in the immune response to parasitic infections (Van Meulder *et al.*, 2013), but their source is still controversial. It has been proposed that GLs might originate from large granular lymphocytes (Konno *et al.*, 1994) or mast cells (Huntley *et al.*, 1984).

Recently a highly significant correlation of GLs with mast cells has been observed, identifying GLs as type of activated mast cells (Van Meulder *et al.*, 2013). However, the histochemical properties of these two populations were very different in the present study. While mast cells in the rumen, reticulum and duodenum showed metacromatic granules under Toluidine blue stain, were positive for Alcian Blue and negative for PAS techniques, GLs showed no metachromasy, were stained by PAS and negative to Alcian blue stains. These findings were in agreement with previous studies (Konno *et al.*, 1994) but are partially (McEntee *et al.*, 1993) or not in accordance with others (Van Meulder *et al.*, 2013).

Additional histological alterations observed in the forestomachs such as parakeratosis, chemical rumenitis, amyloidosis, hyaline degeneration of the vessel walls or cartilaginous metaplasia were not related to the presence of the parasites and are not probably associated with paramphistomosis.

In addition to the morphological changes of papillae and the infiltration of inflammatory cells, infection by *C. daubneyi* could have other effects. Although no specific studies focused on protozoa counting, the high number of ciliate protozoa found in the histological sections from parasitized cattle, in contrast to control animals, could have been caused by alterations in forestomach environment related to the presence of the trematode. Similar effects have been described in other intestinal parasitosis (Bancroft *et al.*, 2012), and might promote a role as opportunistic pathogens for this ciliate protozoa, as was previously demonstrated in pigs (Brown *et al.*, 2007). It has been reported that both host and *Paramphistomum cervi* absorb lipids and fatty acids from the ruminal fluid (Ghosh and Misra, 2011). The route of nutrient uptake is most likely through the tegument of the parasite, although adult trematodes possess some form of gut (Ghosh and Misra, 2011). In our study, the pharynx and oesophagus of some parasites contained cellular debris, bacteria, ciliate protozoa and hyaline drops which are probably captured from the ruminal content by suctorial feeding.

This study confirms that in naturally infected cattle, *C. daubneyi* induces a significant chronic inflammatory reaction both in the reticulum and rumen but also in the proximal duodenum. The mechanical and inflammatory lesions in the rumen and reticulum were restricted to the conical papillae in which the adult flukes were attached. In these papillae, as well as in the duodenal mucosa and submucosa, the lymphoid tissue, frequently as follicles, was constantly seen but eosinophils, GLs, mast cells and macrophages, associated with helminth infections were also observed. Additional studies to characterize this local immune response are needed to further investigate the pathogenesis of the inflammatory response mounted against *C. daubneyi* infection.

5.1.6. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

5.1.7. Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León. The authors wish to thank M. P. del Pozo, C. Espiniella, M. L. Carcedo and G. Belver of the *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE)*, León, (Spain) for technical assistance. They are in deep gratitude to managing director (J.L. Carracedo) and the veterinary inspectors (B.E. Postigo, B. Prieto, N. Aller) for their kind cooperation during the slaughterhouse sampling. The authors also thank E. Sevillano and A. Sánchez-Pedreira of the Veterinary Unit of León (Territorial Service of the Agriculture and Livestock, *Junta de Castilla y León*) for providing information on cattle farms in the studied area.

5.1.8. References

Anuracpreeda, P., Poljaroen, J., Chotwiwatthanakun, C., Tinikul, Y., Sobhon, P., 2013. Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion-secretion fraction of *Paramphistomum cervi*. *Experimental Parasitol*. 133, 327-333.

Bancroft, A.J., Hayes, K.S., Grencis, R.K., 2012. Life on the edge: the balance between marofauna, microflora and host immunity. *Trends Parasitol.* 28, 93-98.

Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K., 2007. Infections and parasitic diseases of the alimentary tract. In: Grant Maxie M. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, 5 th ed. Elsevier Saunders, Edinburgh, pp. 135-279.

Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud A.A., Sher A., Rees, P.H., 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256(5520), 727-729.

Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet. Parasitol.*, 175, 293–299.

Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-González, M.Y., Pérez-Martínez, C., Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A., García-Marín, J.F., 2000. Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 47,763-73.

Ferreras, M.C., González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L., Fernández, M., Manga-González, M.Y., 2014. Paramphistomosis by *Calicophoron daubneyi* in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Vet. Parasitol.* 199, 268-271.

Foster, A.P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M.P., Twomey, D.F., Millar, M.F. Taylor, M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *Vet. Rec.* 162, 528.

Ghosh, D., Misra, K.K., 2011. Major lipids and fatty acids in the liver and rumen of the goat (*Capra hircus*) infected with the trematode *Paramphistomum cervi. J. Helminthol.* 85, 246-254.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine parmaphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Vet. Parasitol.* 191, 252-263.

Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.R., 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6, 371-390.

Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Sugimura, M., 1994. Perforin-like immunoreactivity in feline globule leukocytes and their distribution. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 1101-1105.

Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 1-16.

Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., 2004. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.* 93, 344-355.

McEntee, M.F., Horton, S., Blue, J., Meuten, D.J., 1993. Granulated round cell tumor of cats. *Vet. Pathol.* 30, 195-203.

Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *Vet. Rec.* 170, 343-344.

Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2005. A macroand light microscopical study of the pathology of *Calicophoron microbothrium* infection in experimentally infected cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72, 321-332.

Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2008. Bovine intestinal cellular responses following primary and challenge infections with *Calicophoron microbothrium* metacercariae. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75, 109-120.

Millar, M., Colloff, A., Scholes, S., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection. *Vet. Rec.* 171, 509-510.

Molina, E.C., Skerratt, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol*. 131, 157-163.

Pérez, J., Ortega, T., Morrondo, P., López-Sánchez, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver an hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica* with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.* 127, 30-36.

Rolfe, P.F., Boray, J.C., Collins, G.H., 1994. Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24, 995-1004.

SAS, 1999. SAS OnlineDoc®, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57-66.

Singh, R.P.; Sahai, B.N., Jha, G.J., 1984. Histopathology of the duodenum and rumen of goats during experimental infections with *Paramphistomum cervi*. *Vet. Parasitol*. 15, 39-46.

Toledo, R.; Esteban, J.G., Fried, B., 2006. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Adv. Parasitol.* 63, 285-365.

Van Meulder, F., Van Coppernolle, S., Borloo, J., Rinaldi, M., Li, R.W., Chiers, K., Van den Broeck, K., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Granule exocytosis of granulysin and granzyme B as a potential key mechanism in vaccine-induced immunity in cattle against the nematode *Ostertagia ostertagi. Infect. Immun.* 81, 1798-1809. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01298-12.00

Zintl, A., García-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A.L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., Egan, S., Lawlor, A., Negredo, C., Brennan, G., Hanna, R.E., De Waal, T., Mulcahy, G., 2014. Bovine paramphistomes in Ireland. *Vet. Parasitol.* 204, 199-208.

6. TERCER TRABAJO

Fuertes, M., Manga-González, M.Y., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Giráldez, F.J., Mezo, M., González-Warleta, M., Fernández, M., Regidor-Cerrillo, J., Castaño, P., Royo, M., Ortega-Mora, L.M., Pérez, V., Ferreras, M.C., 2015. Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the local immune response in cattle naturally infected with *Calicophoron daubneyi*. *Vet. Parasitol*. 214 (1-2), 178-183.

6.1. Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the local immune response in cattle naturally infected with *Calicophoron daubneyi*

Miguel Fuertes^a, Yolanda Manga-González^a, Julio Benavides^a, M. Camino González-Lanza^a, Francisco Javier Giráldez^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Miguel Fernández^a, Javier Regidor-Cerrillo^c, Pablo Castaño^a, Marcos Royo^a, Luis M. Ortega-Mora^c, Valentín Pérez^a, M. Carmen Ferreras^{a*}

^(a) Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain.

^(b) Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia. Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7. 15318 Abegondo, A Coruña, Spain.

^(c) SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author: mcfere@unileon.es

6.1.1. Abstract

In order to recognize the local immune response of the definitive host to Calicophoron daubneyi natural infection, an immunohistochemical study was carried out in the reticulum and rumen in 49 naturally infected cattle. The role of cytokines (IL-4 and IL-10 interleukins and IFN-y) in the activation of specific defence mechanisms was evaluated by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays to study cytokine mRNA expression. In all infected animals, CD3+ T lymphocytes seemed to be the main element of the inflammatory infiltrate in the reticular and ruminal lamina propria at the point of the parasite adhesion. Intraepithelial globule leukocytes also showed immunolabelling for CD3. Most CD3+ cells also expressed CD4 (T cell helper) antigen although sporadic CD8+-cytotoxic lymphocytes were observed. Local expression of IFN-y was observed in damaged papillae at the site of parasite attachment and in scattered cells in the lamina propria. B cells (CD79 α cy+, CD45+ and IgG+) were found constantly in relation to lymphoid aggregates. MAC387 was expressed in squamous epithelium and in macrophages of the lamina propria of affected papillae. Macrophages in this location also stained positively for CD163 and CD68. Intraepithelial Langerhans cells and macrophages located in the lamina propria showed immunopositivity for MHCII in the affected areas. RT-qPCR analysis confirmed a

statistical significant increase of IFN- γ , and IL-10 expression (p<0.01) in the rumen associated with the presence of flukes. These findings suggest a predominant Th1 polarized local immune response with the probable involvement of Th regulatory cells in cattle *C. daubneyi* natural infection.

Keywords

Calicophoron daubneyi, local immune response, cytokines, cattle.

6.1.2. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitosis caused by trematodes of the family Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), belonging to different genera (*Paramphistomum*, *Calicophoron* and *Cotylophoron*), which is considered, at present, as an important emerging disease of livestock still highly underestimated (Tandon *et al.*, 2014). In two recent studies, the importance of this infection in Spain, where *Calicophoron daubneyi* was the only agent found, has been reported (González-Warleta *et al.*, 2013; Ferreras *et al.*, 2014).

There is a scarcity of information on the immunophenotypical characterization of the inflammatory cells present in the lesions or the local immune responses associated with trematodes infections in the large animal definitive hosts. The majority of these studies have been carried out in *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp. and *Dicrocoelium* spp. infections. Broadly, they have shown that inflammatory cells are composed of a mixed population of B and T lymphocytes, mainly CD4+ and CD8+, together with macrophages, globular leukocytes and IgG+ plasma cells (Ferreras *et al.*, 2000, 2007; Pérez *et al.*, 2002; Molina and Skerrat, 2005; Zafra *et al.*, 2009). None of these studies have evaluated the local expression of cytokines. Concerning paramphistomes, these trematodes were confirmed as the cause of inflammatory lesions in the rumen and reticulum whose severity was directly related to the parasite burden, and characterized morphologically by lymphocytes together with some macrophages and eosinophils (Fuertes *et al.*, 2015). However, the phenotypical characteristics of the inflammatory infiltrates against this trematode or the cytokine genic expression in infected tissues have not been documented to date.

In general, the adaptive immune response of the host to extracellular parasites, such as helminths, involves the development of T helper cells with characteristic T-helper type 2 (Th2) anti-inflammatory cytokine profiles (Interleukins 4, 5 and 10: IL-4, IL-5, IL-10). In contrast, intracellular parasites induce a T-helper type 1 (Th1) response characterized by production of pro-inflammatory mediators such as IL-12 and Interferon-gamma (IFN- γ). However, certain extracellular helminths (*Trichuris muris*) and

intracellular protozoan (*Leishmania major*) parasites are capable to induce both Th1 and Th2 components (Jankovic *et al.*, 2001). In *Fasciola hepatica* infections, it has been observed that infected cattle show an early Th1 type response which may be polarized in chronic infection to that of a Th2 type (Clery *et al.*, 1996).

The main objective of this study is to immunohistochemically investigate the host local cellular immune response in natural infections of cattle with *C. daubneyi*. Moreover, the mRNA expression of three cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-10), representative of the Th1 and Th2 T cell responses, were evaluated with the aim of understanding their possible role in this parasitosis. The knowledge of the host local immune response against *C. daubneyi* would be of interest to understand the pathogenesis of cattle paramphistomosis.

6.1.3. Materials and methods

6.1.3.1. Sampling

This study has been carried out in 49 cattle naturally infected by *C. daubneyi* and 15 healthy animals as controls, all of them slaughtered in an abattoir (Ferreras *et al.*, 2014). The characteristics of the animals and the inflammatory lesions present in these animals were described in detail in previous works (Ferreras *et al.*, 2014; Fuertes *et al.*, 2015).

For each animal, different tissue samples of the reticulum and different anatomical parts of the rumen (at least 12 per animal) were fixed in 10% neutral-buffered formalin and were dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax for histopathological and immunohistochemical studies. Besides, tissue samples of the ruminal atrium of infected and uninfected cattle were snap frozen and stored at -80 ^oC until used.

In 11 parasitized cattle and 4 uninfected control cattle (without gross or microscopical ruminal lesions) two samples of the ruminal atrium and other two from the ruminal dorsal sac, approximately 5 mm³ each, were obtained for each animal, placed in RNA*later* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and stored at -20 ^oC until they were used for cytokine mRNA expression analysis. No flukes were detected in the ruminal dorsal sac in the 11 parasitized animals.

6.1.3.2. Immunohistochemistry

Selected sections from the rumen and reticulum were immunohistochemically labelled with a panel of antibodies. Table 1 lists the primary antibodies and

immunostaining protocols used. In all the cases, a polymer-based detection system (EnVision® System Labelled Polymer-HRP; Dako, Glostrup, Denmark) was employed and immunolabelling was developed with a solution of 3,3'diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The slides were counterstained with Harris' haematoxylin and mounted in hydrophobic medium. Technique specificity and sensitivity were controlled by omitting of the primary antibody or Envision® and using tissue samples of bovine lymph node as positive control for all the primary antibodies.

Antibody	Clone	Туре	Marker for	Tissue	Antigen retrieval	Dilution	Source
CD3	-	Rabbit, Policlonal	T cells	Paraffin embedded	Heat and pressure; citrate buffer, pH6	1:100	Dako, Denmark
CD4	CC30	Mouse, Monoclonal	T helper cells	Frozen	None	1:100	Serotec, USA
CD8	CC63	Mouse, Monoclonal	Cytotoxic T cells	Frozen	None	1:50	Serotec, USA
CD79acy	HM57	Mouse, Monoclonal	B cells	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:100	Dako, Denmark
CD45R	C363.16A	Mouse, Monoclonal	B cells	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:100	South Biotech, USA
lgG	-	Biotinylated antibody	Plasma cells	Paraffin embedded	Trypsin	1:200	Vector Laboratories, USA
Calprotectin	MAC387	Mouse, Monoclonal	Macrophages and activated epithelial cells	Paraffin embedded	Protease XIV	1:100	Dako, Denmark
CD68	KP1	Mouse, Monoclonal	Macrophages	Paraffin embedded	Trypsin	1:50	Dako, Denmark
CD163	EDHu-1	Mouse, Monoclonal	Macrophages	Paraffin embedded	Heat and pressure; citrate buffer, pH6	1:200	BioRad, USA
MHCII	MCA2224	Mouse, Monoclonal	Antigen- presenting cells	Paraffin embedded	None	1:100	Serotec, USA
IFN-γ	CC330	Mouse, Monoclonal	IFN-γ	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:250	Serotec, USA

 Table 1. Antibodies, specificity and immunohistochemical procedure used.

6.1.3.3. Quantification of cytokine mRNA expression levels in the rumen

Total RNA for cytokine expression analysis was extracted from the above mentioned ruminal tissues by a combined method based on the TRIzol Reagent (Life Technologies, Pasley, UK) and Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was carried out using SuperScript® VILOTM cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Pasley, UK). Primers used for bovine IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines and the housekeeping gene β -actin were designed using the Primer-3Plus software (Untergasser *et al.*, 2007) and are described in Regidor-Cerrillo *et al.*(2014). Real-time

PCR reactions were performed in 20 μ l using Power SYBR®PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 pmol of each primer and 5 μ l of diluted cDNA samples in an ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The cytokine mRNA level was expressed in fg of cytokine mRNA/mg of tissue. The relative quantification of cytokine mRNA expression levels (*x*-fold change in expression) was carried out by the comparative 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method (Schmittgen and Livak, 2008).

6.1.3.4. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the aid of SAS package (SAS Institute, 2008). All data were analysed for normality and homogeneity of variances using the Saphiro-Wilk and Levene tests, respectively. Within each anatomical area (atrium and dorsal sac), comparison of FN- γ , IL-10 and IL-4 citokyne mRNA expression between infected and non-infected animals were performed using the Mann-Whitney *U*-test.

6.1.4. Results

6.1.4.1. Immunohistochemical findings

In all infected animals, CD3+ T lymphocytes, diffusely scattered or forming lymphoid aggregates, were seen as the principal element of the inflammatory infiltrate in the reticular and ruminal lamina propria mainly at the point where the parasite was attached to conical papillae. Furthermore, labelling of CD3 epitopes revealed grouped cells in the periphery of the lymphoid follicles and few cells inside them (Fig. 1a). Intraepithelial CD3+ lymphocytes (IELs) were observed in suprabasal location. Cytoplasmatic granules of the intraepithelial globule leukocytes (GLs) also stained positively for CD3 (Fig. 1b). Most of CD3+ cells also expressed CD4+ T-helper cells forming mantles around the lymphoid follicles and within the epithelium (Fig. 1c). Sporadic CD8+ cytotoxic T cells were observed surrounding lymphoid follicles. CD79 α cy B lymphocytes were observed constantly scattered in small groups but were also demonstrated in relation to lymphoid aggregates and follicles as well as the IgG+ plasma cells. The CD45 mAb stained groups of lymphocytes located in the lamina propria, in subepithelial location, only in the papillae on which the parasites were attached.

Immunolabelling for the anti-INF- γ mAb was observed in the lining epithelial cells, scattered or forming clusters, at the site of parasite attachment in the base of the affected papillae (Fig. 1e). Sparse IFN- γ + cells, consistent with lymphocytes, were also located in the lamina propria of the rumen and reticulum in relation to damaged conical papillae.

MAC387 mAb was expressed in squamous epithelia and in the macrophages located in the lamina propria of the rumen and reticulum in the areas of parasite attachment (Fig. 1d). Within the epithelium of the affected papillae, epithelial cells showed diffuse cytoplasmic immunoreactivity for this mAb which was more intense in epithelial cells located in the base of the papillae encircled by the parasite ventral sucker. In the lamina propria, positively stained MAC387 macrophages, scattered or in groups, were located in the inflammatory infiltrate. The distribution of CD68 and CD163 positive macrophages was similar. These cells were found scattered in the lamina propria between lymphoid aggregates and follicles at the site of parasite attachment.

MHCII expression was detected in dendritic shaped Langerhans cells located within the squamous cell layer of ruminal epithelium, mainly in the conical papillae in which C. daubneyi parasites were attached (Fig. 1g). Numerous MHCII reactive cells with abundant cytoplasm and pale ovoid nuclei compatible with macrophages were also observed intermingled with lymphoid cells in the lamina propria in affected areas (Fig. 1f).



Figure 1. a) Rumino-reticular orifice. Conical papilla encircled by fluke ventral sucker showing inflammatory infiltrate composed by CD3+ T cells. Parasite burden= 93 (12 worms recovered from the rumino-reticular orifice). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 200µm. b) Reticulum. Cytoplasmatic granules of Globular Leukocytes (GLs) intensely immunostained by pAb CD3 (arrows). Parasite burden= 908 (400 worms recovered from the reticulum). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 30µm. c) Ruminal atrium. Inflammatory infiltrate in the lamina propria of a mushroom-shaped affected papilla composed mainly by CD4+ T helper cells. Parasite burden= 253 (82 worms recovered from the ruminal atrium). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 200µm. d) Ruminoreticular fold. Papillar epithelium expressing mAb MAC387 especially in areas in close contact with the tegument of fluke ventral sucker. Sparse immunolabelled macrophages in lamina propria. Parasite burden= 8005 (571 worms recovered from the rumino-reticular fold). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 200µm. e) Rumino-retilcular fold. IFNy Immunolabeling of intraepithelial lining cells in the papillar areas in close contact with the parasite. Parasite burden= 215 (324 worms recovered from the rumino-reticular fold). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar=100µm. f) Reticulum. MHCII expression in dendritic cells in the organized inflammatory infiltrate of the lamina propria. Parasite burden= 908 (400 worms recovered from the reticulum). Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 50µm. g) Reticulum. Detail of f). Expression of MHCII in Langerhans cells within the lining epithelium. Envision® System. Haematoxylin counterstain. Bar= 10µm.

6.1.4.2. Cytokine mRNA expression levels in the ruminal tissues

Within the group of parasitized animals, the gene expression levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10 showed a significant increase (p<0.01) in ruminal atrium samples when they are compared with those in the dorsal sac, an area free of parasites. In the control, unparasitized cattle, the gene expression of IL-4 and IL-10 was also significantly higher



Figure 2. Gene expression of IFN- γ , IL-4 and IL-10 in ruminal atrium and dorsal sac of uninfected and infected cattle. Statistical significances amongst animal groups and locations are expressed as *a* (p<0.01) and *b* (p<0.05).

(p<0.05) in the ruminal atrium than in the dorsal sac. However, no differences were observed for IFN- γ levels in this group.

When comparing parasitized and control cattle, significant increases in the IL-10 and IFN- γ gene expression levels (p<0.01 and p<0.05 respectively) were found in the ruminal atrium of the parasitized animals. In the dorsal sac, all three cytokine levels were raised in the infected group but no statistical differences could be established with the unparasitized animals (Fig. 2).

6.1.5. Discussion

In this study we have used the same tissue samples to immunohistochemically characterize the cellular inflammatory infiltrates and the cytokine mRNA expression levels in selected ruminal tissues, where lesions associated with natural C. daubneyi infection in cattle were previously evaluated (Fuertes et al., 2015). Phenotypic analysis of the inflammatory cellular infiltrates in the reticular and ruminal mucosa in C. daubneyi naturally infected cattle has shown that they are formed by both T and B lymphocytes. The T cell response was composed predominantly of CD4+ T helper cells, distributed as lymphoid aggregates and follicles in the lamina propria and epithelium (Intraepithelial lymphocytes or IELs) of damaged conical ruminal and reticular papillae. An intense infiltration of T and B lymphocytes in hepatic lesions has also been reported also in other trematodoses like experimental fasciolosis and dicrocoeliosis in ruminants (Pérez et al., 2002; Ferreras et al., 2007; Zafra et al., 2009). These data demonstrate that C. daubneyi is also able to trigger a local immune response against flukes and/or their secretion products. The scant amount of CD8+ cells in the present study can be linked to the cytotoxic activity of these cells (Tizard, 2009), that would not be needed in extracellular parasitosis such as C. daubneyi infection.

A remarkable finding was the presence of CD3+ intraepithelial globule leukocytes (GLs) in high amount in some parasitized cattle. This result supports a lymphocytic origin for GLs in cattle in agreement with previous studies in cats (Konno *et al.*, 1994; Roccabianca *et al.*, 2006). The presence of CD79 α cy+ B lymphocytes and IgG plasma cells intermingled with T cells in the ruminal and reticular lamina propria may be indicative of a local humoral immune response against *C. daubneyi* that could be linked with the serum antibody response in natural paramphistome infections (Díaz *et al.*, 2006).

The presence of strong immunoreactivity for the cytosolic protein complex L1 or calprotectin (MAC387+) in the epithelium and in the macrophages within the lamina

propria of altered papillae was another noteworthy finding. It is known that the L1 antigen is a calcium binding protein expressed by squamous epithelium of mucous membranes and injured epidermis, but not by normal epidermis and other cells harboured in the skin (Brandtzaeg *et al.*, 1988; Paquet and Piérard, 1999). Besides expression of the MAC387 antigen in the inflamed epidermis is directly associated with cell-mediated activity in the papillary dermis (Kirkham *et al.*, 1990). In the present study modifications of MAC387 labelling in the rumen and reticulum mucosa were observed at the point of fluke attachment in parasitized cattle in comparison to uninfected animals. Rumen and reticulum mucosa are then considered as reactive pointing out squamous cell damage due to this parasitosis.

