

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS SOBRE LA INFECCIÓN POR *Teladorsagia circumcincta* EN OVINOS DE RAZA CHURRA:
CRITERIOS Y MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE ANIMALES RESISTENTES**

**Memoria que presenta la Licenciada Dña. MARÍA MARTÍNEZ
VALLADARES para optar al grado DE DOCTOR POR LA
UNIVERSIDAD DE LEÓN**

Director
FRANCISCO A. ROJO VÁZQUEZ

León, Noviembre 2006



**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El Dr. D. Francisco A. Rojo Vázquez como Director¹ de la Tesis Doctoral titulada **“Estudios sobre la infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovinos de raza Churra: criterios y métodos para la identificación de animales resistentes”** realizada por Dña. María Martínez Valladares en el Departamento de Sanidad Animal, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 2 de Noviembre de 2006.

Fdo. Francisco A. Rojo Vázquez

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Sanidad Animal en su reunión celebrada el día 17 de Noviembre de 2006 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Estudios sobre la infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovinos de raza Churra: criterios y métodos para la identificación de animales resistentes**”, dirigida por D. Francisco A. Rojo Vázquez y elaborada por Dña. María Martínez Valladares.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 17 de Noviembre de 2006.

El Secretario,

Fdo.: Juan Miguel Fregeneda Grande

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Elías Fernando Rodríguez Ferri

*“Jamás se descubriría nada si nos considerásemos
satisfechos con las cosas descubiertas”*

Séneca

Muchas son las personas que en una u otra medida han contribuido a la realización de este trabajo, y a todas ellas, quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En especial a:

A D. Francisco A. Rojo Vázquez, Director de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo ya desde mis comienzos en el departamento como alumna interna y por su dedicación en la ejecución de la misma.

A D. Miguel Cordero del Campillo, por su especial amparo y valiosos consejos desde el inicio de mis estudios de Veterinaria.

A Dña. Natividad Díez Baños y a Dña. M^a del Rosario Hidalgo Argüello por el interés que han mostrado durante la realización del presente trabajo y por su apoyo en los momentos de dificultad; por su amistad.

A D. Juan F. Martín por haberme facilitado mi estancia en el INBIOTEC y en especial a Ramiro por su amistad y entusiasmo; sin él no hubiera sido posible la realización de parte de este trabajo.

A D. Ángel Reglero por su colaboración en el desarrollo de la Tesis Doctoral cuando ha sido necesaria y a Vanesa por su ayuda, apoyo y amistad.

A Telesforo y a Gloria por su incondicional amistad y ayuda en la realización del trabajo así como por sus innumerables consejos y conversaciones durante todos estos años.

A Pili por su gran amistad desde que emprendimos juntas la carrera universitaria y por compartir todos estos años en los cuales nos hemos apoyado mutuamente. Gracias.

A todas aquellas personas con las que he trabajado y me han ofrecido su ayuda y amistad, bien de forma directa o indirecta. Gracias.

A toda mi familia por su paciencia y comprensión así como por los ánimos dados durante este tiempo, a todos mis amigos que han estado ahí escuchándome y a Dani por su especial cariño y apoyo. Gracias a todos.

Índice

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos de la infección por <i>Teladorsagia circumcincta</i>	1
2. Resistencia genética.....	11
2.1. Concepto de resistencia genética a las parasitosis	11
2.2. Modelos para medir la resistencia genética	12
2.2.1. Modelos de laboratorio	12
2.2.2. Marcadores genéticos.....	13
2.2.3. Marcadores fenotípicos	15
2.2.3.1. Excreción fecal de huevos	16
2.2.3.2. Eosinofilia	17
2.2.3.3. Pepsinógeno	19
2.2.3.4. Ganancia de peso	20
2.2.3.5. Inmunoglobulinas	20
2.2.3.6. Otros marcadores fenotípicos	23
2.3. Desarrollo de la resistencia genética a la infección	23
2.3.1. La resistencia genética es adquirida y no innata	24
2.3.2. Relación entre el tamaño y la fecundidad de los adultos	24
2.3.3. Relación entre el tamaño de los parásitos adultos y la carga parasitaria	25
2.3.4. Las ovejas controlan la longitud de los vermes adultos	26
2.3.5. IgA como mecanismo regulador de la longitud de los adultos	26
3. Mecanismos de la mucosa gastrointestinal frente a los nematodos.....	27
3.1. Mecanismos inmunológicos.....	28
3.1.1. Linfocitos T y su papel en la protección	28
3.1.2. Respuesta de las citocinas	29
3.1.3. Inmunoglobulinas.....	31
3.1.3.1. IgA	31
3.1.3.2. IgG.....	32
3.1.3.3. IgE	33

3.1.4. Eosinófilos.....	34
3.1.5. Mastocitos	35
3.2. Secreciones y motilidad gástrica.....	36
4. Factores que influyen sobre la respuesta inmune	37
4.1. Edad	37
4.2. Peso corporal.....	38
4.3. Gestación y lactancia	38
4.4. Nutrición	39
4.5. Otros factores	39
4.5.1. Genotipo	39
4.5.2. Estrés	40
4.5.2.1. Destete	40
4.5.2.2. Clima	41
4.5.2.3. Manejo.....	41
4.5.3. Estado sanitario	41
4.5.4. Sexo del animal.....	41
5. Estado nutricional e infección por nematodos gastrointestinales	42
5.1. Efectos de la parasitosis sobre la ingesta y utilización de los nutrientes.....	42
5.1.1. Efectos sobre la ingesta de nutrientes	42
5.1.2. Efectos sobre la digestión y absorción de los nutrientes.....	43
5.1.3. Efectos sobre el metabolismo de las proteínas y de los aminoácidos	44
5.1.4. Efectos sobre el metabolismo de la energía.....	44
5.1.5. Efectos sobre el metabolismo mineral	45
5.2. Nutrición y <i>resilience</i> al parasitismo	45
5.3. Nutrición y resistencia al parasitismo	47
5.3.1. Influencia de la nutrición en los animales jóvenes.....	49
5.3.2. Influencia de la nutrición en los animales adultos	51
5.3.2.1. Influencia de la nutrición durante el parto	51

6. Inmunoprofilaxis.....	53
6.1. Naturaleza de los antígenos vacunales.....	54
6.1.1. Proteínas.....	54
6.1.2. Glucanos.....	54
6.2. Caracterización de antígenos protectores.....	55
6.2.1. Antígenos de la superficie larvaria.....	56
6.2.2. Antígenos de excreción-secreción.....	57
6.2.3. Antígenos del tracto gastrointestinal.....	57
7. Caracterización de la proteína disulfuro isomerasa (PDI).....	58
7.1. Localización.....	59
7.2. Estructura.....	59
7.3. Función.....	61
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	63
CAPÍTULO III. TRABAJOS PUBLICADOS.....	65
1. Genetic resistance to <i>Teladorsagia circumcincta</i> : IgA and parameters at slaughter in Churra sheep.....	65
2. Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to <i>Teladorsagia circumcincta</i>	71
3. Expression of the recombinant protein disulfide isomerase of <i>Teladorsagia circumcincta</i>	79
4. Use of a 203 α fragment of Tc-PDI to detect IgA activity during infection by <i>Teladorsagia circumcincta</i> in sheep.....	89
CAPÍTULO IV. RESUMEN GENERAL.....	105
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	111
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....	113

Introducción General

Los tricostrongídeos que viven en el tracto gastrointestinal son los parásitos más frecuentes en los rumiantes en pastoreo de todo el mundo. Su distribución es mundial encontrándose principalmente en zonas húmedas y templadas llegando su prevalencia a alcanzar valores cercanos al 100%, como ocurre en algunas áreas de nuestra región en el ganado ovino. Las razones de su estudio se deben a su repercusión económica ya que se trata de infecciones de curso crónico que producen importantes trastornos digestivos y, como consecuencia, retraso del crecimiento y pérdidas de las producciones animales.

Entre los tricostrongídeos, las especies más frecuentes son *Teladorsagia circumcincta* en los ovinos y caprinos y *Ostertagi ostertagi* en los bovinos. Normalmente las infecciones son mixtas e intervienen también otras especies de los géneros *Trichostrongylus*, *Haemonchus* y *Cooperia*, entre otros.

Debido a sus repercusiones, las medidas rutinarias de control consisten en la administración de fármacos antihelmínticos. Sin embargo, a consecuencia del uso indiscriminado y a la inadecuada dosificación de los mismos, se han desarrollado resistencias antihelmínticas que impiden una correcta desparasitación. A ese problema hay que añadir la ausencia de vacunas eficaces para el control por lo que se están estudiando otras medidas de control, como la selección de animales resistentes a la infección (Gray, 1997).

1. Aspectos de la infección por *Teladorsagia circumcincta*

T. circumcincta se localiza en el abomaso de los pequeños rumiantes domésticos (ovino y caprino) aunque también puede parasitar a ciervos, llamas, muflones, antílopes, etc (Anderson, 1992).

El tamaño de los adultos varía entre ambos sexos, siendo el de las hembras entre 8 y 12 mm y el de los machos entre 6,5 y 9 mm. Los huevos miden entre 80-110 x 40-50 μm , tienen forma elíptica con los polos simétricos no muy anchos y más de 16 blastómeros muy pequeños.

En los bovinos la especie predominante es *Ostertagia ostertagi* (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999). Ambos géneros se diferencian en que los machos de *Teladorsagia* spp presentan espículas cortas, con dos ramas afiladas, y las de *Ostertagia* spp además de ser cortas, de igual longitud, acaban en dos o tres procesos ganchudos o afilados (Durette-Desset, 1982).

El ciclo biológico de *T. circumcincta* es directo, con dos fases: una exógena de vida libre; y otra endógena de vida parasitaria.

La fase de vida libre comienza cuando los animales parasitados eliminan con las heces los huevos del parásito. El número de huevos eliminados depende de distintas condiciones del hospedador y de la prolificidad de la especie; *T. circumcincta* tiene una prolificidad media con una eliminación de 100-200 huevos/día. En presencia de oxígeno y durante un periodo medio de un día, según la temperatura, se desarrolla en el interior del huevo una larva I (LI) que tiene esófago rabadiforme y mide alrededor de 300-450 µm. Al eclosionar el huevo ésta sale a la masa de heces donde se alimenta de bacterias y otros microorganismos para mudar tras 24 horas a larva II (LII), de unos 800 µm y posteriormente, a los 5-6 días muda de nuevo y se transforma en larva III (LIII). La LIII es la fase infectante y mantiene la cutícula del estadio anterior por lo que es muy resistente en el medio ambiente. En condiciones óptimas de temperatura y humedad (22-25 °C y 65-70 %) la LIII se desarrolla entre 5-14 días. Una vez desarrollada, emigra desde la materia fecal hacia la hierba. No se alimenta y sobrevive hasta que agota sus reservas si antes no ha sido ingerida por el hospedador.

A continuación, comienza la fase endógena del ciclo. Cuando las larvas llegan al rumen liberan la cutícula que las envuelve gracias a la acción de un líquido de “muda” segregado por ellas mismas como consecuencia a estímulos del hospedador. Las larvas desenvainadas llegan al abomaso entre el 2º y 5º día post-infección, penetran en la mucosa gástrica y se sitúan en la zona antropilórica, en la base de las glándulas gástricas. En esta localización mudan a larva IV (LIV) entre el 2º y el 8º día post-infección y unos días más tarde (6º - 10º) emergen a la luz gástrica y vuelven a mudar a larvas V (LV) o preadultos, que maduran sexualmente y se transforman en adultos.

Tras la cópula de los adultos, las hembras comienzan a eliminar huevos entre los días 16° y 21° de la infección. En consecuencia, el periodo de prepatencia es de unos 17 días para *Teladorsagia* spp. (Denham, 1969).

Ocasionalmente, el ciclo se detiene en la fase de LIV debido a que las condiciones en el interior del hospedador son extremas para el desarrollo del ciclo biológico del parásito. Este fenómeno se denomina hipobiosis o inhibición larvaria, puede durar cuatro o cinco meses y se asocia a un aumento de la resistencia del hospedador hacia el nematodo. Depende de varios factores como los cambios estacionales, la densidad de población parasitaria en el hospedador o la cepa de nematodo infectante (Balic y col. 2000). La desinhibición larvaria de forma sincrónica en los hospedadores tiene gran importancia epizootiológica ya que se excretan numerosos huevos al exterior contribuyendo a la contaminación del medio en un momento en el que suele haber una población de hospedadores jóvenes y susceptibles. En consecuencia, tiene lugar una elevada contaminación de los pastos que si tiene lugar con un momento favorable para el desarrollo de LIII da lugar a nuevas reinfecciones en los animales (Armour y Duncan, 1987). Este aumento de huevos en el pasto suele coincidir con la primavera y a su vez con la época de partos.

El modelo estacional de contaminación del pasto puede explicarse teniendo en cuenta la concentración de larvas infectantes en la hierba; ésta depende de la velocidad de migración de las LIII desde las heces al pasto, de su longevidad y de la velocidad de crecimiento de la hierba. Cuando la humedad es elevada, aumenta la migración larvaria desde las heces a la hierba lo que unido a un menor crecimiento de la hierba hace que la contaminación del pasto sea mayor en otoño-invierno que en el resto del año. Debido a ello durante esta estación hay un incremento en el número de huevos excretados con las heces. La existencia de condiciones óptimas de temperatura y humedad a finales de primavera e inicios de verano favorece el desarrollo larvario aumentando la cantidad de LIII en los pastos. Al final del invierno, la concentración de larvas en el pasto desciende debido a que las condiciones ambientales son desfavorables además de que se reinicia el crecimiento de la hierba (Miró Corrales, 1990).

Las condiciones ambientales, especialmente la temperatura y las precipitaciones, influyen sobre el desarrollo larvario de las distintas especies de nematodos gastrointestinales, de modo que al aplicar los rangos de tolerancia de cada especie podremos conocer los meses en los que, por ser adecuadas las condiciones climáticas para el desarrollo de los estadios de vida libre, existe riesgo potencial de infección de los animales (Mezo Menéndez y col., 1997).

Tras la infección del hospedador se producen alteraciones en las glándulas gástricas debido a que las larvas penetran en el interior de las mismas dando lugar a una dilatación de la mucosa. Debido al daño físico producido, las células de la glándula dañadas se sustituyen por células indiferenciadas, de forma cilíndrica y de secreción mucosa. En este momento inicial de la infección las glándulas adyacentes presentan una fisiología normal.

Cuando las larvas emergen de la mucosa entre los días 17° y 21° post-infección comienzan a dañarse las glándulas adyacentes a las parasitadas que se cubren de nuevas células indiferenciadas. La consecuencia que tiene lugar al salir la larva a la luz gástrica es la lisis de las células de la glándula provocándose hiperplasia de la mucosa, edema submucoso y aumento de las células plasmáticas. A partir del día 35° de la infección comienza a regenerarse la mucosa hasta la total recuperación hacia el día 63°-70° post-infección. La lesión observable es un nódulo circular abultado de 2-3 mm de diámetro que presenta un orificio central debido a la migración larvaria (Meana Mañes, 1990; Armour y col., 1966).

Las consecuencias fisiológicas del proceso son las siguientes:

✓ Alteración de la integridad de la mucosa que da lugar a un aumento de la permeabilidad de la misma y a una disfunción de las glándulas gástricas (Anderson y col., 1988). La mucosa gástrica actúa como una barrera que limita el tránsito de moléculas y macromoléculas de un lado a otro por lo que al estar dañada pierde esa función dando lugar a una serie de procesos tales como:

- Aumento en la diferencia del potencial transmural: aumentan las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} y disminuyen las de Cl^- y K^+ . Como consecuencia se aumenta la concentración de iones HCO_3^- produciéndose un aumento del pH abomasal.

- Aumento del pH del abomaso: es el resultado de una disminución en la funcionalidad de las células parietales más que la consecuencia de un factor, de origen larvario, que inhibe la secreción de ClH. Al haber un aumento en el pH la digestión proteolítica de los nutrientes se ve disminuida al no pasar el pepsinógeno a pepsina que los degrada.

- Aumento de la síntesis y/o liberación de gastrina: puede llegar a aumentar entre cinco y veinte veces en las infecciones por *T. circumcincta*. La causa de este efecto no está muy clara ya que el aumento del pH parece ser un importante estímulo de la hipergastrinemia pero no es el único (Fox, 1997). No está comprobado que pueda ser causa de una estimulación de las glándulas secretoras de gastrina por parte del parásito (McKellar, 1993). Algunos autores han demostrado que el aumento en la síntesis del péptido coincide con el aumento de la expresión del gen de la gastrina y no con un cambio en el número de células secretoras de gastrina (Fox, 1997; Purewall y col., 1997). Las consecuencias de una hipergastrinemia son una mayor contractilidad del cuajar y del peristaltismo intestinal.

- Pérdida proteínas plasmáticas: aparición de hipoproteinemia con marcado descenso de la albúmina. No se sabe bien si se debe a una disociación entre las uniones intercelulares de la mucosa gástrica, a un aumento de la permeabilidad en la misma o a una distensión entre los espacios intercelulares.

- Aumento del pepsinógeno plasmático: originalmente se pensó que era el resultado conjunto del aumento del pH gástrico, de la acumulación de pepsinógeno en las glándulas gástricas y de un aumento en la permeabilidad de la mucosa (Murray y col., 1970). Sin embargo, trabajos más recientes sugieren que pueden actuar otros factores como la estimulación directa de las glándulas zimógenas productoras del pepsinógeno por parte de los parásitos o indirectamente mediante el

aumento de otras hormonas como la gastrina que puedan influir sobre el aumento del pepsinógeno (McKellar, 1993).

✓ Disminución voluntaria de la ingesta de alimentos: según algunos estudios podría estar causada por el aumento de la gastrina (Holmes, 1985; Fox, 1993). En un capítulo sobre la nutrición se abordará ampliamente este tema.

✓ Alteraciones en la motilidad y en el tránsito gastrointestinal: se deben, en primer lugar a alteraciones en los niveles de hormonas gástricas como la gastrina (Gregory, 1985) y, en segundo lugar, a la disminución en la ingesta de alimentos que es otra consecuencia del estado de infección de los animales.

✓ Alteraciones en la absorción y en el metabolismo de los nutrientes (Fox, 1993):

- Metabolismo proteico: hay un aumento en la eliminación de nitrógeno por la orina y en heces. La disminución de la digestibilidad puede alcanzar, en algunos casos, valores hasta del 30%. En consecuencia aparece un menor crecimiento y una menor producción del animal.

- Metabolismo energético: por una parte se produce disminución de la ingesta de alimentos y por otra una menor utilización de los nutrientes. Debido a ello aparece un aumento de los cuerpos cetónicos en sangre que van a predisponer a la aparición de una toxemia de gestación.

- Metabolismo mineral: debido a alteraciones en el metabolismo proteico y energético se ven alterados el metabolismo del calcio y del fósforo pudiendo incluso llegar a desmineralizaciones o modificaciones durante la osificación.

Los signos clínicos durante la infección por *T. circumcincta* dependen de la edad del animal, del estado nutritivo, del estado inmunitario y del grado de infección. Los más frecuentes son la inapetencia, el mal estado general, la pérdida de productividad y

sobre todo, la diarrea (Bueno y col., 1982). Como consecuencia aparece anorexia, muy común en todas las infecciones por nematodos gastrointestinales. Están también alterados valores de la composición sanguínea produciéndose hipoproteinemia e hipoalbuminemia (Dargie, 1975). En las primoinfecciones la pérdida de proteínas plasmáticas se debe a cambios físicos en la mucosa gástrica, con disociación de las uniones intercelulares de las células epiteliales y áreas de destrucción celular. Sin embargo, en animales que han estado parasitados previamente, la pérdida se encuentra relacionada con un aumento de la permeabilidad de la mucosa debido a una reacción inmunitaria a las larvas (Cordero del Campillo y col., 1999). También pueden alterarse la concentración de minerales tales como el calcio o el fósforo.

Existen dos formas clínicas de la enfermedad: aguda y crónica. La forma aguda es más frecuente en animales jóvenes; los corderos presentan diarrea, deshidratación, pérdida de peso e incluso anemia. Es característica la imagen de los corderos con el tercio posterior manchado. La forma crónica se presenta sobre todo en los animales adultos y se caracteriza por emaciación, pérdida del apetito, adelgazamiento y atrofia de la musculatura esquelética (Meana Mañes y col., 1993).

Aparecen lesiones inespecíficas debido a la diarrea, deshidratación y anemia que se presentan en todos los animales parasitados. La lesión característica de la ostertagiosis es la hiperplasia de la mucosa gástrica acompañada de nódulos de 2-3 mm de diámetro con un orificio central debido a la salida de la larva. En infecciones naturales la mucosa gástrica se encuentra alterada tanto en la región pilórica como en la fúndica. La mucosa se encuentra engrosada y granulosa con los bordes de los pliegues gástricos algo enrojecidos y en algunas ocasiones con la presencia de úlceras. Los ganglios linfáticos regionales están aumentados de tamaño.

Microscópicamente aparecen un gran número de células inflamatorias, principalmente granulocitos. La presencia de eosinófilos solamente tiene lugar cuando se trata de lesiones pronunciadas (Scott y col., 2000). Aparece un incremento de la longitud de las glándulas fúndicas debido a la hiperplasia de la mucosa y al descenso en

el número de las células parietales. La hiperplasia de la mucosa se debe a la presencia de edema intersticial que se extiende hasta la submucosa (Scott y col., 1998).

En cuanto al diagnóstico de la infección, en primer lugar hay que tener en cuenta los datos epidemiológicos obtenidos tras una correcta anamnesis. El diagnóstico clínico es difícil ya que los animales parasitados no presentan signos patognomónicos y además la enfermedad suele tener un curso subclínico.

El diagnóstico de laboratorio es necesario para confirmar la infección; sin embargo, una prueba por sí sola no tiene un valor determinante sino que hay que englobarla dentro de otras pruebas. Entre las técnicas rutinarias están los análisis coprológicos como la determinación del número de huevos excretados por gramo de heces mediante la técnica McMaster (MAFF, 1986) o la identificación de los géneros mediante la realización de coprocultivos (Gevrey, 1971). Para la identificación de la especie existe un método alternativo para diferenciar los huevos eliminados como es la utilización de sondas de ADN específico para los géneros económicamente más importantes (Christensen y col., 1994). El problema de estas pruebas es que tienen escaso valor individual, pero son válidas para el diagnóstico de la infección en el rebaño. También se utilizan técnicas complementarias como la determinación del pepsinógeno en suero o la valoración del título de inmunoglobulinas presentes en los animales parasitados.

Por otra parte, el estudio *post-mortem* permite la observación de las lesiones así como el conocimiento real de la carga parasitaria. Para cuantificar la infección se sigue la técnica descrita en el MAFF (1986) de recuperación y recuento de vermes adultos. Una vez eliminado el contenido gastrointestinal, se limpia la mucosa para la obtención de las fases inmaduras y las larvas inhibidas (Gasbarre, 1987).

El diagnóstico diferencial ha de realizarse con otros procesos parasitarios, infecciosos y nutricionales que presenten los mismos signos clínicos que los que se encuentran en las infecciones por nematodos gastrointestinales.

El control y la profilaxis deben tener en cuenta las particularidades indicadas anteriormente. Es necesario definir el objetivo del tratamiento y escoger el momento más idóneo para realizarlo así como combinarlo con unas prácticas de manejo determinadas para cada zona. También es importante calcular bien la dosis del fármaco que se administra para que no existan animales subdosificados y así evitar el desarrollo de resistencias antihelmínticas. Los antihelmínticos más utilizados son los siguientes:

✓ Bencimidazoles y probenzimidazoles: se administran por vía oral y a las 2-3 horas alcanzan los valores plasmáticos máximos. Los más utilizados son: albendazol, oxibendazol, mebendazol, oxfendazol, fenbendazol, flubendazol y cambendazol. Como probencimidazol se encuentra el netobimin que se puede administrar por vía oral o subcutánea y tiene una eficacia del 98-100 % frente a vermes adultos, estadios larvarios y larvas inhibidas además de ser ovicida y larvicida. Actúan principalmente inhibiendo la polimerización de la tubulina impidiendo la formación de microtúbulos de las células intestinales del nematodo (Lacey, 1990).

✓ Imidazotiazoles: el tetramisol y el levamisol son muy eficaces frente a las formas adultas pero no tanto frente a estadios larvarios. Presentan periodos de supresión de dos y siete días para leche y carne, respectivamente. Ambos actúan como agonistas colinérgicos provocando parálisis espástica y contracción muscular del parásito (Díez Baños y col., 1997).

✓ Lactonas macrocíclicas: la ivermectina y la doramectina se administran por vía oral o parenteral con una eficacia del 95-100 % frente adultos, estadios larvarios y larvas inhibidas. Tienen la ventaja de que también actúan frente a ectoparásitos. Como inconveniente se encuentra el largo periodo de supresión en carne (21 días) y que no se pueden administrar en ganado lechero. Su modo de acción se basa en la liberación de una sustancia inhibidora del ácido γ -amino butírico (GABA), que es un neurotransmisor del sistema nervioso de los nematodos interrumpiéndose los impulsos nerviosos o bien, según otros autores, aumentando la permeabilidad celular para los iones cloro (Conder y col., 1995).

✓ Organofosforados: tienen una alta eficacia pero presentan una elevada toxicidad por lo que están en desuso.

El uso masivo de ciertos antihelmínticos ha dado lugar a la aparición de cepas de tricostrongídeos resistentes a ciertos antihelmínticos (Jackson y col., 1992). La administración frecuente, el uso repetido de un fármaco o de un grupo antihelmíntico y la subdosificación de los animales son factores que han favorecido la aparición de resistencias donde el fármaco comienza a presentar una eficacia menor al 95%.

El control de las tricostrongilidosis mediante técnicas de pastoreo depende de la especificidad del hospedador, la resistencia adquirida y el empleo de pastos poco contaminados. Se intenta limitar al máximo el contacto entre hospedador y parásito, utilizando técnicas de pastoreo que se basan en la utilización de pastos libres de contaminación, técnicas de pastoreo mixto y alternante o pastoreo separando animales jóvenes y adultos. La prevención de la contaminación de los pastos se basa en la introducción de animales jóvenes en pastos libres de parásitos y en el traslado de los animales jóvenes a otras parcelas antes de que se infecten. Cuando se trata de animales que ya han pastado con anterioridad, la medida más recomendable es la administración de antihelmínticos en forma de bolos intrarruminales de liberación lenta o el tratamiento antiparasitario de los animales antes de la entrada a los pastos y antes del parto (McKellar, 1988).

Sistemáticamente se ha utilizado como medida de control de la tricostrongilidosis la administración de antihelmínticos a todos los animales del rebaño. Como se ha indicado anteriormente, el uso indiscriminado, el tratamiento repetido con un mismo fármaco y la subdosificación, han favorecido el desarrollo y la aparición de cepas de nematodos resistentes a un determinado antihelmíntico. Factores genéticos de la cepa parasitaria parecen también estar implicados. En respuesta a dicho problema el estudio de la selección de animales resistentes a una determinada infección aparece como una alternativa al control de las infecciones por nematodos gastrointestinales.

2. Resistencia genética

El estudio e interés por la resistencia genética de los animales a ciertas especies de nematodos gastrointestinales se debe, entre otras razones, al aumento de la prevalencia de resistencias a los fármacos antihelmínticos y a la ausencia de vacunas eficaces frente a dichos parásitos. La selección de animales genéticamente resistentes a la infección es una nueva forma de control de las parasitosis. El éxito de la selección de individuos resistentes depende de la variabilidad del carácter que se quiere seleccionar, de la heredabilidad del mismo, de la intensidad de selección, del intervalo generacional así como del número de crías que presenta cada especie animal (Kloosterman y col., 1992).

2.1. Concepto de resistencia genética a las parasitosis

La resistencia genética a la infección por nematodos gastrointestinales se podría definir como la capacidad de un hospedador a presentar el menor número posible de parásitos y se mediría indirectamente mediante el número de huevos excretados por gramo de heces (Gray, 1997). Un animal es considerado genéticamente resistente a una infección cuando, una vez que el parásito penetra dentro del hospedador, el parásito:

- ✓ no es capaz de establecerse en el animal,
- ✓ se asienta en el animal, se produce la infección pero el parásito no es capaz de completar el ciclo biológico dentro del hospedador,
- ✓ se asienta, se produce la infección y el hospedador o bien controla la infección o elimina al parásito.

En el primer caso, la resistencia tiene una base fisiológica ya que el hospedador no presenta un ambiente propicio para el establecimiento del parásito. Este tipo de resistencia se denomina natural o no específica. La resistencia que se desarrolla para controlar las infecciones se denomina adquirida y depende totalmente de la respuesta inmune del hospedador. El sistema inmune se desarrolla, en origen, como respuesta a antígenos específicos del parásito e implica mecanismos inmunológicos tales como

anticuerpos, linfocitos T y respuesta inflamatoria inmunomediada (Stear MJ y Wakelin, 1998). Según esto un hospedador es susceptible cuando no cumple los requerimientos anteriores y en él si que se establece la infección.

Actualmente se ha acuñado un nuevo término que amplía el concepto de resistencia y se denomina “resilience” (elasticidad, capacidad de recuperación). Riffkin y Dobson (1979) lo describieron como la capacidad para soportar los efectos patógenos producidos por la infección de nematodos gastrointestinales. Sin embargo, los efectos patógenos son numerosos y amplios y pueden definirse como un descenso en el crecimiento, presencia de diarrea, anemia o incluso la muerte según el grado de infección y de la especie predominante que parasite al individuo. En teoría, la capacidad de las ovejas para soportar la infección podría medirse con otra serie de parámetros y con este fin Albers y col. (1984) modificaron el concepto de “resilience” sugiriendo como definición la capacidad de un animal para mantener su nivel productivo durante la infección.

2.2. Modelos para medir la resistencia genética

2.2.1. Modelos de laboratorio

El hospedador más ampliamente utilizado como animal de laboratorio para reproducir las infecciones producidas por los nematodos gastrointestinales ha sido el ratón. Las especies de parásitos que se han utilizado para infectar los ratones han sido *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*) y *Triquinella spiralis*. La primera de las especies es probablemente el modelo más realista para el estudio de los nematodos gastrointestinales en ovejas y vacas, por las siguientes razones:

- ✓ el ciclo biológico es similar al de los nematodos gastrointestinales en rumiantes
- ✓ las primoinfecciones son de curso crónico
- ✓ las lesiones que produce *H. polygyrus* son similares a las debidas a los nematodos gastrointestinales exceptuando la hiperplasia de la mucosa gástrica

✓ la inmunidad que desarrolla el hospedador infectado con *H. polygyrus* es tanto humoral como celular (Kloosterman y col., 1992).

En estos modelos, la resistencia se cuantifica midiendo la carga parasitaria presente en el hospedador tras varias infecciones así como la fecundidad de las hembras adultas, expresada ésta como el número de huevos *in utero* por hembra (Stear y Wakelin, 1998).

2.2.2. Marcadores genéticos

Con el fin de aislar e identificar marcadores genéticos relacionados con genes que intervienen en la resistencia a las enfermedades, se han desarrollado técnicas de genética molecular. La identificación de genes que regulan la resistencia genética permitiría conocer los mecanismos de defensa de los hospedadores frente a las parasitosis y además aceleraría el desarrollo de nuevas vacunas.

Se cree que los genes implicados en la resistencia a los tricostrongídeos en el ganado ovino forman parte del “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (CMH) ya que estos codifican para proteínas que intervienen en la presentación del antígeno de los linfocitos T (Schwaiger y col., 1995). Sin embargo, aunque un tercio o la mitad de la variación genética se atribuyen al CMH sólo el 11% de la variación fenotípica se debe a éste (Stear y col., 1996). Esto significa la presencia de otros genes, aún sin identificar, que regulan la resistencia genética y que no forman parte del CMH.

Los genes del CMH se expresan como glucoproteínas de membrana y se pueden dividir en tres clases: clase I, que codifican para proteínas presentes en la superficie de la mayoría de las células nucleadas; clase II, que codifican para proteínas presentes en la superficie de linfocitos y macrófagos; y clase III, que codifican para una variedad de moléculas involucradas en la respuesta inmune (Tizard, 1984). Los polimorfismos de la clase I y II han sido estudiados en el ganado ovino por su relación con la resistencia a los nematodos gastrointestinales. Según estudios realizados con modelos de laboratorio, los genes de la clase II están más implicados en la resistencia que los de la clase I; sin

embargo, ensayos posteriores realizados en rumiantes contraponen esta teoría dando una mayor importancia a los de la clase I (Kloosterman y col., 1992).

En el ganado ovino, el CMH se encuentra localizado en el cromosoma 20 (Mahdy y col., 1989) y se denomina “Sistema Ovar”. En esta región se han identificado tres *loci* pertenecientes a la clase I del CMH (OLA-A, B, C), dos *loci* incluidos en la clase II del CMH (DR y DQ) y dos *loci* que pertenecen a la clase III del CMH que codifican para proteínas que intervienen en el Sistema Complemento (C2 y C4). Los antígenos procesados por macrófagos o por las células presentadoras de antígeno (APC) son presentados como una pequeña cadena peptídica gracias a moléculas de la clase I que los exponen para los receptores de las células T citotóxicas (Tc) o de la clase III para receptores de las células T helper (Th), implicadas en la estimulación de los linfocitos B y en la producción de anticuerpos (Hohenhaus y Outteridge, 1995).

Se han hallado cuatro marcadores dentro de este cromosoma 20 que podrían relacionarse con la resistencia genética a la infección por nematodos en el ganado ovino: BM1258 y BP34 (Bishop y col., 1994), TGLA387 (Georges y Massey, 1992) y OMHC1 (Groth y Wetherall, 1994). Estudios posteriores llevados a cabo por investigadores alemanes hallaron un nuevo alelo presente dentro del *locus* DRB1 que se relacionaba con una disminución del número de huevos excretados con las heces en 58 veces en ovejas infectadas con *T. circumcincta* (Schwaiger y col., 1995). Posteriormente, Buitkamp y col. (1996) encontraron que algunos alelos de la clase I del CMH y el *locus* DY (clase II) presentaban relación con un descenso de 8 y 218 veces respectivamente en la excreción fecal de huevos de ovejas también infectadas con *T. circumcincta*.

Se ha investigado también la relación entre la resistencia a las infecciones por nematodos con el interferón gamma ya que se trata de una citoquina que afecta a la respuesta inmune frente a la infección parasitaria (Wakelin, 1996). En infecciones naturales se ha confirmado la relación del interferón gamma con la excreción fecal de huevos y el título de IgAs (Coltman y col., 2001).

Benavides y col., (2002) estudiaron como marcador genético un microsatélite denominado CSRD2138 presente en el cromosoma 5 del ganado ovino y relacionado con genes que codifican para las interleucinas 3, 4 y 5. Un alelo del presente microsatélite se le asoció con una reducción del 22% en la excreción de huevos con las heces en ovejas naturalmente infectadas. Más recientemente se han utilizado como marcadores aquellos genes cuya expresión fenotípica da lugar a un cambio cuantitativo y son denominados QTLs. Behnke y col., (2003) identificaron 4 QTL relacionados con la resistencia a *H. polygyrus*; tales QTLs se encuentran relacionados con la capacidad de excreción de huevos por parte del nematodo y con la respuesta inmune del hospedador.

2.2.3. Marcadores fenotípicos

Los marcadores fenotípicos son aquellos que se basan en la medición de la expresión fenotípica de la resistencia genética. Numerosos rasgos pueden ser utilizados para determinar un aumento de la resistencia a la infección. Entre estos se incluyen la excreción fecal de huevos, el aumento de la respuesta inmune, la capacidad de aumento de peso o una combinación de los mismos. Los parámetros que definan la resistencia genética a la infección deben tener una serie de atributos en común. En primer lugar deben ser medidos fácilmente; en segundo lugar deben de ser fiables y repetitivos; y, por último, su análisis ha de poderse automatizar fácilmente. Hay que tener en cuenta que los datos obtenidos de un grupo de individuos de un rebaño han de ser representativos ya que los resultados se extrapolan al resto del mismo (Douch y col., 1996). Además, conocer la repetibilidad de un parámetro es un factor importante ya que ésta se encuentra influenciada por la cantidad de variación genética del parámetro, y por definición los parámetros que no presentan repetibilidad no se encuentran bajo control genético (Falconer, 1981).

Para diseñar un buen programa de selección no solamente es necesario cuantificar la variación fenotípica sino que también es importante determinar la heredabilidad de los parámetros en que se basa la selección para poder conocer el porcentaje que presenta la influencia genética sobre la variación (Woolaston y Baker, 1996). La heredabilidad se define como el ratio de la variación genética aditiva frente al

total de la variación e indica la probabilidad de respuesta a la selección. La variación genética aditiva se trata de la suma de los efectos de todos los genes relevantes. Los factores que afectan a la heredabilidad son la edad del hospedador, el tiempo de exposición a la infección, la precisión de la medición y el número de muestras examinadas (Stear y Wakelin, 1998). Los marcadores fenotípicos más importantes se describen a continuación.

2.2.3.1. Excreción fecal de huevos

La excreción fecal de huevos es el parámetro más ampliamente utilizado para determinar si un animal es resistente o susceptible a la infección. Este parámetro se ve influenciado por varios factores como por el nivel de infección, la composición de las especies parasitarias y por la carga parasitaria; el grado de establecimiento de los parásitos y la fecundidad de las hembras adultas se encuentran afectados por la respuesta inmune del hospedador. Existe otro factor que puede influir sobre la eliminación de huevos con las heces como el estado nutricional del hospedador, incluyendo la cantidad total de nutrientes ingeridos y en particular el porcentaje de proteína en la dieta. La variabilidad de la distribución de los huevos con las heces, el patrón de eliminación a lo largo del día, el tránsito intestinal y la consistencia de las heces influyen también sobre la medición de la excreción de huevos.

La excreción fecal de huevos es el parámetro que mejor expresa el *status* parasitológico del ganado ovino, principalmente en los corderos donde hay una estrecha correlación con la carga parasitaria (Douch y col., 1984). Estudios experimentales se han basado en el número de huevos por gramo de heces (hgh) para seleccionar ovejas con una tasa baja de huevos en Australia. Sin embargo, ensayos llevados a cabo en Nueva Zelanda han demostrado que una selección hacia una menor eliminación de huevos da lugar a una selección hacia una menor ganancia de peso (Bisset y col., 1992).

En relación con la heredabilidad del parámetro hgh hay que destacar que se han encontrado heredabilidades muy similares tanto en infecciones naturales como experimentales. Existen diferencias significativas entre la heredabilidad al destete en

comparación con edades más tardías. Debido a este aumento progresivo se piensa que la resistencia es adquirida y no innata. En un estudio realizado por Stear y Bishop (1999b), se determinó que la heredabilidad en corderos, infectados de forma natural pero predominantemente con *T. circumcincta*, al mes o a los dos meses de edad era 0 y que aumentaba progresivamente hasta 0,33 a los seis meses. En corderos de la raza Merina infectados de forma natural, la heredabilidad osciló entre 0,2 al destete y 0,65 al año de edad (Pollott y col., 2004); en ovejas de raza Rhön, raza local alemana, se encontraron valores entre 0,11 y 0,44 (Gauly y Erhardt, 2001). También se ha determinado la heredabilidad de los hgh en rebaños infectados experimentalmente. De esta forma encontramos valores entre 0,33-0,48 para *Haemonchus contortus* (Winton, 1990; Gruner y col., 2004a) y de 0,47 para *Trichostrongylus colubriformis* (Gruner y col., 2004a).

El problema que presenta la excreción fecal de huevos es que es un parámetro muy variable en comparación con otros. Presenta un coeficiente de variación que a menudo excede el 100% (Woolaston y Baker, 1996) por lo que significa que tiene una repetibilidad moderada (Doligalska y col., 1999).

2.2.3.2. Eosinofilia

La presencia significativa de eosinófilos en la sangre y un aumento de la eosinofilia en la mucosa gástrica (Rothwell, 1989), conjuntamente con un marcado aumento de los niveles de interleucina-5, citoquina Th2 responsable de la diferenciación de los eosinófilos (Korenaga y Tada, 1994), son rasgos identificables en la infección por nematodos gastrointestinales. Los eosinófilos durante las infecciones por nematodos presentan una función citotóxica debido a la liberación de proteínas granulares y por la producción de aniones superóxido (Balic y col., 2000). La eosinofilia periférica ha de considerarse como un marcador de la respuesta inmune del hospedador más que del grado de infección ya que experimentalmente se ha demostrado que animales segregados en resistentes y susceptibles a la infección por *T. colubriformis* presentan diferencias significativas en el título de eosinófilos tras la infección (Dawkins y col., 1989; Buddle y col., 1992).

