INMUNOGLOBULINA IGA COMO BIOMARCADOR DE INFECCIÓN POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVEJAS PERTENECIENTES A DISTINTAS RAZAS

La IgA específica frente los NGI se asoció positivamente con los valores de HGH en ovejas infectadas de forma natural, siendo las secreciones nasales de animales jóvenes las muestras en las que esta asociación fue más fuerte, por lo que podrían utilizarse como marcador de infección. Además, se mostró que los animales jóvenes tienen un mayor riesgo de infección que los adultos.

Verónica Castilla Gómez de Agüero [1,2], Elora Valderas-García [1,3], Laura González del Palacio [1,2], F. Javier Giráldez [1], Rafael Balaña-Fouce [3] y María Martínez-Valladares [1]

[1] Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, 24346 Grulleros, León
[2] Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24007 León
[3] Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24007 León

En los países templados, la alta prevalencia de las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) en pequeños rumiantes es una limitación importante en los sistemas de producción ovina, ya que reduce la producción de leche, carne y lana en las explotaciones y afecta su rentabilidad económica. Según numerosos estudios, Teladorsagia circumcincta es la especie de NGI más prevalente en ovejas en las regiones templadas, seguida de *Trichostrongylus spp., Haemonchus contortus, Oesophagostomum spp.* y *Chabertia ovina*. Los antihelmínticos de amplio espectro se utilizan desde hace más de 40 años para controlar eficazmente las infecciones. Sin embargo, su administración inadecuada ha provocado la aparición y desarrollo de las resistencias a los antihelmínticos. Debido a la progresión de la resistencia a nivel mundial, ha sido necesario desarrollar métodos de control alternativos, como el tratamiento selectivo, el manejo del pastoreo o el control biológico, entre otros, para reducir el uso de fármacos [1]. Uno de los métodos alternativos más prometedores es la selección de ovejas resistentes a las infecciones por NGI, ya que permite un control duradero y regular de la infección [2]. A falta de marcadores fiables para identificar animales resistentes o susceptibles, el número de huevos por gramo en heces (HGH) ha sido el método más utilizado para la identificación de ovejas resistentes. De hecho, nuestro grupo de investigación encontró una correlación positiva entre los HGH y el número de parásitos adultos de *T. circumcincta* en el abomaso de las ovejas [3]. En Australia ya se han desarrollado programas de selección genética basados en los HGH en la raza Merina [4]. Sin embargo, el uso de los HGH para la selección de animales está limitado por varios factores, como la variabilidad en la eliminación de huevos de las diferentes especies de NGI, la raza ovina, la alimentación

Animales con los que se realizó el estudio.

o el estado inmunitario del animal [5]. Debido a estas desventajas, numerosos estudios han sugerido la actividad de inmunoglobulina IgA como un marcador de infección más conveniente que los HGH [3,6]. La IgA interviene en la eliminación inmunitaria de algunos patógenos, entre ellos los NGI. Un aumento de la actividad de la IgA, específica frente a los NGI, se ha asociado con un menor recuento de HGH en corderos y ovejas de diferentes razas [7]. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado bajo condiciones experimentales de infección o en animales muy jóvenes.

Con el fin de evaluar la respuesta IgA específica frente a infecciones naturales por NGI en diferentes razas de ovejas -Assaf, Castellana y Churra- en este estudio se analizaron muestras de saliva, secreciones nasales y sangre en ovejas menores de un año de edad y en adultas pertenecientes a diferentes rebaños del noroeste de España. A continuación, los niveles de IgA se relacionaron con el nivel de la infección tras analizar el número de HGH.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 195 ovejas menores de un año y 394 ovejas adultas, es decir, 589 ovejas en total. Las ovejas pertenecían a las razas Assaf, Castellana y Churra y procedían de 15 rebaños. Todos los rebaños estaban en régimen de pastoreo, y no habían recibido ningún tratamiento antihelmíntico durante al menos los tres meses anteriores al muestreo.