The MAC387+ monocytes/macrophages constitutes as a recently infiltrated cell subpopulation in local inflammatory response so they are considered active inflammation markers (Soulas *et al.*, 2011). The presence of these cells in the inflammatory infiltrate of ruminal and reticular lamina propria in paramphistomosis could be associated to a continuous antigenic stimulus by fluke excretion products or tegumental molecules.

In this study intraepithelial dendritic cells, morphologically compatible with Langerhans cells, as well as macrophages within the lamina propria in lesion sites showed immunolabelling for MHCII antigens. The role of Langerhans cells in the presentation of antigens to T cells through dendritic cell MHCII antigen complex during inflammation and the induction of a Th response is well known (Tizard, 2009) and these results emphasize that *C. daubneyi* infection is able to mount a local immune response triggered by MHCII expression in ruminal antigen presenting cells.

In other trematodoses, an initial proinflammatory reaction mediated by Th1 cytokines, related to the presence of immature flukes, is followed by a Th2 response (Flynn *et al.*, 2010; Chuah *et al.*, 2014). In the present study the local expression of IFN- γ (main Th1 proinflammatory cytokine associated with classical macrophage activation) was detected in infected cattle using immunohistochemistry and qPCR techniques. This result would indicate that *C. daubneyi* infection is able to trigger a cell mediated immune response at the local level, as it has been pointed out in other trematodosis such as fasciolosis in the hepatic lymph nodes (Zafra *et al.*, 2009).

Besides the immunolabelling associated to T cells, in the present study the presence of IFN- γ was observed focally in the epithelial lining cells of those papillae encircled by the parasite ventral sucker. Although IFN- γ is produced mainly by lymphocytes, recently the ability of respiratory epithelial cells to produce IFN- γ after being infected by human parainfluenza virus type 3 has been described (Lewandowska-Polak

et al., 2015). This finding would indicate that epithelial cells in areas in contact with the parasite could contribute to the cellular response to trematode antigens or the mechanical damage due to fluke attachment.

Concerning mRNA cytokine level results, our findings showed that IFN- γ and IL-10 mRNA expression was significantly increased (upregulated) in ruminal atrium mucosa of parasitized animals in comparison to the control group and with the ruminal dorsal sac levels in parasitized cattle, leading to the conclusion that their expression is directly related to the presence of parasites. In contrast, no significant differences were found concerning the IL-4 mRNA levels in the same locations, although comparatively high amount of this type 2 cytokine were produced in the ruminal atrium of infected cattle. The significant local production of IFN- γ by lymphocytes related to the presence of parasites, may indicate the establishment of a cell-mediated immunity which, however, was ineffective in the elimination of the parasite, as already stated for extracellular parasites (Jankovic *et al.*, 2001).

The simultaneous and constant high gene expression levels of IL-10 found in this study would indicate that in *C. daubneyi* naturally infected cattle this cytokine probably downregulates or represses the expression of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and protects against the tissular epithelial damage caused by inflammation as it has been suggested (Ouyang *et al.*, 2011; Chuah *et al.*, 2014). The finding that IL-10 regulates both Th1 and Th2 responses at mucosal surfaces has previously been reported in infected mice with *Trichinella spiralis* (Helmby and Grencis, 2003).

Finally, in unparasitized animals both immunomodulating IL-4 and IL-10 cytokine gene expression was upregulated in the ruminal atrium when compared with the dorsal sac. This could be due to a necessary immunomodulation on ruminal mucosa consequence of constant antigenic stimulation by exogenous and endogenous microbiota of ruminal content (Koboziev *et al.*, 2014). This condition is not present in dorsal sac where ruminal content in direct contact with mucosa is composed by gases and flora is scant or absent.

Our results suggest that a regulatory parasite antigen-specific mechanism exists in natural *C. daubneyi* infection in cattle at the local site of attachment of this trematode towards the production of a polarized Th1 immune response, with the involvement of Th regulatory cells, which may be associated with a mixed cell population activity in this infection. The differences in the cytokine responses may be due to the antigen molecules actively secreted by the surface tegument of the adult rumen fluke in direct contact with the host tissues. Further studies are required to understand host defence against these parasites.

6.1.6. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

6.1.7. Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León. The authors wish to thank Dr. Natalia Elguezabal for her critical review of the final manuscript.

6.1.8. References

Brandtzaeg, P., Jones, D.B., Flavell, D.J., Fagerhol, M.K., 1988. Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *J. Clin. Pathol.* 41, 963-970.

Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., McManus, D.P., Gobert, G.N., 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.* 30, 141-150.

Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune reponses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 62, 71-82.

Díaz, P., Lomba, C., Pedreira, J., Arias, M., Sánchez. Andrade, R., Suárez, J.L., Díez-Baños P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2006. Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Vet. Parasitol.* 140, 281-288.

Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-González, M.Y., Pérez-Martínez, C., Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A., García-Marín, J.F., 2000. Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 47, 763-73.

Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., Manga-González, M.Y., 2007. Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.* 101, 547-555.

Ferreras, M.C, González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L.,

Fernández, M., Manga-González, M.Y., 2014. *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Vet. Parasitol.* 199, 268-271.

Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheika, H.M., 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet. Parasitol.* 169, 235-240.

Fuertes, M., Pérez, V., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, F.J., Fernández, M., Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., 2015. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Vet. Parasitol.* 209, 188-196.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Vet. Parasitol.* 191, 252-263.

Helmby, H., Grencis, K., 2003. Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. *Eur. J. Immunol.* 33, 2382-2390.

Jankovic, D., Liu, Z., Gause, W.C., 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22, 450-457.

Kirkham, N., Peacock, S.J., Jones, D.B., 1990. Monoclonal antibody MAC 387 recognizes a myelomonocytic antigen shared by epithelial cells in inflammatory skin diseases. *Br. J. Dermatol.* 122, 61-69.

Koboziev, I., Reinoso-Webb, C., Furr, K.L., Grisham, M.B., 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 122-133.

Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Sugimura, M., 1994. Perforin-like immunoreactivity in feline globule leukocytes and their distribution. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 1101-1105.

Lewandowska-Polak A., Brauncajs, M., Paradowska, E., Jarzebska, M., Kurowski, M., Moskwa, S., Lesnikowski, Z.J., Kowalski, M.L., 2015. Human parainfluenza virus type III (HPIV3) induces production of IFNγ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *J. Inflamm*. 12, 16. Molina, E.C., Skerrat, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* 131, 157-163.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G., 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71-109.

Paquet, P., Piérard, G.E., 1999. Epidermal calprotectin in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *J. Cutan. Pathol.* 26, 301-305

Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sánchez, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.* 127, 30-36.

Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M., González-Warleta, M., 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet. Res.* 45, 10.

Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P.F., 2006. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukaemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8αα phenotype. *Vet. Pathol.* 43, 15-28

SAS Inst. Inc., 2008. SAS/STAT® 9.2. User's guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

Soulas, C., Conerly, C., Kim, W-K., Burdo, T.H., Alvarez, X., Lackner, A.A., Williams, K.C., 2011. Recently infiltrating MAC⁺ Monocytes/Macrophages. A third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Immun. Infect. Dis.* 178, 2121-2135.

Tandon, V., Roy, B., Shylla, J.A., Ghatani, S., 2014. Amphistomes. En: Toledo R, Fried B (Eds.), *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 766. Springer, New York, pp. 365-392.

Tizard, I., 2009. Veterinary Immunology. Elsevier, Amstedam, 592 pp.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, 71-74.

Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Écija, R.A., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez, J., 2009. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res. Vet. Sci.* 87, 226-232.
7. DISCUSIÓN

La paranfistomosis ha sido considerada históricamente, en las zonas templadas del mundo, como una parasitosis de escaso interés y reducida patogenicidad. Sin embargo, la aparición de brotes agudos de la enfermedad en diferentes países europeos ha dado relevancia a la misma, por lo que, en los últimos años, ha sido objeto de diversos estudios científicos. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia de esta infección parasitaria, no sólo desde el punto de vista epidemiológico, sino también desde la perspectiva de la sanidad animal, ya que los paranfistomidos producen claros efectos patógenos sobre el hospedador definitivo e inducen una respuesta inmunitaria a nivel local.

La discusión, de los resultados del presente trabajo, se ha estructurado en dos grandes bloques: en el primero se tratan los hallazgos epidemiológicos observados y, en el segundo, se abordan los resultados obtenidos en relación con las lesiones y la respuesta inmunitaria local.

El ciclo biológico de los parásitos de la familia Paramphistomidae condiciona la detección, mediante métodos coprológicos convencionales, de huevos en las heces, pues la eliminación de los mismos se produce tras un periodo de prepatencia, que fluctúa entre las siete y diez semanas (Taylor *et al.*, 2007). Este hecho limita la capacidad de detección de las primeras fases de esta parasitosis dentro del hospedador definitivo (Rieu, 2004). Por ello, con el fin de realizar el diagnóstico de la enfermedad, en los estudios de epidemiológicos de la presente Tesis Doctoral, se optó por la inspección de los órganos del hospedador definitivo donde se localizan los parásitos, tanto las formas inmaduras como los paranfistómidos adultos.

En total se han estudiado 790 animales bovinos, procedentes de 184 explotaciones, de las provincias de León, Zamora, Valladolid y Palencia, sacrificados en un matadero cercano a la ciudad de León. Del total de animales estudiados, 49 presentaban trematodos adultos en el rumen y el retículo lo que representa una prevalencia total del 6,20%. Los animales parasitados pertenecían a 34 explotaciones y en 11 de ellas se detectó más de un animal parasitado. La prevalencia observada en nuestro estudio es inferior a la de otros estudios realizados en países de Europa occidental tales como Francia (Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000), Bélgica (Malrait *et al.*, 2015) e Irlanda (Toolan *et al.*, 2015). En España, se han citado prevalencias del 12% y 18,8%

en estudios realizados en Galicia (Arias *et al.*, 2011; González-Warleta *et al.*, 2013). Esta diferencia puede estar relacionada con las distintas condiciones climatológicas existentes entre las áreas de estudio, puesto que en el noroeste de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, las precipitaciones medias anuales son menores que las propias de la Europa atlántica o Galicia (Peel *et al.*, 2007). Diversos autores (Díaz *et al.*, 2007; Titi *et al.*, 2010) han señalado a los factores climatológicos como una de las causas que determinan la finalización del ciclo biológico de los paranfistómidos. Aunque, en condiciones experimentales, la emisión de cercarias por parte de los hospedadores intermediarios se incrementa con las variaciones de temperatura (Rondelaud *et al.*, 2013), las características térmicas extremas, en largos periodos del año, del área de nuestro estudio pueden influir en la biología del molusco hospedador intermediario, pues pueden provocar alteraciones de sus hábitats habituales como desecación de humedales y estanques o congelación los mismos. Por ello, las probabilidades de infección de los hospedadores definitivos pueden verse también limitadas, lo que podría justificar las diferencias en la prevalencia entre ambas áreas geográficas.

Además de lo indicado, y directamente relacionado con la climatología, el sistema de explotación de los bovinos también influye en la prevalencia de infección por paranfistómidos (Rolfe *et al.*, 1991). En las regiones de clima húmedo y templado, la disponibilidad de pastos durante el año es mayor que en áreas más secas, con lo que son más frecuentes los regímenes de explotación ganadera donde los animales se alimentan libremente en prados durante periodos de tiempo más o menos largos. En el presente estudio, los bovinos han sido categorizados en dos grupos según el régimen de explotación: semi-intensivo e intensivo. Tanto las prevalencias como las cargas parasitarias halladas fueron mayores en los animales del primer grupo (10,04%, 253 trematodos de media por animal) que en los del segundo (4,22%, 58 trematodos de media por animal). Estos resultados confirman que, como consecuencia del tipo de explotación ganadera, el acceso de los animales a pastos donde está presente el hospedador intermediario, influye en la prevalencia y carga parasitaria en la paranfistomosis.

En el presente trabajo de los 49 animales parasitados, 19 de ellos habían sido criados en cebadero, hecho no descrito en España, pero si en Irlanda (Murphy *et al.,* 2008; Zintl *et al.*, 2014), precisamente en una parasitosis, la paranfistomosis, ligada al pastoreo. En nuestra investigación tuvimos acceso, a través de los Servicios Veterinarios Oficiales de la Junta de Castilla y León, al Sistema de Trazabilidad en bovinos que incluye el Registro de Explotaciones Ganaderas, el Registro de Identificación Animal y el Registro de Movimientos. En todos los casos estudiados, se

trató de bovinos que habían tenido acceso al pasto en periodos de tiempo variables previamente a su llegada al cebadero. Sin embargo, no se pudo descartar que estos animales ya estabulados hubieran sido alimentados con forraje fresco contaminado.

La edad es otro de los factores que influye en la prevalencia y carga parasitaria de la paranfistomosis bovina. En nuestro trabajo la edad de los bovinos parasitados osciló entre 10 meses y 19 años. Diversos estudios han señalado una mayor prevalencia de parasitación en los animales jóvenes (Díaz et al., 2006; Khan et al., 2008), mientras que en otras investigaciones se indican tasas de prevalencia más elevadas en los animales adultos (Loock, 2003; González-Warleta et al., 2013) e, incluso, hay autores que no hallan relación entre la prevalencia de la infección y la edad (Szmidt-Adjidé et al., 2000; Arias et al., 2011). Los resultados del presente trabajo demuestran una relación directa estadísticamente significativa (p<0,05) de la prevalencia y carga parasitaria con respecto a la edad, siendo los valores más altos los encontrados en el grupo de animales bovinos de más de 30 meses de edad. Los paranfistómidos son trematodos muy longevos, que pueden vivir hasta 4 años dentro del hospedador definitivo (Muro & Ramajo, 1999), con lo que las reinfecciones producen un fenómeno de acumulación de parásitos adultos en los preestómagos, lo que explicaría las mayores cargas parasitarias en los animales adultos. Estas observaciones, además sugieren que las reinfecciones no confieren una inmunidad a los bovinos adultos, en contra de lo afirmado en algunos estudios (Tandon et al., 2014).

El sexo parece también influir en la infección por paranfistómidos, aunque su mecanismo no está claramente definido. Algunos estudios demuestran que la paranfistomosis tiene una mayor prevalencia en los machos que en las hembras (Khan *et al.*, 2008), mientras que otros indican la situación inversa (Szmidt-Adjide *et al.*, 2000; Titi *et al.*, 2010) o no encuentran ninguna relación (Toolan *et al.*, 2015). En nuestro trabajo observamos una diferencia estadísticamente significativa (p=0,001) en la prevalencia entre las hembras (8,71%; n=42) y los machos (2,27%; n=7). Este hecho se podría explicar por la relación que el sexo del individuo tiene con los diferentes sistemas de cría o de manejo, más que con factores genéticos u hormonales (Szmidt-Adjide *et al.*, 2000; Toolan *et al.*, 2015).

No obstante lo indicado anteriormente, cuando se estudiaron de manera conjunta todas las variables (edad, sexo y régimen de explotación), la edad fue la única variable independiente que se correlacionaba de manera significativa con la prevalencia de la paranfistomosis (Odds ratio= 2,49; 1,55-4,902; p≤0,001). De hecho, la edad influye en el resto de variables evaluadas, de manera que los animales hembra explotados en

sistemas semi-intensivos presentan una prevalencia de infección más alta por ser los individuos que se sacrifican a una mayor edad.

Por lo que se refiere a la raza, en nuestro estudio la mayoría de los animales parasitados pertenecían al Conjunto mestizo (57,1%; n=28), aunque también se observaron bovinos parasitados de las siguientes: Parda (10,2%; n=5), Limousine (10,2%; n=5), Charolesa (8,1%; n=4), Frisona (4%; n=2), Asturiana de los Valles (4%; n=2), Salers (4%; n=2) y Gascón (2%; n=1). No se observó influencia de este factor sobre la prevalencia y carga parasitaria de la infección (datos no mostrados).

El número de parásitos hallado en nuestro estudio, en los 49 bovinos parasitados, fue de 19487 y varió entre 8 y 8005 parásitos por animal (mediana=144). Se observó una correlación positiva entre la edad de los bovinos y la cantidad de parásitos recuperados en los preestómagos, lo que coincide con lo indicado en estudios previos (Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000; Titi *et al.*, 2010, 2014; González-Warleta *et al.*, 2013). Sin embargo, dicha carga parasitaria fue inferior a la descrita en investigaciones llevadas a cabo en Galicia (González-Warleta *et al.*, 2013), noroeste de España y norte de Portugal (Arias *et al.*, 2011) o en el centro de Francia (Szmidt-Adjidé *et al.*, 2000). Además, es destacable que el 48,9% de los animales infectados contenían menos de 100 parásitos en sus preestómagos (datos no mostrados) de manera similar a lo señalado por Titi *et al.* (2010) en sus estudios desarrollados en Argelia (53,5%). De la misma forma que la prevalencia, la carga parasitaria puede relacionarse con diversos factores medioambientales, tales como la temperatura y la humedad, que condicionan el desarrollo y supervivencia del parásito en el hospedador intermediario, además de las prácticas ganaderas (González-Warleta *et al.*, 2013).

Uno de los objetivos, de este trabajo de Tesis Doctoral, fue determinar no sólo la carga parasitaria en el total de los animales, sino también la carga parcial según la localización de los paranfistómidos en el tracto gastrointestinal de bovinos en infecciones naturales. Para ello, en todos los animales bovinos se examinaron cinco regiones anatómicas del rumen (orificio rumino-reticular, surco rumino-reticular, atrio ruminal, saco ventral del rumen y saco dorsal del rumen), el retículo, el omaso, el abomaso y el duodeno. Los paranfistómidos adultos se localizaron principalmente en el rumen (90,81±1,71%), con una menor presencia de parásitos en el retículo (9,19±1.71%). Dentro del rumen, el atrio fue la región más intensamente parasitada (62,93±3.31%) y donde de manera constante se localizaron parásitos adultos, lo que coincide con las observaciones señaladas por González-Warleta *et al.* (2013). La región ruminal con mínima o nula carga parasitaria fue el saco dorsal del rumen. Las papilas que posee la mucosa del atrio ruminal y del saco ventral del rumen (localización con

mayor carga parasitaria después del atrio) son largas y de aspecto foliáceo, lo que las diferencia claramente de las del saco dorsal (Hofmann, 1989). Por ello, consideramos que dicha morfología puede ejercer un efecto de protección física del parásito. Además, el contenido ruminal, en el atrio y saco ventral, se encuentra estratificado: en contacto con la mucosa, en la zona ventral, se observa una fase líquida, seguida por una capa de material finamente molido (rumiado) y, por encima, el forraje grueso (Tschuor & Clauss, 2008). Esta disposición podría proporcionar un medio óptimo para el establecimiento y nutrición de los paranfistómidos, si se compara con la fase gaseosa presente en el saco dorsal. A diferencia de lo señalado en bovinos infectados experimentalmente con una dosis elevada de metacercarias (25000), donde se señala el hallazgo de escasos parásitos en el omaso en el día 28 post-infección (Mavenyengwa et al., 2005), en nuestro estudio nunca observamos parásitos en el omaso en animales infectados de manera natural. Ello puede ser debido a que dicha localización constituye un hábitat con escasa humedad y con un espacio físico reducido, debido a la propia estructura del órgano que forma numerosos pliegues, lo que dificulta la presencia de paranfistómidos. En nuestro trabajo tampoco observamos parásitos en el abomaso y duodeno. La presencia de paranfistómidos, en las luces del intestino delgado y abomaso, está relacionada con la migración que las formas juveniles de estos parásitos realizan a través de la luz del tracto gastrointestinal hasta los preestómagos. Estas migraciones tienen lugar durante periodos de tiempo variables, que oscilan entre los 60 y 84 días post-infección en los pequeños rumiantes (Singh et al., 1984; Rolfe et al., 1994) y los 42 días después de la infección experimental en bovinos (Mavenyengwa et al., 2005). El hecho de que en nuestro estudio no se hayan encontrado paranfistómidos en las luces del abomaso e intestino delgado indica que, en el momento del sacrificio (finales de la primavera o inicio del verano), los parásitos, probablemente, ya se habían asentado en los preestómagos y que la infección (o reinfección) pudo haberse producido en la primera mitad de la primavera.

Para la identificación morfológica, en todos los bovinos parasitados, se recogieron paranfistómidos al azar de las diferentes regiones del rumen y del retículo que, posteriormente, fueron fijados en etanol al 70% (472 ejemplares) y formol tamponado al 10% (200 vermes), para ser finalmente coloreados con carmín borácico o procesados histológicamente. La valoración microscópica se realizó siguiendo los criterios establecidos por Eduardo (1983) para la familia Paramphistomidae y en todos los casos, la identificación de los ejemplares de paranfistómidos se correspondió con *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo, 1983.

Para confirmar la identificación, además de los estudios morfoanatómicos e histológicos mencionados, se realizaron técnicas moleculares de PCR para la secuenciación de la zona intergénica ITS-2, secuencia publicada de *Calicophoron daubneyi* y depositada en la base de datos GenBankTM (Número de Acceso AY790883; Rinaldi et al., 2005).

En nuestro estudio, *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo 1983 fue la única especie hallada, al tener en cuenta la coincidencia en la identificación de los ejemplares tanto por métodos morfoanatómicos como histológicos y moleculares. Estos resultados coinciden con observaciones previas tanto en Europa (Mage *et al.*, 2002; Rinaldi *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2013) como en España (González-Warleta *et al.*, 2013; Martínez-Ibeas *et al.*, 2013) en las que se señala que esta especie es, en nuestra área geográfica, la única causante de paranfistomosis en ganado bovino.

Con el fin de abordar el cuarto objetivo de esta Tesis Doctoral, se ha realizado un estudio detallado y sistemático de las lesiones macro y microscópicas causadas por *C. daubneyi* en el tracto digestivo de bovinos en condiciones naturales. Además, se ha llevado a cabo la caracterización inmunohistoquímica de diferentes poblaciones celulares observadas en relación con las lesiones, de acuerdo con el quinto objetivo.

En Europa, como hemos mencionado, se ha considerado a la paranfistomosis como una parasitosis aparentemente inofensiva o con escasos efectos patógenos para el hospedador definitivo. No obstante, varios trabajos han constatado la aparición de casos clínicos agudos asociados a la infección natural y relacionados con la migración desde el intestino delgado hacia los preestómagos de las formas parasitarias inmaduras, las cuales provocan un cuadro gastrointestinal de diarrea, además de caquexia (Dorchies et al., 2000; Toledo et al., 2006; Alzieu y Dorchies, 2007; Dorny et al., 2011; Mason et al, 2012; Millar et al., 2012; Tandon et al., 2014). Diversos autores incluso han descrito manifestaciones clínicas, tales como atonía ruminal y timpanismo, como consecuencia de infecciones masivas de adultos de paranfistómidos y, también se ha señalado un descenso de las producciones (Alzieu & Dorchies, 2007; Anuracpreeda et al., 2008; Foster et al., 2008). En nuestro estudio, según los informes de los Servicios Oficiales Veterinarios, ninguno de los animales había manifestado signos clínicos que pudieran estar asociados a esta parasitosis en el momento de su remisión al matadero. De hecho, todos ellos fueron considerados aptos para el consumo humano en la inspección veterinaria ante-mortem y después de su sacrificio, a pesar de la elevada carga parasitaria que alguno de ellos presentaba. Por ello, no fue posible establecer ningún tipo de relación entre la infección por C. daubneyi y la presentación de un cuadro clínico de enfermedad, de forma similar a las observaciones realizadas por Zintl *et al.*, 2014 en bovinos en Irlanda.