En un estudio longitudinal realizado por Doligalska y col. (1999) se encontró que los animales con elevadas concentraciones de interleucina-5 presentaban elevados títulos de eosinofilia periférica. Existen estudios acerca de la capacidad de los eosinófilos de mediar en la destrucción de las larvas de los parásitos *in vitro* (Butterworth, 1984; Gransmuller y col., 1987); sin embargo, en los trabajos de campo no se encuentran evidencias tan claras. Los ensayos que se han realizado *in vivo* se han llevado a cabo mediante la administración de suero anti-eosinófilos producido en conejos con el fin de aumentar la susceptibilidad a la infección (Mahmoud y col., 1975; Gleich y col., 1979). Estudios más recientes se realizaron mediante la administración de suero anti-interleucina-5 demostrando de esta forma una reducción en la respuesta inmune mediante un aumento del número de larvas halladas en el hospedador (Korenaga y col., 1991; Rotman y col., 1997); por el contrario en otros ensayos no se ha encontrado tal efecto (Herndon y Kayes, 1992; Rotman y col., 1996).

Los valores medios de eosinofilia periférica se encuentran alrededor de $6,14 \times 10^4$ ml^{-1} , para corderos, y de $21,5 \times 10^4$ ml^{-1} en ovejas adultas (Douch y col., 1996). En un ensayo realizado con ovejas Merinas y donde se seleccionaron los animales en susceptibles, con alta tasa de hgh, y en resistentes, con baja tasa de hgh, se encontraron valores de 10×10^4 ml^{-1} y de 27×10^4 ml^{-1} respectivamente (Rothwell y col., 1993).

La heredabilidad para este parámetro se ha determinado en un rebaño de ovejas de 13 meses de edad infectado experimentalmente con *T. colubriformis* obteniéndose un valor de 0,19 (Douch y col., 1996). Por otra parte Stear y col. (2002) estimaron este dato para corderos de 4 y 5 meses de edad, infectados con *T. circumcincta*, obteniendo valores de 0,48 y 0,47 respectivamente e indicando que la eosinofilia periférica podría ser un buen indicador de la resistencia en ovejas adultas ya que éstas se encuentran continuamente expuestas a la infección.

2.2.3.2. Pepsinógeno

La medición de la concentración del pepsinógeno plasmático ha sido recomendada como indicador de las infecciones producidas por nematodos gástricos en rumiantes desde que la técnica fue aplicada por primera vez por Anderson y col. (1965) y posteriormente por Ritchie y col. (1966) en animales infectados con *O. ostertagi*. El mecanismo por el cual se produce un aumento del pepsinógeno no se conoce exactamente pero se cree que puede deberse a una estimulación directa por parte de los productos parasitarios sobre las células zimógenas (McKellar y col., 1990); además existe un descenso en la conversión del pepsinógeno a pepsina debido a un aumento del pH en la mucosa gástrica tras la infección (Jennings y col., 1966). Al mismo tiempo tiene lugar la alteración de las uniones intercelulares del abomaso, aumentando la permeabilidad del mismo y permitiendo el paso del pepsinógeno acumulado al torrente sanguíneo (Murray, 1969).

La repetibilidad del pepsinógeno plasmático en un ensayo realizado por Stear y col. (1995c) con ovejas infectadas experimentalmente con *T. circumcincta* se ha observado que era del 0,75. Sin embargo, un ensayo posterior realizado en cabras infectadas de forma natural presentó unos valores menores, entre 0,39 y 0,48, según el año en el que se determinó la medición (Hoste y col., 2001).

Según Stear y col. (1995c) los valores del pepsinógeno sérico representaban el 13% de la varianza de la carga parasitaria. Posteriormente, Stear y col. (1999a) analizaron una fuerte asociación entre el pepsinógeno y el tamaño de los adultos de *T. circumcincta* presentes en el hospedador, más que con la carga parasitaria. Murray y col. (1970) explicaron este hecho sugiriendo que los adultos de mayor tamaño causaban mayor daño en la mucosa gástrica, requerían más nutrientes y eliminaban más productos de excreción-secreción al medio que los de menor tamaño con lo cual se produciría un mayor trastorno en la mucosa gástrica.

2.2.3.4. Ganancia de peso

La parasitosis induce una relativa deficiencia proteica que da lugar a unos signos clínicos que serán reducidos si los animales han sido alimentados con una dieta rica en proteínas (Coop y Holmes, 1996). Se piensa que incluso una leve infección por nematodos gastrointestinales induce un descenso de 10 Kg de peso así como un cambio en el ratio de conversión del alimento que se modifica de 10:1 en animales no infectados a 1000:1 en los parasitados (Stear y col., 1999d).

Se ha determinado la heredabilidad de este parámetro en distintos trabajos, estimando un valor de 0,31 durante el crecimiento de corderos de la raza Polish de lana larga, según Bouix y col. (1998) que, por otro lado, es semejante a la citada por Swan y col. (1998) para ovinos Merinos. En un trabajo más reciente también con ovejas Merinas de un año de edad se ha indicado un valor alrededor de 0,23 (Pollott y col., 2004).

En corderos de la raza Scottish Blackface se han observado elevadas correlaciones entre este parámetro y la excreción fecal de huevos (-0,8) (Bishop y col., 1996) así como también en los de la raza Polish de lana larga (-0,6) (Bouix y col. 1998). De este modo la selección hacia una mayor ganancia de peso implica inherentemente una selección hacia un menor hgh. La ganancia diaria de peso en ovejas de la raza Rhön también se ha correlacionado de forma negativa y significativa con los hgh (-0,57) (Gauly y Erhardt, 2001). Sin embargo, otros estudios realizados en la raza Romney no han demostrado asociación alguna entre la ganancia de peso y la excreción fecal de huevos en dos líneas de ovejas seleccionadas según los hgh (Douch y col., 1995a) o bien estos valores han sido muy bajos (-0,14) (Khusro y col., 2004).

2.2.3.5. Inmunoglobulinas

En una primera respuesta inmunológica frente a una infección hay un rápido incremento de los valores de las IgG1 y de las IgM para, posteriormente, aumentar solamente las IgG1; en comparación, tanto las IgG2 como las IgA se mantienen con

valores bajos durante la infección (Douch y col., 1996). El estudio de los niveles de anticuerpos como indicadores de la resistencia genética a los nematodos gastrointestinales se debe a Baker y col. (1991) en líneas de ovejas resistentes y susceptibles a la infección. En las experiencias se determinó la heredabilidad de los niveles de anticuerpos en sangre (0,37-0,56) y la correlación genética de estos con los hgh (-0,88).

La primoinfección con nematodos gastrointestinales da lugar a una protección parcial cuando los animales se reinfectan. Esta respuesta inmune protectora se ha evidenciado en *H. contortus* mediante el aumento en el número de larvas inhibidas, aumento del periodo de prepatencia (Courtney y col., 1985; Gill, 1991; Cuquerella y col., 1994) y descenso del número de hgh (Adams y Beh, 1981; Gamble y Zajac, 1992). En infecciones por *H. contortus* se ha determinado que los valores mayores de inmunoglobulinas en suero sanguíneo se corresponden con los de la inmunoglobulina IgG1 y en menor medida de la IgG2, seguidos de la IgA (Gill y col., 1993). Se ha estimado la heredabilidad de las inmunoglobulinas totales en ovejas infectadas experimentalmente con *H. contortus* encontrándose valores entre 0,13 y 0,3; sin embargo, la heredabilidad para la IgG en el mismo ensayo no difería mucho de 0 (Gauly y col., 2002).

Tanto la IgG1 como la IgM se han utilizado como marcadores de la resistencia genética en infecciones naturales por *T. colubriformis* en corderos, observándose que los animales con títulos altos de estas inmunoglobulinas excretaban menos hgh y, por lo tanto, formaban parte de los animales resistentes a la infección (Bisset y col., 1996b). Ensayos *in vitro* han demostrado que los niveles de la IgG1 y de la IgE en los ganglios linfáticos de ovejas seleccionadas como resistentes son mayores que en las susceptibles a la infección por *H. contortus* (Gill y col., 2000).

Durante infecciones experimentales con nematodos de *T. colubriformis* se han identificado valores elevados de la inmunoglobulina IgE en suero sanguíneo inmediatamente después de la reinfección sugiriendo la implicación de la misma en la protección de los hospedadores (Shaw y col., 1998).

Estudios realizados en ovejas infectadas con *T. circumcincta* han demostrado que la mayor manifestación de la resistencia a la infección se encuentra determinada por la inhibición o el retraso del crecimiento y desarrollo de los nematodos presentes en el hospedador (Stear y col., 1997). Smith y col. (1985) encontraron una elevada correlación entre el título de las IgA y el tamaño de los adultos de *T. circumcincta* presentes en el hospedador. Tales hallazgos han sido confirmados posteriormente por Stear y col. (1995a) de tal modo que sustentan la idea de las IgA como mecanismo de resistencia frente a la infección por *T. circumcincta*. La heredabilidad para la IgA fue determinada por Strain y col. (2002) encontrando un valor de 0,56. La fuerte asociación entre un elevado título de IgA y la presencia de vermes adultos de menor tamaño, conjuntamente con la heredabilidad de la misma, hacen de la IgA un marcador de la susceptibilidad o resistencia a la infección (Stear y col., 1999d).

No obstante, existe una gran variación entre la especificidad de la respuesta a las IgA frente a los nematodos gastrointestinales. Tras la realización de Western Blots se identificaron alrededor de unas 100 bandas diferentes frente antígeno de LIII, LIV y adulto; sin embargo, la variabilidad se encuentra en que no todas las ovejas identificaron todas las bandas y muy pocas bandas fueron identificadas por todas las ovejas (McCrie y col., 1997; Strain y Stear, 1999). Mediante el análisis de la covarianza se determinaron las bandas identificadas por los animales seleccionados como resistentes a la infección y, en menor medida, por los susceptibles. El resultado fue que los animales resistentes no solamente producían un mayor título de IgA sino que también producían anticuerpos más específicos que permitían reconocer antígenos parasitarios. Una explicación genética a esta variación en el reconocimiento de los antígenos sería que los parásitos tienden a evadir la respuesta inmune mediante la producción de antígenos similares a moléculas del hospedador que no pueden ser reconocidos por éste (Stear y col., 1999d). Por consiguiente, tanto la cantidad como la especificidad de la respuesta frente a las IgA son posibles marcadores de la resistencia a la infección.

También se ha demostrado una asociación entre las IgA en la mucosa gástrica y la eosinofilia local en infecciones por *Cooperia oncophora* (Kanobana y col., 2002)

sugiriendo que las IgA son capaces de activar la eosinofilia en la mucosa y no en suero sanguíneo (Motegi y col., 2000).

2.2.3.6. Otros marcadores fenotípicos

Pollott y col. (2004) en un estudio realizado con ovejas Merinas determinaron la posibilidad de incluir como parámetros fenotípicos la cantidad de heces adheridas al tercio posterior del animal (“dag score”) y la consistencia del material adherido (“fecal consistency score”). Para ambos parámetros se han encontrado heredabilidades de 0,11 y 0,12, respectivamente así como una correlación entre ellos de 0,63 lo cual permite que sean considerados como posibles marcadores de la resistencia en ovejas Merinas.

El hematocrito, parámetro a tener en cuenta principalmente en nematodos hematófagos, como *H. contortus*, ha presentado heredabilidades entre 0,19 y 0,26 - según el número de muestras tomadas para su determinación- en ovejas de raza Rhön (Gauly y Erhardt, 2001; Gauly y col., 2002); y entre 0,51 y 0,56 en la raza Merino alemán (“Merinoland”) (Gauly y col., 2002).

2.3. Desarrollo de la resistencia genética a la infección

La resistencia de las ovejas a la infección por *T. circumcincta* depende de varios factores como la edad del hospedador y el tiempo de exposición a la misma. Todos los trabajos realizados sobre la resistencia genética frente a nematodos gastrointestinales se han basado en el retraso del desarrollo del nematodo adulto en el hospedador debido a la influencia de la inmunoglobulina IgA (Stear y col., 1995b; Stear y col., 1997). A continuación se explican algunas de las características de la interacción parásito-hospedador que ayudan a conocer el funcionamiento de la resistencia genética a la infección por *T. circumcincta*.

2.3.1. La resistencia genética es adquirida y no innata

Algunos mecanismos que se ponen en marcha tras la infección son de naturaleza innata, como la respuesta a base de sustancias antimicrobianas que tiene lugar en la mucosa gástrica durante la primera exposición del parásito y que no se vuelve más eficaz en infecciones posteriores. La respuesta adquirida mejora tras exposiciones repetidas del parásito o mediante vacunaciones. La velocidad con la que se desarrolla depende de la dosis infectante inicial (Dobson y col., 1990) así como de la especie que parasita; por ejemplo, *T. colubriformis* induce una respuesta más temprana que *H. contortus*. A medida que se desarrolla la inmunidad, el hospedador rechaza el asentamiento de nuevas larvas (tras 5-7 semanas de continua infección en *Trichostrongylus* spp.), hay un descenso en la fecundidad de las hembras adultas presentes en el hospedador (tras 10-12 semanas) y tiene lugar una eliminación de los adultos (tras 16-20 semanas) (McClure, 2000).

Sin embargo, en la mayoría de los ensayos solamente el 40% de la primera dosis infectante se establece finalmente y madura hacia adultos sugiriendo que la resistencia al establecimiento larvario no se limita a una respuesta secundaria consecuencia de reinfecciones (Onah y Nawa, 2000). La resistencia al asentamiento larvario en primoinfecciones por *Strongyloides* se ha atribuido al sistema complemento (Brigandi y col., 1996), a los eosinófilos conjuntamente con la interleucina-5 (Ovington y col., 1998) y a los granulocitos (Watanabe y col., 2000).

2.3.2. Relación entre el tamaño y la fecundidad de los adultos

La fecundidad de las hembras adultas se ha estimado durante años mediante el cociente entre los hgh y el número de adultos presentes en el hospedador (Stear y col., 1999c). Sin embargo, esta relación es poco representativa ya que tanto la carga parasitaria como los hgh son mediciones que arrastran un elevado error. Además, los hgh no reflejan exactamente la fecundidad de las hembras ya que son varios los factores que influyen sobre la excreción de huevos con las heces (Claerebout y Vercruyse, 2000). Debido a ello Stear y col. (1995b) decidieron examinar la relación entre la

fecundidad y la carga parasitaria de manera indirecta midiendo la longitud de las hembras adultas. En un mismo hospedador, la variación en el tamaño de los vermes adultos es grande, pudiendo variar entre 0,6 y 1,2 cm (Stear y col., 1999c).

La relación entre la fecundidad y la longitud de las hembras adultas es curvilínea. La relación se encuentra determinada por la ecuación $y = ax^b$ donde a y b tienen valores de 1,12 y 0,41 respectivamente en infecciones experimentales; y de 1,15 y 0,42, en infecciones naturales, según la regresión logarítmica estimada por Stear y Bishop (1999b). La asociación entre el número de huevos presentes en el útero de las hembras y su longitud se determina por la misma fórmula descrita anteriormente; las constantes descritas según los mismos autores son de 0,002 y 4,2, en infecciones experimentales y de 0,003 y 4, en infecciones naturales.

Varios estudios han demostrado que un 60% de la variación en la longitud de las hembras adultas se debe a factores genéticos del hospedador (Stear y col., 1997). Los factores que influyen en el hospedador sobre la longitud de las hembras son la magnitud de la respuesta de las IgA (Stear y col., 1995b), la especificidad de la respuesta inmunológica (McCrie y col., 1997) y la carga parasitaria. El aumento en la fecundidad de las hembras se encuentra asociado con una mayor longitud de los parásitos; por lo tanto, algunos factores que influyen sobre la longitud de las hembras también lo harán sobre la fecundidad de las mismas. Debido a ello, las diferencias en el tamaño de los adultos están positivamente correlacionadas con las variaciones en la excreción de hgh (Ractliffe y Lejambre, 1971). Un estudio reciente estimó que la longitud de las hembras representaba el 60 y el 70% de la variación del número de huevos presentes *in utero* para las hembras de *T. circumcincta* y *T. colubriformis*, respectivamente (Gruner y col., 2004b).

2.3.3. Relación entre el tamaño de los parásitos adultos y la carga parasitaria

Existe una disminución lineal en el tamaño de las hembras cuando aumenta la carga parasitaria en el hospedador. Por cada aumento de cien hembras, la longitud de las mismas se ve mermada con una media de 0,1 mm (Stear y col., 1999c). Este hecho

puede deberse a que el aumento en la población parasitaria de lugar a una mayor competición por los nutrientes del medio y, en consecuencia, se produce un menor desarrollo del adulto. Alternativamente, puede que haya una mayor repuesta inmune al haber un aumento de la carga parasitaria que impide el desarrollo de los adultos.

La correlación entre la longitud de los adultos y la carga parasitaria es significativa, pero no excesivamente alta (Stear y col., 1999c) probablemente debido a la presencia de otros factores que influyen sobre la longitud de los parásitos.

2.3.4. Las ovejas controlan la longitud de los vermes adultos

Se ha determinado que las ovejas no son capaces de controlar la carga parasitaria pero sí la longitud de los parásitos. Este hecho se ha determinado hallando la heredabilidad para ambos parámetros en corderos, comprobando que la heredabilidad de la carga parasitaria difiere poco de 0 mientras que el valor encontrado para la longitud de los adultos es elevado ($0,62 \pm 0,20$) (Stear y col., 1999c). Esta estimación implica que el 62% de la variación en la media de la longitud de los adultos en un cordero se debe a efectos genéticos del hospedador. Por ello, se sugiere que la mayor manifestación de la resistencia genética a la infección en corderos viene dada por el control del desarrollo de los parásitos en el hospedador y no por la regulación de la carga parasitaria. Los mismos estudios se han llevado a cabo en ovejas y se han encontrado valores similares, pero no tan elevados.

2.3.5. IgA como mecanismo regulador de la longitud de los adultos

De entre varias respuestas inmunológicas investigadas, la única asociada con la reducción de la longitud de los adultos es la determinación local de IgA frente antígenos específicos del parásito. Smith y col. (1985) fueron los primeros en demostrar la asociación significativa entre un aumento en la respuesta de las IgA en los linfocitos y una reducción del tamaño de los parásitos. Estudios posteriores han demostrado la misma correlación pero midiendo el título de anticuerpos en el lugar de la infección, la mucosa gástrica. El mayor efecto se observó mediante la realización de un ELISA

indirecto frente a antígeno somático de LIV encontrándose una correlación de 0,62 entre el título de anticuerpos y la longitud de los adultos (Stear y col., 1995b). Posteriormente, Strain y Stear (2001) confirmaron esta asociación en infecciones naturales; comprobaron que el aumento de los niveles de IgA estaba asociado además de con adultos más pequeños, con una menor cantidad de hgh y con un aumento en el número de LIV (Strain y Stear, 2001). Estos estudios han sido también confirmados en terneros infectados experimentalmente con *C. oncophora* en los cuales el título de las IgA en la mucosa gástrica se correlacionó de forma negativa con los hgh y con el número de huevos presentes en el útero de las hembras adultas (Kanobana y col., 2002). De esta forma, se asocia la acción directa de las IgA frente a los nematodos gastrointestinales presentes en el hospedador.

Un ensayo realizado por McCririe y col. (1997) demostró que ovejas con títulos altos de IgA presentaban también elevadas cargas parasitarias. La causa de este hecho se debe a que no todos los animales reconocen y presentan una respuesta inmune frente a todos los antígenos del parásito.

3. Mecanismos de la mucosa gastrointestinal frente a los nematodos

Se ha observado que la respuesta protectora de ovejas infectadas con nematodos gastrointestinales está basada en la reacción inflamatoria en la mucosa gastrointestinal constituida por un aumento de los mastocitos, leucocitos y eosinófilos (McClure y col., 1992; Rothwell, 1989). El mecanismo responsable de la protección se debe a los linfocitos T los cuales inducen una respuesta de anticuerpos y cambios inflamatorios que facilitan la liberación de mediadores químicos que permiten la expulsión de los adultos del hospedador (Befus, 1995). De esta forma en bovinos infectados con *O. ostertagi* se ha observado, a los 3-4 días de la infección, un aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos que drenan hacia el abomaso llegando a un tamaño 30 veces el inicial a las 4-5 semanas post infección (Gasbarre, 1986, 1994; Canals y col., 1997). Este aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos es consecuencia tanto de un aumento de los linfocitos específicos frente a un determinado parásito como de los que no reconocen los antígenos parasitarios (Gasbarre, 1986).

3.1. Mecanismos inmunológicos

A continuación se describen los distintos mecanismos que intervienen en la respuesta inmune de las mucosas.

3.1.1. Linfocitos T y su papel en la protección

Varios estudios han demostrado que la inmunidad protectora frente a los nematodos gastrointestinales depende de los linfocitos T. Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular y liberan factores biológicamente activos o destruyen directamente las células diana.

La base de la importancia de las células T en las infecciones por nematodos fue establecida gracias a trabajos con ratones infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* (DiNetta y col. 1972; Larsh y col. 1972).

Experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la ausencia de las células T CD4⁺ gracias a la administración de un suero monoclonal anti-CD4 han demostrado la importancia que presentan estos linfocitos T durante la protección de la infección (Finkelman y col. 1997; Else y Finkelman, 1998).

Durante primoinfecciones experimentales con LIII de *Cooperia* spp., *H. contortus*, *O. ostertagi* y *T. colubriformis*, se han encontrado distintas respuestas linfocitarias entre los 7-14 días post infección (Adams, 1978). Sin embargo, en corderos menores de cuatro meses de edad infectados con *H. contortus* no se han detectado linfocitos sanguíneos por lo que no se podía determinar el grado de resistencia a la infección (Lloyd y Soulsby, 1987).

Trabajos realizados en terneros y con infecciones primarias con *O. ostertagi* han determinado valores muy elevados de células en la lámina propia cuatro días post infección, predominantemente de linfocitos CD8 y de CD4 en los ganglios linfáticos; al mismo tiempo se produjo un mayor aumento de los valores de las células B y de los

linfocitos $T\gamma\delta$ así como un aumento de peso de los ganglios linfáticos del abomaso alcanzando su máximo 28 días post infección (Almeria y col., 1997). En reinfecciones llevadas a cabo en ovejas con *T. circumcincta* se producía un aumento de los linfocitos en los ganglios linfáticos abomasales a partir de las 24 horas de la infección y alcanzando el máximo a los 2-5 días (Smith y col., 1985). De nuevo se observaron incrementos en los títulos de las células $T\gamma\delta$, células B y células T CD4 activadas al producirse reinfecciones con *H. contortus* (Balic y col., 2000).

3.1.2. Respuesta de las citoquinas

El descubrimiento, en el ratón, de que las células CD4 podían diferenciarse en dos grupos celulares denominados Th1 y Th2 según las citoquinas que segregasen (Mosmann y col., 1986) ha permitido una mayor profundización del control de la resistencia de los nematodos gastrointestinales. Las células Th1 producen interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y la alfa linfotoxina (LT- γ) y además estimulan las reacciones celulares; por el contrario, las células Th2 segregan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, entre otros, y favorecen la respuesta humoral. Los productos de las células de Th1 regulan negativamente la producción de los Th2 y viceversa (Mosmann y Coffman, 1989).

La respuesta predominante en las infecciones por nematodos gastrointestinales está controlada por las citoquinas Th2 (Finkelman y col., 1991) y en particular por las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. De todas ellas, la de mayor importancia es considerada la IL-4 tras varios estudios en ratón infectados con *H. polygyrus* y *Trichuris muris* (Finkelman y col., 1997; Else y Finkelman, 1998).

Urban y col. (1991) demostraron que al tratar ratones con anticuerpos anti-IL4 o con anticuerpos frente a los receptores de las IL-4 se bloqueaba la respuesta de las IgE y en consecuencia disminuía la expulsión de los parásitos adultos. El papel revelante de esta citoquina se demostró de nuevo al administrar IL-4 a ratones inmunodeficientes e infectados con *H. polygyrus* y *T. muris* dando lugar a una menor producción de huevos con las heces (Urban y col., 1995) así como en ensayos con ratones que no presentaban

el gen que codifica para la IL-4 (Finkelman y col., 1997; Bancroft y col., 1998; Artis y col., 1999). Sin embargo, en trabajos similares realizados con ratones infectados con *N. brasiliensis* la excreción fecal de huevos no se vio modificada (Madden y col., 1991; Lawrence y col., 1996). Debido a ello, se piensa en el papel de otras citoquinas en relación con la resistencia a los nematodos gastrointestinales.

El papel de la IL-5 en la inmunidad protectora frente a los nematodos gastrointestinales *in vivo* no está muy claro ya que ha sido difícil demostrar los efectos de los eosinófilos sobre las formas parásitas. En un estudio realizado por Doligalska y col. (1999) en ovejas se encontró una ligera asociación entre el aumento de los niveles de la IL-5 con los de los eosinófilos y a su vez con una disminución en la producción de los huevos excretados con las heces. Por el contrario, estudios *in vitro* han demostrado la acción directa de los eosinófilos sobre los nematodos adultos produciendo la destrucción de los mismos (Butterworth y col., 1974; Korenaga y Tada, 1994).

Aunque de forma limitada, existe alguna evidencia del papel protector de la IL-9 en estudios llevados a cabo en ratones y humanos. Se ha demostrado que su papel en la resistencia a las infecciones por nematodos gastrointestinales se debe principalmente a su acción reguladora de la producción de IL-4 (Dugas y col., 1993; Petit-Frere y col., 1993). Respecto a la IL-13 se ha demostrado que comparte funciones biológicas con la IL-4 (Finkelman y col., 1999) en tanto en cuanto al tratar con un suero frente a receptores de la IL-4 se ven bloqueados los correspondientes a la IL-4 y a la IL-13.

Respecto a estudios realizados en rumiantes, no abundan los trabajos sobre la respuesta de las citoquinas; en estos se ha utilizado la tecnología RT-PCR para detectar el ARNm específico para la expresión de estas citoquinas. Canals y col. (1997) han llevado a cabo ensayos en terneros realizando primoinfecciones con *O. ostertagi*; mediante RT-PCR encontraron una disminución en la expresión del ARNm de la IL-12 y un aumento en la expresión de las IL-14, IL-10 e IFN- γ . En contraposición, Almería y col. (1998) estudiaron los niveles de expresión del ARNm en terneras inmunizadas tras sucesivas infecciones con *O. ostertagi* y observaron unos valores de expresión de IL-4, IL-10 e IFN- γ menores en los animales inmunizados en comparación con el grupo

control. Estos resultados demuestran que en reinfecciones por *O. ostertagi* la IL-4 no tiene tal poder protector. De la misma manera, se determinaron los niveles de citoquinas en dos grupos de ovejas -resistentes y susceptibles- a la infección por *T. colubriformis*, observándose un incremento de la expresión de los genes para la IL-5, IL-3 y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) predominantemente en los animales resistentes pero no se encontraron expresiones tan elevadas para la IL-4, IL-10 o para el IFN- γ (Pernthaner y col., 2005).

3.1.3. Inmunoglobulinas

3.1.3.1. IgA

En los rumiantes parasitados, la IgA ha sido la inmunoglobulina mayoritariamente estudiada. La IgA es sintetizada en los ganglios linfáticos difusos y en las células plasmáticas relacionadas con el aparato digestivo en respuesta a la estimulación antigénica local. Gran parte de esta inmunoglobulina pasa a la luz intestinal por difusión y a medida que lo hace, se combina con el componente secretor sintetizado por las células epiteliales del intestino. No obstante, una proporción considerable difunde también hacia la circulación portal y pasa al hígado por lo que se encuentran cantidades altas de IgA en bilis (Tizard, 1984). La IgA se encuentra presente en las secreciones seromucosas del organismo como son la saliva, lágrimas, secreciones nasales y traqueales, leche y calostro, secreciones genito-urinarias y en el tracto gastrointestinal (Roitt, 1991). Los niveles de IgA en suero han sido apenas detectados y son el resultado de los excedentes de IgA secretada en la luz gastrointestinal en respuesta a elevadas cantidades de antígeno parasitario. Los niveles de esta inmunoglobulina en suero sanguíneo se mantienen elevados poco tiempo durante la infección ya que descienden rápidamente tras la misma (Carayannopoulos y Capra, 1993). Tanto en la mucosa como en suero sanguíneo los niveles fueron bajos durante las primoinfecciones (Gómez-Muñoz y col., 1998); sin embargo, aumentaron en consecutivas infecciones (Gill y col., 1993, 1994).

Las citoquinas son las responsables de la inducción de la respuesta de las IgAs *in vitro*, la IL-5, el factor de crecimiento de transformación-beta (TGF- β) y también las IL-2, IL-5 y la IL-6 son responsables de la expresión de las IgAs (Miller, 1996a). Sin embargo, respecto a la inducción de la respuesta de las IgA en la mucosa gástrica no se han encontrado muchos trabajos. Se ha determinado que el principal lugar de inducción de las IgA en el organismo son las placas de Peyer y que las ovejas seleccionadas como resistentes a la infección presentan un valor elevado de los anticuerpos (Gill y col., 1994). La ausencia de IgA en corderos menores de 4,5 meses tras varias infecciones con *T. circumcincta* se ha contrastado con los elevados títulos de la misma en el tejido linfático gástrico de ovejas adultas (Smith y col., 1985). La causa podría ser una deficiente presentación del antígeno o una baja producción de citoquinas en la mucosa gástrica de los corderos. Sin embargo, en ovejas lactantes en las que la resistencia a la infección por *T. circumcincta* se encuentra disminuida también tiene lugar un aumento en el título de las IgA en la mucosa gástrica (Smith y col., 1983) aunque el transporte de las inmunoglobulinas hasta la superficie de la mucosa podría estar comprometido.

La respuesta de las IgA puede medirse mediante un ELISA indirecto frente a distintos tipos de antígenos de distintos estadios del parásito. Sinski y col. (1995) demostraron que la respuesta local de las IgA frente a antígeno somático de LIV de *T. circumcincta* es muy similar a la respuesta frente a los antígenos de excreción-secreción de LIV. A la vez, la respuesta frente antígeno de LIII se encuentra muy asociada con los de LIV. Por el contrario, en suero se han encontrado valores negativamente correlaciones entre las IgA y las IgG1. Se ha intentado demostrar una asociación entre la respuesta de las inmunoglobulinas en suero y en la mucosa gástrica y se observaron asociaciones poco fuertes sugiriendo la difícil extrapolación de los datos de la mucosa gástrica al suero sanguíneo.

3.1.3.2. IgG

Las IgG son las inmunoglobulinas más abundantes en el suero sanguíneo. Su elevada afinidad con los antígenos y su amplio espectro de propiedades biológicas hacen que sean una de las primeras barreras de defensa en el organismo. Durante la

respuesta secundaria a la infección, son las inmunoglobulinas mayoritariamente sintetizadas (Roitt, 1991).

La presencia de títulos elevados de IgG refleja el grado de exposición de los rumiantes a los nematodos gastrointestinales; títulos elevados de esta inmunoglobulina se encontraron correlacionados con distintos niveles de exposición a la infección por *O. ostertagi* tras el pastoreo (Ploeger y col., 1990). Tanto en infecciones por *Ostertagia leptospicularis* como por *H. contortus* en ovejas se ha demostrado una mayor presencia de la IgG1 frente a la IgG2 (Gill y col., 1993; Schallig y col., 1995; Hertzberg y col., 1999); sin embargo, Schallig y Van Leeuwen (1997) no pudieron demostrar una correlación entre la respuesta de la IgG1 y un nivel de protección adecuado frente a *H. contortus*. Los niveles de IgG1 en el suero son mayores que los de la IgA en terneros infectados con *C. oncophora* aunque estos títulos se invierten cuando la medición se realiza en la mucosa (Kanobana y col., 2002).

3.1.3.3. IgE

En las infecciones por helmintos existen dos características descritas en los mamíferos: la acumulación de mastocitos en los tejidos parasitados y el aumento en suero sanguíneo de las IgE tanto específicas como inespecíficas (Jarrett y Miller, 1982). Un posible papel de la respuesta específica de las IgE en la resistencia a la infección de los nematodos gastrointestinales es su implicación en la hipersensibilidad inmediata mediante la unión de la inmunoglobulina a los mastocitos, dando lugar a la desgranulación de estos (Jarrett y Miller, 1982; Moqbel y col., 1990) y a la consecuente producción de leucocitos en ovejas (Huntley y col., 1984).

La eliminación de mediadores de la inflamación podría causar un deterioro del microambiente y la consecuente expulsión de los parásitos (Rothwell, 1989; Jones y col., 1994). Sin embargo, Bell (1996) sugirió la ausencia de relación entre los mastocitos y la respuesta de las IgE en las helmintosis.

Pocos estudios se han llevado a cabo en relación con la cinética de las IgE durante las infecciones por nematodos gastrointestinales. Shaw y col. (1998) observaron la respuesta de las IgE en ovejas infectadas con *T. colubriformis*. En dicho estudio la respuesta específica de las IgE presentaban un máximo entre los 13 y 30 días de la primoinfección; el título de inmunoglobulinas comenzaba a aumentar a los 4-6 días o a los 7-8 días tras reinfecciones. El tiempo de respuesta tras primoinfecciones en este ensayo fue muy parecido a los trabajos realizados por Kooyman y col. (1997) utilizando el modelo *H. contortus* - ovino. Por otra parte, reinfecciones consecutivas con *T. colubriformis* dieron lugar a una respuesta de IgE cada vez más temprana (Shaw y col., 1998).

3.1.4. Eosinófilos

La presencia significativa de eosinófilos en la sangre y un considerado aumento de la eosinofilia en la mucosa gástrica (Rothwell, 1989), conjuntamente con un marcado aumento de los niveles de interleucina-5, la citoquina Th2 responsable de la diferenciación de los eosinófilos (Korenaga y Tada, 1994), son rasgos identificables en la infección por nematodos gastrointestinales.

En un estudio longitudinal realizado por Doligalska y col. (1999) se observó que aquellos animales con elevadas concentraciones de interleucina-5, presentaban cifras elevadas de eosinófilos en la sangre periférica. Existen estudios acerca de la capacidad de los eosinófilos de mediar en la destrucción de las larvas de los parásitos *in vitro* (Butterworth, 1984; Gransmuller y col., 1987); sin embargo, en los estudios de campo no se encuentran evidencias tan claras. Los ensayos que se han realizado *in vivo* se han llevado a cabo mediante la administración de suero anti-eosinófilos producido en conejos previamente a la infección experimental demostrándose un aumento en la susceptibilidad a la infección (Mahmoud y col., 1975; Gleich y col., 1979). Otros estudios que se han llevado a cabo mediante la administración de suero anti-interleucina-5 han demostrado una reducción en la respuesta inmune mediante un aumento del número de larvas en el hospedador (Korenaga y col., 1991; Rotman y col.,

1997); por el contrario en otros ensayos no ha tenido tal efecto (Herndon y Kayes, 1992; Rotman y col., 1996).

Durante las infecciones por nematodos, los eosinófilos presentan una función citotóxica debido a la liberación de proteínas granulares y a la producción de aniones superóxido (Balic y col., 2000). Esta acción se produce al unirse las IgA al receptor Fc-alfa presente en los eosinófilos lo cual provoca una liberación de mediadores de la inflamación y citoquinas que tienen un efecto directo sobre la población parasitaria (Motegi y col., 2000).

3.1.5. Mastocitos

Los mastocitos son, por sí mismos, fuente de citoquinas, a través de la producción de IL-4, IL-5 e IL-6, pudiendo influir sobre la respuesta Th y regulando la producción de IgA (Ramsay y col., 1994).

Varios estudios han demostrado que la infección por nematodos gastrointestinales se acompaña de un aumento en el número de mastocitos (Rothwell, 1989; Miller, 1996b). Sin embargo, existen diferencias en el momento de la aparición de la mastocitosis en el hospedador, dependiendo tanto de la especie de parásito como del hospedador, y no siempre coincidiendo con la expulsión de las formas adultas (Lee y Wakelin, 1982; Nawa y col., 1994; Ishiwata y col., 1999). En un estudio comparativo entre hospedadores realizado por Macaldowie y col. (2003) se observó que el número de mastocitos en la mucosa gástrica era significativamente menor en las cabras que en los corderos infectados con *T. circumcincta*.

Existen trabajos en los cuales se ha observado que la eliminación de los adultos tiene lugar en ausencia de la mastocitosis, y viceversa, ausencia de expulsión de adultos con un elevado número de mastocitos en la mucosa (Crowle y Reed, 1981; Nawa y col., 1994; Ishiwata y col., 1999; Kanobana y col., 2002). Por otra parte, más recientemente Gruner y col. (2004b) relacionaron la longitud de los parásitos adultos presentes en el hospedador con el número de mastocitos en la mucosa gastrointestinal.

3.2. Secreciones y motilidad gástrica

En los animales parasitados además de la respuesta inmunitaria también tienen lugar cambios estructurales y funcionales en toda la mucosa gastrointestinal, junto con alteraciones en la motilidad, hiperplasia de la musculatura y disminución del tránsito de alimentos (Emery y col., 1993).

A los pocos minutos de la infección (tanto primaria como en las reinfecciones), tiene lugar en los hospedadores un aumento en las secreciones, principalmente de agua y electrolitos (Castro y col., 1979; Castro 1989). Este mecanismo se interpreta como un intento del hospedador para eliminar los nematodos (Vallance y Collins, 1998) mediante la producción de diarrea o bien la expulsión de los nematodos tras la creación de un ambiente hostil para los parásitos (Baird y O'Malley, 1993). Tanto el transporte de fluidos como de electrolitos se encuentran influenciados por la respuesta inmune, principalmente después de las reinfecciones, de tal forma que mediadores como las proteasas de los mastocitos dañan las uniones intercelulares provocando un aumento de la permeabilidad en la mucosa (Miller, 1996a).

El mucus tiene un papel protector por sí mismo ya que atrapa a los nematodos adultos y previene el asentamiento de las nuevas formas parásitas (Rothwell, 1989). En la protección de las ovejas de la raza Merina frente a las infecciones por *T. colubriformis*, el número de células secretoras de mucus aumenta y también lo hace la cantidad de mucus en el yeyuno. La composición del mucus varía dependiendo de la especie de parásito que infecte a las ovejas. Varía el contenido de los mucopolisacáridos y de las mucoproteínas y se aumenta el número de leucotrienos (Douch y col., 1983; Jones y col., 1990, 1994) y el número de moléculas, todavía no identificadas, con efecto inhibitorio sobre los nematodos.

La inmunidad de las ovejas a los nematodos gastrointestinales parece que también se encuentra asociada con una hipertrofia e hipercontractibilidad de la musculatura lisa local (Meana Mañes, 1990). Estos cambios adaptativos en la motilidad

gastrointestinal persisten durante un tiempo tras la exposición al parásito de tal forma que tienen repercusión sobre la función y fisiología del tracto gastrointestinal.

La eliminación del epitelio gastrointestinal y la proliferación inmediata del mismo a las 24 horas es otro mecanismo de defensa que tiene lugar en las ovejas inmunes a *T. colubriformis*. Después de 4-5 días de la infección existe una pérdida del epitelio del yeyuno con la consecuente eliminación de larvas que no se encontraban embebidas en la mucosa intestinal (McClure y col., 1992).

4. Factores que influyen sobre la respuesta inmune

La inmunidad está influida por numerosos factores tanto fisiológicos del hospedador como externos al mismo (Vercruyse y Claerebout, 1997). Debido a ello hay que identificar aquellos factores predisponentes que impiden un correcto desarrollo de la inmunidad.

4.1. Edad

Los corderos, de entre 3-6 meses de edad, tienen más dificultad para desarrollar una respuesta inmune que las ovejas adultas infectadas con *T. colubriformis* (Gibson y Parfitt, 1972; Dineen y col., 1978), *T. circumcincta* (Smith y col., 1985), *Nematodirus spp* (Brunsdon, 1962) y *H. contortus* (Manton y col., 1962). Los animales de menos de seis meses de edad también responden peor a las vacunaciones con larvas atenuadas frente *T. colubriformis* y *H. contortus* (Urquhart y col., 1966; Benitez-Usher y col., 1977; Smith y Angus, 1980; Duncan y col., 1978). Esta falta de respuesta en corderos de corta edad se asocia con una menor respuesta específica. Sin embargo, no se sabe si el factor limitante es la edad *per se* o si influyen otros factores como el destete, el peso, las reservas grasas o la nutrición. Un trabajo realizado por Emery y col. (1999) sugiere un desarrollo de la inmunidad en corderos recién nacidos, por lo que se entiende que existen otros factores que influyen sobre el desarrollo de la misma además de la edad.