El muestreo de los animales consistió en la recogida de heces, directamente del recto, para determinar el número de HGH mediante la técnica de McMaster. También, por cada rebaño, se realizó un coprocultivo para la identificación de las especies de NGI que infectaban a los animales. Simultáneamente se tomaron muestras de sangre de la vena yugular para obtener suero. Las secreciones nasales se recogieron introduciendo dos hisopos de algodón en cada orificio nasal; por lo tanto, se tomaron cuatro hisopos por animal que se incluyeron en un tubo de vidrio con 4 ml de PBS. Para las muestras de saliva, también se utilizaron cuatro hisopos por animal para recoger la muestra. Tanto las secreciones nasales como las muestras de saliva se mantuvieron en el PBS durante 24 horas, para posteriormente quitar loshisopos, centrifugar la muestra, y quedarnos con el sobrenadante para el análisis posterior de las IgA [3].

La determinación de los niveles de IgA específica frente a la infección por NGI se llevó a cabo mediante la técnica de inmunoensayo enzimático o ELISA, y utilizando dos antígenos diferentes, antígeno de larvas de *T. circumcincta* y una proteína recombinante que nuestro grupo de investigación había identificado, clonado y producido previamente, un fragmento de la proteína disulfuro isomerasa de *T. circumcincta* (PDI-Tc). Ambos métodos ELISA, utilizando los dos antígenos, los habíamos desarrollado con anterioridad en nuestro laboratorio [8]. Los resultados se expresan como densidad óptica (DO).

Tras la determinación de los niveles de IgA, y del número de HGH para cada animal, se realizó en análisis

estadístico de los datos. Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal. Todas las ovejas se clasificaron según sus niveles de HGH en cuatro grupos diferentes (G1: 0-14 hgh; G2: 15-100 hgh; G3: 115-300 hgh; G4: >300 hgh) y tras ello se calculó la proporción de animales de cada grupo y raza; la prueba de Kruskal- Wallis se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre estos cuatro grupos. Las asociaciones de los niveles de los HGH y los resultados de las IgA (DO), para cada muestra, se midieron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$. Debido al elevado porcentaje de ovejas con 0 HGH, se midió el riesgo de estar infectado en función de distintas variables (edad, raza, tipo de pasto) mediante un modelo multinivel que incluía la raza (Assaf, Churra y Castellana), la edad de los animales (joven < 12 meses; adulto > 12 meses) y las interacciones como efectos fijos.

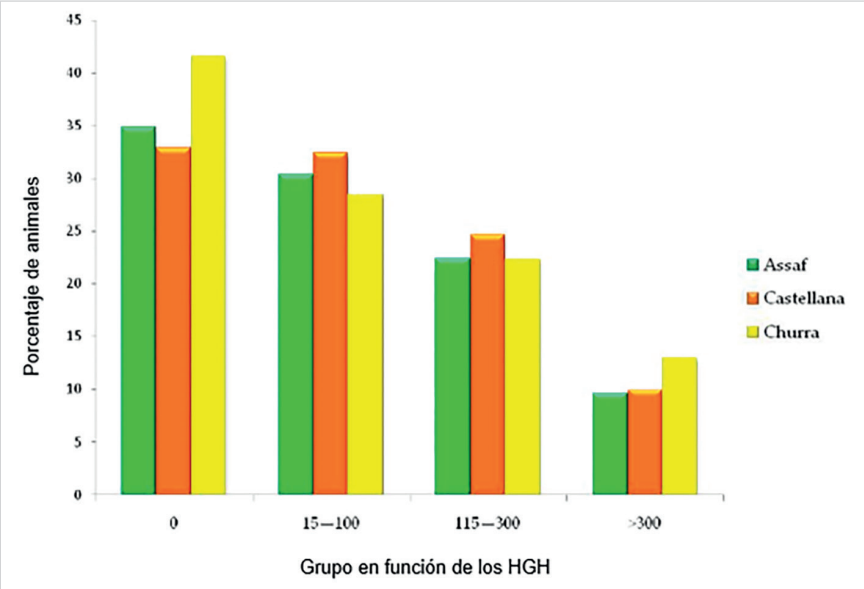

Figura 1. Proporción de animales Assaf, Castellana y Churra clasificados según su recuento individual de huevos por gramo en heces (HGH) en función de los cuatro grupos.