Macroscópicamente, en la mucosa de los animales bovinos parasitados se observó necrosis focal de las papilas del rumen, que incluso llegaban a faltar en algunas zonas. Estas lesiones fueron más evidentes en el atrio y en los animales con mayor carga parasitaria. Nuestras observaciones coinciden con las descritas en infecciones experimentales en bovinos (Mavenyengwa et al., 2005). Histológicamente, se comprobó que C. daubneyi se fija mediante su ventosa ventral únicamente a pequeñas papilas de la mucosa ruminal o reticular. Como consecuencia de esta fijación, las papilas adquieren una forma irregular con una base estrecha y un ápice ancho, lo que proporciona a las mismas un aspecto fungiforme. El epitelio plano estratificado en estas papilas mostraba acantosis e hiperqueratosis y formaba proyecciones en la lámina propia. El efecto irritativo de la ventosa ventral del parásito fue más pronunciado en la base de las papilas, donde se observó un menor número de capas celulares en los estratos espinoso, granuloso y córneo. Aunque en esta localización, el estrato basal generalmente no se encontraba afectado, en algunos casos sí se observó alteración de la lámina basal. Efectos similares en la base de las papilas han sido descritos en ovinos infectados experimentalmente con Paramphistomum ichikawai (Rolfe et al., 1994). El epitelio de las papilas donde se fijaba el parásito mostraba una fuerte inmunorreactividad frente al complejo citosólico proteico L1 o calprotectina (MAC387+), a diferencia de la escasa o nula positividad observada en otras papilas filiformes de mayor tamaño del rumen o de los pliegues mayores del retículo, tanto en los animales parasitados como en las muestras de la misma localización de animales no parasitados. La calprotectina tiene como actividad principal la fijación del calcio y se expresa en el epitelio escamoso de mucosas y en la epidermis con lesión o en "estado reactivo", pero no en la epidermis normal (Brandtzaeg et al., 1988; Paguet & Piérad, 1999). Además, su mayor expresión en la epidermis alterada se relaciona con un aumento de la actividad inflamatoria mediada por células en la dermis papilar (Kirkham et al., 1990). Al tener en cuenta estas consideraciones y, de acuerdo a nuestros resultados, es posible que el epitelio del rumen y del retículo muestre un estado reactivo sugestivo de lesión en sus células escamosas debido a esta parasitosis.

Además de la inmunotinción frente a calprotectina, el epitelio de revestimiento de las papilas donde se fija el parásito mostró positividad con el anticuerpo monoclonal frente a IFN-γ. Esta citoquina se expresó en células aisladas o en pequeños grupos en las zonas del epitelio en más estrecho contacto con la ventosa de *C. daubneyi*, sobre todo en la base de la papila. Aunque la principal población celular productora de IFN-γ

son los linfocitos T, se ha demostrado que células del epitelio respiratorio son capaces de secretar esta citoquina tras su infección por el virus de la parainfluenza humana tipo 3 (Lewandowska-Polak *et al.*, 2015). Los resultados del presente estudio, podrían sugerir una respuesta inmunitaria local del epitelio ante la presencia de antígenos del trematodo, mediada por la acción del IFN- γ . Entre las células epiteliales de las papilas donde se encontraba fijado el parásito, se observó también la presencia de linfocitos T colaboradores CD4+ y células de Langerhans, de morfología estrellada y núcleo alargado, que expresaban MHCII. La función de las células de Langerhans consiste en captar los antígenos del medio, procesarlos y exponerlos en su superficie unidos al MHCII para la activación de los linfocitos Th CD4+ e iniciar así una respuesta inmunitaria (Tizard, 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyarían este hecho y sugieren que la infección por *C. daubneyi* es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria local tras el reconocimiento de antígenos del parásito.

Un tercer tipo celular observado, a veces en gran número, en el epitelio de las papilas donde se fija C daubneyi son los leucocitos globulares, caracterizados por la presencia de grandes gránulos citoplasmáticos acidófilos PAS-positivos, azul alcián negativos y no metacromáticos (azul de toluidina negativos). Los leucocitos globulares son una de las poblaciones celulares efectoras que aparecen de manera constante participando en la respuesta inmunitaria frente a infecciones parasitarias por nematodos (Van Meulder et al., 2013) y trematodos (Ferreras et al., 2000; Manga-González et al., 2004; Zafra et al., 2013) incluidos los paranfistómidos (Rolfe et al., 1994; Mavenyengwa et al., 2005). Sin embargo, sus funciones no están completamente definidas. Para algunos autores, los leucocitos globulares derivan de las células cebadas o mastocitos subepiteliales (Murray et al., 1968; Huntley et al., 1984) e incluso los consideran mastocitos activados (Van Meulder et al., 2013). Otros investigadores señalan que se originan de los linfocitos T yδ (Konno et al., 1994; 2005). En nuestro trabajo, la ausencia de tinción con azul de toluidina, característica de los mastocitos, así como la inmunoposividad frente a CD3+, apoyarían un origen linfocítico de los leucocitos globulares, lo que coincide con diversos trabajos previos (Konno et al., 1994; Roccabianca et al., 2006).

En la lámina propia de las papilas de fijación de *C. daubneyi*, tanto en el rumen como en el retículo, siempre se observó un infiltrado inflamatorio más o menos intenso, frecuentemente en torno a capilares y vénulas con endotelio reactivo. Este infiltrado inflamatorio frente a *C. daubneyi* estaba compuesto por linfocitos (generalmente formando agregados o incluso folículos), células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos, leucocitos globulares y mastocitos. Estas poblaciones celulares se han descrito en otras

trematodosis de los rumiantes, como la fasciolosis y la dicroceliosis (Ferreras et al., 2000; Pérez et al., 2002; Manga-González et al., 2004; Molina & Skerratt, 2005; Zafra et al., 2013), así como en la paranfistomosis (Singh et al., 1984; Rolfe et al., 1994; Mavenyengwa et al., 2005; Mason et al., 2012). Las presencia de estas células inflamatorias sugiere una activación del sistema inmunitario, posiblemente relacionada con la presencia de antígenos de superficie del parásito o productos de E/S liberados por los paranfistómidos (Anuracpreeda et al., 2013). Los eosinófilos son células capaces de adherirse a la superficie del parásito, liberando una serie de productos presentes en sus gránulos que actúan directamente sobre los helmintos (McLaren et al., 1981; Butterworth, 1984; Behm et al., 2000; Falcone et al., 2001) además de citoquinas que promueven una mastocitosis local (Weller, 1994). En la fasciolosis caprina, en animales inmunizados con el antígeno recombinante catepsina L1, los eosinófilos se observan en gran número y posiblemente participan en la eliminación de metacercarias de F. hepática (Zafra et al., 2013). Por su parte, los mastocitos provocan, tras su degranulación, una reacción de hipersensibilidad tipo I, caracterizada por un incremento de la permeabilidad vascular y de la contracción de la musculatura lisa, cuya acción se dirige a la expulsión del parásito (Falcone et al, 2001; Farthing et al., 2003). Esta función se ha demostrado de manera indirecta en infecciones experimentales por paranfistómidos, al comprobar una intensa eosinofilia y mastocitosis en animales con una menor carga parasitaria (Mavenyengwa et al., 2008). Por otra parte, en nematodosis intestinales la presencia de eosinófilos y mastocitos se ha relacionado con una disminución en la eliminación de huevos en heces (Lacroux et al., 2006). En general, se considera que ambos tipos celulares son importantes en la resistencia frente a las helmintosis (Shakya et al., 2009).

En la lámina propia de las papilas ruminales y reticulares afectadas por la fijación de *C. daubneyi* los linfocitos T CD3+ fueron la población celular más abundante y, dentro de ella, el inmunofenotipo más habitual fue el de los linfocitos T CD4+. En otras parasitosis los linfocitos T son un componente habitual e importante del infiltrado inflamatorio (Pérez *et al.*, 2002; Manga-González *et al.*, 2004; Ferreras *et al.*, 2007; Zafra *et al.*, 2009). Los linfocitos, estimulados por la presentación de antígenos por parte de las células de Langerhans, desencadenan una respuesta inmunitaria mediante la liberación de factores químicos que determinan la polarización de la respuesta inmunitaria (Lacroux, 2006; McSorley *et al.*, 2013; Mbongue *et al.*, 2014). Como se ha señalado anteriormente, dentro de los linfocitos T la población más abundante fueron los linfocitos T CD4+, dispuestos en la porción periférica de los folículos linfoides. Sin embargo, también y de forma dispersa en el infiltrado inflamatorio, se identificaron

linfocitos T CD8+ o citotóxicos, lo que coincide con lo observado en otras trematodosis (Ferreras *et al*, 2007; Zafra *et al.*, 2010). Algunos linfocitos del infiltrado inflamatorio de la lámina propia fueron positivos frente al IFN- γ , una de las citoquinas típicas de la respuesta inmunitaria Th1. Además de los linfocitos T, se identificaron linfocitos B CD79 α cy+ en pequeños grupos y en zonas centrales de los folículos linfoides, linfocitos CD45 y células plasmáticas IgG+ dispersas o formando pequeños grupos. La presencia de estas células sugiere una respuesta inmunitaria humoral local frente a *C. daubneyi* de forma similar a lo señalado en otras trematodosis (Pérez *et al.*, 2002; Molina & Skerratt, 2005; Zafra *et al.*, 2010). Así, en infecciones experimentales por *D. dendriticum* en la especie ovina, se han descrito infiltrados difusos de células plasmáticas IgG+ en conductos biliares alterados coincidiendo con niveles elevados de inmunoglobulinas en suero (González- Lanza *et al.*, 2000; Ferreras *et al.*, 2007). De igual modo, se han detectado IgG en suero sanguíneo en infecciones naturales por paranfistómidos (Díaz *et al.*, 2006; Jyoti *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, la calprotectina (MAC387+) no solo se expresó en el epitelio de la mucosa ruminal y reticular en zonas de adhesión del parásito, sino también en macrófagos presentes en el infiltrado inflamatorio de la lámina propia. La calprotectina marcador de inflamación local puesto que se produce es un en los monocitos/macrófagos recién llegados a la zona de inflamación (Soulas et al., 2011). La presencia de macrófagos MAC387+ por tanto, podría estar relacionada con un continuo estímulo antigénico del tegumento o los productos de E/S de C. daubneyi. Los macrófagos son células que, adaptándose al microambiente local y adoptando diferentes fenotipos, juegan un papel central en la defensa del hospedador frente a las infecciones, la regulación inmunitaria y la reparación de los tejidos lesionados (Martínez et al., 2009). En las parasitosis crónicas, la polarización de la función de los macrófagos, desde una actividad exclusivamente enfocada a la eliminación del agente infeccioso a una destinada a la reparación de los tejidos lesionados, es crítica para el hospedador cuando se enfrenta a los daños en sus tejidos como consecuencia de la inflamación (Allen & Wynn, 2011). En presencia de la citoquina IFN-y y ciertos productos microbianos, como el lipopolisacárido de la pared bacteriana, los macrófagos se activan de manera clásica ejerciendo una actividad proinflamatoria Th1. Por el contrario, cuando en el microambiente predominan la IL-4 e IL-13, la diferenciación alternativa se produce hacia una actividad inmunomoduladora (Barron & Wynn, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo indican la participación de los macrófagos (MAC387+, CD68+ y MHCII+) en la respuesta inflamatoria frente a C. daubneyi. Parte de esta población celular expresó el receptor transmembrana CD163 característico de los macrófagos AAM y, por lo tanto, componentes de la respuesta inmunomoduladora Th2. Por ello, estos macrófagos alternativamente activados pueden estar implicados en la reparación de los tejidos en la infección natural por *C. daubneyi* de forma similar a otras helmintosis (Dalton, 2013).

Los estudios estadísticos llevados a cabo en este trabajo permiten concluir que existe una relación significativa (p<0,05 - p<0,001) entre la carga parasitaria y la gravedad de las lesiones que las formas parasitarias adultas de *C. daubneyi* producen en el rumen y retículo. Así, el daño tisular y la inflamación fueron más intensas en el atrio ruminal, localización con mayor carga parasitaria, donde el número de papilas afectadas fue más elevado y donde siempre se observaron parásitos en todos los animales infectados. Por el contrario, en el saco dorsal del rumen las lesiones fueron leves o ausentes coincidiendo con una mínima o nula carga parasitaria. Estos datos no han sido previamente señalados según la bibliografía consultada.

En el estudio histológico, en la luz del rumen y retículo de los bovinos parasitados, se observaron numerosos protozoos ciliados. En nuestra opinión, el elevado número de protozoos ciliados observado en los bovinos parasitados en comparación con los animales no parasitados, podría sugerir una alteración del medio ruminal relacionada con la presencia de C. daubneyi. Alteraciones semejantes han sido señaladas también en otras parasitosis intestinales (Bancroft et al., 2012). En la especie porcina se describe frecuentemente la presencia de estos protozoos, considerados oportunistas potencialmente patógenos, en procesos inflamatorios entéricos (Brown et al., 2007). Por lo que se refiere a la nutrición de los paranfistómidos, se ha indicado que la captación de nutrientes se realiza a través del tegumento (Muro & Ramajo, 1999) e incluso, aunque sea de manera esporádica, mediante la succión de sangre durante las fases juveniles (Alzieu & Dorchies, 2007). En nuestro estudio, tanto la faringe como el esófago de algunos parásitos adultos de C. daubneyi contenían restos celulares, bacterias, protozoos ciliados y gotas hialinas los cuales fueron posiblemente captados del contenido ruminal. La presencia de restos celulares en el aparato digestivo de paranfistómidos ha sido también señalada previamente por Rieu (2004) y Millar et al. (2012).

En 15 bovinos de los 49 parasitados se observaron lesiones macroscópicas en duodeno, tales como aumento de la secreción, presencia de nódulos blanquecinos de 1-2 mm de diámetro y, en el bovino con mayor carga parasitaria, formas erráticas de *F. hepática*. Sin embargo, no se identificaron formas inmaduras de paranfistómidos. Microscópicamente, en 28 animales de los 49 parasitados, se observó hiperplasia de células caliciformes en las criptas intestinales de la lámina propia e hiperplasia y ectasia

de glándulas submucosas de Brunner, secretoras de mucinas ácidas y neutras. En la lámina propia de la mucosa y en la submucosa aparecía un intenso infiltrado inflamatorio compuesto por agregados y folículos linfoides (visibles macroscópicamente como nódulos blanquecinos), mastocitos y eosinófilos. Los leucocitos globulares intraepiteliales se observaron en las criptas intestinales y en las glándulas de Brunner. La hiperplasia epitelial e hipersecreción de mucinas, así como la presencia de folículos linfoides en conductos biliares, ha sido descrita también en corderos infectados experimentalmente con D. dendriticum y sacrificados a los 180 días post-infección (Manga-González et al., 2004). En el caso de la paranfistomosis, se ha descrito la persistencia de lesiones en el duodeno en ausencia de paranfistómidos inmaduros, pricipalmente a los 60 y 80 días post-infección (Singh et al., 1984; Mavenyengwa et al., 2005; 2008). La duodenitis crónica observada en nuestro estudio podría sugerir que los bovinos se infectaron o reinfectaron al principio de la primavera, al tener en cuenta que el periodo de prepatencia en esta parasitosis es de siete a diez semanas (Taylor et al., 2007) y que la toma de muestras se realizó a finales de primavera y en verano. Las lesiones observadas en las glándulas de Brunner son similares a las descritas, por otros autores, en la paranfistomosis caprina (Singh et al., 1984), ovina (Rolfe et al., 1994; Mason et al., 2012) y bovina (Mavenyengwa et al., 2005; 2008; Millar et al., 2012). Según lo señalado por estos investigadores, las glándulas de la submucosa duodenal proporcionarían un ambiente óptimo para el crecimiento de las formas juveniles de los paranfistómidos antes de su migración a los preestómagos.

Para desarrollar el sexto objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral y, con el fin de evaluar la expresión génica de tres citoquinas (IFN-γ, IL-4 e IL-10) representativas de la respuesta Th1, Th2 y Treg, respectivamente, se llevaron a cabo procedimientos moleculares mediante técnicas de PCR cuantitativa (qPCR). Para ello, se tomaron diferentes muestras del atrio ruminal (región con mayor carga parasitaria) y del saco dorsal del rumen (región con mínima carga parasitaria) de once bovinos parasitados. Además, en cuatro bovinos no parasitados, sin lesiones ruminales macroscópicas o microscópicas, se tomaron idénticas muestras en las mismas localizaciones anátomicas (atrio y saco dorsal del rumen). En general, se asume que los helmintos desencadenan una respuesta inmunitaria del tipo Th2 (Mulcahy *et al.*, 2004) aunque, como consecuencia de las características de los ciclos biológicos y de los nichos ecológicos de los parásitos, la respuesta Th1 y la Th2 (Jenkins & Allen, 2010). En otras trematodosis (fasciolosis, esquistosomosis) se ha observado una reacción inicial del tipo Th1 frente a

las formas inmaduras seguida cronológicamente por una respuesta Th2 (Flynn *et al.*, 2010; Chuah *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio han demostrado que, los niveles de expresión de ARNm de las citoquinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 se encontraban elevados de manera significativa (p<0,01) en el atrio ruminal de los animales parasitados cuando se compararon con los del saco dorsal de estos mismos animales. En los bovinos no parasitados la expresión génica de IL-4 e IL-10 también fue más elevada en el atrio ruminal que en el saco dorsal (p<0,05), posiblemente como consecuencia de un estímulo antigénico persistente que la microbiota del contenido ruminal produce de forma fisiológica (Koboziev *et al.*, 2014). Cuando se examinaron los niveles de expresión génica de estas citoquinas, entre bovinos parasitados y no parasitados, se comprobó un incremento significativo en los niveles de IL-10 e IFN- γ (p<0,01 y p<0,05, respectivamente) en el atrio ruminal de los animales parasitados. En el saco dorsal, los niveles de las tres citoquinas se encontraron elevados en los bovinos parasitados pero no se observaron diferencias significativas cuando se compararon con los animales no parasitados. Estos resultados sugieren que la infección por *C. daubneyi* podría inducir una mayor respuesta de citoquinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) en la mucosa del atrio ruminal.

La elevada expresión local de IFN-γ, principal citoquina de la respuesta proinflamatoria Th1, podría indicar que *C. daubneyi* es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por células que no sería suficiente para eliminar la infección, como se ha observado también en otras parasitosis extracelulares (Jankovic *et al.*, 2001).

Los linfocitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+) son la principal fuente de la citoquina inmunorreguladora IL-10 (Beissert *et al.*, 2006). En infecciones por *Trichinella spiralis*, se ha demostrado que esta citoquina es capaz de regular, tanto la respuesta Th1 como la Th2 en las superficies mucosas en contacto con parásitos (Helmby & Grencis, 2003). Así, a través de la inhibición de los linfocitos Th1, y por tanto de la producción de IFN-γ, se evita el daño tisular de la reacción inflamatoria (Hori *et al.*, 2003; Ouyang *et al.*, 2011). En algunas parasitosis, como en la esquistosomosis, se ha comprobado que ciertos productos secretados por los parásitos inducen la activación de los mecanismos reguladores de los linfocitos Treg y la producción de IL-10, por lo que se crea un estado de tolerancia a la estimulación antigénica continua en las infecciones crónicas (Van der Kleij *et al.*, 2002). La IL-10 podría ser por ello fundamental para contener la respuesta Th1, ya que una producción excesiva o prolongada de citoquinas proinflamatorias puede ser perjudicial y causar excesivo daño tisular a nivel local. Además, la IL-10 induce una activación alternativa específica de los macrófagos que, a diferencia de otros AAM,

están implicados en la inmunorregulación y la reparación tisular más que en la activación de la respuesta Th2 (Mantovani *et al.,* 2004). El incremento significativo de la expresión génica de IL-10 a nivel local (atrio ruminal) asociada a la presencia de parásitos adultos orienta hacia el establecimiento de una respuesta inmunitaria T reguladora frente a la infección natural por *C. daubneyi* en ganado bovino.

La IL-4 es la citoquina clave en la activación de la respuesta inmunomoduladora Th2 asociada a las infecciones parasitarias (Lacroux, 2006; Jenkins & Allen, 2010). En este estudio, la expresión génica de esta citoquina presentó valores significativamente mayores en el atrio ruminal que en el saco dorsal de los animales bovinos parasitados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon dichos valores con los obtenidos en los bovinos no parasitados. Este hecho podría ser indicativo de una escasa o insuficiente respuesta humoral que promovería la producción de anticuerpos por los linfocitos B. En resumen, los resultados obtenidos en conjunto para las tres citoquinas (IL-4, IFN- γ e IL-10) sugieren que, en infecciones naturales en el ganado bovino, existe una respuesta inmunitaria asociada a la presencia y fijación de *C. daubneyi* en la mucosa del atrio ruminal. Dicha respuesta tendría una marcada polarización hacia Th1 y, posiblemente, en ella participarían linfocitos CD4+ Treg que modularían dicha respuesta.

8. CONCLUSIONES

1ª. La prevalencia de la paranfistomosis bovina, en condiciones naturales en León y provincias limítrofes de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, fue del 6,20%. Dicha prevalencia fue más elevada en animales bovinos mantenidos en régimen semiintensivo y mayores de 30 meses, que en los animales de régimen intensivo menores de 12 meses de edad.

2^a. La intensidad de la infección por *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo, 1983 fue mayor en el rumen y, dentro de este, el atrio ruminal la región con mayor carga parasitaria.

3ª. En nuestro estudio, no se observaron formas parasitarias inmaduras en el abomaso y duodeno, lo que sugeriría la ausencia de infecciones recientes por *C. daubneyi*.

4ª. En la infección natural por *C. daubneyi* existe una asociación entre la carga parasitaria y la edad de los animales. Al analizar, de forma conjunta la edad, sistema de producción, sexo o raza de los bovinos, la edad fue la única variable independiente correlacionada con la prevalencia de la infección.

5ª. *Calicophoron daubneyi* es la única especie de Paramphistomidae hallada en los animales bovinos de León y provincias limítrofes de la Comunidad de Castilla y León, mediante los métodos de identificación morfoanatómicos, histológicos y moleculares utilizados en este estudio.

6ª. En animales bovinos infectados por *C. daubneyi* en condiciones naturales, la intensidad de las lesiones microscópicas observadas en el retículo y las cinco regiones anatómicas del rumen se relaciona de forma significativa con la carga parasitaria.

7^a. Aunque no se identificaron formas inmaduras del parásito, las lesiones inflamatorias crónicas observadas en el duodeno de los animales parasitados podrían indicar el impacto de las formas juveniles de *C. daubneyi* previo a su migración.

8^a. La inmunorreactividad del epitelio de las papilas ruminales y reticulares donde se fija el parásito con su ventosa ventral, frente a calprotectina e INF-γ, así como la presencia en dicho epitelio de células de Langerhans MHCII+, leucocitos globulares y linfocitos T colaboradores, indican que *C. daubneyi* induce una activación del sistema inmunitario a nivel local, que podría estar implicada en la génesis de las lesiones inflamatorias observadas.

9ª. En la respuesta inmunitaria frente a *C. daubneyi* en la especie bovina se encuentran implicadas diferentes poblaciones celulares, principalmente linfocitos T colaboradores, linfocitos B, macrófagos, la mayoría alternativamente activados, eosinófilos, mastocitos y leucocitos globulares, estimulados por antígenos parasitarios.

10^a. Las propiedades histoquímicas e inmunohistoquímicas de los leucocitos globulares observadas en nuestro estudio, sugieren un origen linfocítico de dichas células y las diferencian de los mastocitos.

11ª. En animales bovinos parasitados, el incremento significativo en la expresión génica de INF-γ, IL-4 e IL-10 en el atrio ruminal en comparación con el saco dorsal así como el incremento significativo de IL-10 e IFN-γ en bovinos parasitados comparados con los animales no parasitados, sugiere que *C. daubneyi* en condiciones naturales induce una respuesta inmunitaria local con una marcada polarización hacia Th1, posiblemente con la participación de linfocitos T reguladores.

9. RESUMEN

Las paranfistomosis son parasitosis digestivas de los rumiantes producidas por diferentes especies de trematodos Digenea, pertenecientes a distintos géneros (Paramphistomum, Calicophoron y Cotylophoron, entre otros) de la familia Paramphistomidae Fischoeder, 1901. La distribución de la paranfistomosis es mundial, siendo una enfermedad altamente patógena en áreas tropicales y subtropicales. En Europa, aunque ha sido considerada una parasitosis con escasa relevancia clínico-patológica, sin embargo el incremento de la prevalencia junto con la aparición de brotes clínicos agudos de la enfermedad en los últimos años, ha contribuido a que esta parasitosis cobre importancia como proceso patológico. En España son escasos los trabajos sobre paranfistómidos y están circunscritos, principalmente, al área de Galicia, donde se aportan datos sobre prevalencia y la especie de paranfistómido que causa la enfermedad. Además, se han realizado estudios sobre los moluscos hospedadores intermediarios que intervienen en su ciclo biológico. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios sistemáticos sobre las posibles lesiones y la respuesta inmunitaria local frente a los paranfistómidos en el hospedador definitivo.