4.2. Peso corporal

La inmunidad frente *T. colubriformis* en ovejas adultas se mantiene durante periodos donde existe una pérdida moderada de peso asociada a una alimentación inadecuada (van Houtert y col., 1995c); sin embargo, la ganancia de peso tras el destete no se asocia necesariamente a una mayor respuesta inmunológica.

McClure y col. (1999) han demostrado que existe una correlación negativa entre el peso corporal y el número de adultos hallados en la necropsia tras la infección en ovejas Merinas de ocho meses de edad. Los animales con un peso inicial menor a 22 Kg excretaban mayor número de hgh y tenían una mayor carga de adultos durante las primoinfecciones y las reinfecciones, a diferencia de los animales del mismo rebaño que pesaban más de 22 Kg antes de la infección. Aunque el peso del animal *per se* no sea un factor determinante para el desarrollo de la inmunidad, el estado sanitario y nutricional son los factores más determinantes; aquellas ovejas con peso inferior al óptimo no serán capaces de desarrollar una inmunidad suficientemente protectora.

4.3. Gestación y lactancia

Durante el parto existe una disminución de la resistencia a los parásitos debido a un menor desarrollo de la inmunidad que se traduce en un mayor riesgo a la infección. La causa puede deberse a cambios hormonales durante el parto o a una competición por los nutrientes entre el sistema inmune y el feto/oveja. La falta de resistencia a las infecciones parasitarias ha sido compensada con suplementos nutricionales como puede ser la harina de pescado (Donaldson y col., 1997) ya que suple las necesidades proteicas necesarias que tienen lugar durante la lactación. El efecto de la suplementación proteica está muy marcado cuando se realiza en animales parasitados. En el trabajo realizado por McAnulty y col. (2000) se sugiere que, con objeto de que el nivel inmunitario sea adecuado, los animales deben exponerse a las larvas antes de la paridera y recibir una nutrición adecuada.

Durante el parto el descenso de la respuesta inmune presenta consecuencias sobre la población parasitaria teniendo lugar un aumento de la contaminación de los pastos y una mayor probabilidad de infección de los corderos más jóvenes.

4.4. Nutrición

El estado nutricional del hospedador es uno de los factores predisponentes más importantes que influyen sobre la resistencia a las infecciones por nematodos gastrointestinales. Ya en el año 1933 Clunies-Ross y Gordon sugirieron que en estaciones de escasez de alimento gran parte de las ovejas australianas estaban sometidas a un estrés nutricional tal que su resistencia a la hemoncosis estaba aminorada. Mientras, Fraser y Robertson (1933) presentaron un estudio en el cual destacaron cómo las ovejas bien alimentadas eran capaces de eliminar los nematodos de manera más eficaz que las que se encontraban en un estado nutricional inferior.

Hasta la fecha existen numerosos estudios acerca de cómo influye la nutrición y los diversos componentes de los alimentos sobre la respuesta inmunitaria de las ovejas a los nematodos gastrointestinales.

4.5. Otros factores

4.5.1. Genotipo

El genotipo del hospedador influye sobre la resistencia del parásito ya que la variación genética de éste es lo que determina el número de larvas que se asientan en el hospedador (Windon 1996; Raadsma y col., 1997). Esto ha permitido la selección de rebaños de ovejas con el fin de mejorar la resistencia a las enfermedades producidas por parásitos. La respuesta inmune adquirida es el factor más importante al comparar líneas o razas de ovejas resistentes o susceptibles a la infección; una selección dirigida hacia una mejor respuesta inmune garantiza una mayor resistencia a la parasitosis. Razas de ovejas tales como Red Maasai (Baker, 1995), Florida Native y St Croix (Zajac, 1995) han sido objeto de numerosos estudios que han demostrado que la raza influye sobre la

resistencia a la infección. Numerosos trabajos han sido publicados acerca de la comparación de la resistencia entre razas; sin embargo, la resistencia de una raza viene marcada no solamente por factores genéticos sino también por factores del entorno, ambientales. Tal es el caso de la importación de la raza St Croix procedente de la isla Virgin en Indonesia donde su resistencia a las nematodosis y su productividad eran inferiores (Gatenby y col., 1995).

Los rebaños de ovejas también se han seleccionado para mejorar la *resilience*, es decir, la capacidad del animal de soportar los efectos fisiológicos de la infección sin alterar su estado productivo. Bisset y col. (1996a) en un ensayo realizado con corderos de la raza Romney determinaron que se trataba de un rasgo independiente.

En la actualidad los estudios van encaminados hacia la identificación de genes implicados en la inmunidad. La base de estos estudios es la búsqueda de marcadores genéticos que se puedan utilizar para la selección de animales genéticamente resistentes.

4.5.2. Estrés

4.5.2.1. Destete

La influencia del destete sobre la resistencia a la infección no está clara ya que no se han realizado muchos estudios al respecto. En condiciones de pastoreo, el destete a las ocho semanas de edad, favorece un aumento en el número de hgh y un mayor número de reinfecciones debido a un retraso en la respuesta de inmunoglobulinas séricas en comparación con corderos más jóvenes del mismo rebaño (Watson y Gill, 1991). A diferencia de lo que sucede en las infecciones, los anticuerpos producidos en respuesta a la administración de una vacuna previa al destete no disminuyen. Shaw y col. (1995) no encontraron tales efectos al destetar corderos a las cuatro semanas de edad en respuesta a *H. contortus*. Estos trabajos indican que la influencia del destete sobre la respuesta inmune hacia los nematodos gastrointestinales puede estar mediada por otro mecanismo como la nutrición.

4.5.2.2. Clima

El calor, frío y otros factores influyen sobre la capacidad de respuesta del organismo. Apenas existen estudios sobre el efecto del clima en la respuesta inmune de los hospedadores. Parece que en ovejas expuestas a condiciones de frío y humedad, existe una disminución en la resistencia y en la *resilience* frente los parásitos. Además, un déficit de energía podría afectar tanto a la respuesta fisiológica como inmunológica hacia las formas parasitarias.

4.5.2.3. Manejo

Muchos son los factores que intervienen en el manejo de los animales. El transporte, el alojamiento, la mezcla de animales, etcétera son posibles inductores de un estrés neuroendocrino que puede afectar al sistema inmune y, en consecuencia, a la resistencia de las infecciones. Sin embargo, pocos trabajos han descrito este tipo de estrés en relación con las parasitosis.

4.5.3. Estado sanitario

Es posible que infecciones concurrentes, especialmente de carácter crónico, impidan la adquisición y el mantenimiento de la inmunidad hacia los parásitos internos aunque se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

4.5.4. Sexo del animal

Según un estudio realizado por Barger (1993), los machos son más susceptibles que las hembras a las parasitosis gastrointestinales. Sin embargo, parece que también pueden influir otros factores, aunque no se conocen bien.

5. Estado nutricional e infección por nematodos gastrointestinales

Desde hace años la influencia de la nutrición en el desarrollo de la resistencia a los nematodos gastrointestinales ha tenido una gran importancia. Esta importancia se debe a que los animales sometidos a un estado nutricional por debajo de las necesidades requeridas tendrán más dificultades para controlar una infección por nematodos gastrointestinales que los que no lo estén. Clunies-Ross (1932) y Stewart y Gordon (1953) fueron los primeros en disponer dos efectos distintos de la nutrición sobre los hospedadores. En primer lugar, la influencia sobre la resistencia de los animales al establecimiento y mantenimiento de la infección; y en segundo lugar el efecto de la nutrición sobre las consecuencias metabólicas derivadas de la parasitación. Stewart y Gordon (1953) concluyeron que la nutrición influía en mayor medida sobre los efectos de la infección que sobre la resistencia a la misma. Es decir, las formas en que influye la nutrición sobre el desarrollo y consecuencias del parasitismo son variadas. Inicialmente, aumenta la capacidad del hospedador para hacer frente a los efectos adversos de la infección, lo que se denomina *resilience*. También mejora la capacidad del hospedador para retener la infección limitando el establecimiento, el crecimiento, la fecundidad de las formas parasitarias en el hospedador. Finalmente, la nutrición actúa directamente frente a los nematodos a través de la ingesta directa de sustancias antiparasitarias (Coop y Kyriazakis, 2001).

5.1. Efectos de la parasitosis sobre la ingesta y utilización de los nutrientes

5.1.1. Efectos sobre la ingesta de nutrientes

Una de las razones por las cuales existen pérdidas en la producción en hospedadores susceptibles parasitados es la disminución voluntaria en la ingesta de alimentos (Gibson, 1955). Aunque estas pérdidas no siempre han sido observadas (Sykes y col., 1979), disminuciones entre un 10 y un 30% sí son frecuentes (Coop y col., 1982; Dynes y col., 1991) o incluso una ausencia total de apetito (Fox y col., 1989). Dargie (1980) estimó que entre el 40 y el 90% de las pérdidas de producción pueden atribuirse al descenso de la toma voluntaria de alimentos.

Tanto las especies parásitas como el número de larvas infectantes ingeridas influyen en el grado de disminución de ingesta (Steel, 1978). Por otra parte, dietas con elevado contenido proteico no conllevan una disminución en la ingesta elevada (Abbott y col., 1986; van Houtert y col., 1995a) así como las de alto contenido en fósforo (Coop y Field, 1983).

Los mecanismos responsables de la disminución de la ingesta de alimentos en los animales parasitados no se encuentran muy bien descritos y se han sugerido varios, como el dolor abdominal y la inflamación de la mucosa, cambios en el pH del contenido gástrico, en el flujo de la ingesta, en la proteína ingerida o alteraciones en la secreción de la hormona gástrica colecistoquinina (CCK) (Symons, 1985). Hace años, el papel de la CCK era determinante aunque hoy en día esta teoría parece poco probable (Dynes y col., 1990). Horbury y col. (1995) estudiaron las vías por las que se producía la anorexia en ratas infectadas por *N. brasiliensis*. La conclusión fue un aumento de la expresión de un gen que codifica para el neuropéptido Y (NPY) cuya función es estimular el apetito. El NPY se encontraba presente en el hipotálamo durante la anorexia en los estadios previos de la infección demostrando de esta forma que los animales parasitados son capaces de detectar periodos de déficit de energía. Sin embargo, un incremento en el NPY no es capaz de aumentar la ingesta de alimento por lo que se cree que se expresa un gen inhibidor del apetito, el factor de liberación de corticotropina, que actúa conjuntamente con algunas citoquinas (Horbury y col., 1995) como el TNF y la IL-1 posibles causantes de la anorexia.

5.1.2. Efectos sobre la digestión y absorción de los nutrientes

Según los estudios de Steel (1978), el escaso rendimiento productivo de los animales parasitados era debido a una mala absorción de los nutrientes, principalmente de la proteína. Por el contrario, experimentos en ovejas infectadas con *T. colubriformis* no demostraron esta consecuencia respecto a la proteína (Poppi y col., 1986) ni tampoco en las infecciones mixtas con *T. colubriformis* y *T. circumcincta* (Bown y col., 1991a).

La función del rumen es crítica respecto a la suplementación de energía metabolizable o de proteína metabolizable en rumiantes. Sin embargo, no existen muchos estudios sobre la alteración de su función en animales parasitados. La infección intestinal por *T. colubriformis* provoca una disminución en la producción de acetato en el rumen de hasta un 30% en comparación con los animales no parasitados (Steel, 1972). Para que este hecho tenga lugar, la fermentación de la materia seca debe de encontrarse afectada. También puede deberse a un descenso en la síntesis de proteína microbiana así como en la suplementación de aminoácidos (Steel, 1972). Coop y Field (1983) observaron una disminución en el contenido y en la concentración de fósforo en el rumen de corderos infectados por *T. vitrinus* lo que podría provocar una alteración en la síntesis de proteína microbiana (Leng, 1990). Por el contrario, en un trabajo llevado a cabo por Rowe y col. (1988) con ovejas infectadas por *H. contortus* la síntesis de proteína no se vio afectada aunque sí hubo cambios en el flujo ruminal y un descenso en la proporción de acetato y propionato.

5.1.3. Efectos sobre el metabolismo de las proteínas y de los aminoácidos

En los animales parasitados aumenta la pérdida de proteína endógena hacia la luz gástrica, procedente de sangre, plasma, mucina y epitelio gástrico (Poppi y col., 1986; Bown y col., 1991b; Holmes, 1993; MacRae, 1993; van Houtert y Sykes, 1996). Parte de la proteína endógena es reabsorbida en el intestino, dependiendo de si las lesiones están en el tramo anterior o posterior del intestino (Coop y Holmes, 1996). La cantidad de proteína que se pierde lo hace en forma de urea con la orina al ser transformada en el intestino a amoníaco o bien se excreta con las heces (MacRae, 1993). También tiene lugar una movilización de proteína desde el músculo, hueso y lana hacia el tracto gastrointestinal como reemplazo de las pérdidas (Jones y Symons, 1982; MacRae, 1993).

5.1.4. Efectos sobre el metabolismo de la energía

Una de las mayores causas de las infecciones por nematodos gastrointestinales es la disminución en el consumo de la energía total. Dos ensayos demostraron que la

eficiencia de la utilización de la energía procedente del alimento es muy baja e implica una disminución en la digestibilidad del alimento, un aumento de la energía necesaria para el mantenimiento y alteraciones en la eficiencia de utilización de las sustancias finales de la digestión (Sykes y Coop, 1977).

Según otros estudios, el mayor efecto de la infección es una alteración en la eficiencia del metabolismo de la energía conjuntamente con pocas alteraciones en la energía digestible (Sykes y Coop, 1977) y viceversa. Existen trabajos donde la eficiencia del metabolismo de la energía no está alterada pero sí lo está la energía digestible (MacRae y col., 1982).

5.1.5. Efectos sobre el metabolismo mineral

Las infecciones por nematodos gastrointestinales pueden producir serios defectos en el crecimiento de los huesos de las ovejas (Sykes y Coop, 1977; Sykes, 1979) debido a una reducción en la absorción y en la retención del fósforo. Tales consecuencias han sido descritas en animales infectados con *T. colubriformis* o con *T. vitrinus* (Poppi y cols; 1986; Bown y col., 1989) pero no en ovejas parasitadas con *T. circumcineta* (Wilson y Field, 1983).

En relación al calcio, existe un aumento de las pérdidas endógenas (Wilson y Field, 1983) y una menor absorción ligada a una disminución de las demandas de calcio como resultado de una reducción en el crecimiento de los huesos.

La absorción de magnesio parece no estar alterada (Bown y col., 1989). Las infecciones gástricas provocan una disminución del cobre en aquellos animales a los cuales se les administra como profilaxis a un elevado pH (Bang y col., 1990).

5.2. Nutrición y *resilience* al parasitismo

Los cambios en el metabolismo proteico como una de las mayores consecuencias de la infección se han centrado en el estudio de los efectos resultantes de

la suplementación proteica requerida tras la infección. Este interés es debido a que el mantenimiento de la proteína del organismo tiene un papel preferencial ya que garantiza la supervivencia del mismo. El crecimiento y la reproducción son consideradas las prioridades más importantes tras el mantenimiento ya que aseguran la preservación del material genético. Las funciones que regulan el estado parasitario del hospedador, como el sistema inmunitario, estarán enormemente influenciadas por la nutrición ya que tienen una preferencia menor respecto al mantenimiento, el crecimiento y la reproducción.

Como consecuencia a esta distribución de las necesidades del organismo, la provisión de nutrientes adicionales al organismo del hospedador tendrá como resultado mejorar la *resilience*. El estudio de suplementación proteica en ovejas infectadas experimentalmente o de forma natural apoya esta idea. En los hospedadores rumiantes, el nitrógeno de la dieta es degradado en el rumen para ser utilizado por los microorganismos o bien atraviesa el tracto gastrointestinal sin degradarse (*by pass* proteico). Tanto los microorganismos como la proteína sin degradar son fuente de proteína metabolizable que será absorbida posteriormente en el intestino delgado. Van Houtert y Sykes (1996) realizaron un trabajo en el cual infectaron experimentalmente ovejas para demostrar que en los animales que habían sido suplementados con proteína no degradable las consecuencias fisiopatológicas de la infección eran más leves que en los no suplementados. Además, la alteración de los parámetros sanguíneos como el hematocrito, las proteínas séricas totales o la concentración de albúmina están menos marcadas en los animales con niveles mayores de proteína metabolizable en la dieta (Coop y Holmes, 1996).

Los caracteres relacionados con la producción como el incremento de peso o el crecimiento de la lana, también mejoran con la suplementación de proteína en la dieta tanto en ovejas infectadas de forma experimental (Abbott y col., 1988; Van Houtert y col., 1995a) como en infecciones naturales (Van Houtert y col., 1995b). Los efectos positivos de la suplementación con proteína también están descritos en cabras (Van Houtert y Sykes, 1996). Tales efectos beneficiosos aparecen mediante la suplementación de la dieta con urea, una fuente de nitrógeno degradable (Knox y Steel,

1999b). Aunque la respuesta de la urea no es tan favorable como la obtenida con la administración de proteína de alta calidad no degradable su utilización es muy útil en países tropicales y subtropicales donde la calidad de los forrajes es muy pobre y la administración de proteína de alta calidad es muy costosa (Waruiru, 2004).

Varios trabajos han demostrado que la mejora de la *resilience* mediante la suplementación proteica está más acentuada en los animales jóvenes, en los cuales las consecuencias fisiopatológicas de la infección son más pronunciadas (Fox, 1997). Por otra parte, las ovejas preñadas, infectadas con *T. circumcincta*, y alimentadas con unas necesidades proteicas del 130% ganan más peso, tienen corderos más pesados y producen más leche que las alimentadas con un 85% de sus necesidades proteicas (Houdijk y col., 2000).

Bown y col. (1991b) evidenciaron que la proteína en la dieta tiene mejores efectos sobre la *resilience* que la energía total que se administra con la misma; sin embargo, en animales subalimentados un incremento en la energía suplementada con la dieta obviamente mejorará la *resilience*. De esta manera, se observó que ovejas en crecimiento infectadas con *T. colubriformis* seleccionaban su alimentación entre dos dietas que aportaban la misma energía pero distinta proteína; los animales parasitados seleccionaron una mayor cantidad de proteína que los testigos (Kyriazakis y col., 1994).

5.3. Nutrición y resistencia al parasitismo

Los animales desarrollan una resistencia a la infección tras continuas exposiciones al parásito lo cual depende de la edad, raza y estado productivo del animal. Numerosos trabajos se han centrado en el estudio de la relación entre el estado nutricional del hospedador y su capacidad para regular la infección mediante el desarrollo de una inmunidad efectiva.

En algunos casos, las consecuencias de una mejora en la alimentación en aquellos animales que se encuentran infectados por nematodos gastrointestinales se corresponden con un aumento de la resistencia a la infección. En otros casos la nutrición

mejora la resistencia a la infección; en un experimento llevado a cabo por Ferre y col. (1995) un suplemento de cebada en la dieta suponía un incremento de la resistencia al establecimiento de los parásitos en comparación con otro grupo de ovejas a las que no se les había administrado la cebada.

Numerosos estudios se han centrado en la influencia de la proteína metabolizable sobre el desarrollo de la inmunidad en animales infectados por nematodos gastrointestinales. De esta manera se han encontrado consecuencias beneficiosas entre las que se encuentran aumento de la ganancia de peso (Datta y col., 1998; Kahn y col., 2000), incremento de los eosinófilos (Datta y col., 1998) y de la respuesta de anticuerpos (Datta y col., 1998; Strain y Stear, 2001), disminución del número de huevos excretados con las heces (Datta y col., 1998; Israfi y col., 1998) y descenso de la carga parasitaria (Strain y Stear, 2001).

Los beneficios de la suplementación proteica sobre la resistencia a la infección pueden estar condicionados por el genotipo del animal. De este modo, en corderos de la raza Scottish Blackface el incremento de proteína en la dieta no supuso ningún cambio significativo en el establecimiento de la infección por *H. contortus* a diferencia de los corderos de la raza Finn Dorset que presentaron signos clínicos más leves gracias al incremento proteico (Abbott y col., 1985). En otros casos se ha comprobado que un aumento de proteína en la dieta incrementaba la resistencia a la infección por *H. contortus* en la raza de oveja Santa Inés (raza resistente) pero no en corderos de la raza Ile de France (raza susceptible) (Bricarello y col., 2003).

En menor medida se han estudiado los efectos del plano de nutrición global en los animales infectados. En un estudio con ratones infectados por nematodos gastrointestinales y alimentados con dietas de bajo aporte energético, los bajos niveles de IgG1 e IgE permitieron una mayor carga parasitaria (Koski y col., 1999). En ovinos, Valderrábano y col. (2002) compararon dos grupos de corderos alimentados con un nivel bajo y otro alto de energía respectivamente. La conclusión en este caso fue que niveles altos de energía permitían un mayor número de eosinófilos circulantes y por lo tanto, un mejor desarrollo de la inmunidad.

Aunque la adquisición y la expresión de la inmunidad es continua, las necesidades nutricionales y, principalmente las proteicas, no son las mismas en los animales jóvenes que en los adultos. La respuesta inmune de los jóvenes a la primoinfección no se desarrolla hasta los 8-24 meses de edad (Gibson y Parfitt, 1972); en los adultos, gracias a continuas reinfecciones, se instaura una inmunidad adquirida.

5.3.1. Influencia de la nutrición en los animales jóvenes

Durante las fases tempranas de la adquisición de la inmunidad, cuando el hospedador reconoce la invasión del parásito en su organismo, las demandas del sistema inmunitario son moderadas. Kahn y col. (2000) determinaron que las necesidades del sistema inmune en animales jóvenes probablemente tuvieron prioridad sobre otras funciones ya que la administración moderada de proteína en la dieta fue suficiente para cubrir las necesidades del desarrollo de la inmunidad.

La principal influencia de la suplementación se encuentra en el grado de expresión de la inmunidad, el cual se puede manifestar como una reducción del establecimiento o un menor desarrollo de las larvas infectantes (Balic y col., 2000). La adición de proteína en la dieta, principalmente la no degradable, para el crecimiento tanto de ovejas como de cabras ha mejorado la expresión de la inmunidad como se ha demostrado al encontrarse adultos más pequeños y hembras con un menor número de huevos *in utero* (Datta y col., 1998). Un mayor grado de expulsión de los adultos y una disminución de los hgh también se encuentran asociados a la suplementación proteica (Van Houtert y col., 1995b).

Datta y col. (1999) han investigado si un aumento de la proteína metabolizable previamente a la infección podría mejorar la resistencia al establecimiento y desarrollo larvario. El resultado del estudio fue que los beneficios de la suplementación con elevadas cantidades de proteína durante un periodo corto de tiempo eran observables cuando los animales salían al pasto. Se observó una mayor ganancia de peso, mayor producción de lana y menor excreción de huevos con las heces que redujo la contaminación de los pastos.

La proteína en la dieta puede influir sobre la respuesta inmune. En los animales parasitados el número de eosinófilos, leucocitos y mastocitos, y la concentración de las proteasas de los mastocitos presentan un aumento en la mucosa gastrointestinal (Coop y col., 1995). Sin embargo, el efecto sobre la respuesta humoral parece ser más variable (Datta y col., 1998). Estas observaciones son concordantes con la idea de que en los animales jóvenes la ganancia de proteína relacionada con el crecimiento presenta prioridad frente al desarrollo de la respuesta inmune, ya que un aumento de la concentración de proteína en la dieta mejora sensiblemente los componentes del sistema inmune.

Varios de los componentes del sistema inmune tales como las mucoproteínas, leucotrienos, interleucinas o inmunoglobulinas, podrían dar lugar a un aumento desproporcionado de la demanda de algún aminoácido cuando se presenta la infección parasitaria. Tal es el caso de la mucosa intestinal que es rica en treonina, serina y prolina, y los leucotrienos son ricos en cisteína (MacRae y col., 1993). De este modo, existen evidencias de que ovejas infectadas con *T. colubriformis* y suplementadas con metionina no degradable en el rumen mejoraron el desarrollo del sistema inmune manifestándose con un incremento de los mastocitos y leucocitos.

Hay que tener en cuenta que durante el crecimiento de los animales existe un incremento de las demandas minerales. Coop y Field (1983) estimaron que un aumento del contenido de fósforo en la dieta en ovejas infectadas con *T. vitrinus* reducía los hgh en un 55% y la carga parasitaria hasta en un 89%. Estos efectos podrían ser una consecuencia directa de los minerales o probablemente, reflejarían los cambios metabólicos resultantes de una pobre utilización del fósforo debida al parasitismo. El molibdeno también tiene una influencia sobre las infecciones por nematodos gastrointestinales, bien por acción directa del mismo sobre el metabolismo de los nematodos o por favorecer la respuesta inflamatoria en la mucosa (Suttle y col., 1992). Por otra parte existe escasa información sobre la influencia del cobalto y del selenio. Chandra y Sarchielli (1993) determinaron que el sistema inmune presenta requerimientos específicos de zinc sin embargo no se ha investigado la influencia de éste sobre los animales parasitados.

5.3.2. Influencia de la nutrición en los animales adultos

Los efectos de la suplementación de nutrientes y en concreto de la proteína metabolizable sobre animales infectados por nematodos gastrointestinales y con déficit nutricional, dependerán de las prioridades del organismo para su propio mantenimiento. Cuanta mayor prioridad tenga una función en el organismo de menor forma se verá afectada por el estado nutricional del animal (Coop y Kyriazakis, 1999). Todas las funciones que garanticen la supervivencia del individuo a corto plazo se ven encuadradas como funciones de mantenimiento como el mantenimiento de la masa muscular o la reparación de las lesiones causadas por la infección de los parásitos. Sin embargo, ya que algunos aspectos de la respuesta inmune de los animales parasitados se ven afectados por cambios en la ingesta de la proteína metabolizable (Holmes y Coop, 1994), no se considerará ésta una función como de mantenimiento.

A diferencia de los animales jóvenes, una vez adquirida la inmunidad, tanto el crecimiento como la reproducción tienen prioridad de las demandas nutritivas sobre la adquisición de la inmunidad. Este hecho se cree que es debido a que las funciones de mantenimiento aseguran la conservación del material genético del hospedador (Coop y Kyriazakis, 1999).

5.3.2.1. Influencia de la nutrición durante el parto

Respecto a la función reproductiva, se ha observado que durante el parto las ovejas infectadas ven disminuida la expresión de la respuesta inmune, especialmente frente a los nematodos gástricos (Barger, 1993). Tanto al final de la gestación como durante la lactación, los animales tienen elevadas necesidades de proteína metabolizable; debido a ello existe una escasez de nutrientes que no se suele subsanar con la ingesta diaria de alimentos (Houdijk y col., 2001). Finalmente, al cubrirse estas necesidades proteicas, el nivel de inmunidad a la infección se restablece por lo que existe la hipótesis de que la deficiencia de la expresión de la inmunidad durante el parto tiene una base nutricional. En un trabajo reciente (Houdijk y col., 2005) se compararon dos grupos de ovejas infectadas por *T. circumcincta*, uno con una elevada

ingesta de proteína durante el parto y el otro con escasez de proteína en la dieta. Los resultados demuestran que la suplementación de la dieta con proteína permite un aumento tanto de los leucocitos como de las IgE en plasma; es decir, se produce una mejora en la expresión de la inmunidad.

En un trabajo llevado a cabo por Donaldson y col. (1997), se infectaron un grupo de ovejas durante la gestación y comienzo de la lactación a la vez que se les administró unas raciones de proteína no degradable en la dieta. El resultado del experimento fue que los animales con altos niveles de proteína en la dieta presentaron una menor excreción de huevos con las heces y una menor carga parasitaria. Además, se determinó que el mantenimiento de la resistencia durante el parto está íntimamente relacionado con un aumento proteico en la dieta y no con un mayor aporte de energía. Kahn y col. (2003a, 2003b) también comprobaron cómo regular la resistencia a la infección mediante la alimentación proteica y la selección de animales en ovejas Merinas durante el parto. La importancia de la disponibilidad de la proteína fue confirmada en otro estudio realizado por Houdijk y col. (2000). En este ensayo, ovejas infectadas por *T. circumcincta* se alimentaron con dietas de un mismo aporte energético pero con distintos niveles de proteína, uno alto y otro bajo, durante la gestación y la lactación. Al final del estudio los animales que habían ingerido la dieta con alto contenido proteico presentaban un mayor número de formas inmaduras y un mayor número de leucocitos en la mucosa gástrica. Además, la excreción de huevos con las heces se mantuvo estable en los animales con altos niveles de proteína pero no fue así en el otro grupo donde aumentaron durante la lactación.

Valderrábano y col. (2006) estudiaron cómo afectaba un mayor aporte nutricional en ovejas infectadas con *H. contortus* durante el parto y observaron que los animales con una alimentación *ad libitum* presentaron un mejor desarrollo de la inmunidad frente a la infección representado por una mayor eosinofilia que las ovejas alimentadas por debajo de sus necesidades nutricionales.

Previamente a la gestación ha de tenerse en cuenta otro factor determinante que tiene un efecto sobre la suplementación proteica durante el parto en ovejas

infectadas, la composición corporal proteica del animal. Aproximadamente, el 25% de las reservas proteicas pueden ser movilizadas durante este periodo para sustentar la lactación y favorecer la expresión de la respuesta inmune (Jessop, 1997). La influencia de este factor fue confirmada también por Houdijk y col. (2005) en un estudio en el que se afirmaba la importancia de la proteína corporal pero no de las reservas grasas del animal.

También se ha demostrado que la producción de leche tiene prioridad frente al reparto de proteína metabolizable antes que la expresión de la inmunidad en ovejas infectadas y durante el peripato. Esta prioridad la estudió Houdijk y col. (2003) en distintos grupos de ovejas infectadas experimentalmente por *T. circumcincta* a las cuales se les administraba hasta cinco niveles distintos de proteína metabolizable. Los resultados describieron que los primeros incrementos de proteína resultaban en un aumento gradual en la producción de leche; sin embargo, solamente las ingestas más elevadas de proteína conseguían una reducción de la carga parasitaria tras mantener constante un estado de producción de leche máximo.

6. Inmunoprolifaxis

La resistencia antihelmíntica de los nematodos a ciertos fármacos así como los residuos que dejan algunos medicamentos en el medio ambiente, han impulsado el desarrollo de vacunas frente a los parásitos como método de control de estos.

Todos los trabajos sobre el desarrollo de vacunas se basan en el estudio de la respuesta inmune del hospedador a los parásitos, en la naturaleza de los componentes de la respuesta del hospedador, en el estadio parasitario con que se podría desarrollar la vacuna y, más recientemente, en la identificación de antígenos parasitarios responsables de producir una protección en el hospedador. Sin embargo, el desarrollo de vacunas basadas en la estimulación de la respuesta inmunitaria del hospedador a través de antígenos no es sencillo. Esto es debido a que no existe un único componente responsable de la respuesta protectora y a que es difícil inducir una adecuada protección en localizaciones determinadas donde se encuentra el parásito como puede ser la

mucosa gástrica. En consecuencia, los estudios se han centrado en el estudio de la respuesta del hospedador frente a proteínas del parásito que son fácilmente accesibles a los anticuerpos como son los antígenos de excreción-secreción, los de la cutícula o, en caso de las especies hematófagas, las proteínas que se expresan en el tracto gastrointestinal.

6.1. Naturaleza de los antígenos vacunales

Hasta la fecha los antígenos que se utilizaban como vacunas eran de naturaleza proteica, pero debido a la dificultad de encontrar proteínas protectoras las investigaciones se están centrando en la búsqueda de otras sustancias, por ejemplo, glucanos como antígenos vacunales.

6.1.1. Proteínas

Las proteínas fueron la primera elección de la mayoría de los investigadores a la hora de buscar candidatos como antígenos vacunales. La justificación está basada en dos características esenciales de las mismas. En primer lugar, las proteínas son moléculas relativamente fáciles de identificar, modificar y producir en grandes cantidades gracias a la biología molecular. En segundo lugar, muchas proteínas juegan un papel importante en el metabolismo de los parásitos por lo que deberían de ser buenas dianas a atacar por parte del sistema inmune del hospedador (Hein y Harrison, 2005).

La pobre selección de proteínas diana, la inapropiada expresión de proteínas recombinantes y la falta de conocimientos sobre cómo inducir una respuesta protectora eficaz dan lugar a una serie de fracasos en el desarrollo de vacunas eficaces.

6.1.2. Glucanos

Los parásitos poseen un amplio rango de moléculas carbohidratadas muchas de las cuales presentan similitud con glucanos de mamíferos o bien son específicas de cada

parásito (Khoo y Dell, 2001; Nyame y col., 2004). Variaciones en los patrones de interacción entre dos moléculas, tal como la composición del azúcar terminal, produce una gran variedad en los epítomos que darán lugar a una respuesta de anticuerpos (Khoo y Dell, 2001). Los glucanos, además de inducir una respuesta inmune, son útiles en el diagnóstico de las infecciones y pueden también modular la inmunidad en el hospedador hacia una respuesta Th2 con un notable incremento de la IgE (Tawill y col., 2004).

Vervelde y col. (2003) estudiaron la respuesta inmune que inducía un glucano presente en el antígeno de excreción-secreción de adultos de *H. contortus* así como su significativo papel protector frente reinfecciones. Previamente, Van Die y cols (1999) propusieron a la IgE como el mecanismo inmunitario de mayor importancia frente a los glucanos ya que interaccionaba directamente con los epítomos de estos. Otros estudios, como los realizados por Harrison y col. (2003), comprobaron el desarrollo de una inmunidad pasiva gracias a la protección de ovejas con un glucano larvario de los antígenos de superficie de *T. colubriformis*. La especificidad de la respuesta inmune era tal que los anticuerpos presentes en la mucosa gastrointestinal frente a los glucanos de superficie de la larva infectante no están presentes en otros estadios del parásito. Del mismo modo, anticuerpos frente a una molécula de naturaleza no proteica similar a la anterior se encontraron en ovejas resistentes a la infección por *T. circumcincta* y producidos por células linfoides gástricas (Balic y col., 2003). Estos estudios demuestran que tales antígenos de superficie de las LIII contribuyen a la inmunidad del hospedador previniendo el asentamiento de nuevas larvas ya que no se expresan en los estadios posteriores como son las LIV y los adultos.

6.2. Caracterización de antígenos protectores

Los rápidos avances en la biología molecular han dado lugar a un gran desarrollo en la producción de vacunas para poder controlar a la mayoría de las infecciones producidas por nematodos y trematodos. La producción de vacunas depende de numerosos factores y el determinante es la disponibilidad de material parasitario a partir del cual se obtiene antígeno suficiente para poder extraer el ARNm. Gracias a las

técnicas del ADN recombinante se pueden aislar fragmentos de ADNc que codifican para unas proteínas determinadas que serán utilizadas como proteínas antigénicas en el desarrollo de futuras vacunas.

6.2.1. Antígenos de la superficie larvaria

Los antígenos presentes en la superficie de las larvas de los nematodos gastrointestinales han sido identificados gracias a la interacción existente entre estos y los anticuerpos producidos por los ganglios linfáticos que drenan en el lugar de infección del parásito, como ocurre en *T. circumcincta* (Meeusen, 1995) y *H. contortus* (Jacobs y col., 1999). Los anticuerpos producidos por los ganglios linfáticos de ovejas infectadas con *H. contortus* reconocían antígenos de LIII con un tamaño entre 44-48 KDa y una zona difusa de 70-83KDa. Posteriormente, las zonas reconocidas se purificaron por inmutofinidad utilizando los anticuerpos como ligandos (Bowles y col., 1995) y un antígeno de la cutícula de LIII, HcL3, fue purificado para su posterior uso como vacuna. El resultado de la vacunación de ovejas de la raza Merina con HcL3 fue una reducción del 64-69% en el número de hgh y del 45-55% en la carga parasitaria (Jacobs y col., 1999).

Estudios similares han sido realizados para identificar antígenos de tamaño 26-36 KDa de *T. circumcincta* y de *T. colubriformis* (Meeusen, 1996). Proteínas de *T. circumcincta* purificadas de geles inducían una reducción en la excreción fecal de huevos del 40-60% cuando se administraban conjuntamente con Quil-A como adyuvante (McGillivray y col., 1992). A partir de la inmunización con una de estas proteínas, de 31-33 KDa, se obtuvieron anticuerpos monoclonales con los que se identificaron fragmentos de ADNc que codificaban secuencias repetidas de galectinas (Newton y col., 1997). Clones de galectinas también han sido estudiados en *T. colubriformis* por Greenhalgh y col. (1999) ya que son secuencias que se encuentran muy conservadas.

6.2.2. Antígenos de excreción-secreción

Se han purificado antígenos de excreción-secreción de LIII y adultos de *H. contortus* y *T. colubriformis* para su posterior uso como agentes protectores en distintos ensayos (Emery, 1996). La creación de genotecas de ADNc y su posterior “mapeo” han detectado proteínas de excreción-secreción de *T. colubriformis* con gran homología al interferón- γ humano (Dopheide y col., 1991), a globinas de insectos y de humanos (Frenkel y col., 1992) y a un péptido intestinal porcino (Savin y col., 1990). Proteínas recombinantes de estos antígenos han producido niveles de protección del 30-70% en infecciones experimentales (Emery, 1996).

En *H. contortus*, Shalling y col. (1994) purificaron dos antígenos de 15 y 24 KDa respectivamente, los cuales fueron reconocidos por animales infectados. Ensayos de protección posteriores con ambos antígenos demostraron una reducción del 77% en la excreción fecal de huevos y del 85% en la carga parasitaria (Schallig y Van Leeuwen, 1997). Ambas proteínas son exclusivas de LIV y adultos y presentan una gran homología con antígenos de excreción-secreción de *T. colubriformis* y *Ancylostoma caninum*.

6.2.3. Antígenos del tracto gastrointestinal

La mayoría de los antígenos protectores que se han descrito hasta la fecha forman parte del intestino de nematodos hematófagos de ovejas y cabras, como es el caso de *H. contortus*.

Uno de los antígenos más estudiado hasta la fecha es la proteína H11 que se encuentra en las microvellosidades del intestino de las larvas IV y adultos de *H. contortus*. Este antígeno de lugar a una alta protección ya que consigue una reducción del 90% del número de parásitos adultos presentes en el hospedador (Smith y col., 1993).

El complejo proteico H-gal-GP, formado por una galactosa que contiene una glucoproteína, fue descubierto por Smith y col. (1994) en la superficie intestinal de adultos de *H. contortus*. Este complejo da lugar a una elevada protección en los animales vacunados ya que disminuye hasta el 72% del total de parásitos y hasta el 93% de los huevos eliminados con las heces (Smith y col., 1994).

También se han descrito proteasas en adultos de *H. contortus* con capacidad de degradar una gran variedad de proteínas de la sangre y componentes de la matriz extracelular (Knox y col., 1993). Knox y col. (1999a) realizaron vacunaciones de ovejas con una de las proteasas enriquecida al pasarla a través de una columna de afinidad de tiol-agarosa. El resultado del ensayo fue una reducción del 77% de la excreción fecal de huevos y del 50-85% en el número total de parásitos.

7. Caracterización de la proteína disulfuro isomerasa (PDI)

El componente humoral del sistema inmune de las mucosas está constituido principalmente por IgA e IgM. El modo de acción de tales anticuerpos es la eliminación de los patógenos mediante la unión a antígenos de superficie o bien previenen la adherencia de los patógenos a las células epiteliales (Bouvet y Fischetti, 1999). En un intento por diagnosticar las infecciones a través del título de las IgA, Meek y col. (2000) buscaron distintos antígenos de *Toxoplasma gondii* que reaccionaran frente las IgA de lágrimas de humanos. El resultado final fue que las IgA reconocieron antígenos de 49, 70 y 74 KDa de *T. gondii* y, de entre todos ellos, el correspondiente con un peso molecular de 49 KDa se identificó como una proteína disulfuro isomerasa (PDI) (Meek y col., 2002).

En los nematodos, la mayoría de los trabajos realizados sobre las PDI se han realizado en *Caenorhabditis elegans* en el que se han descrito dos PDI. Ambas proteínas juegan un papel importante en la formación del colágeno cuticular (Page, 2001). Otras PDI también han sido descritas en *Onchocerca volvulus* (Wilson y col., 1994), *Ancylostoma caninum* (Epe y col., 1998), *Dirofilaria immitis* (Chandrashekar y col., 1998) y *Ostertagia ostertagi* (Geldhof y col., 2003). Sin embargo, en todas ellas el

papel de la formación del colágeno no ha sido demostrado; aun así, se han encontrado altas homologías (hasta el 78 %) ente la Ost-PDI2 descrita en *O. ostertagi* y la enzima PDI2 de *C. elegans* (Geldhof y col., 2003).