RESULTADOS

Tras medir el nivel individual de infecciones en todas las ovejas muestreadas (n = 589), se eliminaron los datos extremos y el tamaño final de la muestra fue de 193 ovejas jóvenes y 394 ovejas adultas (n = 582 en total). Los valores de los HGH oscilaron entre 0 y 975 en función de la edad y la raza ovina. El porcentaje de ovejas con un valor de 0 para los HGH representó el 64,66% de las ovejas muestreadas (20,58% de las ovejas jóvenes y 44,08% de las

Razas		Ovejas en total	Ovejas jóvenes	Ovejas adultas
Assaf	Media ± DE	132 ± 180	122 ± 159	128 ± 181
	Intervalo	(0–975)	0–825	0–975
	% HGH positivo	64,97%	62,22%	65,79%
	N	197	45	152
Castellana	Media ± DE	108 ± 162	99 ± 140	113 ± 164
	Intervalo	0–915	0–735	0–915
	% HGH positivo	67,06%	58,76%	75,19%
	N	255	126	129
Churra	Media ± DE	151 ± 181	155 ± 157	151 ± 181
	Intervalo	0–945	0–735	0–945
	% HGH positivo	59,68%	81,81%	54,63%
	N	129	22	108
Ovejas en total	Media ± DE	113 ± 173	108 ± 164	113 ± 173
	Intervalo	0–975	0–825	0–975
	% HGH positivo	64,43%	85,50%	54,24%
	N	582	193	389

Tabla 1. Número de ovejas (N), media, desviación estándar (DE) e intervalo de los valores de los huevos por gramo en heces (HGH), así como porcentaje de positivos para cada raza, edad y total de ovejas.

	Ovejas jóvenes (N = 193)		Ovejas adultas (N = 389)	
Muestras	**Antígeno de larvas**	**PDI-Tc**	**Antígeno de larvas**	**PDI-Tc**
Suero	Rho = 0,306 **	Rho = 0,107	Rho = 0,123 **	Rho = 0,091
	p = 0,000	p = 0,159	p = 0,000	p = 0,077
Secreción nasal	Rho = 0,504 **	Rho = 0,498 **	Rho = 0,031	Rho = 0,179 **
	p = 0,000	p = 0,000	p = 0,554	p = 0,000
Saliva	Rho = 0,058	Rho = 0,295 **	Rho = 0,059	Rho = 0,001
	p = 0,137	p = 0,000	p = 0,246	p = 0,989

Tabla 2. Correlación Spearman entre el recuento de huevos por gramo en heces (HGH) y los niveles de IgA para cada antígeno y grupo de animales. N: número de ovejas.
** Correlaciones significativas (p < 0,000)

ovejas adultas) (Tabla 1). El porcentaje de ovejas pertenecientes a cada grupo según el número de HGH se muestra en la figura 1. Tras la identificación de las especies de NGI, la mayoría se clasificaron como *T. circumcincta* (21-100%) y *Trichostrongylus spp.* (15-85%). En porcentajes inferiores al 10% se identificaron otras especies como *Chabertia* ovina u *Oesophagostomum* spp.

Se utilizó un modelo multinivel para predecir la influencia de la raza y edad en el riesgo de infección. Según este modelo, la raza no es un factor influyente en este estudio. Sin embargo, la edad se consideró un factor significativo, ya que la probabilidad de infección fue 2,39 veces superior en los animales jóvenes, aunque no de la misma forma en todas las razas. Mientras que las razas Churra y Assaf mostraron esta diferenciación entre ovejas jóvenes y adultas, la edad no afectó a la probabilidad de infección en la raza Castellana. El tipo de pasto (comunal o en propiedad) se incluyó como posible factor ¬influyente en la probabilidad de infección. Este modelo demostró que los animales que pastaban en pastos comunales tenían una mayor probabilidad de infección que los que no compartían los pastos.