Por ello, el objetivo general planteado en este trabajo de Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento de la paranfistomosis bovina en condiciones naturales en el área geográfica de León y provincias limítrofes de la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos parciales: 1º/ Estudio de la prevalencia e intensidad de la infección relacionadas con diferentes factores (sistema de explotación, edad, sexo y raza). 2º/ Identificación genérica y especifica de los trematodos responsables mediante técnicas morfológicas y moleculares. 3º/ Valoración de las lesiones macroscópicas e histológicas en órganos del tracto digestivo y su relación con la carga parasitaria. 4º/ Estudio inmunofenotípico de las células implicadas en la respuesta inmunitaria local y análisis del perfil de expresión génica local de tres citoquinas en la mucosa del rumen. Los resultados obtenidos en los objetivos 1º y 2º se presentan en el primer trabajo, los del objetivo 3º se recogen en el segundo artículo y los correspondientes al objetivo 4º en el tercero.

Durante tres periodos consecutivos (junio-julio, 2010; mayo-julio, 2011 y junio, 2012) se examinaron el rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno y nódulos linfáticos

regionales de 790 bovinos sacrificados en un matadero cercano a la ciudad de León, procedentes de 184 explotaciones y de edades comprendidas entre los 10 meses y 19 años. En cada animal parasitado se cuantificó el número de parásitos en el retículo y cinco regiones anatómicas del rumen: orificio rumino-reticular, pliegue rumino-reticular, atrio ruminal, saco ventral del rumen y saco dorsal del rumen. De ellos, se tomó un número representativo para estudios morfoanatómicos y moleculares. Del total de animales examinados, en 49 se detectaron paranfistómidos adultos en el rumen y en el retículo (6,20%). La edad de los bovinos influyó significativamente (p<0,05) en la prevalencia de la infección: 2,62% (bovinos menores de 12 meses) y 17,88% (bovinos mayores de 30 meses). La carga parasitaria en el total de los animales fue de 19.487 paranfistómidos adultos, variando entre 8 y 8.005 parásitos por animal (mediana = 144). La localización principal y significativa (p<0,01) fue el rumen (90,81±1,71%) con una menor presencia en el retículo (9,19±1,71%). De las cinco regiones anatómicas del rumen examinadas, el atrio ruminal fue la de mayor carga parasitaria (62,93±3,31%) y el saco dorsal la región con un menor número de parásitos (2,07±0,51%). No se observaron parásitos adultos en el omaso ni formas parasitarias inmaduras en abomaso y duodeno. Tanto la prevalencia como la carga parasitaria fueron significativamente (p<0,05) más elevadas en animales bovinos mantenidos en régimen semi-intensivo (10,04%, 253), en comparación con los mantenidos en régimen intensivo (4,22%, 58). Aunque la paranfistomosis es una parasitosis ligada al pastoreo, en este estudio se diagnosticó en 19 bovinos de cebadero pero que habían tenido acceso al pasto en diferentes periodos, según la información obtenida a través de las bases de datos proporcionadas por los Servicios Veterinarios Oficiales.

Los estudios de identificación morfoanatómicos, histológicos y moleculares, de un número representativo de parásitos permitieron la identificación de *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo, 1983, como la única especie de Paramphistomidae hallada en los animales bovinos de León y provincias limítrofes de la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

La valoración de las lesiones se realizó en los 49 bovinos parasitados. Además, se recogieron muestras de 15 bovinos no parasitados. El estudio histológico se llevó a cabo en las siguientes localizaciones: retículo, cinco regiones anatómicas del rumen, omaso, abomaso, duodeno y nódulos linfáticos regionales. Las lesiones microscópicas se observaron en pequeñas papilas cónicas del rumen y del retículo, donde se fija *C. daubneyi* mediante su ventosa ventral. El efecto mecánico de dicha fijación provoca un estrechamiento de la base y la expansión del ápice de las papilas, dándoles un aspecto fungiforme. En estas papilas se observó acantosis, hiperqueratosis e incluso necrosis

del epitelio plano estratificado queratinizado. Entre sus células escamosas se identificaron numerosos leucocitos globulares, linfocitos intraepiteliales y células de Langerhans. En la lámina propia adyacente a las papilas, donde se fijaba el parásito, los capilares y vénulas presentaban un endotelio reactivo y destacaba un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos (frecuentemente formando agregados o folículos), células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. Además, se llevaron a cabo diferentes técnicas histoquímicas para la diferenciación de los leucocitos globulares y los mastocitos. Estas lesiones fueron más intensas en el atrio ruminal, localización donde se observó un mayor número de parásitos y de papilas afectadas. Sin embargo, fueron mínimas en el saco dorsal del rumen, con escasa carga parasitaria. El grado de lesión estuvo significativamente relacionado con la carga parasitaria en las diferentes regiones del rumen y retículo, y fue más significativo en el saco ventral del rumen (p<0,001). Del resto de órganos examinados, el duodeno fue la localización que presentó lesiones más significativas en 28 animales con parásitos adultos en rumen y retículo. Las lesiones observadas fueron: hiperplasia de células caliciformes en las criptas intestinales, incremento en la secreción de las glándulas submucosas de Brunner y presencia de un infiltrado inflamatorio similar al descrito en el rumen y retículo, con numerosos folículos linfoides en lámina propia y submucosa.

Para caracterizar las distintas poblaciones celulares implicadas en la respuesta inflamatoria observada en los animales bovinos parasitados con C. daubneyi, se llevó a cabo un estudio imunohistoquímico con diferentes anticuerpos específicos. Un hallazgo relevante fue la activación únicamente del epitelio de revestimiento en aquellas papilas del rumen y retículo donde se fijaba la ventosa ventral del parásito. Este hecho se puso de manifiesto por la expresión de calprotectina (MAC387+), proteína fijadora de calcio, que se expresa en epitelios cuando están alterados. De manera focal se identificaron grupos de células que expresaban IFN-y en estas zonas de contacto del parásito con el epitelio. Entre las células epiteliales se caracterizaron linfocitos T (CD3+, CD4+), células de Langerhans MHCII+ y leucocitos globulares (CD3+), lo que sugiere un origen linfocítico para estas últimas. En la lámina propia, en los puntos de fijación del parásito, los linfocitos T CD3+ fueron la principal población del infiltrado inflamatorio. La mayoría de los linfocitos CD3+ eran linfocitos T colaboradores (CD4+) y también se observaron linfocitos T citotóxicos (CD8+) de forma dispersa. Algunos linfocitos expresaron IFN-y en esta localización. También se identificaron linfocitos B (CD79αcy+ y CD45+), generalmente en relación con los agregados y folículos linfoides, y células plasmáticas (IgG+) en pequeños acúmulos. La calprotectina se expresó también en macrófagos (MAC387+). Estas células además presentaron inmunopositividad frente a CD68, MHCII (macrófagos activados) y CD163 (macrófagos alternativamente activados).

Para determinar el tipo de respuesta inmunitaria local, que la infección natural por *C. daubneyi* induce en el rumen, se analizó la expresión de ARNm mediante técnicas moleculares (qPCR) de tres citoquinas representativas de las respuestas Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) y T reguladora (IL-10). Para llevar a cabo esta determinación, se tomaron muestras del atrio ruminal (región anatómica con mayor carga parasitaria) y del saco dorsal del rumen (con menor carga parasitaria) en 11 bovinos infectados. La misma sistemática se utilizó en 4 animales no parasitados y sin lesiones macro y microscópicas en el rumen. En este estudio, se confirmó un incremento estadísticamente significativo (p<0,01) en la expresión de las tres citoquinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) en el atrio en comparación con el saco dorsal de los bovinos parasitados. Cuando se compararon estas mismas localizaciones anatómicas entre animales parasitados y no parasitados, la expresión génica de IL-10 e IFN- γ se encontró significativamente elevada (p<0,01 y p<0,05 respectivamente) en el atrio ruminal de los bovinos parasitados con C. daubneyi.

10. SUMMARY

Paramphistomosis are a group of digestive parasitosis of ruminants caused by several species of Digenea trematodes, belonging to various genera (*Paramphistomum, Calicophoron* and *Cotylophoron*) from the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901. While paramphistomosis, which has a worldwide distribution, is regarded as a highly pathogenic process in tropical and sub-tropical regions, in Europe this parasitosis has been considered to be clinically and pathologically irrelevant. However, the increasing prevalence, together with the presence of acute clinical outbreaks, observed in the last years in this continent, have raised the scientific interest focused on this parasitosis. In this regard, the number of studies in Spain is scarce and they have been focused on the prevalence and etiologic agent of paramphistomosis, as well as the intermediate host of the parasite. Besides, most of them have been carried out in the same region, i.e. Galicia, in the northwest of the country. No systematic studies of the lesions associated with this disease and the local immune response developed by the definitive host have been carried out.

Considering this, the main objective of this doctoral thesis is to contribute to the knowledge of natural bovine paramphistomosis in the geographical area of León and other adjacent provinces of Autonomous Community of Castilla and León (Spain). This main objective is divided in the following partial objectives: 1st / Study of the prevalence and intensity of the infection and its relation with exogenous and endogenous factors (management system, age, sex and breed). 2nd / Identification at the level of genus and species of the trematode involved in the natural bovine paramphistomosis, by means of morphological and molecular techniques. 3rd / Evaluation of macroscopical and histological lesions in digestive organs and their relationship with the parasite burden. 4th / Immunophenotypical characterization of the cell populations involved in the local immune response at the ruminal mucosa and analysis of the local gene expression of three cytokines at the same site. The results obtained in the 1st and 2nd objectives are presented in the First article. Those of the 3rd objective are stated in the Second article. The results obtained in the Third one.

A total number of 790 cattle, slaughtered in an abattoir next to the city of León and coming from 184 farms, were studied during three consecutive periods of time (June-July 2010, May-July 2011, and June 2012). These animals were between 10 months and

19 years-old. In every animal, rumen, reticulum, omasum, abomasum and regional lymph nodes were studied. These organs were brought to the laboratory for worm recovery and detailed macroscopic examination. Samples from the different anatomical parts of the rumen (rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ventral sac of rumen, and dorsal sac of rumen) and any other location showing macroscopical lesions were taken for the morphoanatomical and molecular studies. A total number of 49 bovines (6.20%) were parasitized by adult paramphistomids in rumen and reticulum. The age of the animals was significantly related (p<0.05) to the prevalence of infection: 2.62% in bovines younger than 12 months old and 17.88% in animals older than 30months old. The whole parasite number recovered was 19487 adult trematodes, ranging from 8 to 8005 parasites/host (median = 144). The main localization of the parasites, and significantly higher than the others (p<0.01), was the rumen (90.81±1.71%) while the lowest amount was found in the reticulum (9.19±1.71%). Amongst the five anatomical ruminal locations studied, ruminal atrium was the region with highest parasite burden (62.93±3.31%) whereas, ruminal dorsal sac showed the lowest number of parasites. Neither adult flukes were found in the omasum nor immature individuals were observed in abomasum or duodenum. Both prevalence and parasite burden were significantly (p<0.05) increased in cattle reared in semi-intensive systems of management (10.04%, 253) in comparison with those bred under intensive conditions (4.22%, 58). Paramphistomosis was closely related to grazing. Although 19 feedlot calves studied in this work showed parasitosis, data provided by Official Veterinary Services demonstrated that these bovines have grazed before been stabled.

The morphoanatomic, histological and molecular studies carried out in a representative number of parasites, demonstrated that *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) Eduardo, 1983, as the only species of Paramphistomidae identified in cattle from León and other adjacent provinces of the Autonomous Community of Castilla and León.

Macroscopic and microscopic examination was carried out in the digestive tract of the 49 parasitized animals. Histological studies were performed in the reticulum, five anatomical regions of the rumen, omasum, abomasum, duodenum and regional lymph nodes. Macroscopic lesions were detected in the small conical papillae of the rumen and reticulum, where *C. daubneyi* was attached by means of its ventral sucker. The mechanical effect of the acetabulum was revealed by the apex dilatation and stalk narrowing, causing a mushroom shape of the papillae. Acanthosis, hyperkeratosis and focal necrosis of the plain stratified epithelium were frequent findings. Numerous globule leukocytes, intraepithelial lymphocytes and Langerhans cells were observed amongst the epithelial cells. In the lamina propria adjacent to the parasitized papillae, capillaries and venules showed a reactive endothelium. In this location an inflammatory infiltrate composed by lymphocytes (often distributed as aggregates or follicles), plasma cells, macrophages, eosinophils and mast cells. Besides, histochemical techniques were carried out to distinguish globule leukocytes and mast cells. Histological lesions were more intense in the ruminal atrium, location with the highest number of parasites and altered papillae, and minimal in dorsal sac of rumen, region with scant number of parasite burden, and higher in ventral sac of rumen. Amongst the remaining organs evaluated, only the duodenum of 28 parasitized animals showed lesions: globet cell hyperplasia in the intestinal crypts, increased Brunner's glands secretion, and presence of an inflammatory infiltrate, similar to those described in rumen and reticulum, with abundant lymphoid follicles in lamina propria and submucosa.

An immunohistochemical study, employing several specific antibodies, was carried out to characterize the different cell populations of the local inflammatory response in cattle parasitized by C. daubneyi. The activation of the lining epithelium only in parasitized papillae was a relevant finding of the present study, denoted by the expression of calprotectin (MAC387+) in the activated epithelia. Focally, at the points of contact with the parasite sucker, groups of cells expressing IFN-y in the lining epithelium were observed. Amongst epithelial cells, T cells (CD3+, CD4+), Langerhans' cells MHCII+ and globule leukocytes (CD3+) could be identified. The expression of CD3 found in the globule leukocytes suggests a lymphocytic origin for these cells. The lamina propria of the parasitized papillae showed a moderate inflammatory infiltrate composed mainly by T cells (CD3+). Most of the T cells also expressed CD4 antigen (T helper cells) and, to a lesser extent, CD8 antigen (cytotoxic T cells). Some of the T cells in this location secreted IFN-y. There were B cells (CD79acy+ and CD45+), frequently in relation to cellular aggregates and follicles, and also plasma cells (IgG+), which appeared gathered in small groups. Macrophages were found to express different molecules: Calprotectin (MAC387+), CD68, MHCII (denoting activated macrophages) and CD163 (characteristic of alternatively activated macrophages).

To characterize the immune response triggered by *C. daubneyi* natural infection in rumen, local gene expression (mRNA) of three cytokines representative of Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), and T regulatory (IL-10) responses was evaluated by molecular methods (qPCR). Samples of ruminal atrium (anatomic location with largest number of parasites) and dorsal sac of rumen (with lowest parasite burden) of 11 infected and 4 non-parasitized animals were studied for this purpose. This study demonstrated a statistically significant increase (p<0.01) in the gene expression of all cytokines (i.e.: IFN- γ , IL-4 and

IL-10) in the atrium in comparison to the dorsal sac of rumen of parasitized animals. When these anatomical locations were compared between infected and uninfected animals, the gene expression of IL-10 and IFN- γ showed a significant increase (p<0.01 and p<0.05 respectively) in the ruminal atrium of cattle parasitized by C. daubneyi.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2000a. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymanaea trucatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol*. 74, 1-5.

Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2000b. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in Central France. *J. Helmintol.* 74, 189-194.

Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., 1999. Infection of Lymnaea truncatula and Lymnaea glabra by Fasciola hepatica and Paramphistomum daubneyi in farms of Central France. Vet. Res. 30, 113-118.

Agosti, M., Cavalletti, E., Pozza, O., 1980. Clinica e epizootologica della paramphistomiasi bovina nella provincial di Milano. *Clinica Veterinaria*. 103, 284-296.

Allen, J.E., Wynn, T.A., 2011. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog.* 7, e1002003.

Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoya, I., Rodrígez-Sosa, M., Terrazas, L.I., 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia carassiceps* cysticercosis. *Parasitol. Res.* 100, 1341-1350.

Alzieu, J.P., Dorchies, P., 2007. Ré-émergence de la paramphistomose bovine en France: synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopatholosiques et diagnostiques. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 160-162, 93-99.

Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., Fallon, P.G., 2010. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin, Immunol.* 125, 1114-1124.

Anuracpreeda, P., Poljaroen, J., Chotwiwatthanakun, C., Tinikul, Y, Sobhon, P., 2013. Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion/secretion fraction of *Paramphistomum cervi*. *Exp. Parasitol.* 133, 327-333.

Anuracpreeda, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2008. *Paramphistomum cervi*: antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera. *Exp. Parasitol.* 118, 203-207.

Arias, M., Lomba, C, Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J, Francisco, I, Piñeiro, P. Capazal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R, Paz-Silva, A., 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet. Rec.* 168, 408-412. Artis, D., Wang, M.L., Keilbaugh, S.A., He, W., Brenes, M., Swain, G.P., Knight, P.A., Donaldson, D.D., Lazar, M.A., Miller, H.R., Schad, G.A., Scott, P., Wu, G.D., 2004. RELM-β/FIZZ2 is a globet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 13596-13600.

Balic, A., Bowles V.M., Meeusen E.N.T., 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Par. Immunol.* 24, 39–46.

Bancroft, A.J., Hayes, K.S., Grencis, R.K., 2012. Life on the edge: the balance between macrofauna, microflora and host immunity. *Trends Parasitol.* 28, 93-98.

Barron, L., Wynn, T.A., 2011. Macrophage activation governs schistosomiasisinduced inflammation and fibrosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 2470-2525.

Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., Roitt, I., 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*. 21, 12-23.

Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Spakulová, M., Reblánová, M., Oberhauserová. K., 2010. Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helmintol.* 47, 76-82.

Behm, C.A., Ovington, K.S., 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today.* 16, 202-209.

Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, T., 2006. Regulatory T cells. J. Invest. Dermatol. 126, 15-24.

Béné, M.C., Faure, G.C., 2000. Immunité innée et cognitive aux interfaces muqueuses. *Revue française des laboratoires*. 327, 49-55.

Bennema, S.C., Ducheyne, E., Vercruysse, J., Claerebout, E., Hendrickx, E., Charlier, J., 2011. Relative importance of management, meteorological and environmental factors in the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in a temperate climate zone. *Int. J. Parasitol.*, 41, 225-233.

Boray, J.C., 1969. Studies on intestinal paramphistomosis in sheep due to *Paramphistomum ichikawai* Fukui, 1922. *Vet. Med. Rev.* 4, 290-308.

Brandtzaeg, P., Jones, D.B., Flavell, D.J., Fagerhol, M.K., 1988. Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *J. Clin. Pathol.* 41, 963-970.
Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K., 2007. Infections and parasitic diseases of the alimentary tract. En: Grant Maxie M. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, vol. 2.* Elsevier Saunders, Edinburgh, 5th ed. Pp. 135-279.

Brown, M.A., Pierce, J.H., Watson, C.J., Falco, J., Ihle, J.N., Paul, W.E., 1987. B cell stimulatory factor 1 / interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell.* 50, 809-818.

Butler, R.W., Yeoman, G.H., 1962. Acute intestinal paramphistomiasis in zebu cattle in Tanganyka. *Vet. Rec.* 74, 227-231.

Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A., Sher, A., Rees, P.H., 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*. 256, 727-729.

Carneiro-Santos, P., Martins-Filho, O., Alves-Oliveira, L.F., Silveira, A.M., Coura-Filho, P., Viana, I.R., Wilson, R.A., Correa-Oliveira, R., 2000. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 22, 267-277.

Casset, I., 1989. Enquête sur la paramphisomose bovine: recherché des parasites en abattoir. *Rev. Méd. Vét.* 140, 925-927.

Chai, J.Y., Park, Y.J., Park, J.H., Jung, B.K., Shin, E.H., 2014. Mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Pygidiopsis summa* (Trematoda: Heterophydae). *Korean J. Parasitol.* 52, 27-33.

Chauvin, A. & Boulard, C., 1996. Local immune response to experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasite.* 3, 209-2015.

Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., McManus, D.P., Gobert, G.N., 2014. Cellular and chemokyne-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.* 30, 141-150.

Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 62, 71-82.

Coffman, R.L.; von der Weid, T., 1997. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J. Exp. Med.* 185, 373-375.

Dalton, J.P., Robinson, M.W., Mulcahy, G., O'Neill, S.M., Donnely, S., 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* 195, 272-285. Degueurce, F., Abrous, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Gevrey, J., 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. *J. Helminthol.* 73, 197-202.

Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J.F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A., Capron, M., 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* 175, 293-296.

Díaz, P., Lomba, C., Pedreira, J., Arias, M., Sánchez. Andrade, R., Suárez, J.L., Díez-Baños P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2006. Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Vet. Parasitol.* 140, 281-288.

Díaz, P., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2007a. Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 149, 285-289.

Díaz, P., Pedreira, J., Sanchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Arias, M.S., Francisco, I., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2007b. Risk periods of infection by *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) in cattle from oceanic climate areas. *Parasitol. Res.* 101, 339-342.

Dinnik, J.A., 1962. *Paramphistomum daubneyi* sp. nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highlands. *Parasitology.* 52, 143-151.

Dorchies, P., 1989. Les Paramphistomidés: leur apparente extension en France et les difficultés practiques d'identification en coproscopie. *Rev. Méd. Vét.* 140, 573-577.

Dorchies, P., 2006. Flukes: old parasites but new emergence. En: *Abstracts of the* 24th World Buiatrics Congress, Association for Buiatrics Nice. 15-19 de octubre de 2006.

Dorchies, P., Lacroux, C., Levasseur, G., Alzieu, J.P., 2002. La paramphistomose bovine. *Bull. des G.T.V.* 13, 13-16.

Dorchies, P., Levasseur, G., Alzieu, J.P., 2000. La paramphistomose bovine: une pathologie d'actualité. En: *Comptes rendus du Congrès de la Société Françoise de Buiatrie.* 15-17 de noviembre, París. Pp. 132-142.

Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes *Fasciola* and

Paramphistomum in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Vet. Parasitol.* 10, 293-299.

Douch, P.G.C., Harrison, G.B.L.; Elliott, D.C., Buchanan, L.L., Greer, K.S., 1986. Relationship of gastrointestinal histology and mucus anti-parasite activity with the development of resistance to Trichostrongyle infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 20, 315-331.

Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrara, P., Gordon, S., 1994. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages *in vitro*: comparision with interleukin-4 and interferon-γ. *Eu. J. Immunol.* 24, 1441-1445.

Eduardo, S.L., 1983. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Syst. Parasitol.* 5, 25-79.

Eduardo, S.L., 1985. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. V. Revision of the genus *Cotylophoron* Fischoeder, 1901. *Syst. Parasitol.* 7, 13-26.

El Kasmi, K.C., Qualls, J.E., Pesce, J.T., Smith, A.M., Thompson, R.W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., König, T., Schleicher, U., Koo, M.S., Kaplan, G., Fitzgerald, K.A., Tuomanen, E.I., Orme, I.M., KAnneganti, T.D., Bogdan, C., Wynn, T.A., Murray, P.J., 2008. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwatrts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 9, 1399-1406.

Everts, B., Perona.Wright, G., Smits, H.H., Hokke, C.H., van der Ham, A.J., Fitzsimmons, C.M., Doenhoff, M.J., van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, M., Yazdanbakhsh, M., Schramm, G., 2009. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J. Exp. Med.* 206, 1673-1680.

Falcone, F.H., Pritchard, D.I., Gibbs, B.F., 2001. Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends Parasitol.* 17, 126-136.

Fallon, P.G., Jolin, H.E., Smith, P., Emson, C.L., Townsend, M.J., Fallon, R., McKenzie, A.N., 2002. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL9, and IL-13. *Immunity*. 17, 7-17.

Farthing, M.J.G., 2003. Immune response-mediated pathology in human intestinal parasitic infection. *Par. Immunol.* 25, 247–257.

Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., Manga-González, M.Y., 2007. Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.* 101, 547-555.

Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-González, M.Y., Pérez-Martínez, C., Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A., García-Marín, J.F., 2000. Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 47, 763-73.

Fischoeder, F., 1901. Die Paramphistomidender Saugethiere. *Zool. Anz.* 24: 367-375.

Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheika, H.M., 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. *Vet. Parasitol.* 169, 235-240.

Foster, A.P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M.P., Twomey, D.F., Millar, M.F. Taylor, M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *Vet. Rec.* 162, 528.

Fukui, T., 1929. Studies on Japanese amphistomatous parasites, with revision of the group. *Jap. J. Zool.* 2, 219-351.

Ghosh, D., Misra, K.K., 2011. Major lipids and fatty acids in the liver and rumen fluid of the goat (*Capra hircus*) infected with the trematode *Paramphistomum cervi. J. Helmintol.* 85, 246-254.

Gibson, D., 2013. Fauna Europaea: Paramphistomidae. Fauna Europaea versión 2.6.2.http://www.faunaeur.org.

Gill, H.S., Gray, G.D., Watson, D.L., Husband, A. J., 1993. Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Par. Immunol.* 15, 61–67.

González-Lanza, C., Manga-González, M.Y., Campo, R., Del-Pozo, P., Sandoval, H., Oleaga, A., Ramajo, V., 2000. IgG antibody response to ES or somatic antigens of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res.* 86, 472-479.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine parmaphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Vet. Parasitol.* 191, 252-263. Gordon, D.K., Roberts, L.C.P., Lean, N., Zadoks, R.N., Sargison, N.D., Skuce, P.J., 2013. Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Vet. Parasitol.* 195, 65-71.

Guasconi, L., Serradell, M.C., Masih, D.T., 2012. *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148,359-363.

Hamilton, C.M., Dowling, D.J., Loscher, C.E., Morphew, R.M., Brophy, P.M., O'Neill, S.M., 2009. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen supresses dendritic cell maduration and function. *Infect. Immunol.* 77, 2488-2498.

Harnett, W., 2014. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol. Bioch. Parasitol.* 195, 130-136.

Helmby, H., Grencis, K., 2003. Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. *Eur. J. Immunol.* 33, 2382-2390.

Hofmann, R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*. 78, 443-457.

Horak, I.G., 1967. Host-parasite relationships of *Paramphistomum microbothrium*, Fischoeder, 1901, in experimentally infested ruminants, with particular reference to sheep. *Oderstepoort J. Vet. Res.* 34, 451-540.

Horak, I.G., 1971. Paramphistomisasis of domestic ruminants. *Adv. Parasitol.* 9, 33-72.

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299, 1057-1061.

Hoyle, D.V., Taylor, D.W., 2003. The immune response of regional lymph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol.* 25, 221-229.

Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.R., 1984. The isolation and characterization of globule leukocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6, 371-390.

Hussaarts, L., van der Vlugt, L.E.P.M., Yazdanbakhsh, M., 2011. Regulatory Bcell induction by helminths: implications for allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 733-739. Janeway, C.A., 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7461-7468.

Janeway, C.A., Medzhinov, R., 2002. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20, 197-216.

Jankovic, D., Liu, Z., Gause, W.C., 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22, 450-457.

Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Quill, H., Schwartz, R.H., 1987. Tcell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95, 113-135.

Jenkins, S.J., Allen, J.E., 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 262609.

Joly, Y., 1991. Contribution à l'étude du diagnostic sérologique de la paramphistomose bovine par la méthode ELISA. *Tesis Doctoral.* Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. 193 pp.

Jones, A., Bray, R.A., Gibson, D.I., 2005. Keys to the Trematoda, Vol2. CABI/The Natural History Museum. London.

Jyoti, Prasad, A., Singh, N.K., 2014. Evaluation of antibody response to various developmental stage specific somatic antigens of *Paramphistomum epiclitum* in goats. *BioMed. Res. Int.* 2014, 9pp.

Kawai, T., Akira, S., 2007. TLR signalling. Semin. Immunol. 19, 24-32.

Kawakami, T., Galli, S.J., 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol.* 773-786.

Khan, U.J., Tanveer, A., Maqbool, A., Masood, S., 2008. Epidemiological studies of paramphisomosis in cattle. *Vet. Archiv.* 78, 243-251.

Khatoon, N., Mujib, B., Mirza, S., 2003. Histological changes in the liver of buffaloes by digenetic trematode *Paramphistomum cervi*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6, 1540-1543.

Kirkham, N., Peacock, S.J., Jones, D.B., 1990. Monoclonal antibody MAC 387 recognizes a myelomonocytic antigen shared by epithelial cells in inflammatory skin diseases. *Br. J. Dermatol.* 122, 61-69.

Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J.S., Gleish, G.J., 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.* 174, 745-748. Knubber-Schweizer, G., Torgerson, P.R., 2015. Bovine fasciolosis: Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. *Vet. Parasitol.* 208, 77-83.

Koboziev, I., Reinoso-Webb, C., Furr, K.L., Grisham, M.B., 2014. Role of eneteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 68, 122-133.

Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Sugimura, M., 1994. Perforin-like immunoreactivity in feline globule leukocytes and their distribution. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 1101-1105.

Konno, K., Wakabayashi, Y., Akashi-Takamura, S., Ishii T., Kobayashi, M., Takahashi, K., Kusumoto, Y., Saitoh, S., Yoshizawa, Y., Miyake, K., 2005. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1076-1082.

Kourilsky, P., Truffa-Bachi, P., 2001. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol.* 22, 502-509.

Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., Gause, W.C., 2007. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 448-453.

Lacroux, C., 2006. Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostongylus colubriformis*) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly. *Tesis Doctoral*. Institut National Polytechnique de Toulouse. 234pp.

Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 1-16.

Lee, T.D.G., Swieter, M., Befus, A.D., 1986. Mast cell responses to helminth infection. *Parasitol. Today.* 2, 186-191.

Lewandowska-Polak A., Brauncajs, M., Paradowska, E., Jarzebska, M., Kurowski, M., Moskwa, S., Lesnikowski, Z.J., Kowalski, M.L., 2015. Human parainfluenza virus type III (HPIV3) induces production of IFNγ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *J. Inflamm*. 12, 16.

Liu, Y., Janeway, C.A., 1991. Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth. *Int. Immunol.* 3, 323-332.

Loock, N.A.P., 2003. La paramphistomose bovine, enquete epidemiologique dans l'Est de la France. *Tesis Doctoral*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 79pp.

Lotfy, W.M., Brant, S.V., Ashmawy, K.I., Devkota, R., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2010. A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Vet. Parasitol.* 174, 234-240.

Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J.M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2002. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and *Lymnaea truncatula* from Central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33, 439-447.

Mage, C., Dorchies, P., 1998. Paramphistomose des bovins: étude des relactions coproscopies-populations parasitaires. *Rev. Méd. Vét.* 149, 927-929.

Maizels, R.M., Baliz, A., Gómez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89-116.

Malrait, K., Verschave, S., Skuce, P., Van Loo, H., Vercruysse, J., Charlier, J., 2015. Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. *Vet. Parasitol.* 207, 134-139.

Manga-González, M.Y., 1997. Los moluscos como huéspedes intermediarios de parásitos digenea en medicina veterinaria y humana. En: *Enfermedades helmínticas de importancia sanitaria y económica*. Curso Internacional. Universidad Autónoma de Mexico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pp. 39-52.

Manga-González, M.Y., 1999. Trematodos. En: *Parasitología Veterinaria*. Eds: Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, R.A. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 79-104.

Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., 2004. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.* 93, 344-355.

Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., González-Warleta, M., Miñambres, B., Carro-Corral, C., Iglesias, J., Castillejo, J., Mezo, M., 2009. Cinética de la infección de *Galba truncatula* (Mollusca, Basommatophora) por *Fasciola hepatica y Calicophoron daubneyi* (Trematoda, Digenea) en Galicia (España). Acta Parasitológica Portuguesa. 16, 118-119.

Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Kanev, I., 1994. *Lymnaea truncatula*, intermediate host of some Plagiorchiidae and Notocotylidae species in León, NW Spain. *J. Helmintol.* 68, 136-141.

Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Otero-Merino, C.B., 1991. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. *J. Helmintol.* 65, 15-27.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.

Maplestone, P.A., 1923. A revision of the Amphistomata of mammals. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 17, 113-205.

Martínez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-483.

Martínez-Ibeas, A.M., 2013. Nuevos enfoques para el diagnóstico y el control de la Dicroceliosis, importante parasitosis hepática de los rumiantes. *Tesis Doctoral*. Universidad de León. 259pp.

Martínez-Ibeas, A.M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-González, M.Y., 2013. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Vet. Parasitol.* 195, 57-64.

Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *Vet. Rec.* 170, 343-344.

Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2005. A macroand light microscopical study of the pathology of *Calicophoron microbothrium* infection in experimentally infected cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 72, 321-332.

Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2008. Bovine intestinal cellular responses following primary and challenge infections with *Calicophoron microbothrium* metacercariae. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75, 109-120.

Mbongue, J., Nicholas, D., Firek, A., Langridge, W., 2014. The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *J. Immunol. Res.* 2014, 17pp.

McLaren, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venges, P., Kay, A.B., 1981. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic protein in vitro. *Parasite Immunol.* 3, 359-373. McSorley, H.J., Hewiston, J.P., Maizels, R.M., 2013. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 43, 301-310.

McWilliam, H.E., Driquez, P., Piedrafita, D., Maupin, K.A., Haab, B.B., McManus D.P., Meeuse, E.N., 2013. The developing schistosome worms elicit distinct immune responses in different tissue regions. *Immunol. Cell Biol.* 91, 477-485.

Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1998. Innate immune recognition and control of adaptative immune responses. *Immunol.* 10, 351-353.

Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V., 2005. Cells, cytokynes and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Par. Immunol.* 108, 121-125.

Millar, M., Colloff, A., Scholes, S., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection. *Vet. Rec.* 171, 509-510.

Molina, E.C., Skerratt, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol*. 131, 157-163.

Moreau, E., Chauvin, A., 2010. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotech.* 2010, 9pp.

Morphew, R.M., Hamilton, C.M., Wright, H.A., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Brophy, P.M., 2013. Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. *Vet. Parasitol.* 191, 379-385.

Mosconi, I., Dubey, L.K., Esser-von-Bieren, J., Zaiss, M.M., Lebon, L., Massacand, J.C., Harris, N.L., 2015. Parasite proximity drives the expansion of regulatory T cells in Peyer's patches following intestinal helminth infection. *Infect. Immunol.* 83, 3657-3665.

Moser, M., Murphy, K.M., 2000. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nat. Immunol.* 1, 199-205.

Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 Cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

Mulcahy, G., O'Neill, S., Donnelly, S., Dalton, J.P., 2004. Helminth at mucosal barriers-interaction with the immune system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 853-868.

Muro, A., Ramajo, V., 1999. Paranfistomosis. En: *Parasitología Veterinaria*. Eds. Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 225-228.

Murphy, T.M., Power, E.P., Sánchez-Miguel, C., Casey, M.J., Toolan, D.P., Fagan, J.G., 2008. Paramphistomosis in Irish cattle. *Vet. Rec.* 162, 831.

Murray, M., Miller, H.R., Jarrett, W.F., 1968. The globule leukocyte and its derivation from the subepithelial mast cell. *Lab. Invest.* 19, 222-234.

Nair, M.G., Du, Y., Perrigoue, J.G., Zaph, C., Taylor, J.J., Goldschmidt, M., Swain, G.P., Valenzuela, D.M., Murphy, A., Karow, M., Stevens, S., Pearce, E.J., Artis, D., 2009. Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *J. Exp. Med.* 206, 937-952.

Näsmark, K.E., 1937. Revision of the trematode family Paramphistomidae. *Zool. Bidrag Uppsala*. 16, 301-565.

Nolan, J.M., Cribb, T.H., 2005. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv. Parasitol.* 60, 101-163.

Nono, J.K., Pletinckx, K., Lutz, M.B., Brehm, K., 2012. Excretory/secretory products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1516.

Onah, D.N., Nawa, Y., 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J. Parasitol.* 38, 209-236.

Ortega-Mora, L.M. y Rojo-Vázquez, F.A., 1999. Relaciones parásito/hospedador. En: *Parasitología Veterinaria*. Eds. Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 39-48.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G., 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71-109.

Owen, R.L., 1994. M cells: entryways of opportunity for enteropathogens. *J.Exp. Med.* 180, 7-9.

Pandiyan, P., Zhou, J., 2015. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing FoxP3(+) regulatory cells. *Cytokine*. 76, 13-24.

Paquet, P., Piérard, G.E., 1999. Epidermal calprotectin in drug-induced toxic epidermal necrolysis. *J. Cutan. Pathol.* 26, 301-305

Paul, W.E., Seder, R.A., 1994. Lymphocyte response and cytokynes. *Cell.* 76, 241-251.

Pearce, E.J., MacDonald, A.S., 2002. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 499-511..

Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T. A., 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 4, 439-473.

Pérez, J., García, P.M., Hernández, S., Martínez-Moreno, A., Martín de las Mulas, J., Camara, S., 2001. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus. Vet. Res.* 32, 463-473.

Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sánchez, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Pathol.* 127, 30-36.

Phiri, A.M., Chota, A., Phiri, I.K., 2007. Seasonal pattern of bovine amphisomosis in traditionally reared cattle in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. *Trop. Anim. Health Prod.* 39, 97-102.

Postal, J.M., 1984. Les paramphistomes gastroduodenales des ruminants. *Tesis Doctoral.* Ecole Nationale de Vétérinaire d'Alfort. 193pp.

Raes, G., Beschin, A., Ghassabeh, G.H., de Baetselier, P., 2007. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr. Op. Immunol.* 19, 454-459.

Rainbird, M.A., MacMillan, D., Meeusen, E.N., 1998. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* 20, 93-103.

Ramajo-Martín, V., 1992. Zooparasitología. En: *Las dehesas salmantinas*. Junta de Castilla y León. Gráficas Ortega. Pp. 462ss.

Ramajo-Martín, V., Pérez Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A., 2007. Preliminary data about the parasitism caused by Protozoa, Helminths and Ticks in cervids and wild bovids from Salamanca (western Spain). *Rev. Iber. Parasitol.* 67, 69-77.

Rangel-Ruiz, L.J., Albores-Brahms, S.T., Gamboa-Aguilar, J., 2003. Seasonal trends of *Paramphistomum cervi* in Tabasco, Mexico. *Vet., Parasitol.* 116, 217-222.

Raspch, C., Dahinden, T., Heinzmann, D., Torgerson, P.R., Braun, U., Deplazes, P., Hurni, L., Bär, H., Knubben-Schweizer, G., 2008. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 154, 242-249.

Rieu, E., 2004. Paramphistomoses gastroduodenales bovines: enquete epidemiologique en Champagne-Ardenne et mise au point d'un test ELISA pour la detection de coproantigenes parasitaires. *Tesis doctoral*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 264pp.

Rieu, E., Recca, A., Bénet, J.J., Saana, M., Dorchies, P., Guillot, J., 2007. Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Vet. Parasitol.* 146, 249-253.

Rinaldi, L., Perugini, A.G., Capuano, F., Fenizia, D., Musella, V., Veneziano, V., Cringoli, G., 2005. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of- *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 131, 247-253.

Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P.F., 2006. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukaemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8αα phenotype. *Vet. Pathol.* 43, 15-28.

Rolfe, P.F., Boray, J.C., 1993. Comparative efficacy of monoxidectin, an ivermectine/clorsulon combination and closantel against immature paramphistomes in cattle. *Aus. Vet. J.* 70, 265-266.

Rolfe, P.F., Boray, J.C., Collins, G.H., 1994. Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. *Int. J. Parasitol.* 24, 995-1004.

Rolfe, P.F., Boray, J.C., Nichols, P., Collins, G.H., 1991. Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 21, 813-819.

Rondelaud, D., Titi, A., Vignoles, P., Mekrod, A., Dreyfuss, G., 2013. Consequence of temperature changes on cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica* or *Paramphistomum daubneyi*. *Parasite*. 20, 10.

Saifullah, M., Ahmad, G., Abidi, S.M.A., 2011. Isolation and partial characterization of excretory/secretory antigens of *Gastrothylax crumenifer*. *Vet. Parasitol.* 180, 232-236.

Saifullah, M.K., Ahmad, G., Abidi, S.M., 2013. Immunodetection of coproantigens for the diagnosis of amphistomosis in naturally infected Water Buffalo, *Bubalus bubalis. Vet. Parasitol.* 191, 66-72.

Samnaliev, P., Kanev, I., Vassilev, I., 1978. Interactions between larval and parthenite stages of some trematodes in one and the same intermediate host. En: *Proceedings of the Fourth International Congress of Parasitology*, 19-26 de agosto. Varsovia, Sección A. Pp. 45-46.

Sanabria, R., Moré, G., Romero, J., 2011. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leyderi* (Trematoda: Paramphistomidae). *Vet. Parasitol.* 177, 182-185.

Sanabria, R., Mouzet, R., Courtioux, B., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J., Romero, J., 2012. Intermediate hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. *Parasitol. Research.* 111, 2011-2016.

Sánchez, N., Tantalean, M., Cavez, A., Soto, A., 2009. Presencia de *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Paramphistomidae) en bovinos de Loreto, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 16, 141-142.

Sanchís, J., Sánchez-Andrade, R., Machi, M.I., Piñeiro, P., Suárez, J.L., Capazal-Monteiro, C., Maldini, G., Venzal, J.M., Paz-Silva, A., Arias, M.S., 2013. Infection by Paramphistomidae trematodes in cattle from two agricultural regions in NW Uruguay and NW Spain. *Vet. Parasitol.* 191, 165-171.

Sansonetti, P.J., 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 953-964.

Sey, O., 1988. Scope of and proposal for systematic of the Amhistomida (Lühe, 1909) Odening, 1974 (Trematoda). *Parasitol. Hung.* 21, 17-30.

Sey, O., 1991. CRC handbook of the zoology of amphistomes. CRC, Boca Ratón.

Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet. Parasitol.* 163, 57-66.

Silvestre, A., Sauvé, C., Cabaret, J., 2000. Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet. Rec.* 146, 674-675.

Singh, C.D.N., Lakra, G.B.V.C., 1971. Pathologic changes in naturally occurring *Cotylophoron cotylophorum* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 32, 659-663.

Singh, R.P., Prasad, K.D., Ansari, M.Z., Sahai, B.N., 1983. Observations on intradermal skin test for diagnosis of *Paramphistomum cervi* in goats. *Indian J. Anim. Health*. 22, 67-68.

Singh, R.P., Sahai, B.N., Jha, G.J., 1984. Histopathology of the duodenum and rumen of goats during experimental infections with *Paramphistomum cervi*. *Vet. Parasitol.* 15, 39-46.

Skovronskii, R.V., 1985. *Lymnaea truncatula* –first and second intermediate host of *Echinostoma revolutum* and *Hypoderaeum conoideum*. *Parazytologiya*. 19, 323-324.

Smith, G., 1988. The population biology of the parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitol*. 96, 185–195.

Smits, H.H., Hammad, H., van Nimwegen, M., Soullie, T., Willart, M.A., Lievers, E., Kadouch, J., Kool, M., Kosvan Oosterhoud, J., Deelder, A.M., Lambrecht, B.N., Yazdanbakhsh, M., 2007. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 932-940.

Soulas, C., Conerly, C., Kim, W-K., Burdo, T.H., Alvarez, X., Lackner, A.A., Williams, K.C., 2011. Recently infiltrating MAC⁺ Monocytes/Macrophages. A third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Immun. Infect. Dis.* 178, 2121-2135.

Stankiewicz, M., Jonas, W.E., Douch, P.C.G., Rabel, B., Bisset, S., Cabaj, W., 1993. Globule leukocytes in the lumen of the small intestine and the resistance status of sheep infected with parasitic nematodes. *J. Parasitol.* 79, 940-945.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S., 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage manose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287-292.

Steinfelder, S., Andersen, J.F., Cannons, J.L., Feng, C.G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Sher, A., Jankovic, D., 2009. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J. Exp. Med.* 206, 1681-1690.

Stiles, C.W., Goldberger, J., 1910. A study of the anatomy of *Watsonius* (n.g.) *watsoni* of man and of nineteen allied species of mammalian trematode worms of the superfamily Paramphisomoidea. *Hyg. Lab. Bull.* 60:25app.

Szmidt-Adjidé, V., Abrous, M., Adjidé, C.C., Dreyfuss, G., Lecompte, A., Cabaret, J., Rondelaud, D., 2000. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Vet. Parasitol.* 87, 133-138.

Tandom, V., Roy, B., Shylla, J.A., Ghatani, S., 2014. Amphistomes En: *Digenetic Trematodes*. Eds. Toledo, R. y Fried, B. Springer Science. Pp. 365ss.

Taylor, M.D., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. Parasites of cattle. En: *Veterinary Parasitology*. Eds. Taylor, M.D., Coop, R.L., Wall, R.L. Blackwell Publishing. Pp. 52ss.

Taylor, M.D., van deer Werf, N., Maizels, R.M., 2012. T cells in helminth infection: the regulatory and the regulated. *Trends Immunol.* 33, 181-189.

Titi, A., Mekroud, A., Chibat, M.H., Boucheikhchoukh, M., Zein-Eddine, R., Djuikwo-Teukeng, F.F., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., 2014. Ruminal paramphistomosis in cattle from northeastern Algeria: prevalence, parasite burdens and species identification. *Parasite*. 21, 50.

Titi, A., Mekroud, A., Sedraoui, S., Vignoles, P., Rodelaud, D., 2010. Prevalence and intensity of *Paramphistomum daubneyi* infections in cattle from northeastern Algeria. *J. Helminthol.* 84, 177-181.

Tizard, I., 2009. Veterinary Immunology. 8th edition. Elsevier, Amstedam, 592 pp.

Tliba, O., Moire, N., Le Vern, Y., Boulard, C., Chauvin, A., Sibille, P., 2002. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Res.* 33, 261-270.

Toledo, R., Esteban, J.G., Fried, B., 2006. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Adv. Parasitol.* 63, 285-365.

Toolan, D.P., Mitchell, G., Searle, K., Sheehan, M., Skuce, P.J., Zadocks, R.N., 2015. Bovine and ovine rumen fluke in Ireland –Prevalence, risk factors and species identity based on passive veterinary surveillance and abbatoir findings. *Vet. Parasitol.* 212, 168-174.

Tosi, M.F., 2005. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 241-249.

Travassos, L., 1934. Synopse dos Paramphistomoidea. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 29, 19-178.

Tschuor, A., Clauss, M., 2008. Investigations on the stratification of forestomach contents in ruminants: an ultrasonographic approach. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 627-633.

Uematsu, S., Akira, S., 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* 84, 712-725.

Van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F.H.M., Kruize, Y.C.M., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G.M., Yazdanbakhsh, M., 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. *J. Biol. Chem.* 227, 48122-48129. Van Meulder, F., Van Coppernolle, S., Borloo, J., Rinaldi, M., Chiers, K., Van der Broeck, J., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Granule exocytosis of granulysin and granzyme B as a potential key mechanism in vaccine-induced immunity in cattle against the nematode *Ostertagia ostertagi. Infect. Immun.* 81, 1798-1809.

Van Remoortere, A., van Dam, G.J., Hokke, C.H., van den Eijnden, D.H., van Die, I., Deelder, A.M., 2001. Profiles of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against defined carbohydrate epitopes in sera of *Schistosoma*-infected individuals determined by surface plasmon resonance. *Infect. Immun.* 69, 2396-2401.

Voehringer, D., Shinkai, K., Locksley, R.M., 2004. Type 2 immunity reflects orchestrated recreuitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*. 20, 267-277.

Weller, P.F., 1994. Eosinophils: structure and functions. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 85-90.

Wilson, L.R., Good, R.T., Panaccion, M., Wijffels, G.L., Sandeman, R.M., Spithill, T.W., 1998. *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 88, 85-94.

Yamazaki, S., Inaba, K., Tarbell, K.V., Steinman, R.M., 2006. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+Cd25+CD4+ regulatory T cells including supressors of alloreactivity. *Immunol. Rev.* 212, 314-329.

Yoshimoto, T., Paul, W.E., 1994. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* 179, 1285-1295.

Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Écija, R.A., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez, J., 2009. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. *Res. Vet. Sci.* 87, 226-232.