7.1. Localización

Geldhof y col. (2003) localizaron la proteína PDI2 de *O. ostertagi* mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoespecíficos frente a ésta. En los parásitos adultos la proteína fue localizada en la hipodermis, en el intestino y en la faringe. En similares localizaciones se encontró en las LIV y en células del intestino en las LIII. La localización de la PDI en la hipodermis sugiere que presenta un papel en la formación del colágeno de la cutícula.

Finken y col. (1994) encontraron un patrón de expresión de una PDI en *Schistosoma mansoni* muy similar al anterior así como también en *A. caninum* (Epe y col., 1998). Sin embargo, en ambos casos no está tan claro el papel que puede desempeñar la enzima en el intestino.

Levy y col. (2001) demostraron la presencia de una PDI en el intestino humano donde forma parte del complejo enzimático MTP (proteína transportadora de triglicéridos microsomal). Dicho complejo interviene en la secreción de apolipoproteína B (Wang y col., 1997) en humanos; sin embargo, en nematodos no se ha descrito aunque existe un gen de *C. elegans* que codifica para una proteína homóloga al complejo MTP. Este hecho podría sugerir la presencia de un sistema transportador lipídico en el intestino de los nematodos del cual forma parte una PDI.

7.2. Estructura

Todas las proteínas disulfuro isomerasa (PDIs) contienen un dominio en común con una estructura $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ que se corresponde con el dominio conocido como tiorredoxina (Kemink y col., 1996). El núcleo del dominio está formado por 5

subunidades β paralelas entre sí a excepción de la β_4 , que se encuentra rodeando a las 4 hélices α (Kemink y col., 1997).

Las proteínas contienen dos segmentos con una homología del 47% entre ambas y que se denominan la región a, de la posición 9 a la 90 de la secuencia aminoacídica, y la región a', de la posición 353 a la 431. Entre ambas se encuentran las regiones b y b' correspondientes con los aminoácidos 153-244 y 256-343 y que presentan una homología del 28% entre ambas (Edman y col., 1985). Al principio de la secuencia a y a' se encuentran secuencias aminoacídicas altamente conservadas que contienen dos cisteínas separadas por una glicina y una histidina. Posteriormente, estas secuencias se identificaron como el centro activo de la enzima (LaMantia y Lennarz, 1993; Lyles y Gilbert, 1994).

La composición aminoacídica del dominio de tiorredoxina contiene la secuencia -WCGHC- la cual constituye el centro activo de la enzima que cataliza las reacciones (Freedman y col., 1994). Dentro de la secuencia, ambas cisteínas son imprescindibles para la actividad isomerasa y oxido-reductasa de la enzima (Clissold y Bicknell, 2003) ya que en algunas ocasiones la segunda cisteína ha sido sustituida por una serina y en consecuencia la enzima ha perdido su actividad isomerasa (Walker y col., 1996). Todas las PDIs contienen un dominio de tiorredoxina que representa el centro activo de la enzima y otro dominio que no cataliza las reacciones y cuya función se relaciona con el reconocimiento de péptidos. En algunos casos coexiste el dominio funcional con uno o más dominios de unión a péptidos (Kemink y col., 1997).

El dominio de la tiorredoxina se ha encontrado en un número de familias de enzimas implicadas en el metabolismo del sulfuro. Muchas de estas enzimas comparten el dominio Cys-X-Y-Cys y presentan una función similar. Los residuos entre ambas cisteínas varían entre las familias y determinan la función de las enzimas. Debido a ello, enzimas con estructura similar pueden actuar como reductoras, como las tiorredoxinas (-CGPC-) u oxidantes, como las isomerasas (-CPHC-) (Gane y col., 1995; Chivers y col., 1997).

El marco de lectura de la PDI2 de *O. ostertagi* contiene una secuencia C-terminal, -HTEL (Geldhof y col., 2003), que representa una señal de retención de la enzima en el retículo endoplasmático de las células. En otros organismos aparecen otras secuencias terminadoras como -KEEL, en *T. gondii* (Clissold y Bicknell, 2003) o -KDEL (Okamoto y col., 2001) que indican la presencia de la enzima en la misma localización. Por el contrario se ha encontrado la PDI en antígeno de excreción-secreción de LIV y adultos de *O. ostertagi* (Geldhof y col., 2003) por lo que Andres y col. (1991) sugirieron que eran necesarios más factores para la retención de la PDI en el retículo endoplasmático. Otra evidencia de la presencia de la PDI a nivel extracelular es la unión de ésta con la IgA como ha descrito Meek y col., (2002) en infecciones por *T. gondii*. El hecho es que la PDI es retenida en el retículo endoplasmático pero en células con elevada actividad secretora donde el sistema de retención pueda verse saturado la PDI atraviesa la membrana citoplasmática (Freedman y col., 1994). De esta forma estudios han demostrado la secreción de esta proteína por parte de los hepatocitos (Terada y col., 1995), células pancreáticas exocrinas (Yoshimori y col., 1990), células endoteliales (Hotchkiss y col., 1998) y plaquetas (Chen y col., 1992).

7.3. Función

La primera descripción de una PDI la realizaron Goldberger y col. (1963) y determinaron su papel modulador en la formación de los puentes disulfuro. Además de su función oxidorreductasa, la PDI también interviene en el plegamiento de otras proteínas recién formadas actuando como una chaperona (Frand y col., 2000).

La PDI es capaz de catalizar tanto la oxidación como la reducción de los puentes disulfuro bajo condiciones fisiológicas así como la isomerización de los mismos. La base de actuación de las PDI es el centro activo constituido por el dominio de tiorredoxina el cual por sí mismo realiza la actividad catalítica mediante el intercambio tiol-disulfuro (Hawkins y Freedman, 1991). El estado redox del centro activo determina la dirección de la catálisis; la oxidación del sustrato requiere la conversión del centro activo de disulfuro a ditiol mientras que la reducción del sustrato requiere la conversión

de ditiol a disulfuro. En cada centro activo la cisteína N-terminal se expone en la superficie y reacciona con el sustrato (Hawkins y Freedman, 1991).

Mediante ensayos con mutaciones se ha determinado que las regiones a y a' actúan de forma independiente (Vuori y col., 1992). Se ha demostrado que una catálisis eficiente requiere de más dominios además de los a y a'. Estudiando cada uno de los dominios de forma individual Darby y col. en 1998 demostraron la presencia del dominio b como parte esencial para la realización de las catálisis. Además demostraron que para llevar a cabo las reacciones de oxidación se requiere solamente de los dominios a y a', en las reacciones de isomerización simples del dominio b' y de a o de a' mientras que para las reacciones de isomerización en las que se requiera un cambio conformacional se necesita de toda la proteína.

Además de este papel en la formación de puentes disulfuro la PDI también cataliza reacciones ayudando al plegamiento de otras proteínas, es decir actúan como chaperonas. Dicha función es independiente de la función anteriormente descrita como se ha demostrado *in vitro* (Cai y col., 1994). Además la PDI con su sitio activo inactivado es capaz de llevar a cabo esta función demostrando así la independencia de ambas acciones. La actividad chaperona depende de la capacidad de unir o interactuar con los péptidos. Sin embargo, en sustratos con residuos de cisteína la interacción es mayor posiblemente a la formación de puentes disulfuro entre la PDI y el sustrato (Morjana y Gilbert, 1991). El primer trabajo acerca de la secuencia de la PDI donde se producía la unión del péptido a la misma fue llevada a cabo por Noiva y col. (1993) e indicaron el lugar de unión al final del dominio a'.

Objetivos

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos pretendido establecer criterios y métodos de identificación de animales resistentes a la infección por *Teladorsagia circumcincta* en ovinos de raza Churra seleccionados en función de parámetros parasitológicos e inmunitarios.

Durante el desarrollo del trabajo se han intentado establecer los siguientes aspectos:

✓ Demostración de la relación existente entre el título de inmunoglobulina A tras una infección producida por *T. circumcincta* y la resistencia a la infección en ovejas de raza Churra. La resistencia a la infección se demostró mediante diversos parámetros: desarrollo del parásito en el hospedador; excreción de huevos con las heces; porcentaje de eosinófilos en sangre.

✓ Influencia de la nutrición sobre la resistencia a la infección en ovejas Churras infectadas experimentalmente por *T. circumcincta*. La influencia de la proteína en la dieta sobre el desarrollo de la inmunidad se determinó experimentalmente administrando a los animales una dieta hipoproteica.

✓ Desarrollo de una proteína recombinante con fines diagnósticos de la infección por *T. circumcincta*. El diagnóstico se realiza por medio de la detección de la inmunoglobulina A en ovejas resistentes y susceptibles a la infección. La finalidad es mejorar una prueba de ELISA a través de la expresión de un antígeno proteico del nematodo.

✓ Comparación de dos técnicas de detección de animales resistentes a la infección por *T. circumcincta*. Mediante la técnica del ELISA se comparó el título de inmunoglobulina A frente antígeno somático de *T. circumcincta* o bien frente a un fragmento de la proteína recombinante disulfuro isomerasa en sangre, secreciones nasales y saliva.

Trabajos Publicados

**GENETIC RESISTANCE TO *Teladorsagia*
circumcincta: IgA AND PARAMETERS AT
SLAUGHTER IN CHURRA SHEEP**



M. Martínez-Valladares, M.P. Vara-Del Río, M.A. Cruz-Rojo, F.A. Rojo-Vázquez.

Dpt. Sanidad Animal, Parasitología. Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

24071 León, Spain. dsammv@unileon.es

Short running title: IgA and genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*.

Keywords: *Teladorsagia circumcincta*; Sheep; Churra; IgA; Immunity; Antigens.

Parasite Immunology, 2005, 27, 213 -218.

Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep

M. MARTÍNEZ-VALLADARES, M. P. VARA-DEL RÍO, M. A. CRUZ-ROJO & F. A. ROJO-VÁZQUEZ

Departamento Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain

SUMMARY

Previous experiments have shown that genetic resistance to infection by *Teladorsagia circumcincta* in sheep can be measured by the level of IgA in gastric mucus, jointly with other parameters. The aim of this study has been to observe the influence of IgA on adult worms. The experiment was carried out with Churra sheep experimentally infected with *T. circumcincta*. At slaughter, gastric content, gastric mucus, blood samples and faeces were recovered to determine the number of eggs in utero, length of adult females, worm burden, number of L4, titre of serum pepsinogen, peripheral eosinophilia and eggs per gram (epg). IgA activity in gastric mucus, serum, nasal secretions and saliva were tested against somatic antigen from fourth-stage larvae (L4), somatic antigen from the adult stage and excretory–secretory (E/S) antigen from the adult stage. The results showed a significant correlation between serum IgA and gastric mucus ($P < 0.01$) as well as in nasal secretions ($P < 0.01$). We found negative correlations between IgA activity in gastric mucus with the eggs in utero and with adult female length. Furthermore there were also strong relationships between the peripheral eosinophilia with serum ($P < 0.01$) and gastric mucus IgA activity ($P < 0.01$). Moreover serum pepsinogen and the number of L4 at slaughter were related ($P < 0.01$).

Keywords antigens, Churra, IgA, immunity, sheep, *Teladorsagia circumcincta*

INTRODUCTION

The interest in genetic resistance of ruminants to the gastrointestinal nematodes is partly due to the development of resistance to anthelmintics and the absence of suitable vaccines. Some countries, Australia and New Zealand, have selected sheep that are resistant to *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* (1). Many parameters must be taken into consideration to measure the resistance to infection, such as the number of eggs per gram of faeces (epg), the weight gain, the serum pepsinogen, peripheral eosinophilia, the titre of antibodies, and the worm burden at slaughter. According to Stear *et al.* (2) the major manifestation of resistance in weaned lambs appears to be the inhibition or retardation of nematode growth and development. The number of epg of faeces in sheep before slaughter has been found to be highly correlated with the worm burden (3).

Studies carried out by Stear *et al.* (4) have shown that animals with a high titre of IgA in the serum had fewer eggs in the faeces, smaller adult females and an increase in the number of fourth stage larvae. The titre of IgA, in serum and in gastric mucus, has been studied by Strain *et al.* (5) in order to select animals genetically resistant to infection by *T. circumcincta*.

The purpose of this article has been to confirm the direct relationship between IgA and adult worm in Churra sheep and find new associations between the immunoglobulins in gastric mucus with other parameters that can be measured *in vivo*. The antibody response has been tested against L4 somatic antigen, somatic antigen of adults and E/S antigen of adult stage to compare the indirect ELISAs.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

The study was carried out with 22 adult Churra ewes kept indoors during the whole experiment in The Farm of The University of León. The animals were selected from a farm

Correspondence: F. A. Rojo-Vázquez, Departamento Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain (e-mail: dsafvr@unileon.es).

Received: 15 April 2005

Accepted for publication: 10 June 2005

('Bonisa'), of some 1500 animals, according to their faecal counts during the previous 2 years. At the beginning of the assay, the 22 ewes were assigned at random in two groups of 11 each.

Once all ewes were indoors, they were treated with albendazole (ABZ) (7.5 mg/kg). On day 0 of the experiment the animals were experimentally infected with a dose of 30 000 L3 of *T. circumcincta*. One week post-infection, the experimental animals were treated again with ABZ and 7 days later, they were challenged with 60 000 L3. At the end of the study, 42 days after the challenge, the ewes were slaughtered with an intravenous injection of pentobarbital (10–30 mg/kg) ('Dolethal', Vetoquinol). Immediately afterwards, samples of faeces, blood, nasal secretions and saliva were taken from each ewe. At necropsy we recovered the gastric content to determine the worm burden, and samples of gastric mucus to measure the optical densities (OD) of IgA.

Animal sampling

Faeces were collected directly from the rectum; the number of faecal eggs was counted using a modified McMaster method according to the Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques (6).

Blood samples were taken into evacuated glass tubes (Venoject), without anticoagulant to obtain serum and with anticoagulant (EDTA) to estimate the number of leucocytes (cellular counter, CELTAC® model MK-2154) and the percentage of eosinophils in the blood. The serum samples were stored at -20°C until measurement of the serum pepsinogen and the OD of IgA.

Serum pepsinogen was measured following the method described by Edwards *et al.* (7).

Nasal secretions were taken by introducing cotton swabs into the nostril of each sheep. Afterward, the swabs were placed into a test tube containing 2.2 mL of PBS. Then, the test tubes were shaken to dissolve the secretions in the PBS and were stored overnight at 4°C . The swabs were taken away and the tubes were centrifuged at 1000 g, storing the supernatant at -20°C . The samples of saliva were collected with the same protocol, except for introducing the cotton swabs into the buccal cavity.

At necropsy, recovery of the gastric contents, collection of adult worms and digestion of gastric mucus to recover L4 were carried out following the method described by Armout *et al.* (8). Ten percent of the total gastric content was counted to estimate the worm burden per animal. The number of L4 per animal was estimated by counting 10% of larvae collected from the gastric digestion.

The lengths of 50 adult females recovered from the 10% of the total gastric content were measured by an image

analysis computer program, 'Olympus DP-Soft'. The recount of the eggs *in utero* of the first 50 female adults was carried out with an optical microscope, 'Olympus'.

The samples of gastric mucus were collected by scraping on the surface of the abomasum with a glass microscope slide. Afterward samples were stored at -20°C until processing with inhibiting proteases as described by Sinski *et al.* (9).

Titre of IgA

An indirect ELISA was carried out to determine the OD of IgA in gastric mucus, serum, nasal secretions and saliva.

ELISAs were carried out against somatic antigen of L4, adult worm somatic antigen and E/S antigen of the adult stage. The preparation of somatic extracts from L4 and somatic adult stage were carried out as described Strain *et al.* (10). The E/S antigen of the adult stage was obtained as Sinski *et al.* (9) described for the preparation of excretory-secretory products from L4.

Microtitre plates (Sigma) were coated with 100 μL of PBS that contained 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antigen; plates were stored overnight at 4°C . After discarding the contents, plates were blocked with 250 μL PT-Milk (4 g powdered milk +100 mL PBS-Tween) (PBS-Tween: 1 L PBS pH = 7.4 + 1 mL Tween) for 30 min at 37°C . Then, the blocking buffer was discarded and 100 μL serum were added. Sera were diluted in PT-Milk: 1/20 gastric mucus, 1/10 serum, 1/20 nasal secretions and 1/3 saliva. Plates were incubated for 30 min at 37°C . After washing the plate four times with PBS-Tween, 100 μL of a sheep anti-IgA, obtained in mouse (Serotec), at a dilution of 1/150 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C . After a further four washes in PBS-Tween, 100 μL of mouse anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) at 1/500 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C . Then plates were washed again four times with PBS-Tween. Plates were developed by adding 100 μL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ('BluePhos Microwell', KPL). Plates were incubated for a further 30 min at 37°C . The absorbance was measured at 635 nm in a spectrophotometer. Positive and negative controls were included in every plate.

Statistical analyses

The data were analysed using the statistical computer package for social science, SPSS. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determinate if data were normally distributed. Faecal egg counts were transformed to $\text{Ln}(x + 1)$ to produced approximately normally distributed data. Correlations between the parameters at slaughter were obtained with Pearson's coefficient.

RESULTS

Tables 1–4 show the different correlations found between the parameters at slaughter.

Table 1 shows the correlations of the OD of IgA with an indirect ELISA carried out with L4 somatic antigen. There were high positive correlations between gastric mucus IgA and serum IgA ($P < 0.01$). Moreover gastric mucus IgA was negatively correlated with the number of eggs *in utero* ($P < 0.01$) and also with the length of females ($P < 0.01$), but positively correlated with peripheral eosinophilia ($P < 0.01$). The ODs of serum IgA are thus associated with the nasal secretions IgA ($P < 0.01$) and with the peripheral eosinophil numbers ($P < 0.01$), but not so strongly with the mean of eggs *in utero* of the females ($P < 0.05$).

Table 2 shows the correlations of the IgA against somatic antigen from the adult stage. The results were similar to those with activity against L4 but somewhat weaker. The gastric mucus IgA shows a new negative correlation with the epg ($P < 0.05$) and the nasal secretions and saliva IgA have a good association ($P < 0.01$).

Table 3 shows the associations between the same parameters but against E/S antigen of the adult stage. The only significant correlations were found between serum IgA with nasal secretions IgA ($P < 0.01$) and gastric mucus IgA ($P < 0.01$), and between nasal secretions with saliva IgA ($P < 0.01$).

Table 4 shows the correlations between the remaining parameters measured after the necropsy: number of eggs *in utero*, length of females, worm burden, number of L4, serum pepsinogen, peripheral eosinophil and epg. The higher the number of eggs *in utero*, the longer the length of females ($P < 0.01$), the lower the number of L4 ($P < 0.05$), the lower the level of pepsinogen ($P < 0.05$) and the higher the epg in faeces ($P < 0.05$). The level of serum pepsinogen was moderately and negatively correlated with the length of adult females ($P < 0.05$) but had a positive association with the number of L4 in gastric mucus ($P < 0.01$). Moreover, the higher the egg output, the higher the worm burden ($P < 0.05$) and the lower the peripheral eosinophilia ($P < 0.01$).

DISCUSSION

Resistance to infection by gastrointestinal nematodes is believed to be at least partly immunologically mediated (11). The importance of IgA was first reported by Smith *et al.* (12) who first found an association between a rise in the response of IgA in the lymphocytes and a reduction in adult length. Subsequently Stear *et al.* (4) found a high correlation between the activity of IgA in gastric mucus, against antigen of L4, and a reduction in the female length of *T. circumcincta*.

In the present study we have compared three different ELISAs to determine the best correlations between the

Table 1 Correlations between parameters at slaughter and OD of IgA (indirect ELISA against somatic antigen from LIV)

	Serum IgA	Nasal secretions IgA	Saliva IgA	Gastric mucus IgA	Mean number of eggs per female	Mean adult females length	Adult worm burden	No. of fourth stage larvae	Pepsinogen	Peripheral eosinophilia	Ln(epg + 1)
Serum IgA	1	0.6**	0.035	0.719**	-0.44*	-0.313	-0.036	0.124	-0.08	0.514**	-0.263
Nasal secretions IgA		1	0.248	0.291	-0.312	-0.116	-0.219	0.288	0.076	0.392	-0.477*
Saliva IgA			1	-0.306	0.16	0.373	-0.284	-0.178	-0.275	0.007	-0.207
Gastric mucus IgA				1	-0.71**	-0.552**	0.176	0.137	0.224	0.588**	-0.312

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 2 Correlations between parameters at slaughter and OD of IgA (indirect ELISA against somatic antigen from adults)

	Serum IgA	Nasal secretions IgA	Saliva IgA	Gastric mucus IgA	Mean number of eggs per female	Mean adult females length	Adult worm burden	No. of fourth stage larvae	Pepsinogen	Peripheral eosinophilia	Ln(epg + 1)
Serum IgA	1	0.296	0.167	0.618**	-0.359	-0.218	-0.046	0.037	-0.213	0.444*	-0.28
Nasal secretions IgA		1	0.626**	0.071	-0.148	-0.003	-0.173	0.298	0.082	0.259	-0.466*
Saliva IgA			1	-0.127	-0.115	0.03	-0.084	0.275	-0.003	-0.082	-0.248
Gastric mucus IgA				1	-0.628**	-0.389	-0.049	0.139	0.278	0.522*	-0.485*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 3 Correlations between parameters at slaughter and OD of IgA (indirect ELISA against excretory-secretory antigen from adults)

	Serum IgA	Nasal secretions IgA	Saliva IgA	Gastric mucus IgA	Mean number of eggs per female	Mean adult females length	Adult worm burden	No. of fourth stage larvae	Pepsinogen	Peripheral eosinophilia	Ln(epg + 1)
Serum IgA	1	0.59**	0.399	0.779**	-0.121	-0.007	-0.215	-0.084	0.092	0.257	0.053
Nasal secretions IgA		1	0.623**	0.23	-0.08	0.002	-0.057	0.099	0.103	0.011	0.041
Saliva IgA			1	0.119	-0.315	-0.211	-0.41	0.294	0.316	-0.013	-0.232
Gastric mucus IgA				1	-0.221	-0.056	-0.084	-0.04	-0.048	0.299	0.031

Table 4 Correlations between number of eggs 'in utero', length of females, worm burden, number of L4, tittle of serum pepsinogen, peripheral eosinophil and epg

	Mean number of eggs per female	Mean adult females length	Adult worm burden	No. of fourth stage larvae	Pepsinogen	Peripheral eosinophilia	Ln(epg + 1)
Mean number of eggs per female	1	0.882**	-0.024	-0.491*	-0.503*	-0.419	0.438*
Mean adult female length		1	-0.021	-0.388	-0.531*	-0.273	0.18
Adult worm burden			1	0.237	-0.021	-0.122	0.502*
No. of fourth stage larvae				1	0.576**	0.171	-0.178
Pepsinogen					1	0.199	-0.148
Peripheral eosinophilia						1	-0.535*
Ln(epg + 1)							1

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

measurements at slaughter. The OD tested will depend on the amount of antibody present and the avidity and the affinity of the antibody for each component of the antigen preparation (9). The result of the current experiment was that the ELISA carried out against somatic antigen of L4 showed the strongest correlations with the parasitological parameters.

Some authors (4,5) have suggested that 38% of the variation in worm length is associated with variation in the mucus IgA response against L4. Our results are in agreement with them. We have observed that the higher the OD of immunoglobulins in gastric mucus, the lower the length of adult females ($P < 0.01$) and the lower the number of eggs *in utero* of adult females ($P < 0.01$). Kanobana *et al.* (13) also described this negative correlation in *Cooperia oncophora*. In addition, Stear *et al.* (14) and Stear & Bishop (15) demonstrated a high association between the number of the eggs *in utero* and the length of females, as we again confirmed in the current study. The retardation of development of *T. circumcincta* is mediated through local IgA responses, whereas resistance to the establishment of incoming larvae is mediated through immediate hypersensitivity (4).

In relation to epg in faeces, Stear *et al.* (4) suggested that the number of eggs *in utero* per female and the worm burden accounted for 54% of the variation of the faecal egg output. In our experiment we found a moderate relationship ($P < 0.05$) between these parameters.

There is a significant correlation between the level of the serum pepsinogen and the number of L4 ($P < 0.01$), probably because of the damage caused in the gastric mucus by the larvae. Stear *et al.* (4) demonstrated in a similar experiment that the number of L4 was associated with the worm burden and the local IgA response, and more recently Stear *et al.* (16) confirmed these data in naturally infected sheep. However, in the present study we did not find significant correlations between these parameters. In a previous assay done by Stear *et al.* (17), the results indicated that plasma pepsinogen was more strongly associated with the size of the worms rather than with their number; we verified these data in the current experiment but with moderate associations ($P < 0.05$). Murray *et al.* (18) suggested that large worms would cause more damage than smaller ones; in addition, large worms require more nutrients and release more E/S products than small worms. As a result, large worms cause greater disruption to the host tissue.

IgA in mucus has a stronger association with the number of recruited eosinophils compared to serum IgA (19). According to Kanoba *et al.* (13) a rise in mucus IgA coincides with an increase in the number of eosinophils. We verified not only the association between peripheral eosinophilia with IgA activity in the gastric mucus ($P < 0.01$), but also with serum IgA activity ($P < 0.01$); the strongest associations were against somatic antigen from L4.

Sinski *et al.* (9) found a weak relationship between parasite-specific mucus IgA and plasma IgA responses. In contrast, we found a stronger relationship between gastric mucus IgA and serum IgA ($P < 0.01$). The level of immunoglobulins in serum samples is also proportional to the activity in nasal secretions against somatic antigen from L4 ($P < 0.01$) and E/S antigen from adults ($P < 0.01$). Furthermore there is an association between the responses in nasal secretions and saliva against adult antigens of IgA ($P < 0.01$). These relationships of the levels of IgA in many samples need more studies to confirm them.

In conclusion, in our study the greatest associations were with somatic antigen from L4. The relationship of gastric mucus IgA with the length of adult females and with the number of eggs *in utero* was also confirmed. Furthermore we have found additional associations between serum and gastric mucus IgA, serum and nasal secretions IgA, and nasal secretion and saliva IgA. In addition, there were significant correlations between peripheral eosinophilia and serum and gastric mucus IgA against L4, and between serum pepsinogen and the number of L4.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof. M. Stear for his advice and assistance with the manuscript.

REFERENCES

- 1 Woolaston RR & Baker RL. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int J Parasitol* 1996; **26**: 845–855.
- 2 Stear MJ, Bairden K, Duncan JL *et al.* How hosts control worms. *Nature* 1997; **389**: 27.
- 3 Bisset SA, Vlassoff A, Douch PG, Jonas WE, West CJ & Green RS. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet Parasitol* 1996; **61**: 249–263.
- 4 Stear MJ, Bishop SC, Doligalska M *et al.* Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 1995b; **17**: 643–652.
- 5 Strain SAJ, Bishop SC, Henderson NG *et al.* The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 2002; **124**: 545–552.
- 6 Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Technique*, 3rd edn. London, GB: MAFF; 1986.
- 7 Edwards K, Jepson RP & Wood KF. Value of plasma pepsinogen estimation. *Br Med J* 1960; **1**: 30–32.
- 8 Armour J, Jarrett WFH & Jennings FW. Experimental *Ostertagia circumcincta* infections in sheep: development and pathogenesis of a single infection. *Am J Vet Res* 1996; **27**: 1267–1278.

- 9 Sinski E, Bairden K, Duncan JL *et al.* Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet Parasitol* 1995; **59**: 107–118.
- 10 Strain SA & Stear MJ. The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 163–168.
- 11 Miller HRP. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; **6**: 167–259.
- 12 Smith WD, Jackson F, Jackson E & Williams J. Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4 1/2- and 10-month-old lambs. *J Comp Pathol* 1985; **95**: 235–245.
- 13 Kanobana K, Ploeger HW & Vervelde L. Immune expulsion of the thichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. *Int J Parasitol* 2002; **32**: 1389–1398.
- 14 Stear MJ, Bairden K, Duncan JL *et al.* The distribution of faecal nematode egg counts in Scottish Blackface lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology*, 1995a; **110**: 573–581.
- 15 Stear MJ & Bishop SC. The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 1999b; **29**: 777–780.
- 16 Stear MJ, Bairden K, Innocent GT, Mitchell S, Strain S & Bishop SC. The relationship between IgA activity against 4th-stage larvae and density-dependent effects on the number of 4th-stage larvae of *Teladorsagia circumcincta* in naturally infected sheep. *Parasitology* 2004; **129**: 363–369.
- 17 Stear MJ, Bairden K, McKeller QA, Scott I, Strain S & Bishop SC. The relationship between the number and size of nematodes in the abomasum and the concentration of pepsinogen in ovine plasma. *Res Vet Sci* 1999a; **67**: 89–92.
- 18 Murray M, Jennings FW & Armour J. Bovine ostertagiasis: structure, function and mode of differentiation of bovine gastric mucosa and kinetics of the worm loss. *Res Vet Sci* 1970; **11**: 417–427.
- 19 Motegi Y, Kita H, Kato M & Morikawa A. Role of secretory IgA, secretory component and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; **122**: 25–27.

EFFECT OF A LOW PROTEIN DIET ON THE RESISTANCE OF CHURRA SHEEP TO

Teladorsagia circumcincta



M. Martínez-Valladares, M.P. Vara-Del Río, M.A. Cruz-Rojo, F.A. Rojo-Vázquez *.

Dpt. Sanidad Animal, Parasitología. Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

24071 León, Spain. dsammv@unileon.es

Short running title: Low protein diet and genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*.

Keywords: *Teladorsagia circumcincta*; Sheep; Churra; IgA; Immunity; Low protein diet; Genetic resistance.

Parasite Immunology, 2005, 27, 219 -225.

Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*

M. MARTÍNEZ-VALLADARES, M. P. VARA-DEL RÍO, M. A. CRUZ-ROJO & F. A. ROJO-VÁZQUEZ

Departamento Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain

SUMMARY

The aim of this study was to understand the influence of a low protein diet on the resistance of the Churra breed sheep to infection with *Teladorsagia circumcincta*. A previous experiment in our department demonstrated significant differences between resistant and susceptible sheep infected with *T. circumcincta*, in eggs per gram of faeces, serum pepsinogen, serum IgA and peripheral eosinophilia (unpublished). The sheep were fed with a balanced protein diet. In the current assay there were significant differences between the resistant and susceptible groups in egg output, serum pepsinogen and worm burden. The optical densities (OD) of the IgA in blood samples, nasal secretions and saliva were tested throughout the study and the differences between groups were not significant. At necropsy adult worm length, the number of eggs in utero in adult females, the number of fourth stage larvae and the OD of gastric mucus IgA did not differ between groups either. Moreover, due to diet there was a loss of weight in both groups but this was not significant. Our results support the view that low protein diets could influence immune function and as a result resistant genotypes do not show any superiority in comparison with susceptible ones.

Keywords Churra, genetic resistance, IgA, immunity, low protein diet, sheep, *Teladorsagia circumcincta*

INTRODUCTION

Gastrointestinal (GI) nematodes are a major cause of economic loss in ruminants throughout the world. The effects on productivity will be influenced by the species of nematode, age, immunological status and the nutritional status of the host (1). Control of GI nematodes in ruminants is largely based on suppressive or therapeutic use of drugs combined with grazing management strategies. The increasing prevalence of resistance to anthelmintics has led to the search for alternative control methods; the influence of nutrition on the host–parasite relationship in ruminants was considered a short-term alternative (2). The importance of the nutritional status is due to a competition between the demands for the available nutrients of growth, the repair of GI pathology and the immune response (3). Moreover, because of the protein nature of the components of the immune system, it is thought that during the infection there is an increase of the protein demands in diet for repairing the tissues and for the synthesis of plasma components (4).

The effectiveness of protein supplementation and genetic selection to enhance the resistance of sheep to infection by GI nematodes has been tested in some assays (5,6). Bricarello *et al.* (7), studying the interaction between the genotype and the nutritional status, observed that the protein supplementation on Santa Ines lambs (resistant breed) increased the resistance to *H. contortus*; however, on Ile de France lambs (susceptible breed) the protein diet did not improve the resistance to the infection.

In a previous experiment carried out in our department, we have demonstrated significant differences between two groups of Churra ewes – resistant and susceptible – to infection with *T. circumcincta*, and fed with a balanced diet, without any protein deficiency (unpublished). The differences were found in eggs per grams (epg), serum pepsinogen, serum IgA and peripheral eosinophilia.

The aim of the present experiment has been to study the response of resistant and susceptible animals fed with a low protein diet.

Correspondence: F. A. Rojo-Vázquez, Departamento Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain (e-dsafrv@unileon.es).

Received: 15 April 2005

Accepted for publication: 10 June 2005

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

The experiment was carried out with 22 adult Churra sheep, 11 resistant and 11 susceptible, infected with *T. circumcincta*. The ewes were selected from a flock of some 1500 animals; after selection on the basis of faecal egg counts, the animals were brought to the department. The selected ewes were those whose egg outputs were within both extremes of a normal distribution. One month prior to assay, all sheep were fed with a low protein diet (8% of dietary crude protein content) until the end of the trial. At the beginning of the experiment, all sheep were kept indoors in two groups of 11 each.

Before the beginning of the study, the animals were drenched with albendazole (ABZ) (7.5 mg/kg body weight). At day 0 of the experiment the 22 animals were experimentally infected with a dose of 30 000 L3 of *T. circumcincta*. One week post infection (pi) the ewes were treated again with ABZ and 7 days later they were challenged with 60 000 L3. Samples were taken during the experiment. On day 42 after the challenge, the animals were slaughtered with an intravenous injection of pentobarbital (10–30 mg/kg) ('Dolethal', Vetoquinol).

Animal sampling

On day 0 and on the last day of the study (42 days post challenge) all ewes were weighed.

Faeces were collected directly from the rectum; the number of egg was carried out using a modified McMaster method according to the Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques (8).

Blood samples were taken into evacuated glass tubes Venoject, without anticoagulant to obtain serum and with anticoagulant (EDTA) to estimate the number of leucocytes (cellular counter, CELTAC® model. MK-2154) and the percentage of eosinophils in the blood. The serum samples were stored at –20°C until the establishment of serum pepsinogen and the OD of IgA.

Serum pepsinogen was done basing on the method described by Edwards *et al.* (9).

Nasal secretions were taken by introducing cotton swabs into the nostril of each sheep. Afterwards, the swabs were placed into a test tube containing 2.2 mL of PBS, shaken to dissolve the secretions in the PBS and kept overnight at 4°C. Then, the swabs were taken away and the tubes centrifuged at 900 g. The supernatant was stored at –20°C. The samples of saliva were collected with the same protocol, but introducing the cotton swabs into the buccal cavity.

At necropsy, the gastric content of each animal, the recovery of adult worms and the digestion of gastric mucus

to collect L4 were carried out following the method described by Armour *et al.* (10). A 10% subsample of the total gastric content was counted to estimate the worm burden in each animal.

The number of L4 per animal was estimated by counting 10% of larvae that were collected from the gastric digestion.

The length of 50 adult females recovered from the gastric content was measured by the image analysis computer program 'Olympus DP-Soft'. The count of the eggs 'in utero' of the first 50 female adults was carried out with an optical microscope ('Olympus').

The samples of gastric mucus were collected by scraping on the surface of the abomasum with a glass microscope slide. Afterwards samples were stored at –20°C until processing with inhibiting proteases as described Sinski *et al.* (11).

IgA activity

An indirect ELISA, against somatic antigen from L4, was carried out to determine the OD of IgA in serum, gastric mucus, nasal secretions and saliva samples.

The preparation of somatic extracts from L4 was done as described Strain *et al.* (12).

Microtitre plates (Sigma) were coated with 100 µL of PBS that contained 2.5 µg/mL antigen; plates were stored overnight at 4°C. After eliminating the content, plates were blocked with 250 µL PT-Milk (4 g powdered milk + 100 mL PBS-Tween) (PBS-Tween: 1 L PBS pH = 7.4 + 1 mL Tween) for 30 min at 37°C. After eliminating the blocking buffer, 100 µL serum were added. Samples were diluted in PT-Milk: 1/10 serum, 1/20 gastric mucus, 1/20 nasal secretions, 1/3 saliva. Then, plates were incubated for 30 min at 37°C. After washing the plate four times with PBS-Tween, 100 µL of a sheep anti-IgA, obtained in mouse (Serotec), at a dilution of 1/150 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. After a further four washes in PBS-Tween, 100 µL of mouse anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) at 1/500 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. Then, plates were washed again four times with PBS-Tween. Plates were developed adding 100 µL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ('BluePhos Microwell', KPL). Plates were incubated for a further 30 min at 37°C. The absorbance was measured at 635 nm in a spectrophotometer. Positive and negative controls were included in every plate.

Statistical analyses

The data were analysed using the statistical computer package for social science, SPSS. The test of Kolmogorov–Smirnov was carried out to determinate if data were normally distributed. A nonparametric method, the 'Mann–Whitney U' test was used to determine the significant differences between groups.

RESULTS

Faecal egg counts

Faecal egg counts increased gradually in both groups of sheep after the challenge (Figure 1). Infections were patent in the susceptible group by day 16 post challenge and by day 15 in the resistant group.

Mean faecal egg counts in the susceptible group reached a maximum of 522 epg at 25 days post challenge and in the resistant group a maximum of 152 epg at 35 days post challenge; in the susceptible group the peak number of epg was 3.4 times higher than in resistant group.

The largest differences were observed between the two groups at 24 and 25 days post challenge.

Serum pepsinogen

The level of serum pepsinogen rose 10 days before the challenge and 4 days after the challenge to the maximum level in

the resistant group (915 ± 433 mUTyr) (Figure 2). There was a further increase 25 days post challenge, to 549 ± 228 mUTyr in the resistant group and 651 ± 355 mUTyr in the susceptible group. The largest differences were observed 4 days after the challenge.

The maximum number of epg in the susceptible group and the last rise of the serum pepsinogen coincided at 25 days post challenge.

IgA in blood samples, nasal secretions and saliva

The peak OD of IgA in blood samples was at 11 days post challenge in both groups. There was an increase at 3 days before the second infection (Figure 3). There were no significant differences between the two groups. At 25 days post challenge there was a decrease in the OD of immunoglobulins that coincides with a rise in the number of epg for all animals (Figure 4). The kinetics of the IgAs in all blood samples was similar to the kinetics of peripheral eosinophilia (Figure 5).

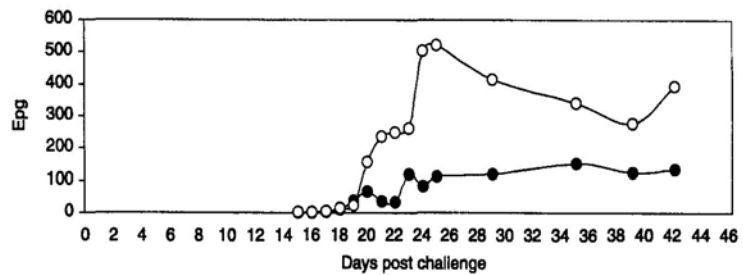


Figure 1 Mean faecal egg excretion in the resistant group (black circles) and in the susceptible group (open circles).

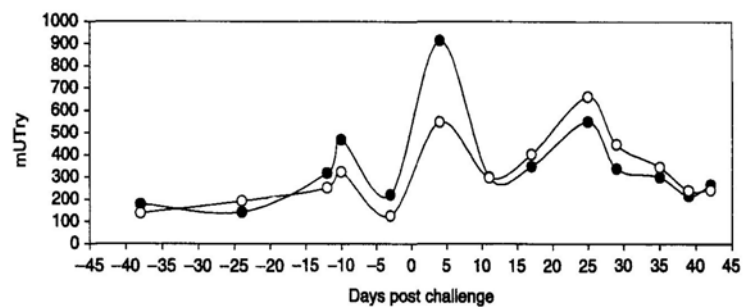


Figure 2 Mean serum pepsinogen in the resistant group (black circles) and in the susceptible group (white circles), in mUTyr.

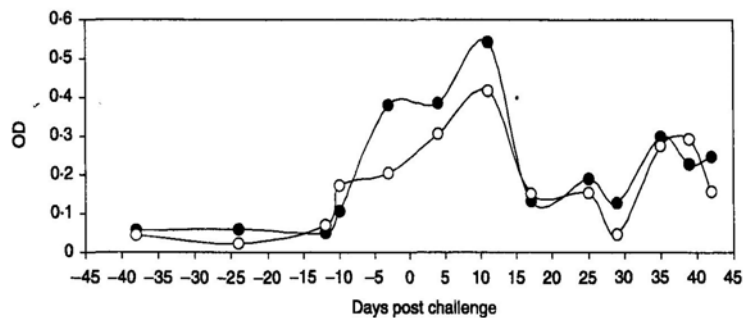


Figure 3 Mean of the OD of the IgAs in blood samples in the resistant group (black circles) and in the susceptible group (white circles).