Dado que el modelo multinivel demostró que la raza no afectaba a la probabilidad de infección, no se tuvo en cuenta este factor para el análisis de las IgA y su posible asociación con

los HGH (Tabla 2). La IgA detectada en muestras de suero mostró una correlación positiva significativa con los HGH utilizando el antígeno de larvas en ambos grupos, con una asociación mayor en las ovejas jóvenes (Rho = 0,306; p = 0,00) que en as adultas (Rho = 0,123; p = 0,00); utilizando el antígeno PDI-Tc, no se detectaron correlaciones significativas en esta muestra. La asociación entre los HGH y las IgA en las secreciones nasales de ovejas jóvenes fue positiva y significativamente alta para ambos antígenos, antígeno de larvas (Rho = 0,504; p = 0,00) o la proteína recombinante PDI-Tc (Rho = 0,498; p = 0,00). En las ovejas adultas, sólo se observó una

Toma de muestras.

correlación significativa entre estas variables utilizando el antígeno PDI-Tc (Rho = 0,179; p = 0,00). En cuanto a las muestras de saliva, se encontró una asociación entre los niveles de los HGH y las IgA en el grupo de ovejas jóvenes (Rho = 0,295; p = 0,00) cuando se utilizó el antígeno PDI-Tc.

DISCUSIÓN

El desarrollo de métodos de control más sostenibles para el control de las infecciones por NGI se ha convertido en una necesidad urgente debido al aumento de la resistencia a los fármacos antihelmínticos. Como punto de partida es esencial comprender el mecanismo a través del cual algunos animales pueden controlar las infecciones resultando resistentes a la infección. La respuesta inmunitaria frente a los NGI implica la producción de inmunoglobulina IgA, y su aumento se ha relacionado con ovejas más resistentes en condiciones experimentales, especialmente frente a *T. circumcincta* y *H. contortus*. De hecho, en ovejas infectadas experimentalmente, el aumento de los niveles de IgA en ovejas adultas de la raza Churra y en corderos pertenecientes a las razas Scottish Blackface y Canaria de Pelo, se ha asociado con parásitos más cortos y, en consecuencia, con un menor número de HGH [9,10].

La saliva y las secreciones nasales son muestras biológicas más fácilmente accesibles que la sangre y menos invasivas para los animales. Además, el análisis de los niveles de anticuerpos puede realizarse en el laboratorio a gran escala en muy poco tiempo, superando las dificultades de las técnicas convencionales, como los métodos coprológicos.

El desarrollo de la inmunidad a los NGI en las ovejas es complejo y muy variable entre razas, y también entre individuos pertenecientes a la misma raza. Por consiguiente, se ha sugerido que la raza es un factor importante en el control inmunitario de la infección, a pesar de que la mayoría de las razas han sido poco estudiadas. Según algunos estudios realizados en condiciones experimentales, determinadas razas se consideran más resistentes que otras, en particular las razas de ovejas de pelo (raza Canaria de Pelo, Blackbelly o Pelibuey) en comparación con las razas de lana (Suffolk u oveja Canaria) [11,12]. Según la base de datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación español, las razas ovinas más comunes en la zona de muestreo del presente estudio son Assaf y las razas autóctonas Castellana y Churra, todas ellas de lana. En la literatura, no hay información sobre cómo estas tres razas son capaces de controlar las infecciones por NGI en condiciones naturales de infección. Sin embargo, en este estudio, los resultados mostraron que el riesgo de infección no está vinculado a ninguna de estas razas.