Zafra, R., Pérez.Écija, R.A., Buffoni, L., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez Galisteo, M.E., Pérez, J., 2010. Evaluation of hepatic damage and local immune response in goats immunized with native glutathione Stransferase of *Fasciola hepatica*. J. Comp. Pathol. 143, 110-119.

Zafra, R., Pérez-Écija, R.A., Buffoni, L., Moreno, P., Bautista, M.J., Martínez-Moreno, A., Mulcahy, G., Dalton, J.P., Pérez, J., 2013. Early and late peritoneal and hepatic changes in goats immunized with recombinant cathepsin L1and infected with *Fasciola hepatica*. J. Comp. Pathol. 148, 373-384.

Zintl, A., Garcia-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A.L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., Egan, S., Lawlor, A., Negredo, C., Brennan, G., Hanna, R.E., De Waal, T., Mulcahy, G., 2014. Bovine paramphistomes in Ireland. *Vet Parasitol.* 204, 199-208.

12. ANEXO DE PUBLICACIONES

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short Communication

Calicophoron daubneyi (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain)

M. Carmen Ferreras^{a,*}, Camino González-Lanza^a, Valentín Pérez^a, Miguel Fuertes^a, Julio Benavides^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Javier Giráldez^a, Ana María Martínez-Ibeas^a, Laetitia Delgado^a, Miguel Fernández^a, M. Yolanda Manga-González^a

^a Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE, Finca Marzanas, Grulleros, León, Spain ^b Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia, Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7, 15318 Abegondo, A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 30 July 2013 Received in revised form 23 October 2013 Accepted 27 October 2013

Keywords: Paramphistomosis Calicophoron daubneyi Cattle Epidemiology

ABSTRACT

The prevalence and aetiology of natural paramphistomosis was investigated in cattle slaughtered in the Castilla y León region (Spain) over a 3 year-period. The overall prevalence of positive animals was 6.20%. The parasite burden per animal ranged from 8 to 8005 (median = 144) and the ruminal atrium had the highest parasite burden whereas the ruminal dorsal sac the lowest. The prevalence and parasite burden increased with age while these parameters were lower in cattle under intensive management. *Calicophoron daubneyi* was the only Paramphistomidae species identified using morphoanatomical, histological and molecular methods in the studied animals.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitism caused by different species of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), belonging to several genera (*Paramphistomum, Calicophoron* and *Cotylophoron*). It has a worldwide distribution and in tropical and sub-tropical regions is regarded as a highly pathogenic disease (Dorny et al., 2011). In Europe, this parasitism is generally considered as clinically irrelevant, although occasionally weight loss and decreased milk production (Spence et al., 1996; Foster et al., 2008), or even mortality in adult sheep, has been described (Mason et al., 2012).

* Corresponding author at: Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24071 León, Spain. Tel.: +34 987291326; fax: +34 987291194. Castilla y León region, in the northwest of Spain, has the largest cattle population in Spain (over one million). Nevertheless, there is a lack of information about paramphistomosis in domestic ruminants of this area. In Galicia, a geographically close region, *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) was the only paramphistome found in slaughtered cattle (González-Warleta et al., 2013).

The aim of this study was to investigate the prevalence of Paramphistomidae species in abattoir slaughtered cattle in Castilla y León, and determine which species were present.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Cattle sampled (total *n* = 790) were from both mountainous and arable areas, primarily from León, Zamora, Valladolid and Palencia provinces (Northwestern Spain),





CrossMark

E-mail address: mcfere@unileon.es (M.C. Ferreras).

^{0304-4017/\$ –} see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.019



Fig. 1. Adults of C. daubneyi present on the reticulum mucosa from an adult cow. Bar = 1 cm.

during the spring-summer seasons of 2010, 2011 and 2012 from an abattoir located in the city of León (Year 1: n = 481; Year 2: n = 173; Year 3: n = 136). Ages ranged from 10 months to 19 years and belonged to both sexes (61.3% females; 38.6% males). The cattle came from 184 farms, 93 of them (50.5%) managed intensively (animals kept indoors and with no access to pasture) and the remaining 91 (49.4%) in a semi-intensive system (at pasture for variable periods of time during the grazing season). Herds were classified, according to their primary purpose, as beef (81.6%) or dairy (18.3%). Detailed information of all the animals and farms was provided by the slaughterhouse and the Livestock Section of the Castilla y León Government.

2.2. Sampling

At the slaughterhouse, the rumen, reticulum, omasum, abomasum and proximal duodenum from each animal were examined for the presence of parasites. The rumen and reticulum of all the parasitized cattle were processed for worm recovery (Fig. 1).

2.3. Parasite count and identification

For each bovid, the presence and number of the parasites in the reticulum and their location(s) in the different anatomical parts of the rumen (rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ventral sac and dorsal sac) was evaluated. A representative number of paramphistomes from each parasitized cattle were fixed in 70% ethanol and 10% neutral-buffered formalin for subsequent identification, while other specimens were frozen individually and stored at -85 °C until DNA extraction.

A total of 472 randomly selected alcohol-fixed paramphistomes were stained with borax carmine and microscopically evaluated as reported previously (Eduardo, 1983). Additionally, a total of 200 formalinfixed paramphistomes were processed for histological examination. Species specific Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) intergene zone and mitochondrial DNA were amplified for molecular identification of *C. daubneyi* (González-Warleta et al., 2013; Martínez-Ibeas et al., 2013).

2.4. Statistical analysis

Animals were classified according to farm intensification level (semi-intensive vs. intensive systems), dairy or beef farms and age (<12 months, 12–30 months and >30 months). Effects of these variables on prevalence and parasite burden (logarithmically transformed) were analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis test. The strength of the relationship between prevalence and the above mentioned independent variables were estimated through logistic regression. Proportion of the total worms localized in the reticulum and different anatomical parts of the rumen was subjected to analysis of variance. All statistical procedures were carried out using SAS package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 9.1).

3. Results

3.1. Parasite identification

All the adult parasite specimens studied from the reticula and rumina of infected cattle were identified morphoanatomically and histologically as *C. daubneyi*. The molecular study by ITS-2 confirmed, in all the worms examined, a 410 bp fragment with a nucleotide composition identical (100% homology) to that published for

Та	ble	21

Effect of farm characteristics and age of animals on distribution of parasites in the rumen-reticulum (mean value ± standard error).

	Localization		Intraruminal localization					
	Reticulum	Rumen	Orifice	Ruminal-reticulum fold	Atrium	Ventral sac	Dorsal sac	
Туре								
Dairy	9.6 ± 4.20	90.4 ± 4.20	2.8 ± 1.028	15.4 ± 4.41	63.2 ± 6.18	16.3 ± 2.52	2.3 ± 1.22	
Beef	9.1 ± 1.88	90.9 ± 1.88	9.6 ± 3.08	8.9 ± 2.01	62.9 ± 3.92	16.6 ± 2.69	2.0 ± 0.56	
Management system								
Semi-intensive	11.5 ± 2.51	88.5 ± 2.51	6.8 ± 2.34	13.3 ± 3.01	57.1 ± 4.25^{a}	19.9 ± 3.22	2.8 ± 0.83	
Intensive	6.3 ± 2.16	93.6 ± 2.16	9.6 ± 4.64	6.7 ± 1.64	70.1 ± 4.88^{b}	12.3 ± 2.52	1.2 ± 0.44	
Age								
<12 months	3.4 ± 1.76^{a}	96.6 ± 1.76^{a}	4.8 ± 4.83	5.9 ± 1.96^{a}	72.5 ± 6.30^{b}	15.5 ± 5.37	1.2 ± 1.23	
12-30 months	4.1 ± 1.32^{a}	$95.9 \pm 1.32^{\text{a}}$	3.2 ± 1.60	3.4 ± 1.34^{a}	76.6 ± 4.00^{b}	14.5 ± 4.60	2.2 ± 0.84	
>30 months	12.6 ± 2.54^{b}	87.4 ± 2.54^{b}	10.7 ± 3.63	14.0 ± 2.76^{b}	55.5 ± 4.44^{a}	17.5 ± 2.83	2.3 ± 0.70	

Within the same factor and column, means with different letters (a and b) are significantly different (P < 0.05).

C. daubneyi in Gen BankTM (Access No. AY790883). Moreover, the studied specimens showed 100% homology with the mtDNA fragment 885 pb of *C. daubneyi* (Gen Bank, Access No. JQ815200).

3.1.1. Epidemiological findings

Overall, 49 out of the 790 cattle examined (6.20%) had adult flukes in the rumen and reticulum, and number of parasites per animal ranged from 8 to 8005 (median = 144).

Neither prevalence of natural paramphistomosis nor fluke burden was significantly affected by the production purpose of the animal (beef *vs* dairy), or the breed. However, prevalence rate and fluke burden were significantly higher (P < 0.05) in semi-intensive (10.04% and 253 respectively) than intensive systems (4.22% and 58).

The age of the animal also showed a significant influence (P < 0.05) over both the prevalence of infection, from 2.62% (<12 months) to 17.88% (>30 months) and the median worm burden (25 at <12 months; 253 at >30 months). Significant differences (P = 0.001) were observed also between females (8.71%; n = 42) and males (2.27%; n = 7).

However, when all the factors were studied together, age was the only independent variable that was significantly correlated with the prevalence of *C. daubneyi* infection (Odds ratio = 2.49; 1.55–4.902; $P \le 0.001$). The average slaughter age was greater for cattle from semi-intensive than intensive systems ($51.4 \pm 3.49 vs 18.9 \pm 1.08$ months) and for females compared to males ($41.4 \pm 2.38 vs 12.0 \pm 0.16$ months).

When considering the production purpose of the animal, it is worth noting that 417 of the 790 cattle examined (52.7%) came from feedlots and *C. daubneyi* was detected in only 19 of them (4.5%). It should also be mentioned that these feedlot cattle were breeding on pastures during different periods of time.

3.2. Parasite burden

The number of fluke was significantly (P < 0.01) higher in the rumen than in the reticulum ($90.81 \pm 1.71\%$ vs $9.19 \pm 1.71\%$). Within the rumen, they were more numerous in the ruminal atrium ($62.93 \pm 3.31\%$) and the ventral sac ($16.53 \pm 2.15\%$). Animals from the semi-intensive management system had significantly less parasites in their ruminal atria (P<0.005, Table 1). Older animals (>30 months) had the highest fluke burden (P<0.05), with an increased number of parasites in the rumino-reticular fold compared to the other groups (Table 1).

4. Discussion

The present study is the first report of the prevalence and aetiology of naturally acquired paramphistomosis *by C. daubneyi* in slaughtered cattle from the Castilla y León region (Spain).

The overall prevalence (6.20%) was lower than those reported in other areas of Spain or France (González-Warleta et al., 2013; Szmidt-Adjidé et al., 2000), but similar to that observed in Algeria (Titi et al., 2010). Climate has been proposed to influence infection rate in cattle (Titi et al., 2010) and as Castilla y León has a temperate to cold, dry climate this may hinder the speed of the parasite life-cycle. An unexpected finding of this study was the presence of naturally acquired paramphistomosis in cattle from feedlots. This finding, not recorded in other Spanish territories (Arias et al., 2011; González-Warleta et al., 2013), has been also observed in Irish store cattle (Murphy et al., 2008). Possible explanations are if that these animals were infected while grazing at pasture before their confinement in feedlots or ingestion of contaminated fodder while in the feedlot.

Paramphistomosis infection was found in animals of all age categories, although the prevalence was significantly higher in cattle older than 30 months, suggesting that repeated exposures to the parasite do not confer protection against re-infections. This is in contrast to other studies (Dorny et al., 2011). A higher percentage of females animals were infected which is in agreement with the suggested genetic or hormonal predisposition of females to paramphistomosis (Szmidt-Adjidé et al., 2000; Titi et al., 2010). However, it has to be considered that, in this study, sex was closely related to the age of the animal.

The climate of the region may have contributed to an individual parasite burden lower than those reported in other areas with a more humid and less extreme climates (Szmidt-Adjidé et al., 2000; Arias et al., 2011; González-Warleta et al., 2013). Differences observed according to the management system are probably related to the maintenance at pasture for longer periods of time of animals under

a semi-intensive than an intensive system and consequently more exposure to the infective form of the parasite.

The mean worm count was the highest in the ruminal atrium and the lowest in the dorsal sac, in agreement with the findings of González-Warleta et al. (2013). The lower burden in the latter may be related to its scarce mucosal papillae, which is due, in turn, to the gas dome of CO_2 and methane present in the area (Tschuor and Clauss, 2008). The long leaf-shaped papillae of the atrium may have had a protective effect for the flukes and the presence of a fluid layer may favour the intake of nutrients by the parasite.

Our results showed that *C. daubneyi* is the only Paramphistomidae species found in naturally infected cattle in the Castilla y León region. This species, although considered as one of the less widespread (Silvestre et al., 2000), has also been found in other regions of Spain (González-Warleta et al., 2013; Martínez-Ibeas et al., 2013), across Europe (Silvestre et al., 2000; Szmidt-Adjidé et al., 2000; Gordon et al., 2013) and Algeria (Titi et al., 2010).

In conclusion, this is the first study of the prevalence of cattle paramphistomosis in Castilla y León region of Spain, and the only species identified was *C. daubneyi*. Data provided may be helpful to devise further studies about seasonality of infection, habitat of the intermediate host, interactions with other trematodes and appropriate control strategies for paramphistomosis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León (JCyL). The authors wish to thank Dr. Dagleish (Moredun Research Institute) for proofreading of the manuscript, and Mses. Del-Pozo, Espiniella and Carcedo of the IGM for technical assistance. The cooperation of the managing director (J.L. Carracedo) and the veterinary inspectors (B.E. Postigo, B. Prieto, N. Aller) of the slaughterhouse and E. Sevillano and A. Sánchez-Pedreira of the Agriculture and Livestock Service (JCyL) is also acknowledged. A.M. Martínez-Ibeas was supported by the JCyL and the European Social Funds (ESF) and J. Benavides by the JAE-Doc programme (CSIC-ESF).

References

- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., 2011. Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. Vet. Rec. 168, 408–412.
- Dinnik, J.A., 1962. Paramphistomum daubneyi sp.nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highlands. Parasitology 52, 143–151.
- Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes, Fasciola and Paramphistomum in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. Vet. Parasitol. 175, 293–299.
- Eduardo, S.L., 1983. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901 with species reference to the morphology of species occurring in ruminants, III. Revision of the genus Calicophoron Näsmark, 1937. Syst. Parasitol. 5, 25–79.
- Foster, A.P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M.P., Twomey, D.F., Millar, M.F., Taylor, M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. Vet. Rec. 162, 528.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. Vet. Parasitol. 191, 252–263.
- Gordon, D.K., Roberts, L.C.P., Lean, N., Zadoks, R.N., Sargison, N.D., Skuce, P.J., 2013. Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. Vet. Parasitol. 195, 65–71.
- Martínez-Ibeas, A.M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-González, M.Y., 2013. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. Vet. Parasitol. 195, 57–64.
- Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. Vet. Rec. 170, 343–344.
- Murphy, T.M., Power, E.P., Sánchez-Miguel, C., Casey, M.J., Toolan, D.P., Fagan, J.G., 2008. Paramphistomosis in Irish cattle. Vet. Rec. 162, 831.
- Silvestre, A., Sauvé, C., Cabaret, J., 2000. Caprine Paramphistomum daubneyi (Trematoda) infection in Europe. Vet. Rec. 146, 674–675.
- Spence, S.A., Fraser, G.C., Chang, S., 1996. Response in milk production to the control of gastro-intestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. Aust. Vet. J. 74, 456–459.
- Szmidt-Adjidé, V., Abrous, M., Adjidé, C.C., Dreyfuss, G., Lecompte, A., Cabaret, J., Rondelaud, D., 2000. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. Vet. Parasitol. 87, 133–138.
- Titi, A., Mekroud, A., Sedraoui, S., Vignoles, P., Rodelaud, D., 2010. Prevalence and intensity of *Paramphistomum daubneyi* infections in cattle from north-eastern Algeria. J. Helminthol. 84, 177–181.
- Tschuor, A., Clauss, M., 2008. Investigations on the stratification of forestomach contents in ruminants: an ultrasonographic approach. Eur. J. Wildl. Res. 54, 627–633.

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes

Miguel Fuertes^a, Valentín Pérez^a, Julio Benavides^a, M. Camino González-Lanza^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Francisco Javier Giráldez^a, Miguel Fernández^a, M. Yolanda Manga-González^a, M. Carmen Ferreras^{a,*}

^a Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

^b Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia, Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7, 15318 Abegondo, A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 28 November 2014 Received in revised form 6 February 2015 Accepted 28 February 2015

Keywords: Paramphistomosis Calicophoron daubneyi Cattle Pathology

ABSTRACT

Local host response and parasite distribution were studied in the forestomachs, abomasum, duodenum and regional lymph nodes of cattle suffering from bovine paramphistomosis. The parasites were found attached, by its ventral sucker, to small conical papillae of the rumen and reticulum. Affected papillae, showed morphological changes denoted by very narrow stalks and expanded heads. Histologically, these changes were characterized by epithelial acanthosis-hyperkeratosis of the epithelium. Infiltration of inflammatory cells was often related with the epithelial changes, although it was also found in the duodenal mucosa and submucosa. These cells were arranged as aggregates or follicles but sparse infiltration of eosinophils, globule leukocytes, mast cells or macrophages was also observed in the lamina propria. Tissue damage and inflammatory reaction were more severe in the ruminal atrium, where the largest number of flukes and affected papillae were observed. In contrast, lesions in the ruminal dorsal sac were absent or mild. Statistical correlation between lesion severity and parasite burden was confirmed.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitosis caused by different species of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), with several genera (*i.e. Paramphistomum*, *Calicophoron* and *Cotylophoron*) described. Recent epidemiological studies carried out in the North West of Spain have reported that *Calicophoron daubneyi* is the only paramphistomid found in slaughtered cattle, with prevalences

* Corresponding author. Tel.: +34 987291326. *E-mail address:* mcfere@unileon.es (M.C. Ferreras).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.034 0304-4017/© 2015 Published by Elsevier B.V. between 6.2% and 18.8% (González-Warleta et al., 2013; Ferreras et al., 2014).

While in tropical regions this parasitosis has been regarded as a very pathogenic disease (Dorny et al., 2011), in Europe it is considered a harmless entity although the prevalence of paramphistomiasis has increased in this area since 2008 (Foster et al., 2008; Zintl et al., 2014). The most serious clinical consequences have been associated with severe haemorrhagic enteritis, produced by the immature paramphistomes before migration to the forestomachs (Toledo et al., 2006; Millar et al., 2012), that occasionally has been reported as the cause of severe outbreaks with relevant mortality (Mason et al., 2012). Loss of weight and







a decrease in milk production are the most common clinical signs associated with paramphistomosis (Foster et al., 2008).

Pathological changes related to natural paramphistomosis have not been studied in detail. In several experimental studies, it has been shown that immature parasites cause a duodenitis characterized by a mononuclear and eosinophilic infiltrate together with Brunner's gland hyperplasia that persist even when the paramphistomes have migrated to the forestomachs (Rolfe et al., 1994; Mavenyengwa et al., 2005). The frequency and significance of lesions caused by the adult worms is unclear (Toledo et al., 2006). Most authors have suggested that the adult paramphistomes are relatively harmless (Brown et al., 2007) but experimental infections have shown that they can cause atrophy and severe cornification of ruminal papillae (Rolfe et al., 1994) with a slight inflammatory reaction in the rumen (Mavenyengwa et al., 2008).

The post-mortem examination of the forestomachs in cattle suffering from natural paramphistomosis has shown that the greatest parasite burden can be found in the ruminal atrium and that *C. daubneyi* was the only species of the Paramphistomidae family identified in these animals (González–Warleta et al., 2013; Ferreras et al., 2014). Due to the absence of systematic studies on pathological changes in cattle naturally infected by *C. daubneyi*, the aim of the current study was to evaluate and characterize the gross and microscopic lesions caused by adult flukes in natural paramphistomosis and their relation to the parasite burden in different gastrointestinal compartments and regional lymph nodes.

2. Materials and methods

2.1. Pathological studies

The rumen, reticulum, omasum, abomasum and proximal duodenum of 64 slaughtered cattle were examined for the presence of parasites and gross pathological changes. In all the parasitized animals (n = 49), the rumen and reticulum were removed and brought to the laboratory for worm recovery and detailed macroscopic examination. Samples from the different anatomical parts of the rumen (rumino-reticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ventral sac, dorsal sac; at least 12 per animal) and any other location showing macroscopic lesions were fixed in 10% neutral-buffered formalin. The total number of parasites identified at the reticulum and different anatomical areas of the rumen was estimated as explained in a previous study (Ferreras et al., 2014). Representative samples from the remaining non-parasitized organs (omasum, abomasum, duodenum and regional lymph nodes) of these animals were also recovered and fixed in 10% neutralbuffered formalin. Identical samples were taken and fixed from the non-parasitized animals (n = 15).

Fixed samples were dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax following conventional processing for histological examination. Microtome sections $(4 \,\mu m)$ were cut, mounted on glass microscope slides and stained with haematoxylin and eosin (HE), Toluidine blue for mast cell identification, Congo red



Fig. 1. *C. daubneyi* adult flukes on the mucosa of the rumino-reticular fold. Note the distinct conical papillae in which parasites were attached (arrowheads). Parasite burden = 719 (349 worms recovered from the rumino-reticular fold). Bar = 0.5 cm.

for amyloid staining, Masson–Goldner trichrome, periodicacid-Schiff (PAS), alcian blue and Perlsí Prussian blue stains for mucins and ferric pigments identification. Finally, the slides were dehydrated and mounted for the histological examination.

The severity of the lesions in the reticulum, ruminoreticular orifice, rumino-reticular fold, ruminal atrium, ruminal ventral sac and ruminal dorsal sac was subjectively evaluated for each section. This was graded on a scale from – to ++++: – = no lesion; + = minimal; ++ = mild; +++ = moderate; ++++ = marked.

2.2. Statistical analysis

Chi-square procedure was used to study the association between fluke attachment and severity of lesions in the digestive mucosa. In the parasitized animals, correlation between parasite burden and severity of lesions in each digestive compartment was evaluated using Spearman test. Data of parasite burden were log transformed, adding 1 to each data point before transforming. Statistical analysis was performed using FREQ and CORR procedures of SAS package (SAS Institute, 1999).

3. Results

3.1. Gross pathology

Macroscopically, adult flukes of *C. daubneyi* were attached to conical ruminal and reticular papillae by the ventral sucker. They were mainly located amongst the leaf-shaped papillae of the rumen and at the deeper part of the honeycomb cells of the reticulum. After the parasites were removed, those papillae showed a shortened mushroom shape with occasional necrosis and ulceration of the tips (Fig. 1). In some parasitized areas of the forestomachs, focal loss of papillae was observed. The mucosa of the rumen, reticulum and omasum of 9 parasitized and 4 control cattle presented a parakeratotic hyperkeratosis characterized by a diffuse darkening of the surface.

Abomasal mucosae was congested and showed punctuate haemorrhages and ulcers in the pyloric region of 12 parasitized cattle. Widespread multifocal, small (1–2 mm) white foci were seen in the abomasal mucosae in 5 parasitized and 2 control cattle.

In the duodenum of 15 parasitized animals, variable degree of mucous secretion, congestion and small haemorrhagic areas were observed. At opening of the duodenum, three of them also showed small (1-2 mm) whitish nodules in the mucosal surface and several small ulcers were found in another one. No gross changes were seen in the control animals. Adult flukes of *Fasciola hepatica* were found in the duodenal mucosa of the cow with the highest paramphistome burden.

Frequently, the regional lymph nodes in all digestive locations examined were enlarged.

3.2. Histopathological changes

3.2.1. Reticulum and rumen

Microscopically the most evident changes were found in the mucosa of those areas parasitized by adult flukes. These lesions involved the epithelium and the core (an extension of the lamina propria–submucosa) of the conical papillae encircled by the ventral sucker of the adult parasite (Fig. 2a and b).