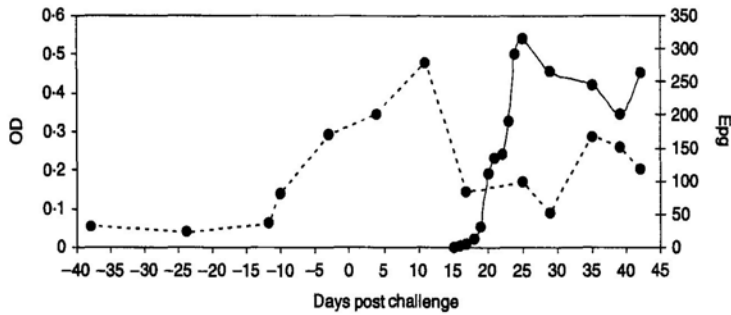


Figure 4 Mean of the eggs per gram (solid line) and mean of the OD of the IgAs in blood samples (slatted line).

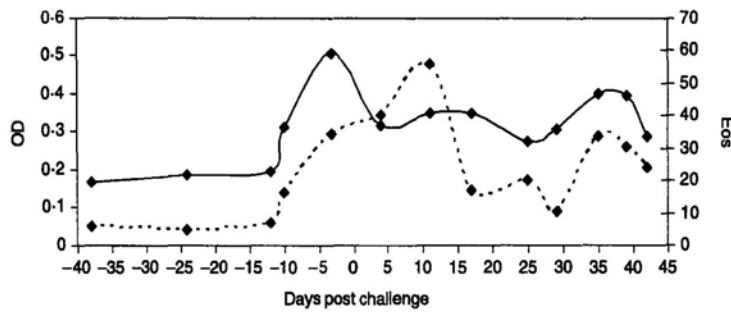


Figure 5 Mean of the peripheral eosinophilia (solid line) and mean of the OD of the IgAs in blood samples (slatted line).

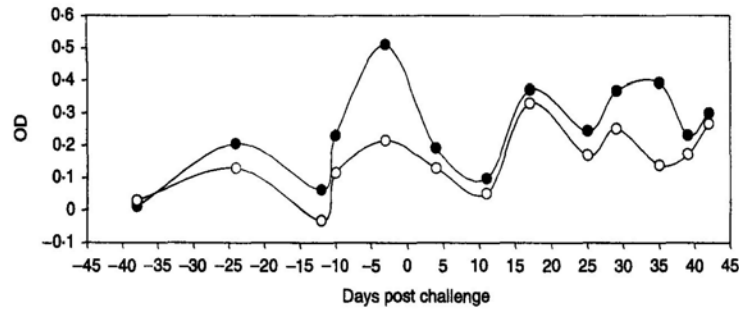


Figure 6 Mean of the OD of the IgAs in nasal secretions samples in the resistant group (black circles) in the susceptible group (white circles).

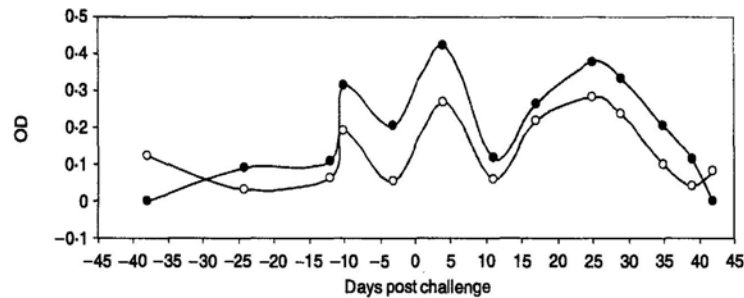


Figure 7 Mean of the OD of the IgAs in saliva samples in the resistant group (black circles) in the susceptible group (white circles).

The titre of IgA in nasal secretions rose at days -10 and 17. The maximum value in the resistant group was at 35 days post challenge (Figure 6). We did not find any significant differences between the two groups.

The IgAs in saliva rose immediately after the infections. There was a third increase at 25 days post challenge (Figure 7). There was not any significant difference between the two groups.

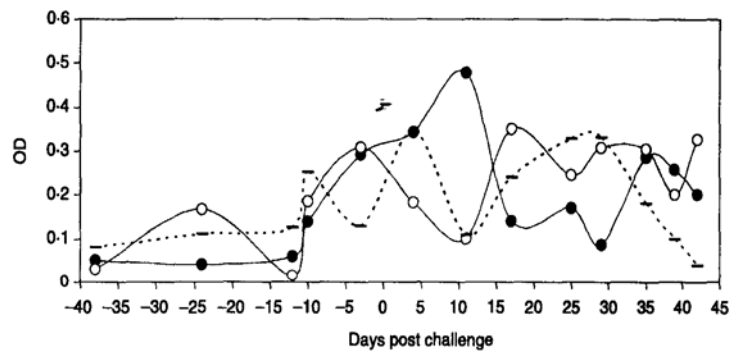


Figure 8 Mean of OD of the IgAs in blood (black circles), nasal secretions (white circles) and saliva (slatted line).

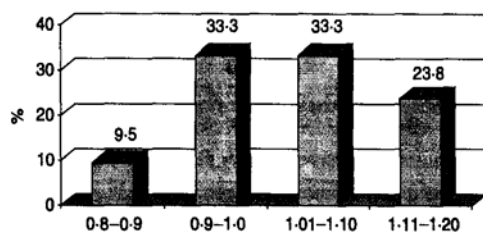


Figure 9 Distribution of the mean the female length (cm).

Figure 8 describes the kinetics of IgA in the blood, nasal secretions and saliva samples.

Live weight

The body live weights at the end of the assay were lower than at the beginning. The mean of the live weights at the beginning was 76.8 and 77.1 kg in the susceptible and resistant group, respectively. At the end of the assay the susceptible group had a mean of 72.9 kg and the resistant one of 74.4. However, there were no significant differences between the two measurements at the beginning and at the end of the assay.

Resistant animals lost less weight than susceptible ones but the differences were not statistically significant. The loss was 2.6 kg in the resistant group and 3.8 kg in the susceptible one.

Data at slaughter

The worm burden in individual sheep had a maximum value of 2740 adults and a minimum value of 10 adults. The range of L4 was from 25 to 6145. The values of the length of adult females were between 1.19 and 0.85 cm. Most of the length ranges were from 0.9 to 1.1 cm (Figure 9). All eggs *in utero* of adult female measured were counted; the maximum value was 67 and the minimum 13.

Only the total worm burden showed significant differences between the two groups; the resistant group showed a mean

burden of 335 worms, whereas the burden in the susceptible group was 878. We did not find any significant difference between the groups in the rest of the parameters measured, including gastric mucus IgA. The mean length of adult females was 1.04 cm in the resistant group and 1.00 in the susceptible animals. The resistant ewes had females with a mean of 40 eggs *in utero* and with a mean of 46 in the susceptible ewes. The number of L4 collected was 1127 and 2501 in the resistant and susceptible group, respectively.

DISCUSSION

Genetic resistance to *T. circumcincta* is an acquired response. The most important manifestation of immunity in growing lambs may be the control of worm growth, causing a reduction in worm fecundity (13). The major mechanism regulating worm growth appears to be the IgA response to L4 (14). The IgA is synthesized by the plasmatic cells localized in the lymphatic tissue and it is found in high concentrations in saliva, intestinal liquid, nasal and tracheal secretions, tears, milk and colostrum, urine and genitourinary secretions (15).

Improved nutrition has been shown to increase resistance to GI nematode parasite infections in sheep. There are studies that have focused on the effects of nutritional modification on the development of worms or some aspects of immunity (5). Diets supplemented with protein have improved resistance to infection by GI nematodes. In some cases dietary crude protein content increased the live weight gain (16,17), the eosinophil count (16) or the antibody response (16,18), and was associated with a significant decrease in the egg (16,19) or in the mean adult worm length (18).

The purpose of our study has been to know whether or not a low dietary protein content has any effect on the resistance to the infection by *T. circumcincta*. Lambs infected with *H. contortus* and fed with a low protein diet had more severe clinical signs than lambs maintained under high protein conditions (20); however, faecal eggs counts, total daily faecal egg output and worm burdens were similar in both groups.

We have compared the OD of serum IgA in the current study with the OD tested in a previous trial with the same ewes (11 resistant and 11 susceptible) and fed with a balanced diet by comparing only the first 11 days of each experiment. The conclusion is that resistant and susceptible ewes fed with a diet without any protein deficiency showed a higher activity of IgA than ewes fed a low protein diet. On the other hand, there was a significant difference between the two groups of sheep in the experiment with a balanced diet, only at 10 days post infection (unpublished).

In the present experiment the resistant group showed a significantly lower worm burden than the susceptible one. Furthermore, there were significant differences in the epg and in the level of serum pepsinogen, both parameters directly related to worm burden.

An important factor in the pathogenesis of GI nematode infections is a reduction in feed intake by the host and thus gut nematodes increase endogenous protein losses. The consequence is a net loss of amino acids and jointly with a low protein diet the result is a loss of weight (21). At the end of our study there was a loss of weight, not significant, that may have been a consequence of a decrease of the feed intake influenced by the infection and accentuated by the low protein diet. This loss of weight has been shown in other assays where infection was combined with a low protein diet. In an experiment carried out by Kahn *et al.* (17), 5 weeks after infection and with a decrease in the diet protein content, ewes suffered a significant loss of weight. Live weight was affected again by infection in a different assay in which lambs were given a diet with a deficiency in protein (22).

The effect of dietary protein supply on resistance to infection may be influenced by the genotype. In Scottish Blackface lambs the dietary protein did not significantly influence the establishment of *H. contortus*; however, in Finn Dorset lambs the protein may have had an influence since lambs on the low protein diet had a higher faecal egg output and more severe clinical signs than lambs on a high protein diet (23). In other cases the supplementation improved the resistance to infection by *H. contortus* in Santa Ines lambs (resistant breed) but not in Ile de France lambs (susceptible breed) (7).

Throughout the study no significant difference was found between groups in the OD of IgA, in contrast with our previous studies in which the same animals were fed with the same balanced diet. There were significant differences in the OD of IgA in serum, nasal secretions and saliva samples (unpublished data). The absence of differences between resistant and susceptible ewes fed with a low protein diet may have been a result of the influence of the diet on the immune function. Koski *et al.* (24) found that mice fed with a deficit in foods containing energy and infected with GI nematodes showed lower levels of IgE and IgG1, which led to higher worm burdens and fecundity. The plane of nutrition

may also have influence on the circulating eosinophils, suggesting that the immune response of lambs consuming high levels of energy enhanced the immune system, compared to lambs kept on a restricted diet (25).

In parasitized ruminants there are competing demands for the available nutrients between the repair of GI pathology and the immune response (3). The nutritional status of the host may affect its ability to mount an immunological response to larval challenge (26). Our results support this view, since low protein diet could have influence on immune function and as a result resistant and susceptible genotypes do not show significant differences between each other.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof. M. Stear for his advice and the assistance with the manuscript.

REFERENCES

- 1 Sykes AR. Parasitism and production in farm animals. *Anim Prod* 1994; **59**: 155–172.
- 2 Coop RL & Kyriazakis I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol* 2001; **17**: 325–330.
- 3 Coop RL, Huntley JF & Smith WD. Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res Vet Sci* 1995; **59**: 24–29.
- 4 Fox MT. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet Parasitol* 1997; **72**: 285–308.
- 5 Gray GD. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. *Vet Parasitol* 1997; **72**: 345–357; discussion 357–66.
- 6 Kahn LP, Knox MR, Gray GD, Lea JM & Walkden-Brown SW. Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet Parasitol* 2003; **112**: 211–225.
- 7 Bricarello PA, Amarante AFT, Houdijk JGM, Rocha RA, Cabral Filho SL & Gennari SM. Influence of dietary protein supply on resistance to infection with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines Lambs. Annual British Society of Animal Science Meeting; 2003.
- 8 Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, 3rd edn. London, GB: MAF; 1986.
- 9 Edwards K, Jepson RP & Wood KF. Value of plasma pepsinogen estimation. *Br Med J* 1960; **1**: 30–32.
- 10 Armour J, Jarrett WFH & Jennings FW. Experimental *Ostertagia circumcincta* infections in sheep: development and pathogenesis of a single infection. *Am J Vet Res* 1966; **27**: 1267–1278.
- 11 Sinski E, Bairden K, Duncan JL *et al.* Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet Parasitol* 1995; **59**: 107–118.
- 12 Strain SA & Stear MJ. The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 163–168.

- 13 Stear MJ, Bairden K, Duncan JL *et al.* How lambs control worms. *Nature* 1997; **389**: 27.
- 14 Stear MJ, Bishop SC, Doligalska M *et al.* Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 1995; **17**: 643–652.
- 15 Tizard I. *Inmunología Veterinaria*, 2nd edn. Mexico DF, Mexico: Interamericana; 1984: 179–191.
- 16 Datta FU, Nolan JV, Rowe JB & Gray GD. Protein supplementation improves the performance of parasitised sheep fed a straw-based diet. *Int J Parasitol* 1998; **28**: 1269–1278.
- 17 Kahn LP, Kyriazakis I, Jackson F & Coop RL. Temporal effects of protein nutrition on the growth and immunity of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 2000; **30**: 193–205.
- 18 Strain SA & Stear MJ. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 2001; **23**: 527–531.
- 19 Israf DA, Zainal MJ, Ben-Gheshir MA, Rasedee A, Sani RA & Noordin MM. Dietary protein influences on regulation of *Haemonchus contortus* populations in Dorsimal lambs. *J Helminthol* 1998; **72**: 143–146.
- 20 Abbott EM, Parkins JJ & Holmes PH. The effect of dietary protein on the pathophysiology of acute ovine haemonchosis. *Vet Parasitol* 1986; **20**: 291–306.
- 21 Van Houtert FJ & Sykes AR. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int J Parasitol* 1996; **26**: 1151–1168.
- 22 Abbott EM, Parkins JJ & Holmes PH. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. *Res Vet Sci* 1988; **45**: 41–49.
- 23 Abbott EM, Parkins JJ & Holmes PH. Influence of dietary protein on the pathophysiology of ovine haemonchosis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection. *Res Vet Sci* 1985; **38**: 54–60.
- 24 Koski GK, Zhong S & Scott E. Energy deficits suppress both systemic and gut immunity during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 796–801.
- 25 Valderrábano J, Delfa R & Uriarte J. Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Vet Parasitol* 2002; **104**: 327–338.
- 26 Sinski AR. Endoparasites and herbivores nutrition. In: *Nutrition of Herbivores*, eds Hacker JB & Ternouth JH. Sydney: Academic Press; 1987: 211–232.

EXPRESSION OF THE RECOMBINANT PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE OF

Teladorsagia circumcincta



M. Martínez-Valladares¹, R. Godio-Fernández ², M.P. Vara-Del Río¹, J.F. Martín²,
F.A. Rojo-Vázquez¹.

1. Departamento de Sanidad Animal, Parasitología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de León. 24071 León, Spain. dsammv@unileon.es

2. Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Parque Científico de León. Av.
Real 1. 24006 León, Spain.

Short running title: A protein disulfide isomerase of *Teladorsagia circumcincta*.

Keywords: *Teladorsagia circumcincta*; Sheep; IgA; Immunity; protein disulfide
isomerase.

Parasite Immunology, 2007, 29,47 - 56.

Expression of the recombinant protein disulphide isomerase of *Teladorsagia circumcincta*

M. MARTÍNEZ-VALLADARES,¹ R. GODIO-FERNÁNDEZ,² M. P. VARA-DEL RÍO,¹ J. F. MARTÍN² & F. A. ROJO-VÁZQUEZ¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain and ²Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), Parque Científico de León, Av. Real 1, 24006 León, Spain

SUMMARY

The aim of this experiment was to find an antigen from *Teladorsagia circumcincta* to measure the level of IgA in ovine serum samples. Previous experiments used the titre of IgA to select sheep resistant to infection with *T. circumcincta*. By Western blotting 22 experimentally infected ewes recognized many proteins, but not all of them were recognized by all animals. Sheep were divided into two groups of animals: those that recognized a protein in Western blotting and those that did not. Among all proteins, three showed significant associations between protein recognition and the titre of IgA in the serum.

Keywords IgA, immunity, protein disulphide isomerase, sheep, *Teladorsagia circumcincta*

Correspondence: M. Martínez-Valladares, Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain (e-mail: dsammv@unileon.es).

Received: 18 July 2006

Accepted for publication: 17 August 2006

According to MALDI-TOF analysis the protein with 50–55 kDa of molecular weight matches up with the PDI protein of 55 kDa from *Ostertagia ostertagi*. This protein belongs to the superfamily of thioredoxins, functioning as an oxidoreductase.

The PDI was cloned and sequenced resulting a sequence of 1479 bp and 493 amino acids. The active sites are the thioredoxin box are constituted by the sequence WCGHCK; moreover, its last segment contains an endoplasmic reticulum retention signal, -HTEL. Subsequently, a fragment of 23 kDa was overexpressed to test its antigenic ability in an ELISA.

INTRODUCTION

Teladorsagia circumcincta is a nematode parasite that infects the abomasum of sheep throughout the world. Anthelmintic resistance and the need of new parasite control measures make genetic resistance to gastrointestinal nematodes an interesting field of research and present a possibility for the control of infection (1). Some studies (2) have shown that the major manifestation of resistance in weaned lambs is the inhibition of development of the parasite in the host. More recently (3), it has been observed that this fact is directly related to the increase of IgA in the gastric mucus and in serum samples. Martínez-Valladares *et al.* (4) have observed that the best correlations between the titre of IgA and nematode development are with somatic antigen from the L4 stage of *T. circumcincta*.

The aim of this study was to find an antigenic protein of somatic extract from L4 of *T. circumcincta* to carry out a more specific ELISA. The purpose of measuring the level of IgA antibodies is to differentiate between susceptible and resistant animals to the infection by *T. circumcincta*. As a result, we have identified an antigen using Western blotting techniques with serum samples from infected sheep. The antigen has been isolated and identified using mass spectrometry. A protein disulphide isomerase (PDI) has been found as the antigenic protein against IgA from serum samples. The PDI of *T. circumcincta* (Tc-PDI) was characterized by determining its amino acid sequence. Moreover, a fragment of Tc-PDI was cloned to obtain specific serum anti-protein and to use it in a later ELISA as antigen.

PDI is an abundant oxidoreductase enzyme that is present in the endoplasmic reticulum. Its importance lies in its catalytic role in disulphide bond formation during protein folding (5).

MATERIALS AND METHODS

Nematode larvae and antigen preparation

Infective larvae (L3) of *T. circumcincta* were obtained after culturing faeces from monospecifically infected donor ewes.

Somatic antigens from L3, L4 and adults were prepared after the necropsy of the ewes experimentally infected with *T. circumcincta* as described by (6).

The somatic antigen preparation of adults from *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* was carried out the same way.

Animal samples

The experiment was carried out with 22 adult Churra ewes, 11 resistant and 11 susceptible, experimentally infected with *T. circumcincta*. The ewes were selected from a flock of some 1500 animals; after selection on the basis of faecal egg count, the animals were brought to the animal facilities of the Animal Health Department. The selected ewes were those whose egg outputs were at both extremes of the egg count distribution. Before the beginning of the study, the animals were drenched with albendazole (ABZ) (7.5 mg/kg body weight). At day 0 of the experiment the 22 animals were experimentally infected with a single dose of 30 000 L3 of *T. circumcincta*.

Faeces were collected directly from the rectum until the day 81 post-infection; the number of epg was carried out using a modified McMaster method according to Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques (7).

Blood samples were taken weekly into evacuated glass tubes (Venoject), without anticoagulant, to obtain serum until the end of the experiment, on day 42 post-infection. The serum samples were stored at -20°C until the establishment of the optical density (OD) of IgA.

Titre of IgA

Indirect sELISA, against L4 somatic antigen and against a fragment of a recombinant protein disulphide isomerase of *T. circumcincta* (Tc-PDI), was carried out to determine the OD of IgA in serum samples.

Microtitre plates (Sigma) were coated with 100 µL of PBS containing 2.5 µg/mL somatic protein; plates were stored overnight at 4°C. After discarding the fluid, plates were blocked with 250 µL PT-Milk (4 g powdered milk +100 mL PBSTween) (PBSTween: 1 L PBS pH=7.4, 0.1% Tween) for 30 min at 37°C. After discarding the blocking buffer, 100 µL serum were added. Serum samples were diluted in PT-Milk 1/10. Then, plates were incubated for 30 min at 37°C. After washing the plate four times with PBSTween, 100 µL of sheep anti-IgA, obtained in mouse (Serotec), at a dilution of 1/150 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. After a further four washes in PBSTween, 100 µL of mouse anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) at 1/500 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. Then, plates were washed four times more with PBST-

wen. Plates were developed by adding 100 µL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ('BluePhos Microwell', KPL). Plates were incubated for a further 30 min at 37°C. The absorbance was measured at 635 nm in a spectrophotometer. Positive and negative controls were included in every plate.

SDS-PAGE and Western blotting

SDS-PAGE was performed with L3, L4 and adult somatic antigens from *T. circumcincta*, with adult somatic antigen from *T. colubriformis* and with a recombinant fragment of Tc-PDI, using a 2.7% stacking gel and a 12% running acrylamide gel. Fifty µg of protein were separated under reducing conditions. Samples were mixed with sample buffer (60 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 5% glycerol) and boiled for 5 min. For size estimation, a prestained protein standard (Bio-Rad) was electrophoresed simultaneously. Protein bands in gels were visualized by staining with silver stain.

After electrophoresis, proteins were transferred to nylon membranes for 1 h at 350 mA. Non-specific binding was blocked by incubation in TBST-milk buffer (5 g powdered milk +100 mL TBSTween) (TBSTween: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 0.5% Tween 20) for 30 min.

Two different Western blottings were carried out during the experiment. In the first one the proteins of the L4 somatic antigen were incubated with serum from experimentally infected sheep. In the second one the L3, L4 and adult somatic antigen from *T. circumcincta* and adult somatic antigen from *T. colubriformis* were incubated with polyclonal antibodies from rabbit serum. Both serum samples were added to TBST-milk buffer and incubated during 2 h. The blots were washed with TBST-milk buffer (3 × 10 min) and incubated for 1 h with sheep anti-IgA (Serotec) in the first Western blotting and with rabbit anti-IgA conjugated to alkaline phosphatase (Bethyl) in the second one. The blots were washed again and in the first Western blotting an intermediate incubation for 1 h with mouse anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) was necessary. Bound proteins were visualized with the addition of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP/NBT Phosphatase Substrate System, KPL).

MALDI-TOF mass spectrometry analysis

After the SDS-PAGE was carried out with L4 somatic antigen from *T. circumcincta*, three protein bands were excised from the gel and in-gel digested with trypsin as previously described (8). The generated set of peptides was mixed with matrix molecules and analysed by a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (CNIC, Spain). Homology searches with

fragmented peptides were performed following the computer program MASCOT (9). As a result a PDI was identified unambiguously.

Two-step RT-PCR for Tc-PDI

Total RNA was extracted from *T. circumcincta* L3 by grinding the parasites in liquid nitrogen and was isolated with an RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The RNA was subsequently DNase treated, air dried and dissolved in a volume of DEPC H₂O. The quality of the extracted total RNA was checked on gel and the concentration measured at 260 and 280 nm. The first reverse transcription step was carried out in a 20 µL volume containing 5 µg of total RNA for the cDNA synthesis using an oligo (dT) primer (Sigma-Genosys). The reaction was carried out at 50°C for 45 min.

In order to determine the sequence of the PDI, the second PCR amplification step was carried out using three combinations of primer pairs: (a) a forward primer (5'-ATG TTC AAA CTC GCT TGC G-3') and a reverse primer (5'-TCC AGT CTT CTT CTT CAA CCA AG-3'); (b) a forward primer (5'-ACC AAG GAT AAC TTC GAT GAG G-3') and a reverse primer (5'-ATA CGG GCA TTG TCT TCG AC-3'); and (c) a forward primer (5'-GTCGAAGACAATGCCCGTAT-3') and a reverse primer (5'-CGTAGA ACTCGACGAGCACA-3'). Primers were designed on the basis of a published PDI-*Ostertagia ostertagi*, with the exception of the third pair, which was designed previously by Geldhof *et al.* (12). cDNA was denatured at 94°C for 2 min, then amplified by 30 cycles and extended at 72°C for 10 min. Sequences were separated in a polyacrylamide gel and were excised from the gel. Then, the PCR products were cloned into a plasmid vector, pGEM-T (Promega) and the constructs were transformed to a competent (JM 109, Promega) strain of *E. coli*. Transformants containing the recombinant plasmid were selected on Luria Broth agar plates and the cDNA inserts were PCR amplified with SP6 and T7 vector primers. The nucleotide sequence of the DNA clones was determined by the 'Laboratorio de Técnicas Instrumentales' (ULE, Spain).

Cloning and expression of a fragment of Tc-PDI

The recombinant plasmid that contained the resulting product of the third pair of primers (c): a forward primer: 5'-GTCGAAGACAATGCCCGTAT-3' and a reverse primer: 5'-CGTAGA ACTCGACGAGCACA-3' was extracted from the *E. coli* according to Amersham's protocol. Afterwards it was digested with *EcoRI* and *SacI* (Fermentas) and the resulting fragment of cDNA was gel purified. The 5' protruding end of the fragment was filled with a T4 DNA polymerase

(Fermentas) to be cloned into an expression vector, pQE30 (Qiagen). The vector was previously digested with *SmaI* and *SacI* (Fermentas). The constructs were transformed into XL1-Blue *E. coli* (Stratagene) competent cells and selected on Luria Broth agar plates supplemented with 0.1 mg mL⁻¹ ampicillin.

The expression of the fragment of the recombinant PDI was induced by the addition of 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside to a culture at 37°C for 6 h. After induction, the cells were pelleted, sonicated, filtered through a 0.2 µm filter, and applied to a nickel-agarose column (Amersham) to be purified. The purification was carried out by chromatography, binding to a 6 × His tag attached to the recombinant protein. The fragment of PDI was eluted from the column with 50 mM Tris, 300 mM NaCl and 250 mM imidazole pH 7.4, and then the protein was analysed by electrophoresis.

Polyclonal antibody production

Two adult male rabbits were used for antibody production against a partial fragment encoded in the PDI clone. Preimmune serum was collected from the auricular artery, and subsequently each animal was injected with 300 µg of purified recombinant PDI in an emulsion with Freund's complete adjuvant. The rabbits received two booster immunizations with 100 µg of purified protein each at 2-week intervals. Three days after the last immunization, blood samples were obtained from the auricular artery. One month later the rabbits were injected with 300 µg of the PDI in an emulsion with Freund's incomplete adjuvant. Seven days after the last immunization blood samples were obtained again from the auricular artery.

For all immunizations, the antigen emulsion was injected subcutaneously in two sites on the rabbit back. Blood was collected in serum separation tubes (Venoject). After centrifugation at 1750 g for 10 min, the serum was removed and frozen until needed.

Statistical analysis

The data on eggs per gram and OD of sIgA were analysed using the statistical computer package for social science, SPSS. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine if data were normally distributed. A nonparametric method, the Mann-Whitney *U* test, was used to determine the significant differences between the resistant and the susceptible groups.

Correlations between the OD of sIgA and the identification or not of the proteins in the Western blotting of each animal were obtained with Pearson's product moment correlation coefficient.

RESULTS

Faecal egg counts

Faecal egg counts increased gradually in both groups of sheep after the infection (Figure 1). Infections were patent in the susceptible group by day 17 pi and by day 20 in the resistant group.

The largest differences were observed between the two groups at 27 and 32 ($P < 0.01$) days post-infection and by day 60 ($P < 0.05$) post-infection.

Titre of IgA against L4 somatic antigen

The titre of IgA post-infection was measured in the resistant and susceptible groups of animals weekly for 42 days against L4 somatic antigen. The data showed (not published) similar kinetics of sIgA in serum in both groups; however, sIgA titres in resistant ewes were higher than those from animals in the susceptible group during the whole experiment.

By day 10 post-infection the differences between resistant and susceptible animals were statistically significant; with the highest values in the resistant group ($P < 0.01$). Table 1 shows the OD for each animal.

Identification of a 55 kDa protein disulphide isomerase

In order to determine a protein from L4 for the diagnosis of animals infected by *T. circumcincta* and to identify resistant and susceptible animals, the Western blotting was carried out with the serum from day 10 post-infection.

Figure 2 is an SDS-Page showing constituent proteins of the L4 somatic antigen. In Figure 3 the proteins that were recognized by the sIgA of each animal are shown with a Western blot.

Western blotting was carried out with serums from day 10 post-infection, since there were significant differences in the IgA between resistant and susceptible ewes at that date.

Sera recognized many proteins, but not all of them were recognized by all animals. Sheep were divided into two groups



Figure 1 Mean number of eggs of *Teladorsagia circumcincta* per gram (\pm SE) in resistant and susceptible groups of sheep. The arrows indicate the days with significant differences.

Table 1 OD values of sIgA in sheep on day 10 after infection with *Teladorsagia circumcincta*

	OD sIgA	
	Resistant	Susceptible
	0.757	0.078
	0.391	0.213
	0.389	0.524
	0.635	0.481
	0.407	0.081
	0.218	0.279
	0.39	0.182
	0.552	0.649
	0.242	0.23
	0.728	0.273
	0.632	0.17
Mean	0.485	0.289
SD	0.185	0.177

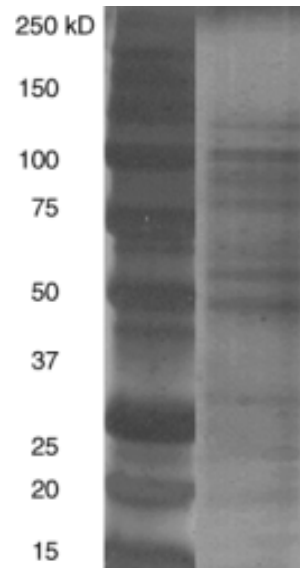
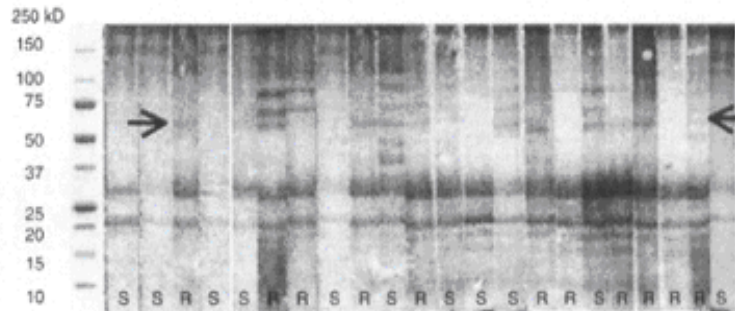


Figure 2 SDS-PAGE of L4 somatic antigen from *T. circumcincta*.

of animals: those that recognized a protein in the Western blotting and those that did not. Among all proteins, three showed significant differences between the titre of IgA and the identification or not of the protein ($P < 0.01$). These proteins had a molecular weight of 50–55 kDa, 55–60 kDa and 70–75 kDa, respectively. Moreover, there was a significant correlation ($P < 0.01$) between the titre of sIgA on day 10 post-infection and the recognition of each one of the three proteins.

Afterwards, a SDS-page was performed with somatic antigen from L4 and silver-stained to identify these three

Figure 3 Western blotting with serum from infected sheep against L4 somatic antigen from *T. circumcincta*; R: resistant sheep, S: susceptible sheep. The arrow shows the 55 kDa protein.



bands. The protein bands were excised from the gel and the generated sets of peptides were analysed by MALDI-TOF. According to MALDI-TOF analysis the protein with 50–55 kDa molecular weight matched up with a PDI of 55 kDa from *Ostertagia ostertagi*. Figure 5 shows the similarity between the protein disulphide isomerase amino acid sequence of *O. ostertagi* and the tryptic fragments after the MALDI-TOF analysis, amino acid sequence overlined with a dot line. As listed in Table 2, the MALDI-TOF data of the fragments were identical to the calculated mass data for the amino acid sequences of each overlined part in Figure 5. The identifications of the other two proteins did not show any interesting result.

These results indicate that the excised band corresponds to a 55 kDa PDI with a pI of 5 from *T. circumcincta* due to the similarity of the amino acid sequences with the related species *O. ostertagi*. Both species are stomach worms producing severe infections in ruminants in temperate areas of the world (10). PDI is member of the superfamily of thioredoxins, a group of oxidoreductases characterized by one or more thioredoxin-like boxes with a CXXC motif (11).

Within the resistant group eight animals identified the 55 kDa PDI and three did not, and in the susceptible group only three animals out of 11 identified the PDI (Figure 3). Moreover, there was a relationship between the titre of IgA on day 10 post-infection and the recognition of PDI ($P < 0.01$);

the higher the titre of IgA, the higher the possibility of recognizing the protein.

CDNA sequence of Tc-PDI

The cDNA sequence is the result of the amplification of the fragments of cDNA with the three pairs of primers. Each pair of primers amplifies fragments of 648 bp, 760 bp and 609 bp, respectively. The cDNA resulting sequence is shown in Figure 4 as well as the alignment with the PDI from *O. ostertagi* (Oo-PDI). Sequence analysis showed that Tc-PDI (DQ357222) contained 1479 bp, the same number as the sequence of *O. ostertagi*.

The encoded Tc-PDI is a protein constituted by 493 amino acids, also the same length as Oo-PDI. In both species the sequences match up, with the exception of one amino acid in the position 65; in the Tc-PDI the amino acid is an alanine (A) and in the Oo-Tc a threonine (T) (Figure 4). A multiple alignment of the derived amino acid sequences of Tc-PDI with PDI proteins from related species is shown in Figure 5. The Tc-PDI sequence is constituted by two segments with homology to each other that are the active site motif of the protein. These regions are two thioredoxin boxes that include the sequence WCGHCK in positions 51 and 392, respectively (Figure 5, overlined). The sequence contains a modified C-terminal endoplasmic reticulum

Table 2 List of tryptic fragments matching the theoretical digested fragments of mature protein disulphide isomerase from *Teladorsagia circumcincta*

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Position	Miss	Peptide
863.44	862.43	862.43	0.00	372–378	0	NFEQVAR
888.47	887.46	887.46	-0.00	223–229	0	TWIQANR
888.47	887.46	887.46	-0.00	223–229	0	TWIQANR
913.48	912.47	912.50	-0.03	305–312	1	KDDLPAVR
938.47	937.46	937.45	0.01	449–456	0	VIDYTGDR
984.51	983.50	983.51	-0.01	297–304	0	IMEFFGLK
1286.68	1285.68	1285.67	0.01	410–420	0	YADHENIIIAK
1356.61	1355.61	1355.60	0.01	205–215	1	FDEGRDVFEK
1714.89	1713.88	1713.86	0.02	449–463	1	VIDYTGDRITLEGFTK
1767.91	1766.90	1766.88	0.02	282–296	0	VLFVYINTDVEDNAR

```

Oo-PDI : ATGTTCAAACFCGCTTGCCTTTGCCTCCTTGTCTGTGCGGCATTTGCAGCAACCGTTGAGGAGGAGAAAAATGTATCGTCCCTC : 84
Tc-PDI : ATGTTCAAACFCGCTTGCCTTTGCCTCCTTGTCTGTGCGGCATTTGCAGCAACCGTTGAGGAGGAGAAAAATGTATCGTCCCTC : 84

Oo-PDI : AC AAGGATAA CTT CGATGAGGTTATCAACGGTCA T GAGTTTGTCTTCCCGAGTTCTACGCTCCTTGGTGCGGTCACTGCAAG : 168
Tc-PDI : AC AAGGATAA CTT CGATGAGGTTATCAACGGTCA C GAGTTTGTCTTCCCGAGTTCTACGCTCCTTGGTGCGGTCACTGCAAG : 168

Oo-PDI : SGTCTAGCCCCGAGTATGAGAAA CCGCAACCCA AACTCAAGGAGGAAGGATC GAAATCAAGTTGGC AAACTCGA GCCACC : 252
Tc-PDI : SGTCTAGCCCCGAGTATGAGAAA CCGCAACCCA AACTCAAGGAGGAAGGATC GAAATCAAGTTGGC AAACTCGA GCCACC : 252

Oo-PDI : GTTCACGGTGATGTTGCCAGCAAGTTCGAGGTCGA GGATATCCAACA CTGAAACTGTTCCGCAATGAAAAACCCCTCTGAATAC : 336
Tc-PDI : GTTCACGGTGATGTTGCCAGCAAGTTCGAGGTCGA GGATATCCAACA CTTGAAACTGTTCCGCAATGAAAAACCCCTCTGAATAC : 336

Oo-PDI : AC GGTGGACGTGA C TCGCTCAATTGTCGCTTGGTTGAAGAAGAACTGGACCGGTTGC AAGACCCCTCAAGACGGCCGAT : 420
Tc-PDI : AC GGTGGACGTGA C TCGCTCAATTGTCGCTTGGTTGAAGAAGAACTGGACCGGTTGC AAGACCCCTCAAGACGGCCGAT : 420

Oo-PDI : SACGTTAAGTC C TCGAAGA GAGGCTGATGTCGCTGTTGT GGATACTTCAAGAAAGCCGATGGCGATAAGGCGAAGGTCTTC : 504
Tc-PDI : SACGTTAAGTC C TCGAAGA GAGGCTGATGTCGCTGTTGT GGATACTTCAAGAAAGCCGATGGCGATAAGGCGAAGGTCTTC : 504

Oo-PDI : CTCGAGGTCGCTGCTGGAATCGATGACATTCATTCCGGAATCTC ACTGAAGATGCCGC AARAARCARCTCGAGCTCAAAGAG : 588
Tc-PDI : CTCGAGGTCGCTGCTGGAATCGATGACATTCATTCCGGAATCTC ACTGAAGATGCCGC AAGAAGCAGCTCGAGCTCAAAGAG : 588

Oo-PDI : SAAGGAATCCT C TCCTCAARAAGTTCGA T GAAGGAGC GATGTGTT T GATGAGAAGCTCAC GCTGACAACCTCAAGACCTGG : 672
Tc-PDI : SAAGGAATCCT C TCCTCAARAAGTTCGA T GAAGGAGC GATGTGTT T GATGAGAAGCTCAC GCTGACAACCTCAAGACCTGG : 672

Oo-PDI : ATCCAGGCCAACCGTCT GCCCTTGTGTCGGAATTCCTCAGGARACCCGATCCGTCATCTTCGGTGGAGAGATCAAGACCCAC : 756
Tc-PDI : ATCCAGGCCAACCGTCT GCCCTTGTGTCGGAATTCCTCAGGARACCCGATCCGTCATCTTCGGTGGAGAGATCAAGACCCAC : 756

Oo-PDI : AACCTAT TGTTCGCTCAAAGGAATCGAGCGAGTTTGARAAGCTTGAAGAAAGTTCAAGAACGCCCAAGCAATTC AAGGGC : 840
Tc-PDI : AACCTAT TGTTCGCTCAAAGGAATCGAGCGAGTTTGARAAGCTTGAAGAAAGTTCAAGAACGCCCAAGCAATTC AAGGGC : 840

Oo-PDI : AAGGTTCTGTTCT TACATCAACACCGATGTCGAAGACAATGCCCGTATCATGGAGTTCTTCGGCCTCAAGAAGGACGATCTG : 924
Tc-PDI : AAGGTTCTGTTCT TACATCAACACCGATGTCGAAGACAATGCCCGTATCATGGAGTTCTTCGGCCTCAAGAAGGACGATCTG : 924

Oo-PDI : CCAGC STCCGT T GATCTC CT GAAGAGGATATGACCAAAATTC AAGCC GAYTTTCGCTGAAATCAACACCGAAAAATTTGTC : 1008
Tc-PDI : CCAGC STCCGT T GATCTC CT GAAGAGGATATGACCAAAATTC AAGCC GACTTCGCTGAAATCAACACCGAAAAATTTGTC : 1008

Oo-PDI : AAATTCACGCAGCTACCTCGACGGTGCCTCAAGCCCCACCTCATGTCCGAGGA ATCCCTGA GACTGGGACAAGGCACCA : 1092
Tc-PDI : AAATTCACGCAGCTACCTCGACGGTGCCTCAAGCCCCACCTCATGTCCGAGGA ATCCCTGA GACTGGGACAAGGCACCA : 1092

Oo-PDI : STCAAGGTTCTCGTCGGAAGA AACTTCGAACAAGTTGC TCGGACAACACCAAGAATGTGCTCGTCGAGTTCTACGCTCCATGG : 1176
Tc-PDI : STCAAGGTTCTCGTCGGAAGA AACTTCGAACAAGTTGC TCGGACAACACCAAGAATGTGCTCGTCGAGTTCTACGCTCCATGG : 1176

Oo-PDI : TGGCG CACTGCAAGCAGCTTGTCTCTACCTGGGACAAGCTYGGAGAGAAGTACGCTGA CACGAGAACATCATCAT GCTAAG : 1260
Tc-PDI : TGGCG CACTGCAAGCAGCTTGTCTCTACCTGGGACAAGCTYGGAGAGAAGTACGCTGA CACGAGAACATCATCAT GCTAAG : 1260

Oo-PDI : ATGGA C TACTG C AACGAGGTTGAGGACGT SAAGGTGCAGTCATTCCCAGCATCA A TCTTCCCAGCTGGATCAAACAAG : 1344
Tc-PDI : ATGGA C TACTG C AACGAGGTTGAGGACGT SAAGGTGCAGTCATTCCCAGCATCA A TCTTCCCAGCTGGATCAAACAAG : 1344

Oo-PDI : STCATCGACTACACTGGTGACAGA AACTCTTGAAGGATTCA C A AATTCCTCGAGAGTGGTGCAAGGAAGG SGTGGACCATCT : 1428
Tc-PDI : STCATCGACTACACTGGTGACAGA AACTCTTGAAGGATTCA C A AATTCCTCGAGAGTGGTGCAAGGAAGG SGTGGACCATCT : 1428

Oo-PDI : SA TATGAGAAGGCTGCTGAAGAGGCCGAGGAAGAGGTTACACTGAGCTC : 1479
Tc-PDI : SA TATGAGAAGGCTGCTGAAGAGGCCGAGGAAGAGGTTACACTGAGCTC : 1479
    
```

Figure 4 cDNA sequence from *T. circumcincta* protein disulphide isomerase (Tc-PDI).