Por otro lado, la edad es otra variable a tener en cuenta en cuanto al riesgo de infección. Los corderos empiezan a mostrar competencia inmunitaria a partir de los 2-3 meses de edad, alcanzando un pico a los 12 meses, cuando la capacidad protectora está plenamente desarrollada [13]. Como era de esperar, en este estudio, el riesgo de infección estuvo asociado a la edad, siendo mayor en las ovejas jóvenes, pero no de la misma forma para las tres razas, ya que no hubo diferencias en cuanto al riesgo de infección entre ovejas Castellana jóvenes y adultas.

En infecciones experimentales, se han descrito correlaciones negativas entre los niveles de los HGH y las IgA en muestras de suero recogidas en ovejas de raza Churra, Blackface y Soay [3, 14-16]. Sin embargo, la relación entre estas dos variables cuando se trata de infecciones naturales aún no está clara debido a los pocos estudios que hay al respecto. De la Chevrotére y cols. [17] demostró que los niveles de IgA medidos en muestras de suero de cabritos infectados de forma natural con *H. contortus* se correlacionaban positivamente con los HGH, es decir, a mayor eliminación de huevos en heces, mayor el nivel de IgA. En el presente estudio, todas las asociaciones entre los HGH y las IgA fueron positivas, siendo más significativas en ovejas jóvenes para todas las muestras. En las muestras de suero y saliva, estas asociaciones fueron moderadas cuando se utilizó el antígeno de larvas (Rho = 0,306; p = 0,000) o la proteína recombinante PDI-Tc (Rho = 0,295; p = 0,000); sin embargo, las asociaciones fueron mayores en las secreciones nasales, independientemente del antígeno utilizado, ya fuera el antígeno de larvas (Rho = 0,504; p = 0,00) o el PDI-Tc (Rho = 0,498.; p = 0,000).

Estos datos sugieren que las ovejas jóvenes con un nivel de HGH más elevado, producen más IgA en condiciones naturales, ya que los animales en pastoreo están continuamente expuestos a las infecciones por NGI. En consecuencia, la IgA de las secreciones nasales podría considerarse un posible marcador de infección por NGI en ovejas jóvenes.

CONCLUSIONES

La IgA específica frente los NGI se asoció positivamente con los valores de HGH en ovejas infectadas de forma natural, siendo las secreciones nasales de animales jóvenes las muestras en las que esta asociación fue más fuerte, por lo que podrían utilizarse como marcador de infección. Además, el modelo predictivo explicó que la variación en el riesgo de infección no está afectada por ninguna de las razas incluidas en este estudio -Assaf, Castellana y Churra. Sin embargo, como era de esperar, el modelo demostró que la edad era un factor clave y que los animales jóvenes tienen un mayor riesgo de infección que las ovejas adultas, excepto en el caso de la raza Castellana, en la que todos los animales mostraron el mismo riesgo independientemente de la edad.■