Conical papillae in which the adults of C. daubneyi were attached became mushroom-shaped, with narrow stalks and expanded heads (Fig. 2b and c). They were covered by a thickened keratinized stratified squamous epithelium showing variable degree of acanthosis, hyperkeratosis and evident rete pegs (Figs. 2c and 3a). At the site of attachment, mainly the base of the papillae, the lining epithelium was markedly narrowed (Figs. 2c and 3a). The stratum squamous was thinned (1-3 cell layers) or absent; and the stratum granulosum and corneum were very thinned (2-3 cell layers) or eroded. The basal stratum was generally intact, although it was occasionally flattened. In the latter, the basal lamina was disrupted and the lamina propria was covered only by the stratum corneum (Fig. 2d). In the parasitized samples, inflammatory cells were found within the epithelium, usually in low amounts: intraepithelial lymphocytes (IELs), usually at suprabasal location and with irregular nuclear contours ("squiggle cells"); intraepithelial globule leukocytes (GLs) characterized by the presence of large acidophilic PAS-positive, Alcian blue-negative and Toluidine blue-negative (no metachromasia) cytoplasmic granules, occasionally in high amount, amongst the basal and squamous cells; intraepithelial eosinophils (IEEs) in the same location of GLs but also forming isolated infiltrates in the stratum corneum; and an increase in the number of Langerhans cells (LCs), characterized by dark elongated nuclei surrounded by a clear space, located preferentially in the squamous cell layer (Fig. 3b-d). These inflammatory cells were not found in the samples from the control, non-parasitized animals.

The lamina propria of the parasitized papillae showed a moderate inflammatory infiltrate. It was formed by lymphocytes, macrophages, eosinophils, plasma cells, GLs and mast cells scattered throughout the connective tissue and predominantly located in the subepithelial areas, around the capillaries and venules that showed hypertrophied (reactive) endothelial cells (Fig. 3a and b). Only in damaged papillae Toluidine blue staining allowed detection of mucosal mast cells intermingled with other cell types in the lamina propria (Fig. 3d). Mast cell granules stained positive also with Alcian blue. GLs were present in lower number in the lamina propria and their granules lacked metachromasia when stained with the Toluidine blue dye and were negative for Alcian blue method. A constant finding in all the parasitized cattle was the presence of lymphocyte aggregates, with follicles formation, within the lamina propria adjacent to the areas of parasite attachment (Fig. 3a).

In two parasitized cattle, small granulomas composed of a central area of necrotic debris, surrounded by numerous eosinophils, macrophages, giant cells, lymphocytes and an external layer of fibrous tissue were observed. They were present in the lamina propria of the dorsal sac and ruminoreticular fold.

Intact trematodes, identified as *C. daubneyi* (Ferreras et al., 2014) were observed attached to the damaged papillae. The pharynx and oesophagus of some observed flukes contained numerous ciliate protozoa with ovoid shape and a large and dense macronucleus, consistent with *Ciliophora*, together with some bacteria and hyaline drops. Similar protozoa were also observed forming rows in the lumen of the forestomachs, chiefly in parasitized animals.

In the reticulum, lesions were similar to those described for the rumen.

The statistical study on association between parasite burden and severity of lesions in each anatomical location is showed in Table 1. The severity of the lesions was directly related to the fluke burden with a variable statistical significance (between p < 0.05 and p < 0.001) depending on the area (Fig. 4). The ventral sac was the forestomach compartment where this correlation was stronger. The ruminal atrium, with the highest parasite burden, showed the greatest degree of inflammation although statistical analysis was not possible, as all the parasitized animals showed flukes on this location.

In addition to the lesions associated with the parasites, other histological changes were found in the rumen and reticulum of these animals. In the 13 cattle showing a darkened ruminal and reticular mucosa and coming from feed lot, lining epithelium was parakeratotic and, in 4 of them, keratinocytes showed ballooning degeneration leading to vesiculation, focal necrosis, ulceration and microabscesses formation in some areas. Amyloidosis, hyalinosis of the vessels walls and cartilaginous metaplastic change were also found each in three adult cows respectively.

3.2.1.1. Abomasum. Mild to moderate superficial abomasitis, characterized by the presence of infiltrates composed of esoinophils, mast cells, lymphocytes, plasma cells and macrophages in the lamina propria between the gastric pits, was observed in 19 cattle (14 parasitized and 5 control). Focally, the gastric glands were ectatic, with numerous IGLs, and contained nematode sections morphologically compatible with *Ostertagia* spp.

3.3. Proximal duodenum

Twenty eight (57%) out of 49 parasitized cattle showed microscopic lesions in the duodenum, including all those



Fig. 2. (a) Rumino-reticular orifice. Only the short conical papillae located between the large ruminal papillae were affected. Parasite burden = 8005 (206 worms recovered from the rumino-reticular orifice). H-E. Bar = 500 µm. (b) Ruminal atrium. Encircling of the ruminal conical papilla by the ventral sucker of the adult parasite. Parasite burden = 20 (20 worms recovered from the ruminal atrium). H-E. Bar = 600 µm. (c) Reticulum. Reticular papilla with narrow stalk and expanded head. Parasite burden = 258 (14 worms recovered from the reticulum). H-E. Bar = 300 µm. (d) High-magnification view of Fig. 2c. Erosive effect of the parasite ventral sucker at the site of attachment. The lamina propria was covered by the basal and corneum layers. H-E. Bar = 100 μ m.

Table 1

Number (and percentage) of infected animals showing mucosal lesions of different severity, and the presence of C. daubneyi in each studied locations.

	Severity of mucosal lesion ^a						
	_	+	++	+++	++++	χ ²	P-value ^b
Orifice							
No parasites	10(90.9)	10(50.0)	4(26.7)	0	0	13.61	**
Parasites	1 (9.1)	10(50.0)	11(73.3)	1(100)	2(100)		
Reticulum							
No parasites	7(77.8)	4(26.7)	2(13.3)	0	0	17.08	**
Parasites	2(22.2)	11(73.3)	13(86.7)	5(100)	5(100)		
Rumino-reticular fold							
No parasites	6(60.0)	3(25.0)	5(29.4)	0	-	8.92	*
Parasites	4(40.0)	9(75.0)	12(70.6)	10(100)	-		
Atrium							
No parasites	0	0	0	0	0	с	с
Parasites	0	9(100)	21(100)	14(100)	5(100)		
Ventral sac							
No parasites	7(70.0)	2(11.1)	0	1(14.3)	0	19.85	***
Parasites	3(30.0)	16(88.9)	13(100)	6(85.7)	1(100)		
Dorsal sac							
No parasites	11(84.6)	16(50.0)	1(25.0)	-	-	6.36	*
Parasites	2(15.4)	16(50.0)	3(75.0)	-	-		

^a -: no lesion; + minimal lesion; ++: mild; +++: moderate; ++++: marked. ^b Probability: ^{*} *P* < 0.05; ^{**} *P* < 0.01; ^{***} *P* < 0.001.

^c No statistical study could be carried out in atrium due to the constant presence of parasites in this anatomical area.



Fig. 3. (a) Rumino-reticular orifice. Mushroom-shaped papilla with hyperkeratosis/acanthosis of the stratified squamous epithelium and the presence of rete pegs. The lamina propria is filled by an inflammatory infiltrate. Parasite burden = 253 (79 worms recovered from the rumino-reticular orifice). H-E. Bar = 300 μ m. (b) High-magnification view of Fig. 3a. Numerous GLs were recruited in the papilla were the parasite was present. Note the presence of abundant subepithelial lymphocytes and eosinophils. H-E. Bar = 50 μ m. (c) Serial section of the same rumino-reticular orifice sample of Fig. 3a. GLs contain granules that stained positive for PAS. PAS stain. Bar = 20 μ m. (d) Serial section of the same rumino-reticular orifice sample of Fig. 3a. The cytoplasmic granules of GLs were negative (no metachromatic) for Toluidine blue stain (arrowheads) in contrast to those of subepithelial mast cells (arrows). Toluidine blue stain. Bar = 20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that had gross changes. No *C. daubneyi* flukes were detected in the duodenum.

Lesions were only observed in parasitized cattle and consisted of changes in the glands and adjacent connective tissue. The epithelium of the crypts in the lamina propria showed goblet cell hyperplasia and increased number of intraepithelial GLs and IELs. There was diffuse proliferation of the submucosal Brunner's glands where Alcian blue/PASpositive mucins were seen in the secretory cells and in the lumen of ectatic excretory ducts. GLs were common within the glandular epithelium.

Lymphoid aggregates and follicles, isolated or in groups (up to 15), were seen in the mucosal lamina propria and, in some cases, extended to the adjacent submucosa, causing distortion of the Brunner's gland architecture. Besides, numerous plasma cells, eosinophils, GLs, moderate number of mast cells and a smaller number of macrophages (occasionally with granular brown pigment) were observed not only in the lamina propria but also infiltrating the submucosal Brunner's glands.

Duodenal GLs and mast cells showed similar histochemical features that both cell types found in the rumen and reticulum. Ciliate protozoa were identified occasionally in the duodenal lumen.

3.4. Regional lymph nodes

Most of the lymph nodes showed lymphoid hyperplasia together with abundant eosinophils and macrophages in the sinuses and plasma cells in medullary cords. The presence of parasitic granulomas, megakaryocytes, and vessel wall hyalinosis were occasionally observed.

In the rest of the examined organs, no significant lesions or worms were found. Only hyperkeratosis was present in the omasum of those cows with the same change in the rumen and reticulum.

4. Discussion

While there is scarce information on the pathological changes caused by *C. daubneyi* in cattle, this study shows significant gross and histological changes directly associated with the parasitic burden of the affected organs. Paramphistomosis is considered harmless conditions in temperate regions. However, several studies have pointed out natural acute clinical cases chiefly related to the migration along alimentary tract of immature parasites (Toledo et al., 2006; Millar et al., 2012). Such acute lesions were not found in the present study and all studied animals were considered suitable for human consumption, since



Fig. 4. Relationship between parasite burden (log transformed) and severity of mucosal lesions in each digestive compartment.

they showed no clinical or productive alterations despite of high parasitic burden in several individuals. Thus, and similarly to the observations described in Irish cattle (Zintl et al., 2014), no direct correlation could be established between *C. daubneyi* infection and clinical signs of illness.

However, positive correlation between fluke burden and severity of lesions was demonstrated by statistical analysis. Tissue damage and inflammatory reaction were more pronounced in the ruminal atrium, location with the most intense fluke burden and higher number of affected papillae, although, the constant presence of adult trematodes in every parasitized animal made impossible the determination of statistical correlation in this anatomical region. In contrast, in the ruminal dorsal sac lesions were absent or mild and the fluke burden the lowest in all parasitized animals. No adult flukes were either observed in the omasum, in contrast to data provided by experimental challenge of cattle with C. microbotrium, where 10.4% of flukes were recovered from this forestomach (Mavenyengwa et al., 2005). The absence of histological lesions in the omasum suggests that this location was never parasitized or, if so, the burden was very low. In this regard, although no immature flukes were seen in the proximal duodenum, inflammatory infiltration in the lamina propria and submucosa was found at this location. It was characterized by the presence of solitary or associated lymphoid follicles and numerous eosinophils, GLs and mast cells. This organized lymphoid tissue was a constant feature in experimental trematodosis related with the chronicity of infection (Manga-González et al., 2004). It has been demonstrated in experimental paramphistome infections that these lesions persisted even when no flukes can be recovered from the duodenum (Mavenyengwa et al., 2008) and were more consistent at 60 and 80 days postinfection when the parasite was not present (Singh et al., 1984; Mavenyengwa et al., 2005). Therefore, the duodenitis found in some animals of the current study is likely a consequence of acquired the infection in early spring, since the prepatent period of paramphistomosis is between three and five weeks (Brown et al., 2007) and the tissue samples were collected at late spring and early summer. Besides, in some cattle the Brunner's glands were hyperplastic with abundant mucin in the ectatic excretory ducts. Similar changes were described in caprine (Singh et al., 1984), ovine (Rolfe et al., 1994; Mason et al., 2012) and bovine (Mavenyengwa et al., 2005; Millar et al., 2012) paramphistomosis. Brunner's glands are considered to be an optimal environment for fluke growth, and their cystic dilatation suggests previous occupation by the parasites (Mavenyengwa et al., 2005).

Macroscopic lesions could be found in those locations where the parasites were more frequent, like the atrium and ventral sac of the rumen, where focal papillary necrosis, even lack of papillae were found, specially in the most parasitized animal (8005 worms). Similar lesions have been previously described after experimental infection of cattle (Mavenyengwa et al., 2005). Besides these lesions, the anchoring of the parasite caused morphological changes, like narrowing of the base, enlarging of the apex plus acanthosis and hyperkeratosis, of ruminal and reticular papillae affected. The mechanical irritating effect of the ventral sucker was more pronounced in the base of papillae with a variable degree of epithelial atrophy or even ulceration foci. Epithelial thinness in this site has been observed in sheep experimentally infected with *Paramphistomum ichikawai* (Rolfe et al., 1994). It is noteworthy that the direct mechanical irritation due to the ventral sucker of *C. daubneyi* did not to induce fibrosis, a constant finding in hepatic trematodosis (Ferreras et al., 2000; Manga-González et al., 2004).

The inflammatory response to C. daubneyi found in this study was characterized by a mucosal infiltration of lymphocytes, eosinophils, macrophages, GLs and mast cells at the site of parasite attachment in the ruminal and reticular papillae. These cell populations are commonly observed in experimental trematodosis of ruminants, such as fasciolosis or dicrocoeliasis (Ferreras et al., 2000; Pérez et al., 2002; Manga-González et al., 2004; Molina and Skerratt, 2005) and in animals suffering paramphistomiasis (Singh et al., 1984; Rolfe et al., 1994; Mavenyengwa et al., 2005; Mason et al., 2012). The infiltration of eosinophils, mast cells and globule leukocytes, typically associated with helminth infections, could be induced by the superficial antigens in contact with ruminal mucosa but also by a excretion-secretion fraction recently demonstrated to be released by paramphistomes (Anuracpreeda et al., 2013), similarly as described in other trematodosis (Molina and Skerratt, 2005). These cells may have a role in delaying the development of the parasite, decreasing the faecal egg output (Lacroux et al., 2006) and in the resistance to parasite infection (Shakya et al., 2009). In Haemonchus contortus infection mucosal mast cells are also regarded to increase the epithelial permeability and thus facilitate the infiltration of the inflammatory cells. The secretion of cellular products by these cells into the abomasal lumen could promote an abomasal environment unsuitable for parasite survival (Shakya et al., 2009). Although the significance of in vivo eosinophilic infiltration in trematode infections is yet unknown, it has been described how these cells are responsible for in vitro elimination of shistosomules (Butterworth et al., 1975). However, no dead flukes of C. daubnevi surrounded by these cells were observed in the present study, similarly to the observations in previous studies on cattle fasciolosis (Molina and Skerratt, 2005). On the other hand, the high number of GLs found in the duodenal, ruminal and reticular mucosa in the studied cases suggests that they may play an important role in the immune response against C. daubneyi. These cells have been also found in previous descriptions of ovine experimental trematodosis (Ferreras et al., 2000; Manga-González et al., 2004).

GLs and mast cells have been considered two of the major types of effector cells participating in the immune response to parasitic infections (Van Meulder et al., 2013), but their source is still controversial. It has been proposed that GLs might originate from large granular lymphocytes (Konno et al., 1994) or mast cells (Huntley et al., 1984). Recently a highly significant correlation of GLs with mast cells has been observed, identifying GLs as type of activated mast cells (Van Meulder et al., 2013). However, the histochemical properties of these two populations were very different in the present study. While mast cells in the rumen, reticulum and duodenum showed metacromatic

granules under Toluidine blue stain, were positive for Alcian Blue and negative for PAS techniques, GLs showed no metachromasy, were stained by PAS and negative to Alcian blue stains. These findings were in agreement with previous studies (Konno et al., 1994) but are partially (McEntee et al., 1993) or not in accordance with others (Van Meulder et al., 2013).

Additional histological alterations observed in the forestomachs such as parakeratosis, chemical rumenitis, amyloidosis, hyaline degeneration of the vessel walls or cartilaginous metaplasia were not related to the presence of the parasites and are not probably associated with paramphistomosis.

In addition to the morphological changes of papillae and the infiltration of inflammatory cells, infection by C. daubneyi could have other effects. Although no specific studies focused on protozoa counting, the high number of ciliate protozoa found in the histological sections from parasitized cattle, in contrast to control animals, could have been caused by alterations in forestomach environment related to the presence of the trematode. Similar effects have been described in other intestinal parasitosis (Bancroft et al., 2012), and might promote a role as opportunistic pathogens for this ciliate protozoa, as was previously demonstrated in pigs (Brown et al., 2007). It has been reported that both host and P. cervi absorb lipids and fatty acids from the ruminal fluid (Ghosh and Misra, 2011). The route of nutrient uptake is most likely through the tegument of the parasite, although adult trematodes possess some form of gut (Ghosh and Misra, 2011). In our study, the pharynx and oesophagus of some parasites contained cellular debris, bacteria, ciliate protozoa and hyaline drops which are probably captured from the ruminal content by suctorial feeding.

This study confirms that in naturally infected cattle, *C. daubneyi* induces a significant chronic inflammatory reaction both in the reticulum and rumen but also in the proximal duodenum. The mechanical and inflammatory lesions in the rumen and reticulum were restricted to the conical papillae in which the adult flukes were attached. In these papillae, as well as in the duodenal mucosa and submucosa, the lymphoid tissue, frequently as follicles, was constantly seen but eosinophils, GLs, mast cells and macrophages, associated with helminth infections were also observed. Additional studies to characterize this local immune response are needed to further investigate the pathogenesis of the inflammatory response mounted against *C. daubneyi* infection.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León. The authors wish to thank M. P. del Pozo, C. Espiniella, M. L. Carcedo and G. Belver of the *Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE)*, León, (Spain) for technical assistance. They are in deep gratitude to

managing director (J.L. Carracedo) and the veterinary inspectors (B.E. Postigo, B. Prieto, N. Aller) for their kind cooperation during the slaughterhouse sampling. The authors also thank E. Sevillano and A. Sánchez-Pedreira of the Veterinary Unit of León (Territorial Service of the Agriculture and Livestock, *Junta de Castilla y León*) for providing information on cattle farms in the studied area.

References

- Anuracpreeda, P., Poljaroen, J., Chotwiwatthanakun, C., Tinikul, Y., Sobhon, P., 2013. Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion-secretion fraction of *Paramphistomum cervi*. Exp. Parasitol. 133, 327–333.
- Bancroft, A.J., Hayes, K.S., Grencis, R.K., 2012. Life on the edge: the balance between marofauna, microflora and host immunity. Trends Parasitol. 28 (3), 93–98.
- Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K., 2007. Infections and parasitic diseases of the alimentary tract. In: Grant Maxie, M. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, vol. 2, 5th ed. Elsevier Saunders, Edinburgh, pp. 135–279.
- Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A., Sher, A., Rees, P.H., 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. Nature 256 (5520), 727–729.
- Dorny, P., Stoliaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J., 2011. Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. Vet. Parasitol. 175, 293–299.
- Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-González, M.Y., Pérez-Martínez, C., Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A., García-Marín, J.F., 2000. Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health 47 (10), 763–773.
- Ferreras, M.C., González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L., Fernández, M., Manga-González, M.Y., 2014. Paramphistomosis by *Calicophoron daubneyi* in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). Vet. Parasitol. 199, 268–271.
- Foster, A.P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M.P., Twomey, D.F., Millar, M.F., Taylor, M.A., 2008. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. Vet. Rec. 162, 528.
- Ghosh, D., Misra, K.K., 2011. Major lipids and fatty acids in the liver and rumen of the goat (*Capra hircus*) infected with the trematode *Param-phistomum cervi*. J. Helminthol. 85, 246–254.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine parmaphistomosis in Galicia (Spain): prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. Vet. Parasitol. 191, 252–263.
- Huntley, J.F., Newlands, G., Miller, H.R., 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. Parasite Immunol. 6, 371–390.
- Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Sugimura, M., 1994. Perforin-like immunoreactivity in feline globule leukocytes and their distribution. J. Vet. Med. Sci. 56, 1101–1105.
- Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. Vet. Res. 37, 1–16.
- Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., 2004. Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Parasitol. Res. 93, 344–355.
- McEntee, M.F., Horton, S., Blue, J., Meuten, D.J., 1993. Granulated round cell tumor of cats. Vet. Pathol. 30, 195–203.
- Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. Vet. Rec. 170, 343–344.
- Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2005. A macro- and light microscopical study of the pathology of *Calicophoron* microbothrium infection in experimentally infected cattle. Onderstepoort J. Vet. Res. 72, 321–332.
- Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Obwolo, M., Monrad, J., 2008. Bovine intestinal cellular responses following primary and challenge

infections with *Calicophoron microbothrium* metacercariae. Onderstepoort J. Vet. Res. 75, 109–120.

- Millar, M., Colloff, A., Scholes, S., 2012. Disease associated with immature paramphistome infection. Vet. Rec. 171, 509–510.
- Molina, E.C., Skerratt, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. Vet. Parasitol. 131, 157–163.
- Pérez, J., Ortega, T., Morrondo, P., López-Sánchez, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver an hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica* with or without triclabendazole treatment. J. Comp. Pathol. 127, 30–36.
- Rolfe, P.F., Boray, J.C., Collins, G.H., 1994. Pathology of infection with Paramphistomum ichikawai in sheep. Int. J. Parasitol. 24, 995– 1004.
- SAS, 1999. SAS OnlineDoc®, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W., 2009. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to Haemonchus

contortus in naturally infected Gulf Coast Native lambs. Vet. Parasitol. 163, 57–66.

- Singh, R.P., Sahai, B.N., Jha, G.J., 1984. Histopathology of the duodenum and rumen of goats during experimental infections with *Paramphistomum cervi*. Vet. Parasitol. 15, 39–46.
- Toledo, R., Esteban, J.G., Fried, B., 2006. Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. Adv. Parasitol. 63, 285–365.
- Van Meulder, F., Van Coppernolle, S., Borloo, J., Rinaldi, M., Li, R.W., Chiers, K., Van den Broeck, K., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Granule exocytosis of granulysin and granzyme B as a potential key mechanism in vaccine-induced immunity in cattle against the nematode Ostertagia ostertagi. Infect. Immun. 81, 1798–1809, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01298-12.
- Zintl, A., García-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A.L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., Egan, S., Lawlor, A., Negredo, C., Brennan, G., Hanna, R.E., De Waal, T., Mulcahy, G., 2014. Bovine paramphistomes in Ireland. Vet. Parasitol. 204, 199–208.

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Immunohistochemical study and mRNA cytokine profile of the local immune response in cattle naturally infected with *Calicophoron daubneyi*

Miguel Fuertes^a, Yolanda Manga-González^a, Julio Benavides^a, M. Camino González-Lanza^a, Francisco Javier Giráldez^a, Mercedes Mezo^b, Marta González-Warleta^b, Miguel Fernández^a, Javier Regidor-Cerrillo^c, Pablo Castaño^a, Marcos Royo^a, Luis M. Ortega-Mora^c, Valentín Pérez^a, M. Carmen Ferreras^{a,*}

^a Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña CSIC-ULE, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071 León, Spain

^b Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia, Carretera Betanzos-Mesón do Vento, km 7, 15318, Abegondo, A Coruña, Spain

^c SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

A R T I C L E I N F O

Article history: Received 27 July 2015 Received in revised form 22 September 2015 Accepted 9 October 2015

Keywords: Calicophoron daubneyi Local immune response Cytokines Cattle

ABSTRACT

In order to recognize the local immune response of the definitive host to Calicophoron daubneyi natural infection, an immunohistochemical study was carried out in the reticulum and rumen in 49 naturally infected cattle. The role of cytokines (IL-4 and IL-10 interleukins and IFN- γ) in the activation of specific defence mechanisms was evaluated by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) assays to study cytokine mRNA expression. In all infected animals, CD3+ T lymphocytes seemed to be the main element of the inflammatory infiltrate in the reticular and ruminal lamina propria at the point of the parasite adhesion. Intraepithelial globule leukocytes also showed immunolabelling for CD3. Most CD3+ cells also expressed CD4 (T cell helper) antigen although sporadic CD8+-cytotoxic lymphocytes were observed. Local expression of IFN-γ was observed in damaged papillae at the site of parasite attachment and in scattered cells in the lamina propria. B cells (CD79 α cy+, CD45+ and IgG+) were found constantly in relation to lymphoid aggregates. MAC387 was expressed in squamous epithelium and in macrophages of the lamina propria of affected papillae. Macrophages in this location also stained positively for CD163 and CD68. Intraepithelial Langerhans cells and macrophages located in the lamina propria showed immunopositivity for MHCII in the affected areas. RT-qPCR analysis confirmed a statistical significant increase of IFN- γ , and IL-10 expression (p < 0.01) in the rumen associated with the presence of flukes. These findings suggest a predominant Th1 polarized local immune response with the probable involvement of Th regulatory cells in cattle C. daubneyi natural infection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Paramphistomosis is a ruminant digestive parasitosis caused by trematodes of the family Paramphistomidae (Trematoda, Digenea), belonging to different genera (*Paramphistomum*, *Calicophoron* and *Cotylophoron*), which is considered, at present, as an important emerging disease of livestock still highly underestimated (Tandon et al., 2014). In two recent studies, the importance of this infection

* Corresponding author. *E-mail address:* mcfere@unileon.es (M.C. Ferreras).

http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.012 0304-4017/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved. in Spain, where *Calicophoron daubneyi* was the only agent found, has been reported (González-Warleta et al., 2013; Ferreras et al., 2014).