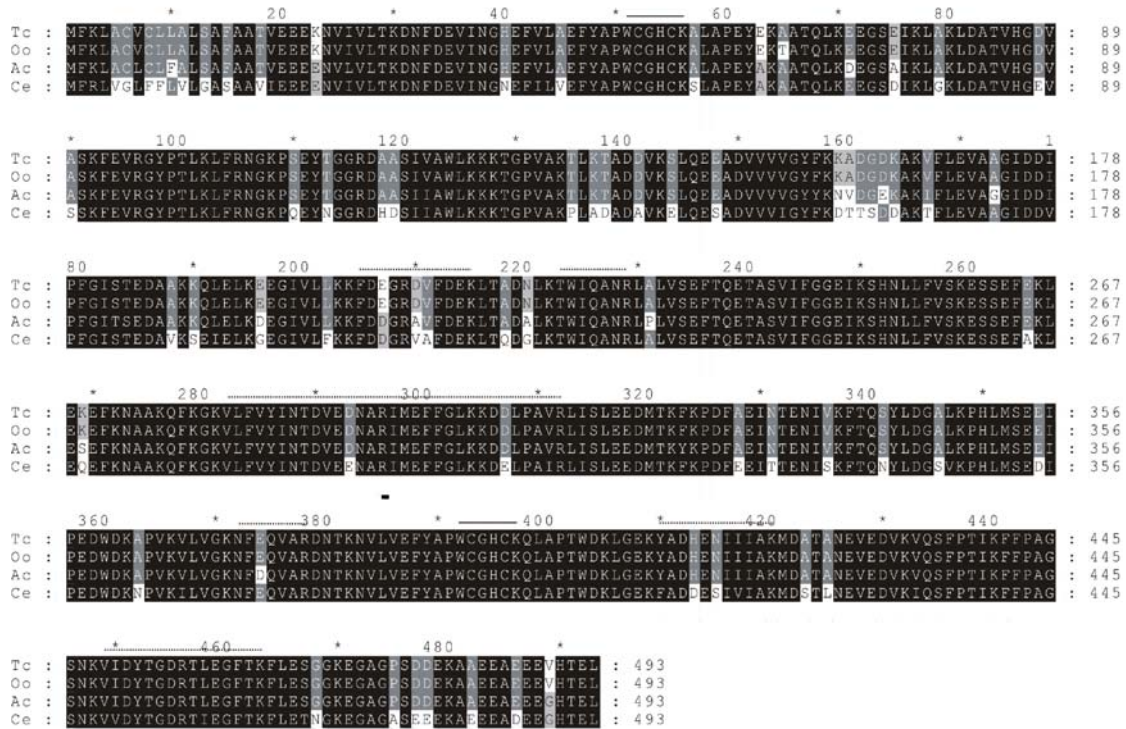


Figure 5 Amino acid sequence of PDIs. Tc (*T. circumcincta*), Oo (*Ostertagiaostertagi*), Ac (*Ancylostoma caninum*), Ce (*Caenorhabditis elegans*).

retention sequence, HTEL, which also matches up with the C-terminal of other nematode species (Figure 5). The similarity of Tc-PDI to other PDIs is 99% with *O. ostertagi* (CAD11865), 94% with *Ancylostoma caninum* (AAS84455) and 83% with *Caenorhabditis elegans* (NP 508778).

Cloning and expression of a fragment of Tc-PDI

After the RT-PCR amplification with the prime pair (c) (forward primer: 5'-GTCGAAGACAATGCCCGTAT-3' and reverse primer: 5'-CGTAGA ACTCGACGAGCAC-3'), a band of 609 bp was amplified. The single amplification product was recovered from the gel, cloned into the pGEM-T plasmid vector and sequenced.

The cloned sequence is constituted by the last 203 amino acids of the sequence, including the C-terminal sequence (HTEL) and a thioredoxin box with the sequence WCGHCK, which represents one of the active sites of the protein (5). Because of the presence of the active site in the sequence, this fragment is suitable for serodiagnostic use as an antigen to measure the level of sIgA.

After sequencing, the fragment was cloned into an expression vector, pQE30, and was then expressed with the addition of IPTG. The resulting protein was analysed by Western blotting, resulting in a fragment protein with a Mr of 23 kDa and a

pI of 5.2 (Figure 6). The antigenic ability of this fragment of Tc-PDI will be tested in a different assay to measure the level of sIgA in ovine serum samples.

Recognition patterns of Tc-PDI

Western blots were carried out to determine the recognition pattern of sIgA from rabbit sera. The aim was to recognize the PDI in L3, L4 and adult somatic antigen from *T. circumcincta* with antibodies raised against Tc-PDI. The results shown in Figure 7 confirm the presence of the PDI in somatic extract of L4 as well as in the L3 and adult somatic antigen, since a band of 55 kDa is shown in all extracts.

The same serum was used to determine the presence or absence of the PDI in adult somatic antigen from *T. colubriformis*. The result was positive and a band of the same molecular weight is shown in Figure 7. However, with the somatic antigen of adults from *H. contortus* the 55 kDa protein was not recognized. Therefore, there is a cross reaction with *T. colubriformis*.

Titre of IgA against a recombinant fragment of PDI

The titre of IgA post-infection was measured at the end of the experiment against a 203 amino acid fragment of PDI.

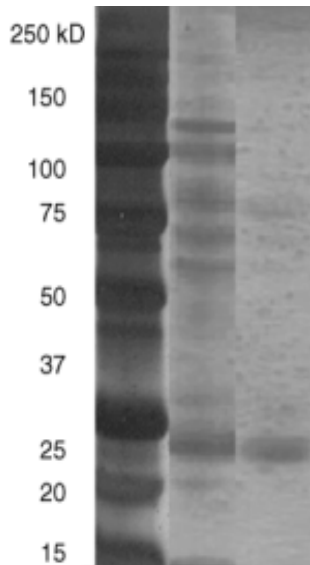


Figure 6 The last band represents the recombinant fragment of Tc-PDI and the previous one the protein without purifying.

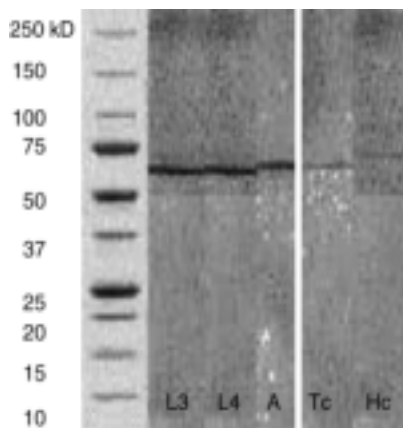


Figure 7 Western blotting with somatic antigen from L3, L4, and adults (A) of *T. circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* (Tc) and *Haemonchus contortus* (Hc).

The data showed (not published) parallel kinetics between resistant and susceptible animals. Moreover, the resistant group had a higher titre than susceptible group throughout the experiment.

By day 25 post-infection significant differences between resistant and susceptible animals were found ($P < 0.01$), matching up with the differences in the faecal egg counts at day 27 post-infection. Therefore a weak correlation ($P < 0.05$) was found between both parameters at day 25 post-infection.

On the other hand, the level of infection according to the faecal eggs counts was low by day 25 post-infection and at the same time a high level of immunoglobulins was found on that day.

DISCUSSION

The aim of this experiment was to find an antigen from *T. circumcincta* to measure the level of IgA in ovine serum samples. Previous experiments have used the titre of IgA to determine the level of infection in sheep infected with parasite species (4). The development of resistance to the most commonly used anthelmintics to control parasite gastroenteritis in sheep is a drawback in many countries. It is thus necessary to find an alternative. Among the possibilities, the selection of genetically resistant animals is a promising option. This has been carried out according to the level of sIgA in resistant and susceptible animals. Because of the absence of a commercial serodiagnostic kit we overexpressed a possible protein fragment of *T. circumcincta* to distinguish between susceptible and resistant ewes. The results showed that after an experimental infection with *T. circumcincta* the IgA in serum recognized many proteins of L4, but not all proteins were recognized by all animals. In order to select an antigen to be used in a serodiagnostic test, with the aim to segregate resistant and susceptible animals, the IgA titre after 10 days post-infection was compared when significant differences ($P < 0.01$) were found between the two groups. Then the 22 sheep were divided into animals that recognized a protein and animals that did not. Comparing both parameters, the titre of sIgA and the recognition or not of a protein, a band with a Mr of 50–55 kDa was analysed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The resulting band was constituted by peptides that matched up with the peptides of a PDI of *O. ostertagi* (Figure 6). The amino acid sequence of the Oo-PDI is registered in GenBank as AJ419174 and was described by Geldhof *et al.* (12). Moreover, previous studies have already related the antibody IgA to the PDI. Meek *et al.* (13) found that the secretory IgA antibody in human tears and milk recognized a PDI on a *Toxoplasma gondii* lysate immunoblot.

PDI is a possible antigen for identifying resistant sheep infected with *T. circumcincta*, as shown by the relationship between the titre of IgA on day 10 post-infection and the recognition of PDI ($P < 0.01$); the higher the titre of IgA, the higher the possibility of identifying the protein. Moreover, within the resistant group, eight animals identified the 55 kDa PDI and three did not, and in the susceptible group only three animals out of 11 identified the PDI.

PDI is a multifunctional enzyme that belongs to the superfamily of thioredoxins, functioning as an endoplasmic reticulum oxidoreductase (14). It is found in all eukaryotes and is fairly uniform in its features. The principal function of this superfamily is the formation of disulphide bridges between cysteines (oxidation), and/or rearranging existing disulphide bridges (isomerization). Besides this function, PDI also acts as chaperones, forming a subunit of prolyl-4-hydroxylase and triacylglycerol transfer proteins (11).

The size of the mature polypeptide in mammals is approximately 490 amino acids with a molecular weight of 56 kDa (15). In the gastrointestinal nematode of cattle, *O. ostertagi*, its size is 493 and its molecular weight is 55 kDa (12), the same size as the PDI present in *Caenorhabditis elegans* or *Ancylostoma caninum* (16). Regarding the structure of PDI, the mature protein contains two segments with homology (47% identity) to each other, regions a (amino acids 9–90) and a' (353–431). The mid-part of the protein corresponds with the regions b and b' and with the positions 153–244 and 256–343, respectively. These regions also show some homology between each other (28% identity) (15). Highly conserved sequences in the regions a and a' were seen to contain two cysteines separated by a glycine and a histidine; these putative active sites were identified as such by LaMantia and Lennarz (17) and Puig *et al.* (18) and are homologous to thioredoxin, a small protein involved in cytoplasmic redox reactions (5). The domain usually occurs in two tandem imperfect copies or repeats, and both copies are involved in binding peptide substrate (19). In the Tc-PDI the active sites are the thioredoxin box and are constituted by the sequence WCGHCK, the same one as in other parasites, as shown in Figure 5. The thioredoxin box has been described in many enzyme families involved in sulphur metabolism (20). It facilitates *de novo* formation of disulphide bridges between cysteines (oxidation) and/or rearranges existing disulphide bridges (isomerization) in secretory and cell-surface proteins (11). PDI also has redox-independent foldase activity; it assists in folding of proteins with no disulphides (21). Furthermore, it is an essential subunit in the enzyme complexes collagen prolyl-4-hydroxylase (22) and microsomal triglyceride-transfer protein (MTP) (23).

The PDI protein is also constituted by a last segment, the c domain, which is situated at the C-terminal and contains an endoplasmic reticulum retention signal. In the Tc-PDI as well as in other related disulphide isomerase proteins (Figure 5) the sequence retention signal is -HTEL. Furthermore, other sequences such as -KDEL, and its variants, are well documented in other organisms as an endoplasmic retention signal (14). However, despite the presence of the retention sequence, the Tc-PDI was available for binding by IgA as described in the Western blotting (Figure 3), indicating the presence of the PDI on the surface. The fact is that PDIs are retained in the endoplasmic reticulum, but in highly secretory cells where the retention system could be saturated the PDI could go through the plasma membrane (5). The presence of PDI on the cell surface has been shown in *T. gondii* (13) and in excretion-secretion material from L4 and adult life stage from *O. ostertagi* (12).

As demonstrated in Figure 7, rabbits challenged with the recombinant protein generate IgA antibodies reacting with the PDI in L3, L4 and adult extracts from *T. circumcincta*,

confirming the presence of PDI in all stages. Other related species, such as *T. colubriformis*, also demonstrated the expression of PDI in adult somatic extract. Since the domains of PDI are highly conserved among PDI, it is suggested that anti-Tc-PDI IgA antibodies could react with the PDI of other related species. In the same way Geldhof *et al.* (12), demonstrated the reaction of monospecific antibodies of *O. ostertagi*-PDI against excretion-secretion antigen from the closely related cattle parasite *Cooperia oncophora*. However, with the somatic antigen of adults from *H. contortus* the 55 kDa protein was not recognized.

On the other hand, with the aim to determine the antigenic ability of the 203 amino acid fragment of PDI, the titre of IgA against the recombinant protein was measured, with satisfactory results. It was shown that the titre of immunoglobulins was higher in the resistant group than in the susceptible group and significant differences were found at day 25 post-infection ($P < 0.01$). Moreover a weak correlation ($P < 0.05$) was found between both parameters at day 25 post-infection.

In conclusion, sIgA in serum samples from sheep was found to recognize PDI on a *T. circumcincta* lysate immunoblot. However, the PDI in somatic L4 from *T. circumcincta* was not recognized in the same way by all resistant and susceptible experimental infected sheep. Owing to this fact this recombinant fragment of Tc-PDI could be used to identify resistant and susceptible animals infected with *T. circumcincta*. As described previously by Meek *et al.* (13), the conserved regions of the PDI are target of the IgA and because of this fact the 203 amino acid fragment is made up of one of the two active sites. However ELISAs are necessary to confirm the relationship between the PDI and the resistance to *T. circumcincta*. The antigenic ability of this fragment of Tc-PDI will be tested in a different assay with the aim of measuring the level of sIgA in ovine serum samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof M. Stear for his advice and the assistance with the manuscript.

REFERENCES

- 1 Sayers G & Sweeney T. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim Health Res Rev* 2005; **6**: 159–171.
- 2 Stear MJ, Bairden K, Duncan JL, *et al.* How hosts control worms. *Nature* 1997; **389**: 27.
- 3 Strain SA, Bishop SC, Henderson NG, *et al.* The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 2002; **124**: 545–552.
- 4 Martinez-Valladares M, Vara-Del Rio MP, Cruz-Rojo MA & Rojo-Vazquez FA. Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*.

- IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunol* 2005; **27**: 213–218.
- 5 Freedman RB, Hirst TR & Tuite MF. Protein disulphide-isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 331–336.
 - 6 Strain SA & Stear MJ. The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 163–168.
 - 7 Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. 3rd edn. London: MAFF; 1986.
 - 8 Gevaert K, Eggermont L, Demol H & Vandekerckhove J. A fast and convenient MALDI-MS based proteomic approach: identification of components scaffolded by the actin cytoskeleton of activated human thrombocytes. *J Biotechnol* 2000; **78**: 259–269.
 - 9 Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM & Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; **20**: 3551–3567.
 - 10 Vercruyse J & Claerebout E. Treatment versus non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. *Vet Parasitol* 2001; **98**: 195–214.
 - 11 Frand AR, Cuozzo JW & Kaiser CA. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 203–210.
 - 12 Geldhof P, Vercauteren I, Knox D, et al. Protein disulphide isomerase of *Ostertagia ostertagi*: an excretory–secretory product of L4 and adult worms? *Int J Parasitol* 2003; **33**: 129–136.
 - 13 Meek B, Back JW, Klaren VNA, Speijer D & Peek R. Conserved regions of protein disulfide isomerase are targeted by natural IgA antibodies in humans. *Int Immunol* 2002; **11**: 1291–1301.
 - 14 Munro S & Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987; **48**: 899–907.
 - 15 Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA & Rutter WJ. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 1985; **317**: 267–270.
 - 16 Epe C, Kohlmetz C & Schnieder T. A recombinant protein disulfide isomerase homologue from *Ancylostoma caninum*. *Parasitol Res* 1998; **84**: 763–766.
 - 17 LaMantia ML & Lennarz WJ. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* 1993; **74**: 899–908.
 - 18 Puig A, Lyles MM, Noiva R & Gilbert HF. The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19128–19135.
 - 19 Freedman RB, Klappa P & Ruddock LW. Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO J* 2002; **3**: 136–140.
 - 20 Gonzalez Porque P, Baldesten A & Reichard P. The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J Biol Chem* 1970; **245**: 2371–2374.
 - 21 Yao Y, Zhou Y & Wang C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *EMBO J* 1997; **16**: 651–658.
 - 22 Pihlajaniemi T, Helakoski T, Tasanen K, et al. Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J* 1987; **6**: 643–649.
 - 23 Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN & Joiner BJ. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem* 1990; **265**: 9801–9807.

**USE OF A 203 $\alpha\alpha$ FRAGMENT OF Tc-PDI TO
DETECT IgA ACTIVITY DURING
INFECTION BY *Teladorsagia circumcincta* IN
SHEEP**



Martínez-Valladares M., Vara-Del Río M.P., Rojo-Vázquez F.A.

Departamento de Sanidad Animal, Parasitología. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071 León, Spain. dsammv@unileon.es

Key words: *Teladorsagia circumcincta*, ELISA, IgA, protein disulphide isomerase, somatic antigen, sheep.

Parasitology Research. In Press.

Summary

The objectives of this study are to find an appropriate ELISA technique to monitor IgA activity during infection by *T. circumcineta* in sheep as well as to identify the degree of resistance to the infection. Previous studies have shown the relationship between the activity of IgA in infected sheep and the degree of resistance to the infection. In this study the titre of IgA in resistant and susceptible infected ewes was tested in blood, nasal secretions and saliva. ELISAs were carried out against somatic antigen from L4 and against a 203 amino acid fragment of a recombinant protein disulphide isomerase of *T. circumcineta* (Tc-PDI) to prove its antigenic ability. The results showed that, in general, the titres of IgA against a fragment of a Tc-PDI were lower than against the somatic antigen. These lower levels are clearly shown in blood samples and nasal secretions in contrast to saliva samples where the titre reached higher values from the day 32 until 46 pi testing the IgA against Tc-PDI. This could be due to the fact that, in the detection of IgA against Tc-PDI, the antibody-antigen reaction is much more specific than against the whole somatic antigen. To differentiate between resistant and susceptible animals, the significant differences were more present with the somatic antigen. Nevertheless, the ELISA technique using the somatic antigen cannot be standardized, and the antigen-antibody reactions are more unspecific; therefore, the recombinant Tc-PDI could be a better option.

1. Introduction

The infection by *Teladorsagia circumcineta* in sheep is very common and has a great importance worldwide. Because of the development of anthelmintic resistance in ruminant trichostrongyles, the studies about genetic resistance to the infection by trichostrongyles are a new strategy to control this widespread infection (Waller, 1997). Some studies have shown the relationship between the titre of IgA and the degree of resistance to *T. circumcineta* (Strain et al. 2002; Martinez-Valladares et al., 2005). An assay carried out by Smith et al. (1975) shows the importance of the IgA in the organic fluids as saliva, lung and lachrymal fluid, tracheobronchial and nasal secretions as the majority antibody. We focused on determining the presence of IgA in blood, nasal

secretions and saliva in both resistant and susceptible ewes to the infection by *T. circumcincta*.

With the intention of improving a serodiagnostic method to test the IgA level in resistant and susceptible ewes we have identified a protein disulphide isomerase (PDI) as a possible antigenic protein. This protein (DQ357222) was identified in all stages from *T. circumcincta* by sera from resistant and susceptible infected sheep with a Western blotting technique (Martinez-Valladares et al. 2007). PDI belongs to the superfamily of thioredoxins, and its main function is the formation of disulphide bridges between cysteines (oxidation) and /or rearrangement of existing disulphide bridges (isomerization) in secretory and cell-surface proteins (Frandsen et al. 2000). We cloned and expressed a fragment of 203 amino acids, which sequence contains one of the active site of the protein, a thioredoxin box (WCGHCK), and the C-terminal (HTEL).

The present study shows a comparison between two ELISA techniques with two different antigens. In the first one, the immunoglobulin level was tested against L4 somatic antigen from *T. circumcincta* and in the second one, against a recombinant fragment of protein disulphide isomerase of *T. circumcincta* (Tc-PDI). The lack of standardization of the ELISA with the whole extract of the parasite as antigen makes it necessary to find an antigenic recombinant protein.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

The study was carried out with 22 adult Churra ewes kept indoors during the whole experiment in the farm of the University of León (Spain). Ewes were selected from a farm ("Bonisa"), with some 1,500 animals, according to their faecal counts during the previous 2 years. The selected ewes were those whose egg outputs were at the extremes of the egg count distribution. Animals were classified into two groups; the resistant one with 11 ewes with the lowest eggs per gram (epg) level and the susceptible

group of 11 ewes with the highest epg level. At the beginning of the assay, the 22 ewes were assigned at random into two boxes.

Once all ewes were indoors, they were treated with albendazole (ABZ; 7.5 mg/kg). On day 0 of the experiment, the animals were experimentally infected with a dose of 40.000 L3 of *T. circumcincta*. Animal samples were collected periodically until the day 85 post-infection (pi).

As control group, ten ewes were maintained free of nematodes in a different box. Animal samples were collected at the same time as the other ewes.

2.2. Animal sampling

Faeces were collected directly from the rectum; the number of epg was carried out using a modified McMaster method according to Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1986).

Blood samples were taken into evacuated glass tubes Venoject, without anticoagulant to obtain serum. Serum samples were stored at -20°C until the establishment of the optical density (OD) of IgA antibodies.

Nasal secretions were taken by introducing cotton swabs into the nostril of each ewe. Afterwards, the swabs were placed into a test tube containing 2.2 ml of phosphate-buffered saline (PBS), shaken to dissolve the secretions in the PBS and kept overnight at 4°C. Then, the swabs were removed, and the tubes centrifuged at 900xg. The supernatant was stored at -20°C. The samples of saliva were collected with the same protocol but introducing the cotton swabs into the buccal cavity.

2.3. Titre of IgA

An indirect ELISA was carried out to determine the OD of IgA in serum, nasal secretions and saliva.

ELISAs were carried out against a somatic antigen of L4 and against a fragment of a recombinant (Tc-PDI).

Microtiter plates (Sigma) were coated with 100 μ l of PBS that contained 2.5 μ g/ml of both antigens; plates were stored overnight at 4°C. After discarding the contents, plates were blocked with 250 μ l PT-Milk (4g powdered milk + 100ml PBSTween; PBSTween: 1l PBS pH 7.4 + 1ml Tween) for 30 min at 37°C. Then, the blocking buffer was discarded, and 100 μ l serum was added. Sera were diluted in PT-Milk: 1/10 serum, 1/20 nasal secretions and 1/3 saliva. Plates were incubated for 30 min at 37°C. After washing the plates four times with PBSTween, 100 μ l of a sheep anti-IgA, obtained in a mouse (Serotec), at a dilution of 1/150 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. After a further four washes in PBSTween, 100 μ l of mouse anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) at 1/500 in PT-Milk were added and incubated for 30 min at 37°C. Then, plates were washed again four times with PBSTween. Plates were developed adding 100 μ l of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (“BluePhos Microwell”, KPL). Plates were incubating for a further 30 min at 37°C. The absorbance was measured at 635 nm in a spectrophotometre. Positive and negative controls were included in every plate.

2.4. Antigen production

The preparation of somatic extracts from L4 was carried out from two experimentally infected sheep that were killed after 5 days pi with an intravenous injection of pentobarbital (10-30mg/kg; “Dolethal”, Vetoquinol). At necropsy, the recovery of the abomasa and the digestion of gastric mucus to collect L4 were done following the method described by Armour et al. (1966). The somatic extract was obtained according to Strain and Stear (1999). The protein concentration was estimated in the Bio-Rad protein assay system.

A fragment of a Tc-PDI (DQ357222) with a molecular weight of 23 kDa was cloned and expressed with the aim to test its antigenic ability. The fragment is constituted by the last 203 amino acids of the sequence, including the C-terminal

sequence (HTEL) and a thioredoxin box with the sequence WCGHCK that represents one of the active sites of the protein (Freedman et al., 1994). The amino acid sequence is shown in Fig. 1.

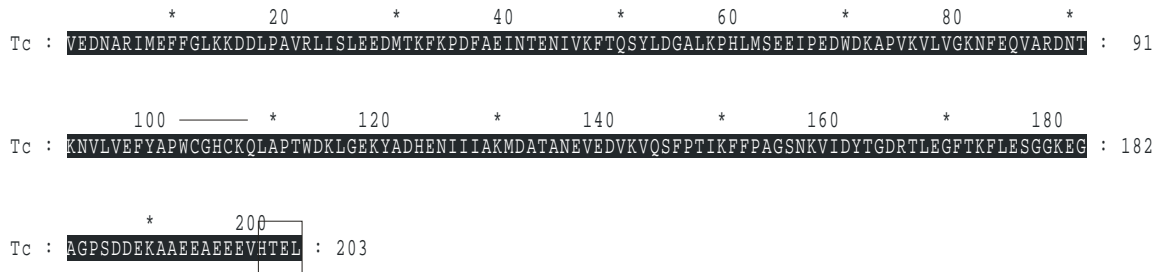


Figure 1. Amino acid sequence of the fragment of Tc-PDI. The thioredoxin box is overlined.

2.5. Statistical analyses

The data were analysed using the statistical computer package for social science, SPSS. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determinate if data were normally distributed. A non-parametric method, the “Mann-Whitney U” test was used to determine the significant differences between groups. Variations around the mean were expressed as the standard error (SE).

Correlations between the OD of IgAs were obtained with Pearson’s product moment correlation coefficient.

3. Results

3.1. Comparison between resistant and susceptible sheep

3.1.1. Faecal egg counts

Faecal egg counts increased gradually in both groups of sheep after the infection (Fig. 2). Infections were patent in the susceptible group by day 17 pi and by day 20 in the resistant group.

Mean faecal egg counts in the susceptible group reached a maximum of 1280 epg at 32 days pi and in the resistant group, a maximum of 602 epg at 34 days pi; in the susceptible group, the peak number of epg was 2.1 times higher than in the resistant group.

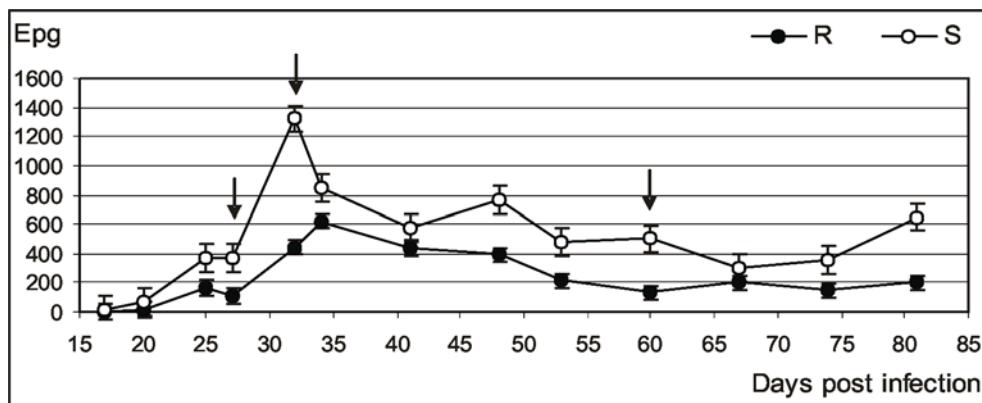


Fig. 2. Eggs per gram (Mean \pm SE) during the infection. The arrows indicate the days with significant differences.

The largest differences were observed between the two groups at 27 and 32 ($p < 0.01$) days pi and by day 60 ($p < 0.05$) pi.

3.1.2. IgA against somatic antigen from L4

As shown in Fig. 3, the peak of IgA in blood was reached at 10 days pi in both resistant and susceptible groups of animals; afterwards there was a decrease in IgA activity. Comparing the titre of antibodies in both groups, there were significant differences between them at day 10 pi ($p < 0.01$) and at days 20 and 25 ($p < 0.05$).

The titre of IgA in nasal secretions (Fig. 4) rose by day 10 in both groups of animals matching up with the increase in serum samples as shown in Fig. 4. Unlike immunoglobulins in serum samples, the titre of IgA was high throughout the experiment particularly between days 34 and 48 pi. The higher differences were observed on days 3 and 10 pi ($p < 0.01$) and a bit lower by days 17 and 20 ($p < 0.05$) pi as well.

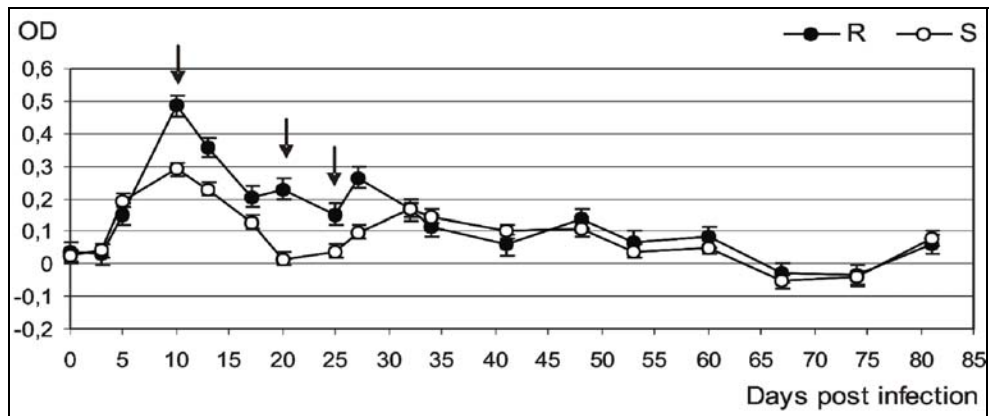


Fig. 3. IgA in blood samples (OD ± SE) against somatic antigen from L4. The arrows indicate the days with significant differences.

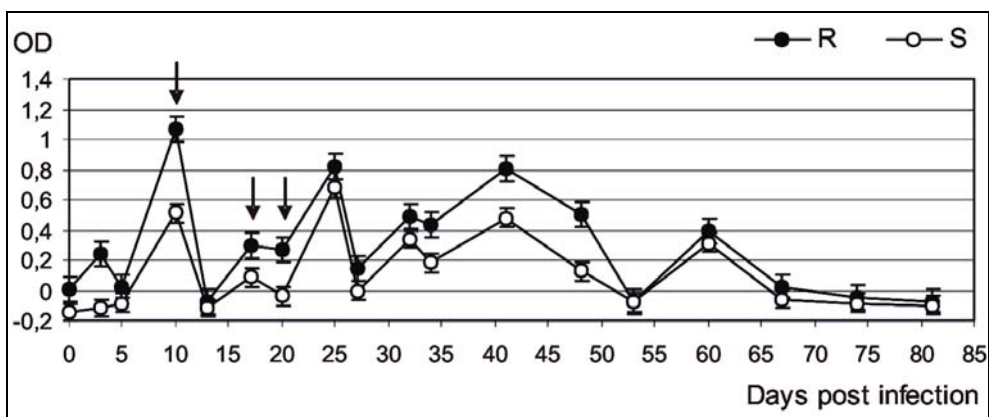


Fig. 4. IgA in nasal secretions (OD ± SE) against somatic antigen from L4. The arrows indicate the days with significant differences.

As in other fluids, the immunoglobulins in saliva reached a maximum by day 10 pi, then decreased until day 30 rising again to maintain a high level until the end of the measurement. Especially high values were found between days 34 and 48 pi as the increase matched up with the kinetics in nasal secretion samples (Fig. 5). Comparing the groups on days 34, 41 and 67 ($p < 0.01$) significant differences between resistant and susceptible ewes were found.

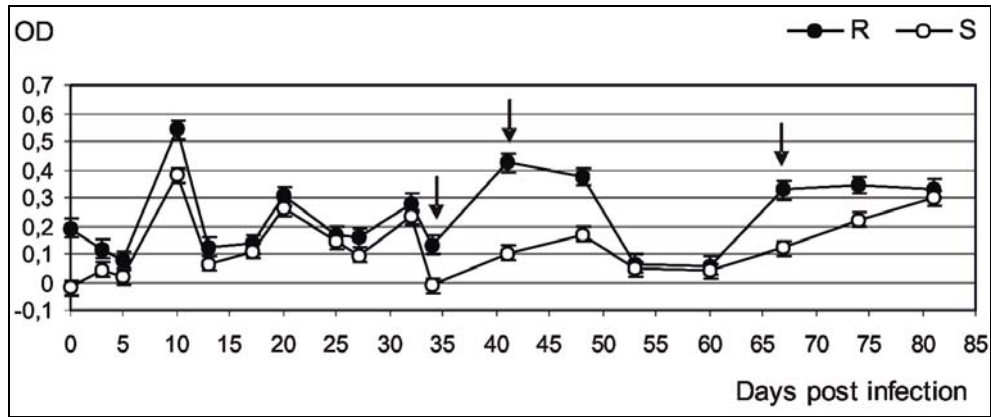


Fig. 5. IgA in saliva (OD ± SE) against somatic antigen from L4. The arrows indicate the days with significant differences.

3.1.3. IgA against a fragment of Tc-PDI

The titre of IgA in blood samples increased until a maximum at day 13 pi. The immunoglobulin activity decreased slowly until day 55 when IgA suffered a slight ascent (Fig. 6). The titre did not reach values as high as the OD against the whole somatic antigen. Between resistant and susceptible animals, significant differences were shown at days 25 ($p < 0.01$) and 67 ($p < 0.05$) pi.

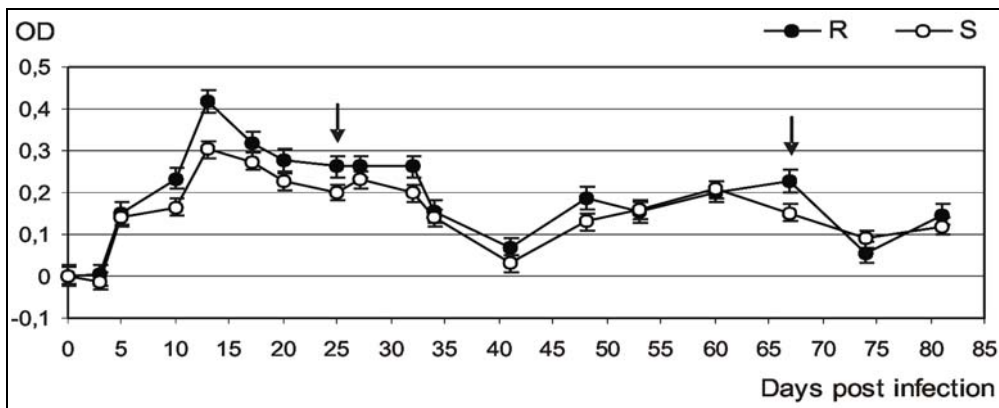


Fig. 6. IgA in blood samples (OD ± SE) against Tc-PDI. The arrows indicate the days with significant differences.

IgA immunoglobulins in nasal secretions reached the highest OD at day 5 pi, earlier than with the somatic antigen. At day 39 pi, there was an increase in IgA matching up with the measured ascent against somatic antigen (Fig. 7). The antibody activity was lower than the ELISA with somatic antigen. No significant differences were found between groups (Fig. 7).

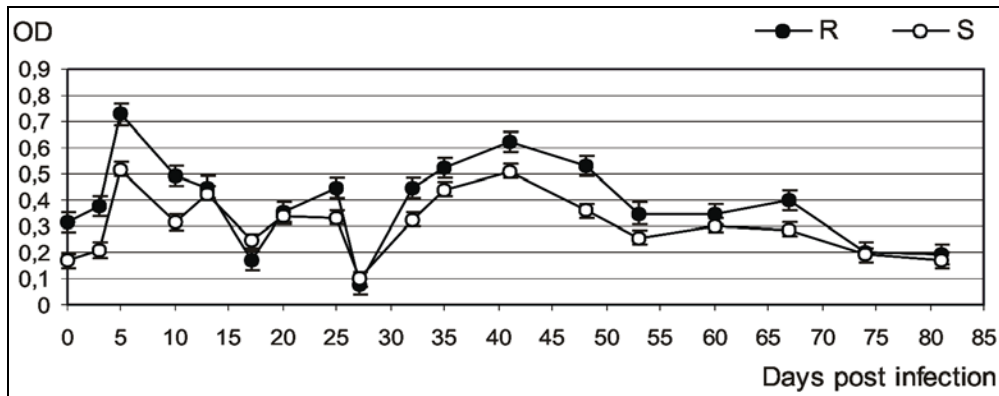


Fig. 7. IgA in nasal secretions (OD \pm SE) against Tc-PDI.

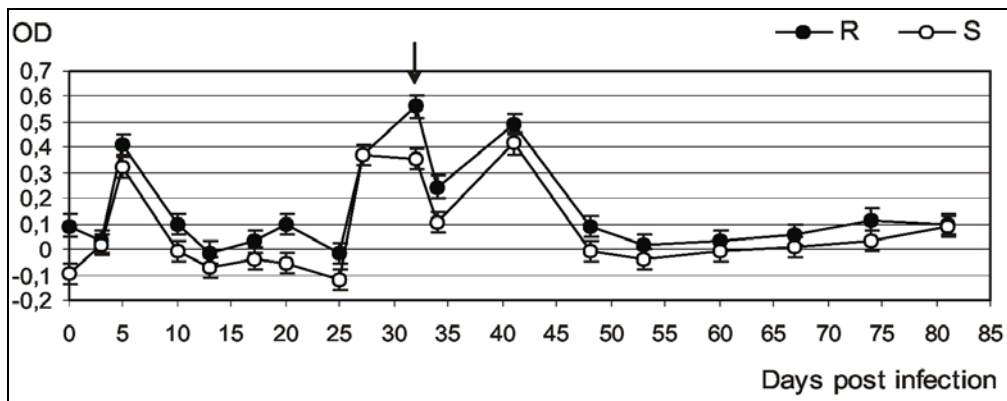


Fig.8. IgA in saliva against (OD \pm SE) Tc-PDI. The arrows indicate the days with significant differences.

IgA antibodies in saliva samples first rose on day 5 pi and later reached maximum values between days 32 and 46 pi. The OD reached against the Tc-PDI is higher than the ones tested against somatic antigen. By day 32 pi, significant differences were found between resistant and susceptible animals ($p < 0.01$). Moreover significant

correlations ($p < 0.01$) were obtained between the OD at days 32 and 34 pi against the somatic antigen (Fig. 8).

3.2. Comparison of the IgA kinetic with both antigen

With the intention to compare the serodiagnostic ability of the two antigens, the data of susceptible and resistant animals were analysed jointly.