REFERENCIAS

1. Szewc, M.; De Waal, T.; Zintl, A. Biological Methods for the Control of Gastrointestinal Nematodes. Vet. J. 2021, 268, 105602.
2. Gunia, M.; Phocas, F.; Gourdine, J.L.; Bijma, P.; Mandonnet, N. Simulated Selection Responses for Breeding Programs Including Resistance and Resilience to Parasites in Creole Goats. J. Anim. Sci. 2013, 91, 572–581.
3. Martínez-Valladares, M.; Vara-Del Río, M.P.; Cruz-Rojo, M.A.; Rojo-Vázquez, F.A. Genetic Resistance to Teladorsagia circumcincta: IgA and Parameters at Slaughter in Churra Sheep. Parasite Immunol. 2005, 27, 213–218.
4. Pollott, G.E.; Karlsson, L.J.E.; Eady, S.; Greefft, J.C. Genetic Parameters for Indicators of Host Resistance to Parasites from Weaning to Hogget Age in Merino Sheep. J. Anim. Sci. 2004, 82, 2852–2864.
5. Shaw, R.J.; Morris, C.A.; Wheeler, M.; Tate, M.; Sutherland, I.A. Salivary IgA: A Suitable Measure of Immunity to Gastrointestinal Nematodes in Sheep. Vet. Parasitol. 2012, 186, 109–117.
6. De Cisneros, J.P.J.; Stear, M.J.; Mair, C.; Singleton, D.; Stefan, T.; Stear, A.; Marion, G.; Matthews, L. An Explicit Immunogenetic Model of Gastrointestinal Nematode Infection in Sheep. J. R. Soc. Interface 2014, 11, 20140416.
7. Fairlie-Clarke, K.; Kaseja, K.; Sotomaior, C.; Brady, N.; Moore, K.; Stear, M. Salivary IgA: A Biomarker for Resistance to Teladorsagia circumcincta and a New Estimated Breeding Value. Vet. Parasitol. 2019, 269, 16–20.
8. Martínez-Valladares, M.; Vara-Del Río, M.P.; Rojo-Vázquez, F.A. Use of a 203 A Fragment of Tc-PDI to Detect IgA Activity during Infection by Teladorsagia circumcincta in Sheep. Parasitol. Res. 2007, 100, 1213–1220.
9. Pérez-Hernández, T.; Corripio-Miyar, Y.; Hernández, J.N.; Machín, C.; Paz-Sánchez, Y.; Hayward, A.D.; Wright, H.W.; Price, D.R.G.; Matthews, J.B.; McNeilly, T.N.; et al. Differences in the Protection Elicited by a Recombinant Teladorsagia circumcincta Vaccine in Weaned Lambs of Two Canarian Sheep Breeds. Vet. Parasitol. 2022, 306, 109722.
10. Ramos, A.C.S.; Oliveira, L.M.; Santos, Y.L.D.C.O.; Dantas, M.C.S.; Walker, C.I.B.; Faria, A.M.C.; Bueno, L.L.; Dolabella, S.S.; Fujiwara, R.T. The Role of IgA in Gastrointestinal Helminthiasis: A Systematic Review. Immunol. Lett. 2022, 249, 12–22.
11. González, J.F.; Hernández, A.; Molina, J.M.; Fernández, A.; Raadsma, H.W.; Meeusen, E.N.T.; Piedrafita, D. Comparative experimental *Haemonchus contortus* Infection of Two Sheep Breeds Native to the Canary Islands. Vet. Parasitol. 2008, 153, 374–378.
12. Shakya, K.P.; Miller, J.E.; Lomax, L.G.; Burnett, D.D. Evaluation of Immune Response to Artificial Infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native Compared with Suffolk Lambs. Vet. Parasitol. 2011, 181, 239–247.
13. Mcrae, K.M.; Stear, M.J.; Good, B.; Keane, O.M. The Host Immune Response to Gastrointestinal Nematode Infection in Sheep. Parasite Immunol. 2015, 37, 605–613.
14. McManus, C.; Paim, T.D.P.; De Melo, C.B.; Brasil, B.S.A.F.; Paiva, S.R. Selection Methods for Resistance to and Tolerance of Helminths in Livestock. Parasite 2014, 21, 56.
15. Watt, K.A.; Nussey, D.H.; Maclellan, R.; Pilkington, J.G.; McNeilly, T.N. Fecal Antibody Levels as a Noninvasive Method for Measuring Immunity to Gastrointestinal Nematodes in Ecological Studies. Ecol. Evol. 2016, 6, 56–67.
16. Castilla-Gómez de Agüero, V.; González, J.F.; Hernández, J.N.; Valderas-García, E.; Rojo Vázquez, F.A.; Arranz, J.J.; Gutiérrez-Gil, B.; Martínez-Valladares, M. Differences within Churra Breed Sheep in the Early Immune Response to the Infection by Teladorsagia circumcincta. Parasitol. Res. 2021, 120, 1115–1120.
17. De la Chevrotère, C.; Bambou, J.C.; Arquet, R.; Jacquiet, P. Genetic Analysis of the Potential Role of IgA and IgE Responses against *Haemonchus contortus* in Parasite Resistance of Creole Goats Vet. Parasitol. 2011, 186, 337–343.