There is a scarcity of information on the immunophenotypical characterization of the inflammatory cells present in the lesions or the local immune responses associated with trematodes infections in the large animal definitive hosts. The majority of these studies have been carried out in *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp. and *Dicrocoelium* spp. infections. Broadly, they have shown that inflammatory cells are composed of a mixed population of B and T lymphocytes, mainly CD4+ and CD8+, together with macrophages, globular leukocytes and IgG+ plasma cells (Ferreras et al., 2000,







2007; Pérez et al., 2002; Molina and Skerrat, 2005; Zafra et al., 2009). None of these studies have evaluated the local expression of cytokines. Concerning paramphistomes, these trematodes were confirmed as the cause of inflammatory lesions in the rumen and reticulum whose severity was directly related to the parasite burden, and characterized morphologically by lymphocytes together with some macrophages and eosinophils (Fuertes et al., 2015). However, the phenotypical characteristics of the inflammatory infiltrates against this trematode or the cytokine genic expression in infected tissues have not been documented to date.

In general, the adaptive immune response of the host to extracellular parasites, such as helminths, involves the development of T helper cells with characteristic T-helper type 2 (Th2) antiinflammatory cytokine profiles (Interleukins 4,5 and 10: IL-4, IL-5, IL-10). In contrast, intracellular parasites induce a T-helper type 1 (Th1) response characterized by production of pro-inflammatory mediators such as IL-12 and Interferon-gamma (IFN- γ). However, certain extracellular helminths (*Trichuris muris*) and intracellular protozoan (*Leishmania major*) parasites are capable to induce both Th1 and Th2 components (Jankovic et al., 2001). In *Fasciola hepatica* infections, it has been observed that infected cattle show an early Th1 type response which may be polarized in chronic infection to that of a Th2 type (Clery et al., 1996).

The main objective of this study is to immunohistochemically investigate the host local cellular immune response in natural infections of cattle with *C. daubneyi*. Moreover, the mRNA expression of



Fig. 1. (a) Rumino-reticular orifice. Conical papilla encircled by fluke ventral sucker showing inflammatory infiltrate composed by CD3+T cells. Parasite burden = 93 (12 worms recovered from the rumino-reticular orifice). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 200 μ m. (b) Reticulum. Cytoplasmatic granules of Globular Leukocytes (GLs) intensely immunostained by pAb CD3 (arrows). Parasite burden = 908 (400 worms recovered from the reticulum). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 200 μ m. (b) Reticulum. Cytoplasmatic granules of Globular Leukocytes (GLs) intensely immunostained by pAb CD3 (arrows). Parasite burden = 908 (400 worms recovered from the reticulum). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 200 μ m. (d) Rumino-reticular fold. Papillar epithelium expressing mAb MAC387 especially in areas in close contact with the tegument of fluke ventral sucker. Sparse immunolabelled macrophages in lamina propria. Parasite burden = 8005 (571 worms recovered from the rumino-reticular fold). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 200 μ m. (e) Rumino-reticular fold. IFN- γ Immunolabeling of intraepithelial lining cells in the papillar areas in close contact with the parasite. Parasite burden = 215 (324 worms recovered from the rumino-reticular fold). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m. (g) Reticulum. Detail of (h. Expression of MHC II expression in dendritic cells in the organized inflammatory infiltrate of the lamina propria. Parasite burden = 908 (400 worms recovered from the rumino-reticular fold). Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m. (g) Reticulum. Detail of (h. Expression of MHC II in Langerthans cells within the lining epithelium. Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m. (g) Reticulum. Detail of (h. Expression of MHC II in Langerthans cells within the lining epithelium. Envision[®] System. Haematoxylin counterstain. Bar = 50 μ m. (g) Reticulum. Detail of (h. Expression of MHC II in

three cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-10), representative of the Th1 and Th2 T cell responses, were evaluated with the aim of understanding their possible role in this parasitosis. The knowledge of the host local immune response against *C. daubneyi* would be of interest to understand the pathogenesis of cattle paramphistomosis.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

This study has been carried out in 49 cattle naturally infected by *C. daubneyi* and 15 healthy animals as controls, all of them slaughtered in an abattoir (Ferreras et al., 2014). The characteristics of the animals and the inflammatory lesions present in these animals were described in detail in previous works (Ferreras et al., 2014; Fuertes et al., 2015).

For each animal, different tissue samples of the reticulum and different anatomical parts of the rumen (at least 12 per animal) were fixed in 10% neutral-buffered formalin and were dehydrated through graded alcohols before being embedded in paraffin wax for histopathological and immunohistochemical studies. Besides, tissue samples of the ruminal atrium of infected and uninfected cattle were snap frozen and stored at -80 °C until used.

In 11 parasitized cattle and 4 uninfected control cattle (without gross or microscopical ruminal lesions) two samples of the ruminal atrium and other two from the ruminal dorsal sac, approximately 5 mm^3 each, were obtained for each animal, placed in RNA*later* (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and stored at -20 °C until they were used for cytokine mRNA expression analysis. No flukes were detected in the ruminal dorsal sac in the 11 parasitized animals.

2.2. Immunohistochemistry

Selected sections from the rumen and reticulum were immunohistochemically labelled with a panel of antibodies. Table 1 lists the primary antibodies and immunostaining protocols used. In all the cases, a polymer-based detection system (EnVision[®] System Labelled Polymer-HRP; Dako, Glostrup, Denmark) was employed and immunolabelling was developed with a solution of 3,3'diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The slides were counterstained with Harris' haematoxylin and mounted in hydrophobic medium. Technique specificity and sensitivity were controlled by omitting of the primary antibody or Envision[®] and using tissue samples of bovine lymph node as positive control for all the primary antibodies.

2.3. Quantification of cytokine mRNA expression levels in the rumen

Total RNA for cytokine expression analysis was extracted from the above mentioned ruminal tissues by a combined method based on the TRIzol Reagent (Life Technologies, Pasley, UK) and Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was carried out using SuperScript[®] VILOTM cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Pasley, UK). Primers used for bovine IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines and the housekeeping gene β -actin were designed using the Primer-3Plus software (Untergasser et al., 2007) and are described in Regidor-Cerrillo et al., (2014). Real-time PCR reactions were performed in 20 ml using Power SYBR[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), 10 pmol of each primer and 5 µl of diluted cDNA samples in an ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The cytokine mRNA level was expressed in fg of cytokine mRNA/mg of tissue. The relative quantification of cytokine mRNA expression levels (x-fold change in expression) was carried out by the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Schmittgen and Livak, 2008).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the aid of SAS package (SAS Institute, 2008). All data were analysed for normality and homogeneity of variances using the Saphiro–Wilk and Levene tests, respectively. Within each anatomical area (atrium and dorsal sac), comparison of IFN- γ , IL-10- and IL-4-citokyne mRNA expression between infected and non-infected animals were performed using the Mann–Whitney *U*-test.

3. Results

3.1. Immunohistochemical findings

In all infected animals, CD3+ T lymphocytes, diffusely scattered or forming lymphoid aggregates, were seen as the principal element of the inflammatory infiltrate in the reticular and ruminal lamina propria mainly at the point where the parasite was attached to conical papillae. Furthermore, labelling of CD3 epitopes revealed grouped cells in the periphery of the lymphoid follicles and few cells inside them (Fig. 1a). Intraepithelial CD3+ lymphocytes (IELs) were observed in suprabasal location. Cytoplasmatic granules of the intraepithelial globule leukocytes (GLs) also stained positively for CD3 (Fig. 1b). Most of CD3+ cells also expressed CD4+ T-helper cells forming mantles around the lymphoid follicles and within the epithelium (Fig. 1c). Sporadic CD8+ cytotoxic T cells were observed surrounding lymphoid follicles. CD79 α cy B lymphocytes were observed constantly scattered in small groups but were also demonstrated in relation to lymphoid aggregates and follicles as well as the IgG+ plasma cells. The CD45 mAb stained groups of lymphocytes located in the lamina propria, in subepithelial location, only in the papillae on which the parasites were attached.

Immunolabelling for the anti-INF- γ mAb was observed in the lining epithelial cells, scattered or forming clusters, at the site of parasite attachment in the base of the affected papillae (Fig. 1e). Sparse IFN- γ + cells, consistent with lymphocytes, were also located in the lamina propria of the rumen and reticulum in relation to damaged conical papillae.

MAC387 mAb was expressed in squamous epithelia and in the macrophages located in the lamina propria of the rumen and reticulum in the areas of parasite attachment (Fig. 1d). Within the epithelium of the affected papillae, epithelial cells showed diffuse cytoplasmic immunoreactivity for this mAb which was more intense in epithelial cells located in the base of the papillae encircled by the parasite ventral sucker. In the lamina propria, positively stained MAC387 macrophages, scattered or in groups, were located in the inflammatory infiltrate. The distribution of CD68 and CD163 positive macrophages was similar. These cells were found scattered in the lamina propria between lymphoid aggregates and follicles at the site of parasite attachment. MHCII expression was detected in dendritic shaped Langerhans cells located within the squamous cell layer of ruminal epithelium, mainly in the conical papillae in which C. daubneyi parasites were attached (Fig. 1g). Numerous MHCII reactive cells with abundant cytoplasm and pale ovoid nuclei compatible with macrophages were also observed intermingled with lymphoid cells in the lamina propria in affected areas (Fig. 1f).

3.2. Cytokine mRNA expression levels in the ruminal tissues

Within the group of parasitized animals, the gene expression levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10 showed a significant increase (p < 0.01) in ruminal atrium samples when they are compared with
Table 1		
Antibodies, specificity	and immunohistochemical	procedure used.

Antibody	Clone	Туре	Marker for	Tissue	Antigen retrieval	Dilution	Source
CD3	_	Rabbit, Policlonal	T cells	Paraffin embedded	Heat and pressure; citrate buffer, pH6	1:100	Dako, Denmark
CD4	CC30	Mouse, Monoclonal	T helper cells	Frozen	None	1:100	Serotec, USA
CD8	CC63	Mouse, Monoclonal	Cytotoxic T cells	Frozen	None	1:50	Serotec, USA
CD79αcy	HM57	Mouse, Monoclonal	B cells	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:100	Dako, Denmark
CD45R	C363.16A	Mouse, Monoclonal	B cells	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:100	South Biotech, USA
IgG	-	Biotinylated antibody	Plasma cells	Paraffin embedded	Trypsin	1:200	Vector Laboratories, USA
Calprotectine	MAC387	Mouse, Monoclonal	Macrophages and activated epithelial cells	Paraffin embedded	Protease XIV	1:100	Dako, Denmark
CD68	KP1	Mouse, Monoclonal	Macrophages	Paraffin embedded	Trypsin	1:50	Dako, Denmark
CD163	EDHu-1	Mouse, Monoclonal	Macrophages	Paraffin embedded	Heat and pressure; citrate buffer, pH6	1:200	BioRad, USA
MHCII	MCA2224	Mouse, Monoclonal	Antigen-presenting Cells	Paraffin embedded	None	1:100	Serotec, USA
IFN-γ	CC330	Mouse, Monoclonal	IFN-γ	Paraffin embedded	Microwave; citrate buffer pH9	1:250	Serotec, USA

those in the dorsal sac, an area free of parasites. In the control, unparasitized cattle, the gene expression of IL-4 and IL-10 was also significantly higher (p < 0.05) in the ruminal atrium than in the dorsal sac. However, no differences were observed for IFN- γ levels in this group.

When comparing parasitized and control cattle, significant increases in the IL-10 and IFN- γ gene expression levels (p < 0.01 and p < 0.05 respectively) were found in the ruminal atrium of the parasitized animals. In the dorsal sac, all three cytokine levels were raised in the infected group but no statistical differences could be established with the unparasitized animals (Fig. 2).

4. Discussion

In this study we have used the same tissue samples to immunohistochemically characterize the cellular inflammatory infiltrates and the cytokine mRNA expression levels in selected ruminal tissues, where lesions associated with natural C. daubneyi infection in cattle were previously evaluated (Fuertes et al., 2015). Phenotypic analysis of the inflammatory cellular infiltrates in the reticular and ruminal mucosa in C. daubneyi naturally infected cattle has shown that they are formed by both T and B lymphocytes. The T cell response was composed predominantly of CD4+ T helper cells, distributed as lymphoid aggregates and follicles in the lamina propria and epithelium (Intraepithelial lymphocytes or IELs) of damaged conical ruminal and reticular papillae. An intense infiltration of T and B lymphocytes in hepatic lesions has also been reported also in other trematodoses like experimental fasciolosis and dicrocoeliosis in ruminants (Pérez et al., 2002; Ferreras et al., 2007; Zafra et al., 2009). These data demonstate that C. daubneyi is also able to trigger a local immune response against flukes and/or their secretion products. The scant amount of CD8+ cells in the present study can be linked to the cytotoxic activity of these cells (Tizard, 2009), that would not be needed in extracellular parasitosis such as C. daubneyi infection.

A remarkable finding was the presence of CD3+ intraepithelial globule leukocytes (GLs) in high amount in some parasitized cattle. This result supports a lymphocytic origin for GLs in cattle in agreement with previous studies in cats (Konno et al., 1994; Roccabianca et al., 2006). The presence of CD79 α cy+ B lymphocytes and IgG plasma cells intermingled with T cells in the ruminal and reticular lamina propria may be indicative of a local humoral immune response against *C. daubneyi* that could be linked with the serum antibody response in natural paramphistome infections (Díaz et al., 2006).

The presence of strong immunoreactivity for the cytosolic protein complex L1 or calprotectin (MAC387+) in the epithelium and in the macrophages within the lamina propria of altered papillae was another noteworthy finding. It is known that the L1 antigen is a calcium binding protein expressed by squamous epithelium of mucous membranes and injured epidermis, but not by normal epidermis and other cells harboured in the skin (Brandtzaeg et al., 1988; Paquet and Piérard, 1999). Besides expression of the MAC387 antigen in the inflamed epidermis is directly associated with cell-mediated activity in the papillary dermis (Kirkham et al., 1990). In the present study modifications of MAC387 labelling in the rumen and reticulum mucosa were observed at the point of fluke attachment in parasitized cattle in comparison to uninfected animals. Rumen and reticulum mucosa are then considered as reactive pointing out squamous cell damage due to this parasitosis.

The MAC387⁺ monocytes/macrophages constitutes as a recently infiltrated cell subpopulation in local inflammatory response so they are considered active inflammation markers (Soulas et al., 2011). The presence of these cells in the inflammatory infiltrate of ruminal and reticular lamina propria in paramphistomosis could be associated to a continuous antigenic stimulus by fluke excretion products or tegumental molecules.

In this study intraepithelial dendritic cells, morphologically compatible with Langerhans cells, as well as macrophages within the lamina propria in lesion sites showed immunolabelling for MHCII antigens. The role of Langerhans cells in the presentation of antigens to T cells through dendritic cell MHCII antigen complex during inflammation and the induction of a Th response is well known (Tizard, 2009) and these results emphasize that *C. daubneyi* infection is able to mount a local immune response triggered by MHCII expression in ruminal antigen presenting cells.

In other trematodoses, an initial proinflammatory reaction mediated by Th1 cytokines, related to the presence of immature flukes, is followed by a Th2 response (Flynn et al., 2010; Chuah et al., 2014). In the present study the local expression of IFN- γ (main Th1 proinflammatory cytokine associated with classical macrophage activation) was detected in infected cattle using immunohistochemistry and qPCR techniques. This result would indicate that *C. daubneyi* infection is able to trigger a cell mediated immune response at the local level, as it has been pointed out in other trematodosis such as fasciolosis in the hepatic lymph nodes (Zafra et al., 2009).

Besides the immunolabelling associated to T cells, in the present study the presence of IFN- γ was observed focally in the epithelial



Fig. 2. Gene expression of IFN-γ, IL-4 and IL-10 in ruminal atrium and dorsal sac of uninfected and infected cattle. Statistical significances amongst animal groups and locations are expressed as *a* (*p* < 0.01) and *b* (*p* < 0.05).

lining cells of those papillae encircled by the parasite ventral sucker. Although IFN- γ is produced mainly by lymphocytes, recently the ability of respiratory epithelial cells to produce IFN- γ after being infected by human parainfluenza virus type 3 has been described (Lewandowska-Polak et al., 2015). This finding would indicate that epithelial cells in areas in contact with the parasite could contribute to the cellular response to trematode antigens or the mechanical damage due to fluke attachment.

Concerning mRNA cytokine level results, our findings showed that IFN- γ and IL-10 mRNA expression was significantly increased (upregulated) in ruminal atrium mucosa of parasitized animals in comparison to the control group and with the ruminal dor-

sal sac levels in parasitized cattle, leading to the conclusion that their expression is directly related to the presence of parasites. In contrast, no significant differences were found concerning the IL-4 mRNA levels in the same locations, although comparatively high amount of this type 2 cytokine were produced in the ruminal atrium of infected cattle. The significant local production of IFN- γ by lymphocytes related to the presence of parasites, may indicate the establishment of a cell-mediated immunity which, however, was ineffective in the elimination of the parasite, as already stated for extracellular parasites (Jankovic et al., 2001).

The simultaneous and constant high gene expression levels of for IL-10 found in this study would indicate that in *C. daubneyi* naturally infected cattle this cytokine probably downregulates or represses the expression of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and protects against the tissular epithelial damage caused by inflammation as it has been suggested (Ouyang et al., 2011; Chuah et al., 2014). The finding that IL-10 regulates both Th1 and Th2 responses at mucosal surfaces has previously been reported in infected mice with *Trichinella spiralis* (Helmby and Grencis, 2003).

Finally, in unparasitized animals both immunomodulating IL-4 and IL-10 cytokine gene expression was upregulated in the ruminal atrium when compared with the dorsal sac. This could be due to a necessary immunomodulation on ruminal mucosa consequence of constant antigenic stimulation by exogenous and endogenous microbiota of ruminal content (Koboziev et al., 2014). This condition is not present in dorsal sac where ruminal content in direct contact with mucosa is composed by gases and flora is scant or absent.

Our results suggest that a regulatory parasite antigen-specific mechanism exists in natural *C. daubneyi* infection in cattle at the local site of attachment of this trematode towards the production of a polarized Th1 immune response, with the involvement of Th regulatory cells, which may be associated with a mixed cell population activity in this infection. The differences in the cytokine responses may be due to the antigen molecules actively secreted by the surface tegument of the adult rumen fluke in direct contact with the host tissues. Further studies are required to understand host defence against these parasites.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grant LE023A10-2 from Junta de Castilla y León. The authors wish to thank Dr. Natalia Elguezabal for her critical review of the final manuscript.

References

- Brandtzaeg, P., Jones, D.B., Flavell, D.J., Fagerhol, M.K., 1988. Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. J. Clin. Pathol. 41, 963–970.
- Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., McManus, D.P., Gobert, G.N., 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. Trends Parasitol. 30, 141–150.
- Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G., 1996. Immune reponses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 62, 71–82.
- Díaz, P., Lomba, C., Pedreira, J., Arias, M., Sánchez.Andrade, R., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Paz-Silva, A., 2006. Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. Vet. Parasitol. 140, 281–288.
- Ferreras, M.C., García-Iglesias, M.J., Manga-González, M.Y., Pérez-Martínez, C., Mizinska, Y., Ramajo, V., González-Lanza, M.C., Escudero, A., García-Marín, J.F.,

2000. Histopathological and immunohistochemical study of lambs experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *Schistosoma bovis*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 763–773.

- Ferreras, M.C., Campo, R., González-Lanza, C., Pérez, V., García-Marín, J.F., Manga-González, M.Y., 2007. Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). Parasitol. Res. 101, 547–555.
- Ferreras, M.C., González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L., Fernández, M., Manga-González, M.Y., 2014. *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). Vet. Parasitol. 199, 268–271.
- Flynn, R.J., Mulcahy, G., Elsheika, H.M., 2010. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: implications for control. Vet. Parasitol. 169, 235–240.
- Fuertes, M., Pérez, V., Benavides, J., González-Lanza, M.C., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, F.J., Fernández, M., Manga-González, M.Y., Ferreras, M.C., 2015. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. Vet. Parasitol. 209, 188–196.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M., 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. Vet. Parasitol. 191, 252–263.
- Helmby, H., Crencis, K., 2003. Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. Eur. J. Immunol. 33, 2382–2390.
- Jankovic, D., Liu, Z., Gause, W.C., 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. Trends Immunol. 22, 450–457.
- Kirkham, N., Peacock, S.J., Jones, D.B., 1990. Monoclonal antibody MAC 387 recognizes a myelomonocytic antigen shared by epithelial cells in inflammatory skin diseases. Br. J. Dermatol. 122, 61–69.
- Koboziev, I., Reinoso-Webb, C., Furr, K.L., Grisham, M.B., 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. Free Radic. Biol. Med. 0, 122–133.
- Konno, A., Hashimoto, Y., Kon, Y., Sugimura, M., 1994. Perforin-like immunoreactivity in feline globule leukocytes and their distribution. J. Vet. Med. Sci. 56, 1101–1105.
- Lewandowska-Polak, A., Brauncajs, M., Paradowska, E., Jarzebska, M., Kurowski, M., Moskwa, S., Lesnikowski, Z.J., Kowalski, M.L., 2015. Human parainfluenza virus type III (HPIV3) induces production of IFNγ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). J. Inflamm. 12, 16.
- Molina, E.C., Skerrat, L.F., 2005. Cellular and humoral responses in liver of cattle and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. Vet. Parasitol. 131, 157–163.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G., 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu. Rev. Immunol. 29, 71–109.
- Paquet, P., Piérard, G.E., 1999. Epidermal calprotectin in drug-induced toxic epidermal necrolysis. J. Cutan. Pathol. 26, 301–305.
- Pérez, J., Ortega, J., Moreno, T., Morrondo, P., López-Sánchez, C., Martínez-Moreno, A., 2002. Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. J. Comp. Pathol. 127, 30–36.
- Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M., González-Warleta, M., 2014. Neospora caninum infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. Vet. Res. 45, 10.
- Roccabianca, P., Vernau, W., Caniatti, M., Moore, P.F., 2006. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukaemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8αα phenotype. Vet. Pathol. 43, 15–28.
- SAS Inst. Inc, 2008. SAS/STAT[®] 9.2. User's guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat. Protoc. 3, 1101–1108.
- Soulas, C., Conerly, C., Kim, W.-K., Burdo, T.H., Alvarez, X., Lackner, A.A., Williams, K.C., 2011. Recently infiltrating MAC+ Monocytes/Macrophages: a third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. Immunol. Infect. Dis. 178, 2121–2135.
- Tandon, V., Roy, B., Shylla, J.A., Ghatani, S., 2014. Amphistomes. In: Toledo, R., Fried, B. (Eds.), Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 766. Springer, New York, pp. 365–392.

Tizard, I., 2009. Veterinary Immunology. Elsevier, Amstedam, 592 pp.

- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35, 71–74.
- Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Écija, R.A., Mendes, R.E., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Pérez, J., 2009. Study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunised with a peptide of the Sm14 antigen. Res. Vet. Sci. 87, 226–232.