In blood samples, the IgA kinetics with both antigens were very similar, although the maximum titre was reached previously with the somatic antigen on the day 10 pi. Throughout the experiment, the level of immunoglobulins was maintained higher using the recombinant protein as antigen (Fig. 9).

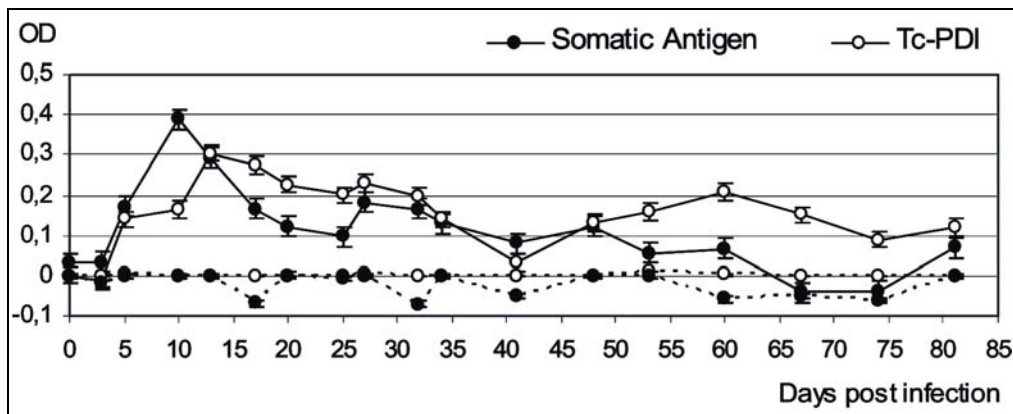


Fig. 9. IgA in saliva blood samples ($OD \pm SE$) against somatic antigen from L4 and Tc-PDI. The slatted lines are the control groups.

On the other hand, in nasal secretions the first increase in immunoglobulins after the infection was detected at day 5 with the Tc-PDI and at day 10 with the somatic antigen (Fig. 10). During the assay, the level of IgA was more constant using the Tc-PDI than the somatic antigen.

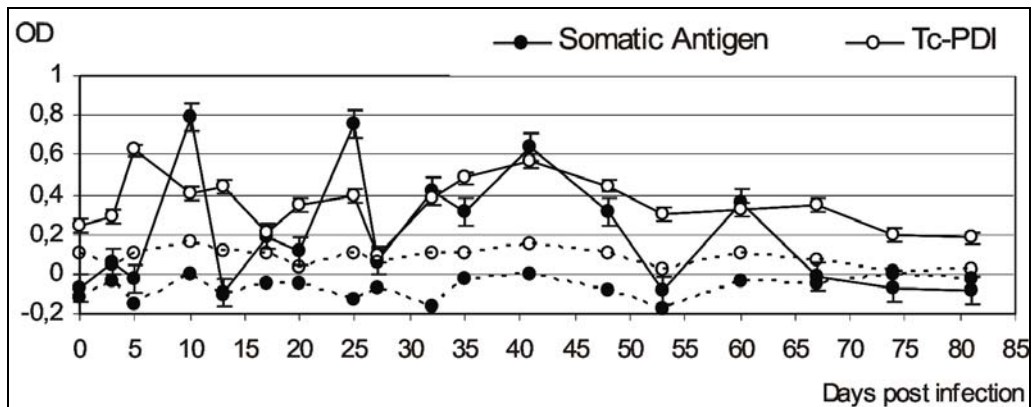


Fig. 10. IgA in nasal secretions (OD \pm SE) against somatic antigen from L4 and Tc-PDI. The slatted lines are the control groups.

In saliva samples, the infection was detected before with the recombinant protein and at the same time as in nasal secretions (Fig. 11). However, the highest titres were not tested until the day 32 pi with the Tc-PDI. Comparing both kinetics, they are considered very similar, although the immunoglobulins measured with the fragment of Tc-PDI were tested previously.

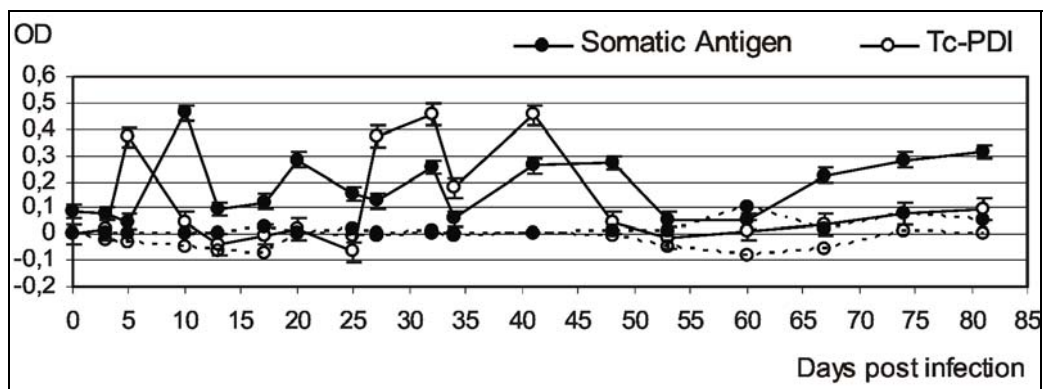


Fig. 11. IgA in saliva (OD \pm SE) against somatic antigen from L4 and Tc-PDI. The slatted lines are the control groups.

4. Discussion

The objectives of this study have been to find an appropriate ELISA technique to detect the IgA level during the infection by *T. circumcincta* in sheep as well as to identify the degree of resistance to the infection. Previous studies have shown the relationship between the IgA level in infected sheep and the degree of resistance to *T. circumcincta* (Strain et al. 2002; Martinez-Valladares et al. 2005) due to the influence of the immunoglobulin in the inhibition of parasite development (Stear et al. 1997).

In this experiment, the titre of IgA was tested against somatic antigen from L4, as previously described Martinez-Valladares et al. (2005), and against a fragment of a Tc-PDI with the intention of proving its antigenic ability. PDI is an enzyme that belongs to the superfamily of thioredoxins (Munro and Pelham 1987); it functions as an endoplasmic reticulum oxidoreductase (Munro and Pelham 1987) that facilitates *de novo* formation of disulphide bridges between cysteines (oxidation) and/or rearranges existing disulphide bridges (isomerization) (Frand et al. 2000).

The recombinant Tc-PDI was cloned and expressed in our laboratory, and its sequence is constituted by 203 amino acids (Martinez-Valladares et al. 2007). The sequence includes one of the active site of the protein, a thioredoxin box (WCGHCK), and the C-terminal sequence -HTEL. In the trichostrongyle *Cooperia oncophora*, a recombinant protein of 14.2 kDa was cloned (Poot et al. 1997) and used for the serodiagnostic of the infection in cattle even when the level of the infection was low (Githiori et al. 2000). In the trematode *Fasciola hepatica* a recombinant cathepsin-L1 was tested for diagnostic purpose (Cornelissen et al. 1999) and in *Ostertagia ostertagi*, a 19.7 kDa antigen was purified for the detection of IgG1 (Graaf et al. 1994).

The titre of IgA was measured in blood, nasal secretions and saliva because IgA is secreted in the gastrointestinal mucus and distributed to mucosal secretions through the blood (Tizard, 1984). The ELISA carried out against somatic antigen showed that the highest immunoglobulin level during the infection was observed at day 10 pi in all kind of samples, and at the same time, significant differences between groups were

found in blood and nasal secretions on this day. In blood samples, the OD level decreased after the day 10 pi until low levels with which the identification of the disease would not be possible. In contrast, the titre of immunoglobulins in nasal secretions and saliva remained high throughout the experiment. Moreover, the IgA kinetics in both samples had some similarity particularly between days 34 and 48 pi. As in nasal secretions and in saliva samples, significant differences were found between resistant and susceptible animals, being more obvious in saliva samples.

The titre of IgA also was determined in the same samples against a fragment of a Tc-PDI with the intention to test its antigenic ability. The results showed that, in general, the titres of IgA against a fragment of a Tc-PDI were lower than against somatic antigen. These lower levels are clearly shown in blood samples and in nasal secretions in contrast to saliva samples where the OD reached higher values from the days 32 until 46 pi testing the IgA against Tc-PDI. This could be due to the fact that in the detection of the IgA against Tc-PDI the antibody-antigen reaction is much more specific than against the whole somatic antigen, and the possibility of unspecific reactions is higher. Rodero et al. (2005) compared the antibody levels in patients reinfected with *Anisakis simplex* with two ELISA techniques, using purified antigens and crude extracts. The result was that the immunoglobulins tested with the purified antigens ELISA were lower than the values observed measuring with the crude extract, in the same way as in the present experiment.

IgA kinetics in blood samples against Tc-PDI differs from the previous one. In this case, immunoglobulin activity was maintained higher along the assay as Tc-PDI is expressed by the parasite in all larvae stages according to previous experiments carried out in our laboratory (unpublished data). Geldhof et al. (2003) also confirmed the presence of PDI in L3, L4 and adults from *O. ostertagi*. The IgA values in nasal secretions against PDI were detected before the somatic antigen, probably due to the presence of the protein in the L3 stage. The same phenomenon occurred in saliva samples, where the first increase in the OD was at day 5 pi. Comparing IgA kinetic in nasal secretions against the somatic antigen, demonstrated the similarity between both ELISA techniques. The diagnostic value of IgA in saliva against the recombinant

protein could be an acceptable technique because of the presence of high values between the days 27 and 46 pi and the presence of significant differences between resistant and susceptible animals at day 32 pi. Moreover, significant correlations ($p < 0.01$) were observed between the IgA titres at day 32 pi, against Tc-PDI, and at day 34 pi, against the somatic antigen. Furthermore, the infection is detected previously in nasal secretions and saliva using the recombinant protein.

On the other hand, the epg during the infection reached the maximum value by day 32 in the susceptible group and by day 34 in the resistant one, matching up with one of the days when the largest differences between groups were found. In saliva samples, there were significant differences at day 32 pi against the Tc-PDI.

In conclusion, in the present study, the antigenic ability of the 203 amino acids fragment of Tc-PDI to the monitor IgA activity during the infection in sheep by *T. circumcincta* is shown. The differences between resistant and susceptible animals were greater with the somatic antigen. Nevertheless, the ELISA technique using the somatic antigen cannot be standardized conveniently and the antigen-antibody reactions are less specific. Moreover, the potential ability of the Tc-PDI to detect IgA in nasal secretions and saliva is also showed as it is much more accessible and less invasive than taking blood and the detection is earlier than in blood samples.

5. Acknowledgements

The authors thank Prof. M. Stear for his advice and assistance with the correction of English.

6. References

Armour J, Jarrett WFH, Jennings FW (1966) Experimental *Ostertagia circumcincta* infections in sheep: development and pathogenesis of a single infection. Am J Vet Res 27:1267-1278.

- Cornelissen JBWJ, Gaasenbeek CPH, Boersma W, Borgsteede FHM, Van Milligen FJ (1999) Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Int J Parasitol* 29:685-696.
- Frand AR, Cuzzo JW, Kaiser CA (2000) Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 10:203-210.
- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF (1994) Protein disulphide-isomerase: building ridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 19:331-336.
- Geldhof P, Vercauteren I, Knox D, Demaere V, Van Zeveren A, Berx G, Vercruysse J, Claerebout E (2003) Protein disulphide isomerase of *Ostertagia ostertagi*: an excretory-secretory product of L4 and adult worms?. *Int J Parasitol* 33:129-136.
- Githiori JB, Kooyman FNJ, Kuitwagen C, Ploeger HW, Eysker M (2000) Use of a 14.2 kDa recombinant *Cooperia oncophora* protein in an enzyme-linked immunosorbent assay for herd health monitoring of nematode infections in first grazing season calves. *Vet Parasitol* 91:63-78.
- Graaf DC, Berghen P, Hilderson H, Claerebout E, Vercruysse J (1994) Identification and isolation of a 19.7 kDa *Ostertagia ostertagi* specific antigen and evaluation of its potential for immunodiagnosis. *Int J Parasitol* 24:681-688.
- Martinez-Valladares M, Godio-Fernandez R, Vara-Del Rio MP, Martin JF, Rojo-Vazquez FA (2007) Expression of the recombinant protein disulphide isomerase of *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 29: 47-56.
- Martinez-Valladares M, Vara-Del Rio MP, Cruz-Rojo MA, Rojo-Vazquez FA (2005) Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep. *Parasite Immunol* 27:213-218.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1986) Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, 3rd edn. London, GB.
- Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
-

- Poot JO, Kooyman FNJ, Dop PY, Schallig HDFH, Eysker M, Cornelissen AWCA (1997) Use of cloned excretory/secretory low molecular weight proteins of *Cooperia oncophora* in a serological assay. *Cli Microbiol* 35:1728-1733.
- Rodero M, Chivato T, Muro A, Cuellar C (2005) Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:293-301.
- Smith WD, Dawson AM, Wells PW, Burrells C (1975) Immunoglobulin concentrations in ovine body fluids. *Res Vet Sci* 19:189-94.
- Stear MJ, Bairden K, Duncan JL, Holmes PH, McKellar QA, Park M, Strain S, Murray M (1997) How hosts control worms. *Nature* 389:27.
- Strain SAJ, Bishop SC, Henderson NG, Kerr A, McKellar QA, Mitchell S, Stear MJ (2002) The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 124:545-552.
- Strain SA, Stear MJ (1999) The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. *Parasite Immunol* 21:163-168.
- Tizard I (1984) Inmunidad en las superficies corporales. In: *Inmunología veterinaria*, 2nd edn. Interamericana México D.F., México, pp179-191.
- Waller PJ (1997) Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet Parasitol* 31:195-207.

Resumen General

La resistencia genética a las infecciones por tricostrongídeos en los rumiantes es un nuevo método de control con posibilidades de aplicación en el futuro. La selección de ovinos resistentes a *Haemonchus contortus* se ha llevado a cabo en diversos países con censos ovinos elevados, como Australia y Nueva Zelanda (Woolaston y Baker, 1996). La selección de animales resistentes aparece como consecuencia del abuso en la utilización de fármacos antihelmínticos que ha provocado el desarrollo de resistencias antihelmínticas. A diferencia de las infecciones producidas por otros patógenos, como virus o bacterias, no existen vacunas eficaces para el control de las infecciones por parásitos en los animales domésticos, por lo que se hace más necesario el desarrollo de nuevas estrategias de control antiparasitario.

Tradicionalmente, se ha relacionado una baja excreción de huevos en las heces con una mayor resistencia a las infecciones por tricostrongídeos. Según Stear y col. (1997) la mayor manifestación de la resistencia en corderos es la inhibición o retraso del desarrollo de los parásitos en el hospedador lo que se traduce en una menor excreción de huevos con las heces. La importancia de las IgA en relación con la resistencia genética fue puesta de manifiesto por Smith y col. (1985) que fueron los primeros en describir la relación entre las inmunoglobulinas y una reducción del tamaño de las hembras adultas en el hospedador.

Nuestro trabajo de tesis doctoral se presenta bajo la modalidad de “compendio de publicaciones” e incluye varios trabajos publicados en los que la primera firmante es la autora de la tesis, participando también el director de la misma.

El primero de los trabajos se titula “**Genetic resistance to *Teladorsagia circumcincta*: IgA and parameters at slaughter in Churra sheep**”. En él se describe la relación entre las IgAs y una serie de parámetros al sacrificio en ovinos de raza Churra infectados experimentalmente por *Teladorsagia circumcincta*. Como se puede observar, cuanto menor es la longitud de las hembras adultas mayor es el título de las IgA en la mucosa gástrica ($p < 0,01$). Debido a un menor desarrollo del nematodo hay un menor número de huevos *in utero* en las hembras ($p < 0,01$) y una menor excreción de huevos con las heces ($p < 0,05$). Según nuestros estudios, el título de las IgA en la

mucosa gástrica está relacionado con el título de inmunoglobulinas en suero sanguíneo ($p < 0,01$) cuando es medido frente antígeno somático de LIV. También hemos demostrado la existencia de correlación de las IgA en la mucosa gástrica con los niveles de IgA en el suero sanguíneo y en las secreciones nasales ($p < 0,01$), y de éstas con el título en la saliva ($p < 0,01$).

Por otra parte, estudiamos la correlación entre la resistencia a la infección y el pepsinógeno sérico. Un aumento de pepsinógeno en suero esta asociado a un aumento en la carga parasitaria debido al daño tisular provocado en la mucosa gástrica. Tras ello se produce un aumento del pH y la imposibilidad de la transformación del pepsinógeno en pepsina. Hemos demostrado la relación entre éste y el número de LIV ($p < 0,01$). Hemos confirmado también los resultados de otros autores, como Kanoba y col. (2002) que encontraron relación entre el título de IgA y un incremento en el número de eosinófilos.

En el segundo trabajo, titulado **“Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*”**, se determinó la influencia de una dieta hipoproteica sobre la resistencia a la infección por *T. circumcincta* en ovinos de raza Churra. Según Stewart y Gordon (1953), la nutrición influye más sobre los efectos de la infección que sobre la resistencia a la misma, ya que por una parte hay un aumento de la capacidad del hospedador para hacer frente a los efectos adversos de la infección y, por otra, el establecimiento de los parásitos en el hospedador se ve limitado. La relación entre dieta proteica y grado de resistencia a la infección se basa en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Estudios llevados a cabo por numerosos autores (Datta y cols., 1998; Strain y Stear, 2001) han relacionado la ingesta de proteína metabolizable con un aumento de los eosinófilos y con la respuesta de anticuerpos.

El estudio de la influencia de la nutrición sobre la resistencia a la infección se realizó con dos grupos de animales de raza Churra: resistentes y susceptibles a *T. circumcincta*. Como ya se demostró en el primer trabajo citado, el título de IgA en la mucosa gástrica es indicativo de la resistencia a la infección y éste a su vez se encuentra relacionado con el título en el resto de las secreciones orgánicas. Se comparó el título de IgA en un ensayo realizado previamente con unas condiciones óptimas de nutrición con

los niveles de IgA obtenidos tras un segundo ensayo con los mismos animales pero sometidos a una dieta hipoproteica. El resultado fue un mayor título de anticuerpos al alimentar a los animales con una dieta sin deficiencias nutricionales. También se encontraron mayores diferencias significativas en el título de IgA entre las ovejas resistentes y susceptibles a la infección en condiciones óptimas de nutrición, no ocurriendo lo mismo tras la administración de la dieta hipoproteica. Un factor importante relacionado con esta parasitosis es el descenso de la ingesta de alimentos que, junto con la pérdida de proteína endógena debida a la infección, da lugar a una importante pérdida de peso corporal (van Houtert y Sykes, 1996). Este hecho se confirmó al final del estudio ya que en este caso la pérdida de peso se vio favorecida por una dieta deficitaria.

Con el fin de mejorar el diagnóstico de las infecciones por *T. circumcincta* en los ovinos y poder diferenciar entre animales susceptibles y resistentes a la infección, se estudiaron posibles antígenos proteicos de LIV. Los resultados constituyen el tercer trabajo, cuyo título es **“Expression of the recombinant protein disulfide isomerase of *Teladorsagia circumcincta*”**. Mediante la técnica del Western Blotting se enfrentaron 22 sueros de ovejas infectadas experimentalmente por *T. circumcincta* a antígeno somático de LIV de esta especie parásita. En el estudio se utilizaron sueros de 11 animales resistentes y de 11 susceptibles, obtenidos a los 10 días de la infección cuando se encontraron diferencias significativas en el título de IgA entre ambos grupos. Las IgA de los sueros identificaron varias proteínas, pero no todas fueron identificadas por todos los sueros. De entre todas las bandas proteicas, se identificaron tres por presentar diferencias significativas entre el título de IgA de los sueros y la identificación o no de la proteína. El tamaño de las bandas era de 50-55 KDa, 55-60 KDa y 70-75 KDa cada una. Tras el análisis peptídico mediante la técnica MALDI-TOF, se identificó una banda de 55 KDa como una proteína disulfuro isomerasa (PDI) del también nematodo gastrointestinal *Ostertagia ostertagi*. La posible utilización de la PDI como antígeno en la identificación de IgA en ovinos infectados viene dada por la identificación de la proteína por parte de ocho sueros de las ovejas resistentes y por tres sueros de las susceptibles. Es decir, los animales resistentes, con un mayor título de IgA identificaron

de manera significativa la PDI presente en el antígeno somático a diferencia de los animales susceptibles de los que sólo tres reconocieron la proteína.

Estudios previos sobre la PDI (Frاند y col., 2000) la han caracterizado como una proteína perteneciente a la familia de las tiorredoxinas cuya principal función es la reordenación de los puentes disulfuro. La secuencia aminoacídica de las PDI presenta dos zonas altamente conservadas las cuales contienen dos cisteínas separadas por una glicina y una histidina. LaMantia y Lennarz (1993) así como Puig y col. (1994) las identificaron como los centros activos de la enzima.

Tras el diseño de cebadores a partir de los péptidos obtenidos tras la espectrometría MALDI-TOF se obtuvo la secuencia completa de la PDI en *T. circumcincta* (Tc-PDI) la cual se encuentra identificada en la base de datos GenBank como DQ357222. La proteína consta de 1479 pares de bases o 493 aminoácidos y presenta un homología del 99% con *O. ostertagi* ya que solamente difieren en el aminoácido de la posición 65 de la secuencia aminoacídica. En las posiciones 51 y 392 se identifican dos cajas de tiorredoxinas como centros activos representativos de las PDI, -WCGHCK-. Además, en el extremo C-terminal presenta una secuencia -HTEL que representa una señal de retención de la proteína en el retículo endoplasmático (Munro y Pelham, 1987). Con el fin de determinar la capacidad antigénica de la proteína, se expresó un fragmento de la misma de un tamaño de 203 aminoácidos que incluía el extremo C-terminal y uno de los centros activos para posteriormente inmunizar dos conejos con el fin de obtener anticuerpos policlonales. Al enfrentar el suero de los conejos inmunizados con antígenos de LIII, LIV y adultos de *T. circumcincta* así como frente antígeno somático de adultos de *T. colubriformis* y *H. contortus* se identificó una banda de 55 KDa en todos los casos excepto en el antígeno de *H. contortus*. De esta forma se confirma la presencia de la PDI en todos los estadios parasitarios de *T. circumcincta* y en adultos de *T. colubriformis*.

Con el fin de mejorar y estandarizar un método de detección de anticuerpos IgAs en ovejas infectadas por *T. circumcincta*, se comprobó la capacidad antigénica del fragmento de 203 aminoácidos de la PDI expresado anteriormente en el trabajo “Use of

a 203 aa fragment of Tc-PDI to detect IgA activity during infection by *Teladorsagia circumcincta* in sheep". El título de las inmunoglobulinas se determinó en suero sanguíneo, secreciones nasales y saliva de ovejas resistentes y susceptibles a *T. circumcincta* experimentalmente infectadas. La evaluación de los ELISAs se realizó mediante comparación de la cinética de las inmunoglobulinas frente al antígeno somático de LIV y frente al fragmento de 203 aminoácidos de la PDI.

Frente el antígeno de LIV se halló que el título más alto tras la infección tuvo lugar el día 10 post infección en todas las muestras; además, se encontraron diferencias significativas entre los animales resistentes y susceptibles en la sangre y secreciones nasales este mismo día. Respecto a la cinética de las IgA, se observó que el título de anticuerpos se mantenía elevado durante toda la infección tanto en secreciones nasales como en saliva, pero no en las muestras hemáticas en las que disminuían tras haber alcanzado el máximo de la infección. Al comparar la cinética de las inmunoglobulinas frente a la PDI se observó que con casi todas las muestras el título de anticuerpos era ligeramente menor excepto para las muestras de saliva en las que se determinaron valores mayores entre los días 32 y 46 post infección. La explicación de este hecho es que el antígeno somático de LIV consta de multitud de proteínas las cuales pueden dar lugar a reacciones inespecíficas por lo que al medir el título de las inmunoglobulinas se pueden presentar valores mayores.

Al medir los valores de IgA frente al fragmento de PDI en la sangre se observó un mantenimiento de los valores durante toda la infección debido a que la proteína se encuentra expresada en todos los estadios del parásito, como se demostró anteriormente con los anticuerpos policlonales de conejo. Tanto en las secreciones nasales como en la saliva, el título de anticuerpos aumentó antes de los 10 días post infección, por la misma razón anteriormente descrita. Por otra parte, las cinéticas de las IgA en las secreciones nasales y en la saliva son muy similares al comparar ambos antígenos. En cuanto al título de anticuerpos en saliva, frente al fragmento de 203 aminoácidos de PDI, se encontraron valores elevados entre los días 27 y 46 post infección además de diferencias significativas el día 32 post infección. En relación a la excreción de huevos con las heces, en los días 32 y 34 se observó la máxima excreción de huevos en los grupos

resistentes y susceptibles, respectivamente, coincidiendo con el día en que se hallaron diferencias en muestras de saliva. Por esa razón, la detección de IgA en ovinos infectados por *T. circumcincta* frente a un fragmento de PDI podría considerarse una técnica óptima para medir el nivel de anticuerpos. Sin embargo, se necesitan pruebas en infecciones naturales para confirmar y ampliar estos resultados.

En resumen, uno de los mecanismos por los cuales se desarrolla la resistencia genética a la infección por *Teladorsagia circumcincta* en los ovinos se explica mediante la respuesta de las IgA durante la infección.

También se ha demostrado la influencia de la dieta –con especial atención a la proteína- sobre el desarrollo de la infección. Por otra parte, con el fin de mejorar el método de detección de los niveles de IgA durante la infección, se expresó un fragmento de una proteína del antígeno somático de LIV que posteriormente se utilizó en el diagnóstico de una infección experimental.

No obstante, se necesitan más estudios para intentar conocer los mecanismos implicados en la resistencia así como en el desarrollo de la misma en infecciones naturales.

Conclusiones

I. Relación entre el título de IgA y la resistencia a la infección por *T. circumcincta* en ovinos de raza Churra:

1. Existe una relación inversamente proporcional entre el título de IgA en la mucosa gástrica y el tamaño (longitud) de los nematodos adultos.
2. Igualmente, existe una correlación entre el nivel de anticuerpos en la mucosa gástrica y en el suero sanguíneo, entre las inmunoglobulinas en el suero y en las secreciones nasales, y entre las secreciones nasales y saliva.
3. También hemos demostrado la relación entre la eosinofilia periférica y los títulos de anticuerpos en la sangre y en la mucosa gástrica.

II. Influencia del contenido de proteína de la dieta sobre el desarrollo de la inmunidad en la infección por *T. circumcincta* en ovinos de raza Churra:

4. En animales resistentes, una dieta con déficit proteico hace que la respuesta inmune a la infección sea menor. En tales circunstancias, el título de IgA entre animales resistentes y susceptibles no es significativamente diferente.

III. Desarrollo de una proteína recombinante con fines diagnósticos para la detección de IgAs durante la infección por *T. circumcincta* en ovinos de raza Churra:

5. Hemos identificado una proteína disulfuro isomerasa que es reconocida principalmente por las IgA de los ovinos resistentes a la infección.
6. Hemos determinado la secuencia completa de esa proteína y clonado un fragmento de 203 aminoácidos que incluye uno de los centros activos de la proteína así como el extremo C-terminal. Tras la expresión del fragmento, se ha ensayado su capacidad inmunógena frente a sueros de animales experimentalmente infectados con *T. circumcincta*.

IV. Comparación del título de inmunoglobulinas durante la infección por *T. circumcincta* en ovejas infectadas experimentalmente:

7. Hemos comprobado la capacidad antigénica de la proteína recombinante en muestras de saliva de animales resistentes y susceptibles a la infección por *T. circumcincta*, observando diferencias significativas en los títulos de IgA.

Bibliografía

1. **Abbott EM, Parkins JJ, Holmes PH.** 1986. The effect of dietary protein on the pathophysiology of acute ovine haemonchosis. *Vet Parasitol.* 20, 291-306.
2. **Abbott EM, Parkins JJ, Holmes PH.** 1985. Influence of dietary protein on the pathophysiology of ovine haemonchosis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection. *Res Vet Sci.* 38, 54-60.
3. **Abbott EM, Parkins JJ, Holmes PH.** 1988. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. *Res Vet Sci.* 45, 41-9.
4. **Adams DB.** 1978. The induction of selective immunological unresponsiveness in cells of blood and lymphoid tissue during primary infection of sheep with the abomasal nematode, *Haemonchus contortus*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 56, 107-18.
5. **Adams DB, Beh KJ.** 1981. Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol.* 11, 381-6.
6. **Albers GAA, Burgess SE, Adams DB, Barker JSF, Le Jambre LF, Piper LR.** Breeding *Haemonchus contortus* resistant sheep – problems and prospects. In: Immunogenetics Approaches to the Control of Endoparasites, ed. Dineen JK and Outteridge PM, Melbourne: CSIRO, Division of Animal Health; 1984; 41-51.
7. **Almería S, Canals A, Gómez-Muñoz MT, Zarlenga DS, Gasbarre LC.** 1998. Characterization of protective immune responses in local lymphoid tissues after drug-attenuated infections with *Ostertagia ostertagi* in calves. *Vet Parasitol.* 80, 53-64.
8. **Almería S, Canals A, Zarlenga DS, Gasbarre LC.** 1997. Isolation and phenotypic characterization of abomasal mucosal lymphocytes in the course of a

- primary *Ostertagia ostertagi* infection in calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 57, 87-98.
- 9. Anderson RC.** Orden Strongylida (The Bursate Nematodes). Superfamilia Trichostrongyloidea. In: *Nematode Parasites of Vertebrates. Their development and Transmission*, United Kingdom: C.A.B. International; 1992; 35-191.
- 10. Anderson N, Armour J, Jarrett WF, Jennings FW, Ritchie JS, Urquhart GM.** 1965. A field study of parasitic gastritis in cattle. *Vet Rec.* 77, 1196-204.
- 11. Anderson N, Reynolds GW, Titchen DA.** 1988. Changes in gastrointestinal mucosal mass and mucosal and serum gastrin in sheep experimentally infected with *Ostertagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 18, 325-31.
- 12. Andres DA, Rhodes JD, Meisel RL, Dixon JE.** 1991. Characterization of the carboxyl-terminal sequences responsible for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 5, 14277-82.
- 13. Armour J, Duncan M.** 1987. Arrested larval development in cattle nematodes. *Parasitol Today.* 3, 171-6.
- 14. Armour J, Jarrett WFH, Jennings FW.** 1966. Experimental *Ostertagia circumcincta* infections in sheep: development and pathogenesis of a single infection. *Am J Vet Res.* 27, 1267-1278.
- 15. Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, Grecnis RK.** 1999. Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection. *J Exp Med.* 190, 953-62.
- 16. Baird AW, O'malley KE.** 1993. Epithelial ion transport - Possible contribution to parasite expulsion. *Parasitol Today.* 9, 141-3.

17. **Baker RL.** Genetics of disease resistance in small ruminants in Africa. In: Breeding for resistance to infectious diseases in small ruminants, ed. Gray GD, Woolaston RR, Eaton BT; Canberra: ACIAR; 1995; 119-38.
18. **Baker RL, Watson TG, Bisset SA, Vlassoff A, Douch PGC.** Breeding sheep in New Zealand for resistance to internal parasites: research results and commercial applications. In: Breeding for disease resistance in sheep, ed. Gray GD, Woolaston RR; Melbourne: Australian Wool Corporation; 1991; 19-32.
19. **Balic A, Bowles VM, Liu YS, Meeusen EN.** 2003. Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 25, 375-81.
20. **Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT.** 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv Parasitol.* 45, 181-241.
21. **Bancroft AJ, McKenzie AN, Grecis RK.** 1998. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. *J Immunol.* 160, 3453-61.
22. **Bang KS, Familton AS, Sykes AR.** 1990. Effect of ostertagiasis on copper status in sheep: a study involving use of copper oxide wire particles. *Res Vet Sci.* 49, 306-14.
23. **Barger IA.** 1993. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int J Parasitol.* 23, 463-9.
24. **Befus AD.** Immune responses: protective immunity, adaptation and pathogenesis. In: Enteric Infection, ed. Farthing MJG, Keusch GT, Wakelin D; London: Chapman and Hall Medical; 1995; 49-70.
25. **Behnke JM, Iraqi F, Menge D, Baker RL, Gibson J, Wakelin D.** 2003. Chasing the genes that control resistance to gastrointestinal nematodes. *J Helminthol.* 77, 99-110.

26. **Benavides MV, Weimer TA, Borba MFS, Berne MEA, Sacco AMS.** 2002. Association between microsatellite markers of sheep chromosome 5 and faecal egg counts. *Small Ruminant Res.* 46, 97-105.
27. **Bell RG.** 1996. IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol.* 74, 337-45.
28. **Benitez-Usher C, Armour J, Duncan JL, Urquhart GM, Gettingby G.** 1977. A study of some factors influencing the immunization of sheep against *Haemonchus contortus* using attenuated larvae. *Vet Parasitol.* 3, 273-342.
29. **Bishop SC, Bairden K, McKellar QA, Park M, Stear MJ.** 1996. The inheritance of faecal egg count following natural *Ostertagia circumcincta* infection in Scottish Blackface lambs. *Anim Sci.* 63, 423-8.
30. **Bishop MD, Kappes SM, Keele JW y cols.** 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics.* 136, 619-39.
31. **Bisset SA, Vlassoff A, Morris CA, Southey BR, Baker RL, Parker AGH.** 1992. Heritability of and genetic correlations among faecal egg count and productivity traits in Romney sheep. *NZJ Agric Res.* 35, 51-8.
32. **Bisset SA, Morris CA, Squire DR, Hickey SM.** 1996a. Genetics of resilience to nematode parasites in young Romney sheep – use of weight gain under challenge to assess individual treatment requirements. *NZJ Agric Res.* 39, 313-23.
33. **Bisset SA, Vlassoff A, Douch PG, Jonas WE, West CJ, Green RS.** 1996b. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet Parasitol.* 61, 249-63.
34. **Bouix J, Krupinski J, Rzepecki R, Nowosad B, Skrzyzala I, Roborzynski M, Fudalewicz-Niemczyk W, Skalska M, Malczewski A, Gruner L.**
-

1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *Int J Parasitol.* 28, 1797-804.
- 35. Bouvet JP, Fischetti VA.** 1999. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun.* 67, 2687-91.
- 36. Bowles VM, Brandon MR, Meeusen E.** 1995. Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. *Immunology.* 84, 669-74.
- 37. Bown MD, Poppi DP, Sykes AR.** 1989. The effect of a concurrent infection of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* on calcium, phosphorous and magnesium transactions along the digestive tract of lambs. *J Comp Pathol.* 101, 11-20.
- 38. Bown MD, Poppi DP, Sykes AR.** 1991a. Nitrogen transactions along the digestive tract of lambs concurrently infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. *Br J Nutr.* 66, 237-49.
- 39. Bown MD, Poppi DP, Sykes AR.** 1991b. The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. *Aust J Agric Res.* 42, 253-67.
- 40. Bricarello PA, Amarante AF, Rocha RA, Cabral Filho SL, Huntley JF, Houdijk JG, Abdalla AL, Gennari SM.** Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. Annual British Society of Animal Science Meeting. 2003.
- 41. Brigandi RA, Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Leon O, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D.** 1996. *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol.* 82, 279-89.
-

42. **Brunsdon RV.** 1962. The effect of nutrition on age resistance of sheep to infestation with *Nematodirus* spp. *New Zealand Vet J.* 10, 123-27.
43. **Buddle BM, Jowett G, Green RS, Douch PGC, Risdon PL.** 1992. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematode. *Int J Parasitol.* 22, 955-60.
44. **Bueno L, Honde C, Luffau G, Fioramonti J.** 1982. Origin of the early digestive disturbances induced by *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Am J Vet Res.* 43, 1194-9.
45. **Buitkamp J, Filmether P, Stear MJ, Epplen JT.** 1996. Class I and class II major histocompatibility complex alleles are associated with faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitol Res.* 82, 693-6.
46. **Butterworth AE.** 1984. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol.* 23, 143-235.
47. **Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, Rees PH.** 1974. Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature.* 252, 503-5.
48. **Cai H, Wang CC, Tsou CL.** 1994. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem.* 269, 24550-2.
49. **Canals A, Zarlenga DS, Almería S, Gasbarre LC.** 1997. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 58, 63-75.
50. **Carayannopoulos L, Capra JD.** Immunoglobulins. In: *Fundamental Immunology*, ed. Paul WE; New York: Raven Press; 1993; 284-311.
51. **Castro GA.** 1989. Immunophysiology of enteric parasitism. *Parasitol Today.* 5, 11-9.
-

52. **Castro GA, Hessel JJ, Whalen G.** 1979. Altered intestinal fluid movement in response to *Trichinella spiralis* in immunized rats. *Parasite Immunol.* 1, 259-66.
53. **Chandra RK, Sarchielli P.** 1993. Nutritional status and immune responses. *Clin Lab Med.* 13, 455-61.
54. **Chandrashekar R, Tsuji N, Morales T, Ozols V, Mehta K.** 1998. An ERp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 531-6.
55. **Chen K, Lin Y, Detwiler TC.** 1992. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood.* 79, 2226-8.
56. **Christensen CM, Zarlenga DS, Gasbarre LC.** 1994. *Ostertagia, Haemonchus, Cooperia,* and *Oesophagostomum*: construction and characterization of genus-specific DNA probes to differentiate important parasites of cattle. *Exp Parasitol.* 78, 93-100.
57. **Chivers PT, Prehoda KE, Raines RT.** 1997. The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry.* 36, 4061-6.
58. **Claerebout E, Vercruyse J.** 2000. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology.* 120 Suppl:S25-42.
59. **Clissold PM, Bicknell R.** 2003. The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. *Bioessays.* 25, 603-11.
60. **Clunies-Ross I.** 1932. Observations on the resistance of sheep to infestations by the stomach worm *Haemonchus contortus*. *J Counc Sci Ind Res.* 5, 73-80.
61. **Clunies-Ross I, Gordon H. McL.** 1933. Nutritional factors affecting resistance to Haemonchosis. *Austr Vet J.* 100-7.
-

62. **Coltman DW, Wilson K, Pilkington JG, Stear MJ, Pemberton JM.** 2001. A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology*. 122, 571-2.
63. **Conder GA, Campbell WC.** 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Adv Parasitol*. 35, 1-84.
64. **Coop RL, Field AC.** 1983. Effect of phosphorus intake on growth rate, food intake and quality of the skeleton of growing lambs infected with the intestinal nematode *Trichostrongylus vitrinus*. *Res Vet Sci*. 35, 175-81.
65. **Coop RL, Holmes PH.** 1996. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol*. 26, 951-62.
66. **Coop RL, Huntley JF, Smith WD.** 1995. Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res Vet Sci*. 59, 24-9.
67. **Coop RL, Kyriazakis I.** 1999. Nutrition-parasite interaction. *Vet Parasitol*. 84, 187-204.
68. **Coop RL, Kyriazakis I.** 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol*. 17, 325-30.
69. **Coop RL, Sykes AR, Angus KW.** 1982. The effect of three levels of intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on growth rate, food intake and body composition of growing lambs. *J Agric Sci*. 98, 247-255.
70. **Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA.** Parasitosis del aparato digestivo. Trichostrongilidosis y otras nematodosis. In: *Parasitología Veterinaria*, ed. McGraw-Hill Interamericana; Aravaca (Madrid); 1999; 195-259.
-

- 71. Courtney CH, Parker CF, McClure KE, Herd RP.** 1985. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol. 15, 101-9.
- 72. Crowle PK, Reed ND.** 1981. Rejection of the intestinal parasite *Nippostrongylus brasiliensis* by mast cell-deficient W/W^v anemic mice. Infect Immun. 33, 54-8.
- 73. Cuquerella M, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM.** 1994. Partial protection of Manchego sheep against *Haemonchus contortus* after a 6-month postpriming period. J Vet Med Series B. 41, 399-406.
- 74. Darby NJ, Penka E, Vincentelli R.** 1998. The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency. J Mol Biol. 13, 239-47.
- 75. Dargie JD.** 1975. Application of radioisotopic techniques to the study of red cells and plasma protein metabolism in helminth diseases of sheep. Symp Br Soc Parasit. 13, 1-26.
- 76. Dargie JD.** 1980. The pathophysiological effects of gastrointestinal and liver parasites in sheep. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants, ed. Ruckebusch Y, Thivend P; Lancaster: MTP Press; 1980; 349-71.
- 77. Datta FU, Nolan JV, Rowe JB, Gray GD.** 1998. Protein supplementation improves the performance of parasitised sheep fed a straw-based diet. Int J Parasitol. 28, 1269-78.
- 78. Datta FU, Nolan JV, Rowe JB, Gray GD, Crook BJ.** 1999. Long-term effects of short-term provision of protein-enriched diets on resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. Int J Parasitol. 29, 479-88.

- 79. Dawkins HJS, Windon RG, Eagleson GK.** 1989. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 19, 199-205.
- 80. Denham DA.** 1969. The development of *Ostertagia circumcincta* in lambs. *J Helminthol.* 43, 299-310.
- 81. Díez Baños N, Díez Baños P, Morrondo Pelayo P, Rojo Vázquez FR.** 1997. Terapéutica y control. Bovis: Gastroenteritis parasitarias. 79, 77-96.
- 82. Dineen JK, Gregg P, Lascelles AK.** 1978. The response of lambs to vaccination at weaning with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae: segregation into 'responders' and 'non-responders'. *Int J Parasitol.* 8, 59-63.
- 83. DiNetta J, Katz F, Campbell WC.** 1972. Effect of heterologous antilymphocyte serum on the spontaneous cure of *Trichinella spiralis* infections in mice. *J Parasitol.* 58, 636-7.
- 84. Dobson RJ, Waller PJ, Donald AD.** 1990. Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of infection rate on loss of adult parasites. *Int J Parasitol.* 20, 359-63.
- 85. Doligalska M, Moskwa B, Stear MJ.** 1999. Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and faecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 70, 299-308.
- 86. Donaldson J, van Houtert MFJ, Sykes AR.** 1997. The effect of protein supply on the periparturient parasite status of the mature ewe. *Proc New Zealand Soc. Animal Production.* 57, 186-9.
- 87. Dopheide TA, Tachedjian M, Phillips C, Frenkel MJ, Wagland BM, Ward CW.** 1991. Molecular characterization of a protective, 11 KDa excretory-secretory protein from the parasitic stages of *Trichostrongylus colubriformis*. *Mol Biochem Parasitol.* 45, 101-7.
-

- 88. Douch PGC, Green RS, Morris CA, Bisset SA, Vlassoff A, Baker RL, Watson TG, Hurford AP, Wheeler M.** 1995. Genetic and phenotypic relationships among anti-*Trichostrongylus colubriformis* antibody level, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney sheep. *Livestock Production Science*. 41, 121-32.
- 89. Douch PGC, Green RS, Morris CA, McEwans JC, Windon RG.** 1996. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol*. 26, 899- 911.
- 90. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Brunson RV.** 1984. Relationship of histamine in tissues and antiparasitic substances in gastrointestinal mucus to the development of resistance to trichostrongyle infections in young sheep. *Vet Parasitol*. 16, 273-88.
- 91. Douch PGC, Harrison GB, Buchanan LL, Greer KS.** 1983. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol*. 13, 207-12.
- 92. Dugas B, Renaud JC, Pene J, Bonnefoy JY, Peti-Frere C, Braquet P, Bousquet J, Van Snick J, Mencia-Huerta JM.** 1993. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 23, 1687-92.
- 93. Duncan JL, Smith WD, Dargie JD.** 1978. Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to immune unresponsiveness of lambs to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 4, 21-7.
- 94. Durette-Desset MC.** 1982. Generic divisions of the Ostertagiinae nematodes. *Ann Parasitol Hum Comp*. 57, 375-81.
- 95. Dynes RA, Ankersmit AEL, Poppi DP, Barrell GK, Sykes AR.** 1990. Studies on physiological basis of appetite depression in nematode infection in

- sheep. Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production. 50, 249-53.
- 96. Dynes RA, Poppi DP, Barrell GK, Sykes AR.** 1991. Effects of fasting and an opioid antagonist on food intake in lambs infected with intestinal parasites. Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production. 51, 371-4.
- 97. Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA, Rutter WJ.** 1985. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature*. 317, 267-70.
- 98. Else KJ, Finkelman FD.** 1998. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *Int J Parasitol*. 28, 1145-58.
- 99. Emery DL.** 1996. Vaccination against worm parasites of animals. *Vet Parasitol*. 64, 31-45.
- 100. Emery DL, McClure SJ, Davey RJ, Bendixsen T.** 1999. Induction of protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in neonatal merino lambs. *Int J Parasitol*. 29, 1037-46.
- 101. Emery DL, McClure SJ, Wagland BM.** 1993. Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. *Immunol Cell Biol*. 71, 463-72.
- 102. Epe C, Kohlmetz C, Schnieder T.** 1998. A recombinant protein disulfide isomerase homologue from *Ancylostoma caninum*. *Parasitol Res*. 84, 763-6.
- 103. Falconer DS.** Introduction to quantitative genetics, 2nd ed., New York: Longman; 1981.
- 104. Ferre I, Brusa CM, Manzanera E, Rojo-Vázquez FA, Buratovich OF, Mantecón AR.** 1995. Effect of supplementary feeding on the gastrointestinal strongylid eggs shedding in grazing pregnant Merino ewes. *J Anim Feed Sci*. 4, 237-45.
-

- 105. Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF Jr, Sher A.** 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today*. 12, A62-6.
- 106. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J.** 1997. Cytokine regulation of host defence against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol*. 15, 505-33.
- 107. Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF.** 1999. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol*. 11, 420-6.
- 108. Finken M, Sobek A, Symmons P, Kunz W.** 1994. Characterization of the complete protein disulfide isomerase gene of *Schistosoma mansoni* and identification of the tissues of its expression. *Mol Biochem Parasitol*. 64, 135-44.
- 109. Fox MT.** 1993. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet Parasitol*. 46, 143-58.
- 110. Fox MT.** 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet Parasitol*. 72, 285-97.
- 111. Fox MT, Gerrelli D, Pitt SR, Jacobs DE, Gill M, Gale DL.** 1989. *Ostertagia ostertagi* infection in the calf: effects of a trickle challenge on appetite, digestibility, rate of passage of digesta and liveweight gain. *Res Vet Sci*. 47, 294-8.
- 112. Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA.** 2000. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol*. 10, 203-10.
- 113. Fraser AHH, Robertson D.** 1933. The influence of the nutritional state of the sheep on its susceptibility to infestation with the stomach worm, *Haemonchus contortus*. *Empire Journal of Experimental Agriculture*. 1, 17-21.
-

114. **Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF.** 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci.* 19, 331-6.
115. **Frenkel MJ, Dopheide TA, Wagland BM, Ward CW.** 1992. The isolation, characterization and cloning of a globin-like, host-protective antigen from the excretory-secretory products of *Trichostrongylus colubriformis*. *Mol Biochem Parasitol.* 50, 27-36.
116. **Gamble HR, Zajac AM.** 1992. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet Parasitol.* 41, 211-25.
117. **Gane PJ, Freedman RB, Warwicker J.** 1995. A molecular model for the redox potential difference between thioredoxin and DsbA, based on electrostatics calculations. *J Mol Biol.* 2, 376-87.
118. **Gatenby RM, Wilson AJ, Romjali E, Pandey VS, Batabura LP, Bradford GE.** Helminth infections in rubber plantations in Sumatra. In: *Breeding for Resistance to Infectious Diseases in Small Ruminants*, ed. Gray GD, Woolaston RR, Eaton BT; Canberra: ACIAR; 1995; 167-71.
119. **Gasbarre LC.** 1986. Limiting dilution analyses for the quantification of cellular immune responses in bovine ostertagiasis. *Vet Parasitol.* 20, 133-47.
120. **Gasbarre LC.** 1987. Recovery of third larvae of *Ostertagi ostertagi* from the abomasa of experimentally inoculated calves by prolonged saline incubation. *Proc Helminthol Soc.* 54, 160-1.
121. **Gasbarre LC.** 1994. *Ostertagia ostertagi*: changes in lymphoid populations in the local lymphoid tissues after primary or secondary infection. *Vet Parasitol.* 55, 105-14.
122. **Gauly M, Erhardt G.** 2001. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhön sheep following natural infection. *Vet Parasitol.* 102, 253-9.

- 123. Gauly M, Kraus M, Vervelde L, VanLeeuwen MAW, Erhardt G.** 2002. Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol.* 106, 55-67.
- 124. Geldhof P, Vercauteren I, Knox D, Demaere V, Van Zeveren A, Berx G, Vercruyse J, Claerebout E.** 2003. Protein disulphide isomerase of *Ostertagia ostertagi*: an excretory-secretory product of L4 and adult worms?. *Int J Parasitol.* 33, 129-36.
- 125. Georges M, Massey J.** 1992. Polymorphic DNA markers in bovidae. World Intellectual Property Org. WO Publ. No. 92/13102.
- 126. Gevrey J.** 1971. Les coprocultures: Réalisation-interprétation en vue de la diagnose des Strongles digestifs des ruminants et du porc. *Rec Medic Veter.* 147, 287-317.
- 127. Gibson TE.** 1955. Studies on *Trichostrongylus axei*. IV. Factors in the causation of pathogenic effects by *T. axei*. *J Comp Pathol.* 65, 317-24.
- 128. Gibson TE, Parfitt JW.** 1972. The effect of age on the development by sheep of resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. *Res Vet Sci.* 13, 529-35.
- 129. Gill HS.** 1991. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunol.* 13, 617-28.
- 130. Gill HS, Altmann K, Cross ML, Husband AJ.** 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology.* 99, 458-63.
- 131. Gill HS, Gray GD, Watson DL, Husband AJ.** 1993. Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol.* 15, 61-7.
-

132. Gill HS, Husband AJ, Watson DL, Gray GD. 1994. Antibody-containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci. 56, 41-7.
133. Gleich GJ, Olson GM, Herlich H. 1979. The effect of antiserum to eosinophils on susceptibility and *acquired* immunity of the guinea-pig to *Trichostrongylus colubriformis*. Immunology. 37, 873-80.
134. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. 1963. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. J Biol Chem. 238, 628-35.
135. Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, De la Fuente C, Gómez-Iglesias LA, Alunda JM. 1998. Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in merino and manchego sheep. Relationship to serum antibody response. Zentralbl Veterinarmed B. 45, 449-59.
136. Gransmuller A, Anteunis A, Venturiello SM, Bruschi F, Binaghi RA. 1987. Antibody dependent *in vitro* cytotoxicity of newborn *Trichinella spiralis* larvae: nature of cells involved. Parasite Immunol. 9, 281-93.
137. Gray GD. 1997. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. Vet Parasitol. 72, 345-57.
138. Greenhalgh CJ, Beckham SA, Newton SE. 1999. Galectins from sheep gastrointestinal nematodes are highly conserved. Mol Biochem Parasitol. 98, 285-9.
139. Gregory PC. Parasitic infection and stomach motility: relation to intestinal motility and food intake. In: The Ruminant Stomach: Veterinary Research Communication, ed. Ooms LAA, Degryse AD, Marsboom R ; Beerse: Janssen Research Foundation; 1985; 267-8.
140. Groth DM, Wetherall JD. 1994. Dinucleotide repeat polymorphism within the ovine major histocompatibility complex class I region. Animal Genetics. 25, 61.
-

- 141. Gruner L, Bouix J, Brunel JC.** 2004a. High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Vet Parasitol.* 119, 51-8.
- 142. Gruner L, Cortet J, Sauve C, Hoste H.** 2004b. Regulation of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* worm populations by grazing sheep with differing resistance status. *Vet Res.* 35, 91-101.
- 143. Harrison GB, Pulford HD, Hein WR, Severn WB, Shoemaker CB.** 2003. Characterization of a 35-kDa carbohydrate larval antigen (CarLA) from *Trichostrongylus colubriformis*; a potential target for host immunity. *Parasite Immunol.* 25, 79-86.
- 144. Hawkins HC, Freedman RB.** 1991. The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biochem J.* 15, 335-9.
- 145. Hein WR, Harrison GB.** 2005. Vaccines against veterinary helminths. *Vet Parasitol.* 30, 217-22.
- 146. Herndon FJ, Kayes SG.** 1992. Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *J Immunol.* 149, 3642-7.
- 147. Hertzberg H, Schallig HD, Deplazes P.** 1999. Development of a protective immunity against *Ostertagia leptospicularis* in trickle-infected sheep and parallel changes of serum gastrin, pepsinogen and antibody levels. *Vet J.* 157, 148-59.
- 148. Hohenhaus MA, Outteridge PM.** 1995. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br Vet J.* 151, 119-40.
- 149. Holmes PH.** 1985. Pathogenesis of trichostrongylosis. *Vet Parasitol.* 18, 89-101.
-

- 150. Holmes PH.** 1993. Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequences. *Proc Nutr Soc.* 52, 113-20.
- 151. Holmes PH, Coop RL.** 1994. Workshop summary: pathophysiology of gastrointestinal parasites. *Vet Parasitol.* 54, 299-303.
- 152. Horbury SR, Mercer JG, Chappell LH.** 1995. Anorexia induced by the parasitic nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*: effects on NPY and CRF gene expression in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 7, 867-73.
- 153. Hoste H, LeFrileux Y, Pommaret A.** 2001. Distribution and repeatability of faecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Res Vet Sci.* 70, 57-60.
- 154. Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ.** 1998. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 10, 478-88.
- 155. Houdijk JG, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL.** 2001. The relationship between protein nutrition, reproductive effort and breakdown in immunity to *Teladorsagia circumcincta* in periparturient ewes. *Anim Sci.* 72, 595-606.
- 156. Houdijk JG, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL.** 2000. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep?. *Vet Parasitol.* 24, 43-62.
- 157. Houdijk JG, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL.** 2003. Is the allocation of metabolisable protein prioritised to milk production rather than to immune functions in *Teladorsagia circumcincta*-infected lactating ewes?. *Int J Parasitol.* 33, 327-38.
- 160. Houdijk JG, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL.** 2005. Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune
-

responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. *Vet Parasitol.* 129, 105-17.

- 161. Huntley JF, Newlands G, Miller HR.** 1984. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. *Parasite Immunol.* 6, 371-90.
- 162. Ishiwata K, Uchiyama F, Maruyama H, Kobayashi T, Kurokawa M, Nawa Y.** Glycoconjugates and host-parasite relationship in the mucosal defence against intestinal nematodes. In: *Mucosal Immunology*, ed. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR; San Diego: Academic Press; 1999; 925-33.
- 163. Israf DA, Zainal MJ, Ben-Gheshir MA, Rasedee A, Sani RA, Noordin MM.** 1998. Dietary protein influences on regulation of *Haemonchus contortus* populations in Dorsimal lambs. *J Helminthol.* 72, 143-6.
- 164. Jackson F, Jackson E, Coop RL.** 1992. Evidence of multiple anthelmintic resistance in a strain of *Teladorsagia circumcincta* (*Ostertagia circumcincta*) isolated from goats in Scotland. *Res Vet Sci.* 53, 371-4.
- 165. Jacobs HJ, Ashman K, Bowles V, Meeusen ENT.** 1999. Vaccination against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-68.
- 166. Jarrett EE, Miller HR.** 1982. Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy.* 1982. 31, 178-233.
- 167. Jennings FW, Armour J, Lawson DD, Roberts R.** 1966. Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: Studies with abomasal cannulas. *Am J Vet Res.* 27, 1249-57.
- 168. Jessop NS.** 1997. Protein metabolism during lactation. *Proc Nutr Soc.* 56, 169-75.
- 169. Jones WO, Emery DL, McClure SJ, Wagland BM.** 1994. Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal

contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 24, 519-25.

170. Jones WO, Symons LE. 1982. Protein synthesis in the whole body, liver, skeletal muscle and kidney cortex of lambs infected by the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 12, 295-301.

171. Jones WO, Window RG, Steel JW, Outteridge PM. 1990. Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 20, 1075-9.

172. Kahn LP, Knox MR, Gray GD, Lea JM, Walkden-Brown SW. 2003a. Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet Parasitol.* 112, 211-25.

173. Kahn LP, Knox MR, Walkden-Brown SW, Lea JM. 2003b. Regulation of the resistance to nematode parasites of single- and twin-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet Parasitol.* 114, 15-31.

174. Kahn LP, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2000. Temporal effects of protein nutrition on the growth and immunity of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 30, 193-205.

175. Kanobana K, Ploeger HW, Vervelde L. 2002. Immune expulsion of the trichostrongylid *Cooperia oncophora* is associated with increased eosinophilia and mucosal IgA. *Int J Parasitol.* 32, 1389-98.

176. Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE. 1996. Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 35, 7684-91.

177. Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE. 1997. The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr Biol.* 7, 239-45.

- 178. Khoo KH, Dell A.** 2001. Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications. *Adv Exp Med Biol.* 491, 185-205.
- 179. Khusro M, Van der Werf JHJ, Brown DJ, Ball A.** 2004. Across flock (co)variance components for faecal worm egg count, live weight, and fleece traits for Australian merinos. *Livestock Production Science.* 91, 35-43.
- 180. Kloosterman A, Parmentier HK and Ploeger HW.** 1992. Breeding cattle and sheep for resistance to gastrointestinal nematodes. *Parasitol Today.* 10, 330-5.
- 181. Knox DP, Redmond DL, Jones DG.** 1993. Characterisation of proteases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode. *Parasitology* 106, 395-404.
- 182. Knox DP, Smith SK, Smith WD.** 1999a. Immunisation with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitol Immunol.* 21, 201-10.
- 183. Knox MR, Steel JW.** 1999b. The effects of urea supplementation on production and parasitological responses of sheep infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol.* 15, 123-35.
- 184. Kooyman FN, Van Kooten PJ, Huntley JF, MacKellar A, Cornelissen AW, Schallig HD.** 1997. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology.* 114, 395-406.
- 185. Korenaga M, Hitoshi Y, Yamaguchi N, Sato Y, Takatsu K, Tada I.** 1991. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology.* 72, 502-7.
-

- 186. Korenaga M, Tada I.** 1994. The role of IL-5 in the immune responses to nematodes in rodents. *Parasitol Today*. 10, 234-6.
- 187. Koski GK, Zhong Su, Scottt E.** 1999. Energy deficits suppress both systemic and gut immunity during infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 264, 796-801.
- 188. Kyriazakis I, Oldham JD, Coop RL, Jackson F.** 1994. The effect of subclinical intestinal nematode infection on the diet selection of growing sheep. *Br J Nutr*. 72, 665-77.
- 189. Lacey E.** 1990. Mode of action of Benzimidazoles. *Parasitol Today*. 6, 112-5.
- 190. LaMantia ML, Lennarz WJ.** 1993. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell*. 74, 899-908.
- 191. Larsh JE Jr, Weatherly NF, Goulson HT, Chaffee EF.** 1972. Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. VII. The effect of ATS injections on the numbers of adult worms recovered after challenge. *J Parasitol*. 58, 1052-60.
- 192. Lawrence RA, Gray CA, Osborne J, Maizels RM.** 1996. *Nippostrongylus brasiliensis*: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice. *Exp Parasitol*. 84, 65-73.
- 193. Lee TD, Wakelin D.** 1982. The use of host strain variation to assess the significance of mucosal mast cells in the spontaneous cure response of mice to the nematode *Trichuris muris*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 67, 302-5.
- 194. Leng RA.** 1990. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr Res Rev*. 3, 277-303.

- 195. Levy E, Stan S, Garofalo C, Delvin EE, Seidman EG, Menard D.** 2001. Immunolocalization, ontogeny, and regulation of microsomal triglyceride transfer protein in human fetal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280, G563-71.
- 196. Lloyd S, Soulsby E.JL.** Immunobiology of gastrointestinal nematodes of ruminants. In: *Immune responses in Parasitic infections: Immunobiology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*; Florida: CRC Press. Boca Raton; 1987; 1-41.
- 197. Lyles MM, Gilbert HF.** 1994. Mutations in the thioredoxin sites of protein disulfide isomerase reveal functional nonequivalence of the N- and C-terminal domains. *J Biol Chem.* 269, 30946-52.
- 198. Macaldowie C, Jackson F, Huntley J, Mackellar A, Jackson E.** 2003. A comparison of larval development and mucosal mast cell responses in worm-naive goat yearlings, kids and lambs undergoing primary and secondary challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Parasitol.* 114, 1-13.
- 199. MacRae JC.** 1993. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proc Nutr Soc.* 52, 121-30.
- 200. MacRae JC, Smith JS, Sharman GAM, Corrigan W, Coop RL.** Energy metabolism of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. In: *Energy Metabolism of Farm Animals*, ed. Ekern A, Sundstol F; Norway: European Association for Animal Production; 1982; 112-5.
- 201. Madden KB, Urban JF Jr, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD, Katona IM.** 1991. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol.* 147, 1387-91.
- 202. MAFF:** *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques.* N° 148, 3rd Edn. HMSO; London; 1986; 160.
-

203. Mahdy EA, Makinen A, Chowdhary BP, Andersson L, Gustavson I. 1989. Chromosomal localization of the ovine major histocompatibility complex (OLA) by in situ hybridization. *Hereditas*. 111, 87-90.
204. Mahmoud AF, Warres KS, Peters PA. 1975. A role of the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by antieosinophil serum. *J. Exp Med*. 142, 805-13.
205. Manton VJA, Peacock R, Poynter D, Silverman PH, Terry RJ. 1962. The influence of age in naturally acquired resistance to *Haemonchus contortus* in lambs. *Res Vet Sci*. 3, 308-14.
206. McAnulty RW, Maher AP, Stankiewicz M, Sykes AR. 2000. Effects of dietary protein and previous nematode challenge on the peri-parturient ewe. In: Joint Meeting New Zealand Society for Parasitology and Australian Society for Parasitology Abstracts; 2000; 11.
207. McClure SJ. Sheep immunity to gastrointestinal nematode parasites, CSIRO Livestock Industries; Australia: F.D. McMaster Laboratory; 2000.
208. McClure SJ, Emery DL, Wagland BM, Jones WO. 1992. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. *Int J Parasitol*. 22, 227-34.
209. McClure SJ, McClure TJ, Emery DL. 1999. Effects of molybdenum intake on primary infection and subsequent challenge by the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis* in weaned Merino lambs. *Res Vet Sci*. 67, 17-22.
210. McCririe L, Bairden K, Buitkamp J, Britton C, McKeand JB, Stear MJ. 1997. Heterogeneity in the recognition of parasite antigen by sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol*. 19, 235-42.
211. McGillivray DJ, Yong WK, Adler B, Riffkin GG. 1992. A purified stage-specific 31 kDa antigen as a potential protective antigen against *Ostertagia circumcincta* infection in lambs. *Vaccine*. 10, 607-13.
-

- 212. McKellar QA.** 1988. Strategic use of anthelmintics for parasitic nematodes in cattle and sheep. *Vet Rec.* 123, 483-7.
- 213. McKellar QA.** 1993. Interactions of *Ostertagia* species with their bovine and ovine hosts. *Int J Parasitol.* 23, 451-62.
- 214. McKellar QA, Mostofa M, Eckersall PD.** 1990. Stimulated pepsinogen secretion from dispersed abomasal glands exposed to *Ostertagia* species secretion. *Res Vet Sci.* 48, 6-11
- 215. Meana Mañes A.** Fisiopatología de las gastroenteritis parasitarias ovinas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 1990.
- 216. Meana Mañes A, Miró L, Rojo Vázquez FA.** 1993. Patología y clínica. *Ovis.* 25, 53-60.
- 217. Meek B, Back JW, Klaren VN, Speijer D, Peek R.** 2002. Protein disulfide isomerase of *Toxoplasma gondii* is targeted by mucosal IgA antibodies in humans. *FEBS Lett.* 522, 104.
- 218. Meek B, Klaren VN, van Haeringen NJ, Kijlstra A, Peek R.** 2000. IgA antibodies to *Toxoplasma gondii* in human tears. *Ophthalmol Vis Sci.* 41, 2584.
- 219. Meeusen EN.** 1995. Production of antigens. Patent No. WO 95/09182.
- 220. Meeusen EN.** 1996. Rational design of nematode vaccines; natural antigens. *Int J Parasitol.* 26, 813-8.
- 221. Mezo Menéndez M, Morrondo Pelayo P, Díez Baños N, Díez Baños.** 1997. Ciclo biológico y epidemiología. *Bovis.* 79, 29-41.
- 222. Miller HRP.** 1996a. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? *Int J Parasitol.* 26, 801-11.
-

223. **Miller HRP.** 1996b. Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet Immunol Immunopathol.* 54, 331-6.
224. **Miró Corrales G.** Epizootiología de las gastroenteritis parasitarias ovinas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 1990.
225. **Morjana NA, Gilbert HF.** 1991. Effect of protein and peptide inhibitors on the activity of protein disulfide isomerase. *Biochemistry.* 30, 4985-90.
226. **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136, 2348-57.
227. **Mosmann TR, Coffman RL.** 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7,145-73.
228. **Moqbel R, MacDonald AJ.** Immunological and inflammatory responses in the small intestine associated with helminthic infections. In: editor. In: *Parasites, immunity and pathology: the consequences of parasitic infection in mammals*, ed. Behnke JM; London: Taylor and Francis; 1990; 249-82.
229. **Motegi Y, Kita H, Kato M, Morikawa A.** 2000. Role of secretory IgA, secretory component, and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 122, 25-7.
230. **Murray, M.** 1969. Structural changes in bovine ostertagiasis associated with increased permeability of the novel bowel wall to macromolecules. *Gasstroenterology.* 56, 763-72.
231. **Murray, M., Jennings, F.W., Armour, J.** 1970. Bovine ostertagiasis: structure, function and mode of differentiation of bovine gastric mucosa and kinetics of the worm loss. *Res Vet Sci.* 11, 417-27.
-

232. Nawa Y, Ishikawa N, Tsuchiya K, Horii Y, Abe T, Khan AI, Bing-Shi, Itoh H, Ide H, Uchiyama F. 1994. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite Immunol.* 16, 333-8.
233. Newton SE, Monti JR, Greenhalgh CJ, Ashman K, Meeusen ENT. 1997. cDNA cloning of galectins from the third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Mol Biochem Parasitol.* 86, 143-53.
234. Noiva R, Freedman RB, Lennarz WJ. 1993. Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J Biol Chem.* 268, 19210-7.
235. Nyame AK, Kwarar ZS, Cummings RD. 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch Biochem Biophys.* 426, 182-200.
236. Okamoto T, Toyooka K, Minamikawa T. 2001. Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole. *J. Biol Chem.* 276, 742-51.
237. Onah DN, Nawa Y. 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J Parasitol.* 38, 209-36.
238. Ovington KS, McKie K, Matthaai KI, Young IG, Behm CA. 1998. Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology.* 95, 488-93.
239. Page AP. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: *Parasitic Nematodes*; ed. Kennedy MW, Harnett W; Oxon: CAB International; 2001; 167-93.
240. Pernthaner A, Cole SA, Morrison L, Hein WR. 2005. Increased Expression of Interleukin-5 (IL-5), IL-13, and Tumor Necrosis Factor Alpha Genes in Intestinal Lymph Cells of Sheep Selected for Enhanced Resistance to
-

- Nematodes during Infection with *Trichostrongylus colubriformis*. Infect Immun. 73, 2175-83.
- 241. Petit-Frere C, Dugas B, Braquet P, Mencia-Huerta JM.** 1993. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. Immunology. 79, 146-51.
- 242. Ploeger HW, Kloosterman A, Borgsteede FH, Eysker M.** 1990. Effect of naturally occurring nematode infections in the first and second grazing season on the growth performance of second-year cattle. Vet Parasitol. 36, 57-70.
- 243. Pollott GE, Karlsson LJ, Eady S, Greeff JC.** 2004. Genetic parameters for indicators of host resistance to parasites from weaning to hogget age in Merino sheep. J Anim Sci. 82, 2852-64.
- 244. Poppi DP, MacRae JC, Brewer A, Coop RL.** 1986. Nitrogen transactions in the digestive tract of lambs exposed to the intestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. Br J Nutr. 55, 593-602.
- 245. Purewal A, Fox MT, Shivalkar P, Carroll AP, Uche UE, Vaillant C, Watkinson A.** 1997. Effects of *Ostertagia ostertagi* on gastrin gene expression and gastrin-related responses in the calf. J Physiol. 498, 809-16.
- 246. Raadsma HW, Gray GD, Woolaston RR.** Genetics of disease resistance and vaccine response. In: Genetics of the Sheep, ed. Piper LR, Ruvinsky A; Wallingford: CAB International; 1997; 199-224.
- 247. Ractliffe LH, Lejambre LF.** 1971. Increase of rate of egg production with growth in some intestinal nematodes of sheep and horses. Int J Parasitol. 1, 153-6.
- 248. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, Kopf M.** 1994. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. Science. 264, 561-3.
-

- 249. Ritchie JD, Anderson N, Armour J, Jarrett WF, Jennings FW, Urquhart GM.** 1966. Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: parasitology and pathogenesis of a single infection. *Am J Vet Res.* 27, 659-67.
- 250. Riffkin GC, Dobson C.** 1979. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infections. *Vet Parasitol.* 5, 365-78.
- 251. Roitt IM.** Essential immunology. London: Blackwell Scientific Publications; 1991.
- 252. Rothwell TL.** 1989. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *Int J Parasitol.* 19, 139-68.
- 253. Rothwell TLW, Windon RG, Horsburgh BA, Anderson BH.** 1993. Relationship between eosinophil and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Int J Parasitol.* 23, 203-11.
- 254. Rotman HL, Schnyder-Candrian S, Scott P, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D.** 1997. IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 19, 29-39.
- 255. Rotman HL, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Gleich GJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D.** 1996. *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Exp Parasitol.* 82, 267-78.
- 256. Rowe JB, Nolan JV, de Chaneet G, Teleni E, Holmes PH.** 1988. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *Br J Nutr.* 59, 125-39.
- 257. Savin KW, Dopheide TA, Frenkel MJ, Wagland BM, Grant WN, Ward CW.** 1990. Characterization, cloning and host-protective activity of a 30 kilodalton glycoprotein secreted by the parasitic stages of *Trichostrongylus colubriformis*. *Mol Biochem Parasitol.* 41, 167-76.
-

258. Schallig HD, Van Leeuwen MA. 1997. Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology*. 114, 293-9.
259. Schallig HD, van Leeuwen MA, Hendrikx WM. 1995. Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol*. 56, 149-62.
260. Schwaiger FW, Gostomski D, Stear MJ, Duncan JL, McKellar QA, Epplen JT, Buitkamp J. 1995. An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int J Parasitol*. 25, 815-22.
261. Scott I, Hodgkinson SM, Khalaf S, Lawton DE, Collett MG, Reynolds GW, Pomroy WE, Simpson HV. 1998. Infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*: abomasal morphology. *Int J Parasitol*. 28, 1383-92.
262. Scott I, Khalaf S, Simcock DC, Knight CG, Reynolds GW, Pomroy WE, Simpson HV. 2000. A sequential study of the pathology associated with the infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*. *Vet Parasitol*. 89, 79-94.
263. Shaw RJ, Gatehouse TK, McNeill MM. 1998. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol*. 28, 293-302.
264. Shaw KL, Nolan JV, Lynch JJ, Coverdale OR, Gill HS. 1995. Effects of weaning, supplementation and gender on acquired immunity to *Haemonchus contortus* in lambs. *Int J Parasitol*. 25, 381-7.
265. Sinski E, Bairden K, Duncan JL, Eisler MC, Holmes PH, McKellar QA, Murray M, Stear MJ. 1995. Local and plasma antibody responses to

the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Vet Parasitol.* 59, 107-18.

266. **Smith WD, Angus KW.** 1980. *Haemonchus contortus*: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. *Res Vet Sci.* 29, 45-50.
267. **Smith WD, Jackson F, Jackson E, Williams J.** 1983. Studies on the local immune response of the lactating ewe infected with *Ostertagia circumcincta*. *J Comp Pathol.* 93, 295-305.
268. **Smith WD, Jackson F, Jackson E, Williams J.** 1985. Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4½ and 10 month-old lambs. *J Comp Pathol.* 95, 235-45.
269. **Smith TS, Munn EA, Graham H, Tavernor A, Greenwood CA.** 1993. Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol.* 23, 271-7.
270. **Smith WD, Smith SK, Murray JM.** 1994. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16, 231-41.
271. **Stear MJ, Bairden K, Duncan JL, Gettinby G, McKellar QA, Park M, Strain S, Murray M, M & Wallace DS.** 1995a. The distribution of faecal nematode egg counts in Scottish Blackface lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Parasitology.* 110, 573-81.
272. **Stear MJ, Bairden K, Duncan JL, Holmes PH, McKellar QA, Park M, Strain S, Murray M, Bishop SC, Gettinby G.** 1997. How hosts control worms. *Nature.* 389, 27.
273. **Stear MJ, Bairden K, McKellar QA, Scott I, Strain S, Bishop SC.** 1999a. The relationship between the number and size of nematodes in the abomasum

- and the concentration of pepsinogen in ovine plasma. *Res Vet Sci.* 67, 89-92.
- 274. Stear MJ, Bishop SC.** 1999b. The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 29, 777-80.
- 275. Stear MJ, Bishop SC, Doligalska M, Duncan JL, Holmes PH, Irvine J, McCririe L, McKellar QA, Sinski E, Murray M.** 1995b. Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol.* 17, 643-52.
- 276. Stear MJ, Bishop SC, Duncan JL, McKellar QA, Murray M.** 1995c. The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. *Int J Parasitol.* 25, 375-80.
- 277. Stear MJ, Henderson NG, Kerr A, McKellar QA, Mitchell S, Seeley C, Bishop SC.** 2002. Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in Scottish Blackface lambs. *Parasitology.* 124, 553-60.
- 278. Stear MJ, Park M, Bishop SC.** 1996. The key components of resistance to *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Parasitol Today.* 12, 438-41.
- 279. Stear MJ, Strain S, Bishop SC.** 1999c. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *Int J Parasitol.* 29, 51-6.
- 280. Stear MJ, Strain S, Bishop SC.** 1999d. How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*. *Vet Immunol Immunopathol.* 72, 213-8.
- 281. Stear MJ, Wakelin D.** Genetic resistance to parasitic infection. 1998. *Rev Sci Tech.* 17, 143-53.
- 282. Steel JW.** 1972. Effects on the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* on ruminal acetate metabolism in young sheep. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production.* 9, 402-7.
-

- 283. Steel JW.** Inter-relationships between gastrointestinal helminth infection, nutrition and impaired productivity in the ruminant. In: Recent Advances in Animal Nutrition in Australia, ed. Farrell DJ; Armidale: The University of New England, 1978; 98-109.
- 284. Stewart DF, Gordon HM.** 1953. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus* spp. and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation VI. The influence of age and nutrition on resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. Aust J Agric Res. 4, 340-48.
- 285. Strain SA, Bishop SC, Henderson NG, Kerr A, McKellar QA, Mitchell S, Stear MJ.** 2002. The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. Parasitology. 124, 545-52.
- 286. Strain SA, Stear MJ.** 1999. The recognition of molecules from fourth-stage larvae of *Ostertagia circumcincta* by IgA from infected sheep. Parasite Immunol. 21, 163-8.
- 287. Strain SA, Stear MJ.** 2001. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol. 23, 527-31.
- 288. Suttle NF, Knox DP, Angus KW, Jackson F, Coop RL.** 1992. Effects of dietary molybdenum on nematode and host during *Haemonchus contortus* infection in lambs. Res Vet Sci. 52, 230-5.
- 289. Swan AA, Raadsma HW, Lewer RP, Woolaston RR, Ponzoni RW, Eady SJ.** 1998. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: correlation with production traits. Aust J Agric Res. 49, 1201-12.
- 290. Sykes AR, Coop RL.** 1977. Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. J Agric Sci, Cambridge. 88, 671-7.
-

- 291. Sykes AR, Coop RL, Angus KW.** 1979. Chronic infection with *Trichostrongylus vitrinus* in sheep. Some effects on food utilisation, skeletal growth and certain serum constituents. *Res Vet Sci.* 26, 372-77.
- 292. Symons LEA.** 1985. Anorexia: occurrence, pathophysiology, and possible causes in parasitic infections. *Adv Parasitol.* 24, 103-33.
- 293. Tawill S, Le Goff L, Ali F, Blaxter M, Allen JE.** 2004. Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect Immun.* 72, 398-407.
- 294. Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML.** 1995. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 270, 20410-6.
- 295. Tizard I.** Relación de las respuestas inmunes. In: *Inmunología veterinaria, Interamericana*; 1984.
- 296. Urban JF Jr, Katona IM, Paul WE, Finkelman FD.** 1991. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 5513-7.
- 297. Urban JF Jr, Maliszewski CR, Madden KB, Katona IM, Finkelman FD.** 1995. IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *J Immunol.* 154, 4675-84.
- 298. Urquhart GM, Jarrett WF, Jennings FW, McIntyre WI, Mulligan W.** 1966. Immunity to *Haemonchus contortus* infection: relationship between age and successful vaccination with irradiated larvae. *Am J Vet Res.* 27, 1645-8.
- 299. Valderrábano J, Delfa R, Uriarte J.** 2002. Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Vet Parasitol.* 104, 327-38.
-

- 300. Valderrábano J, Gómez-Rincón C, Uriarte J.** 2006. Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Vet Parasitol.* 29.
- 301. Vallance BA, Collins SM.** 1998. The effect of nematode infection upon intestinal smooth muscle function. *Parasite Immunol.* 20, 249-53.
- 302. Van Die I, Gomord V, Kooyman FN, van den Berg TK, Cummings RD, Vervelde L.** 1999. Core alpha1-3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminths and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep. *FEBS Lett.* 463, 189-93.
- 303. Van Houtert MF, Barger IA, Steel JW, Windon RG, Emery DL.** 1995a. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol.* 56, 163-80.
- 304. Van Houtert MF, Barger IA, Steel JW.** 1995b. Dietary protein for young grazing sheep: interactions with gastrointestinal parasitism. *Vet Parasitol.* 60, 283-95.
- 305. Van Houtert FJ, Sykes AR.** 1996. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int J Parasitol.* 1151-68.
- 306. Van Houtert MF, Watson DL, Barger IA.** 1995c. Maintenance of acquired immunity to *Trichostrongylus colubriformis* in Merino sheep that are losing weight. *Aust Vet J.* 72, 301-3.
- 307. Vercruyse J, Claerebout E.** 1997. Immunity development against *Ostertagia ostertagi* and other gastrointestinal nematodes in cattle. *Vet Parasitol.* 72, 309-26.
- 308. Vervelde L, Bakker N, Kooyman FN, Cornelissen AW, Bank CM, Nyame AK, Cummings RD, van Die I.** 2003. Vaccination-induced protection of lambs against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* correlates
-

with high IgG antibody responses to the LDNF glycan antigen. *Glycobiology*. 13, 795-804.

- 309. Vuori K, Pihlajaniemi T, Myllyla R, Kivirikko KI.** 1992. Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells. *EMBO J*. 11, 4213-7.
- 310. Wakelin D.** Immunity to Parasites: How parasitic infections are controlled. Cambridge: Cambridge University Press; 1996.
- 311. Walker KW, Lyles MM, Gilbert HF.** 1996. Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine. *Biochemistry*. 13, 1972-80.
- 312. Wang L, Fast DG, Attie AD.** 1997. The enzymatic and non-enzymatic roles of protein-disulfide isomerase in apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem*. 31, 27644-51.
- 313. Waruiru RM.** 2004. The influence of supplementation with urea-molasses blocks on weight gain and nematode parasitism of dairy calves in central Kenya. *Vet Res Commun*. 28, 307-15.
- 314. Watanabe K, Noda K, Hamano S, Koga M, Kishihara K, Nomoto K, Tada I.** 2000. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitol Res*. 86, 188-93.
- 315. Watson DL, Gill HS.** 1991. Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Res Vet Sci*. 51, 128-32.
- 316. Wilson WD, Field AC.** 1983. Absorption and secretion of calcium and phosphorus in the alimentary tract of lambs infected with daily doses of *Trichostrongylus colubriformis* or *Ostertagia circumcincta* larvae. *J Comp Pathol*. 93, 61-71.
-

- 317. Wilson WR, Tuan RS, Shepley KJ, Freedman RB, Greene BM, Awadzi K, Unnasch TR.** 1994. The *Onchocerca volvulus* homologue of the multifunctional polypeptide protein disulfide isomerase. *Mol Biochem Parasitol.* 68, 103-7.
- 318. Windon RG.** 1990. Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 9, 555-76.
- 319. Windon RG.** 1996. Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* 54, 245-54.
- 320. Woolaston RR, Baker RL.** 1996. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int J Parasitol.* 26, 845-55.
- 321. Yoshimori T, Semba T, Takemoto H, Akagi S, Yamamoto A, Tashiro Y.** 1990. Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J Biol Chem.* 265, 15984-90.
- 322. Zajac AM.** Genetics resistance to infectious disease in small ruminants: North America and the Caribbean. In: *Breeding for Resistance to Infectious Diseases in Small Ruminants*, ed. Gray GD, Woolaston RR, Eaton BT; Canberra: ACIAR Monograph No 34; 1995; 153-66.

