

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,  
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**TESIS DOCTORAL**

***Ascaridia galli*: estudio de la prevalencia y de la respuesta  
inmune en gallinas ponedoras**

**Fdo.: D<sup>a</sup>. Cristina Marcos Achutegui**

Salamanca, 2015







**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL,  
PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA  
Y QUÍMICA AGRÍCOLA

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

**Dr. Fernando Simón Martín**, Catedrático de Parasitología de la Universidad de Salamanca,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada “*Ascaridia galli*: estudio de la prevalencia y de la respuesta inmune en gallinas ponedoras”, que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección, por **D<sup>a</sup>. Cristina Marcos Achutegui**, con D.N.I. 30631151-G, licenciada en Biología por la Universidad de Salamanca, en el Área de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca. Dicha Tesis Doctoral reúne las condiciones necesarias para ser defendida.

Y para que así conste, a los efectos legales, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 25 de noviembre de 2015.

Fdo.: **Dr. Fernando Simón Martín**



*a Luis*  
*a Félix y Alberto, mis salvajes*  
*a Choco y a Melquiades*



## AGRADECIMIENTOS

---

Por la parte científica, en primer lugar y sin lugar a dudas, esta Tesis va dedicada a Fernando Simón. Sin tu dirección y tu paciencia todo esto no habría sido posible. Gracias por haberme dado la oportunidad de haber trabajado contigo en el mundo de la parasitología, por todo lo que me has enseñado y todo lo que he aprendido.

A Guadalupe Prieto y mis primeros ELISAs entre humo.

Al Dr. Miguel A. Arévalo, Catedrático de Histología del Departamento de Anatomía e Histología Humana de la Facultad de Medicina, por la realización de las preparaciones histológicas.

Al equipo de la empresa Ibérica de Tecnología Avícola, del Parque Tecnológico de Boecillo en Valladolid, y muy especialmente a Javier Ramirez, Jorge Sagardia, Teresa Aranguena y Mónica.

Tengo que reservar un hueco especial al paisano de Castellanos de Villiquera: Jaime Vicente. Sin sus gallinas “tristes” este trabajo nunca habría sido posible.

Y claro, ¡cómo no! a mis compañeros del laboratorio: Rodrigo y Javier. ¡¡Si es que nos hemos visto crecer!!.

A mi querida Martha Nelly Montoya, por ser como eres, por reírte así y morirnos de risa juntas... ¡Cómo te echo de menos!

A todos los compañeros de laboratorio que venían y se iban: Simona Gabrielli, Barbara Gandolfi, Fernando Roca, Elaine Pagés, Roberta Bottari, Sara Carpani. Hay un poquito de todos ellos en este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis otros compañeros de laboratorio, los del IRNA, otra manera de hacer, otro estilo: a la Dra. Ana Oleaga, por enseñarme todos los secretos de la proteómica y a la técnico de laboratorio, Olga, por ayudarme a encontrar los reactivos cada 10 minutos y por todos los ratos que allí pasamos.

A José Ángel y Nuria del SAS que me ayudaron con la primera gallina... La que liamos en el laboratorio...

A Veronica Bobo, del laboratorio 2.8 del IBFG y a María Delgado, investigadora del IBSAL, por su tiempo y mis preguntas.

A Rosa por la paciencia, por su tiempo, por dejarme ir a su casa, por estar siempre dispuesta y por esas tiras y ¡¡esos *spots* redondos y gordos!! . ¡Gracias Luis por la parte que te toca!

A Rosa por aguantarme, por hacer mi matrícula y... simplemente por cogerme el teléfono cada vez que le llamo.

A Belén, por compartir el stress, por los emails a las doce de la noche. ¡Ya sólo quedamos nosotras y lo vamos a hacer estupendamente bien!

## AGRADECIMIENTOS

---

A Luis, Félix y Alberto, por apoyarme y animarme, siempre, por estar y por ser una familia.

A mis padres Manolo y M<sup>a</sup> Carmen, y a mi hermana Raquel por estar a mi lado siempre.

A mis compañeros del Fotón Charro: Íñigo, Julio, Cruz, Pablo, Enrique, Ana, Isabel, Javi, Isa, Oscar, Carolina. ¡Y todo lo que habéis aprendido de los bichos! (¡¡Carolinor... ahora sí que podemos!!)

A Yaiza y Ricardo, siempre nos quedará Menorca, chicos.

A Raquel y Olga, las Nulis, por esas cenas. Somos las más guapas y las más estupendas.

A Aude, por estar siempre ahí, por el apoyo, por ser como eres.

¡¡¡¡Choni!!!!

A Amaya, mi amiga ejecutiva.

A Ana “de micro”, “de Altea”, por las charlas, por las risas, por los ánimos que nos damos, por la vida real, por los whatsapp que nos enviamos... tienes que estar siempre ahí.

Y por último, a mis compis del IBSAL: Raquel, Encarni, Cristina, Sara, Beatriz, Carmen, Luis y Encarni CEIC. ¡¡Chicas, sacad la bola que suena el teléfono!!





## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

## ÍNDICE DE CONTENIDOS



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
1. Taxonomía y sistemática.....	23
2. Morfología y Biología.....	25
3. Epidemiología.....	30
4. El hospedador y sistemas de cría.....	36
4.1 Categorías de las gallinas.....	37
4.2 Sistemas de producción.....	38
5. Relaciones parásito/hospedador.....	42
5.1 Patología.....	42
5.2 Sintomatología.....	44
5.3 Resistencia y susceptibilidad del hospedador a la infección por <i>A. galli</i> .....	46
5.4 Interacción de <i>A. galli</i> con otros parásitos dentro de un mismo hospedador.....	48
6. Aspectos inmunitarios y de resistencia a la infección.....	49
7. Diagnóstico.....	53
8. Control.....	53
<b>ESTUDIO 1: Epidemiología de <i>A. galli</i> en explotaciones avícolas de Castilla y León</b>	
Objetivo.....	61
Materiales y Métodos.....	61
1.1 Obtención de las muestras de heces y sangre.....	61
1.2 Análisis coprológico.....	62

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

1.3 Obtención de parásitos.....	63
1.4 Preparación del extracto antigénico de <i>A. galli</i> (AgSA).....	63
1.5 Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	64
1.6 Western Blot.....	65
1.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	65
1.7 Análisis estadísticos.....	68
Resultados.....	69
1.8 Prevalencia de <i>A. galli</i> en las explotaciones estudiadas.....	69
1.9 Seroprevalencia.....	69
Discusión.....	72

### **ESTUDIO 2: Respuesta de anticuerpos contra *A. galli* en la 1ª generación de gallinas infectadas experimentalmente**

Objetivo.....	77
Materiales y Métodos.....	77
2.1 Aves utilizadas para el estudio.....	77
2.2 Localización y obtención de parásitos.....	77
2.3 Preparación de extracto antigénico de huevos embrionados (AgHL2).....	77
2.4 Preparación del extracto antigénico de adultos <i>A. galli</i> (AgSA).....	78
2.5 Infección experimental de gallinas y recogida de muestras.....	78
2.6 Muestras obtenidas.....	80
2.7 Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	81
2.8 Western Blot.....	82
2.9 Análisis estadísticos.....	83
Resultados.....	83
2.10 Análisis parasitológicos.....	83

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

2.11 Respuesta de anticuerpos IgG en las muestras de los sueros de las gallinas infectadas experimentalmente.....	85
2.12 Respuesta de anticuerpos IgG en yema de huevo de gallinas infectadas experimentalmente.....	87
2.13 Respuesta de anticuerpos IgA en las muestras de los sueros y heces de las gallinas infectadas experimentalmente.....	88
2.14 Identificación de las moléculas implicadas en la reactividad frente a <i>A. galli</i> .....	90
2.15 Antígenos responsables del estímulo de anticuerpos detectados en yemas de huevos puestos por las gallinas infectadas.....	91
2.16 Valores de otros parámetros del experimento.....	92
Discusión.....	93
Anexo.....	96

### **ESTUDIO 3: Susceptibilidad a *A. galli* en la 2ª generación de gallinas**

Objetivo.....	101
Materiales y Métodos.....	101
3.1 Aves utilizadas para el estudio.....	101
3.2 Preparación del extracto antigénico y embrionamiento de los huevos del parásito.....	101
3.3 Obtención de la segunda generación de pollitos e infecciones experimentales.....	102
3.4 Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	104
Resultados.....	107
3.5 Análisis parasitológicos.....	107
3.6 Vermes adultos.....	108

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

3.7 Respuesta de anticuerpos IgG.....	109
Discusión.....	110
Anexo.....	113
<b>ESTUDIO 4: Análisis proteómico de <i>A. galli</i></b>	
Objetivo.....	119
Materiales y Métodos.....	119
4.1 Selección de las muestras y establecimiento de los grupos de sueros.....	119
4.2 Electroforesis bidimensional (2-D SDS-PAGE).....	121
4.2.1 Solubilización del extracto antigénico.....	121
4.2.2 Rehidratación de las muestras en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG).....	122
4.2.3 Isoelectroenfoque (IEF).....	123
4.2.4 Equilibrado de las tiras IPG.....	124
4.2.5 Western Blot 2D.....	125
<i>a. Electroforesis para tiras IPG.....</i>	125
<i>b. Tinción de los geles.....</i>	125
<i>c. Electrotransferencia.....</i>	126
<i>d. Detección de spots inmunógenos en el extracto AgSb en sueros de         gallinas infectadas por <i>A. galli</i>.....</i>	126
4.2.6 Adquisición y análisis de la imágenes.....	127
4.3 Espectrometría de masas e identificación de proteínas.....	127
4.3.1 Digestión de proteínas en los geles.....	128
4.3.2 Espectrometría de masas (MS).....	128
4.3.3 Búsqueda en bases de datos.....	129
Resultados.....	129

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

4.4 Estudio protéico de la fracción AgSb del extracto antigénico de <i>A. galli</i> mediante electroforesis 2D.....	129
4.4.1 Valoración cualitativa del extracto antigénico.....	129
4.4.2 Estudio protéico del extracto AgSb mediante electroforesis 2D.....	131
4.4.3 Proteínas inmunógenas de la fracción AgSb del extracto antigénico de <i>A. galli</i> .....	132
a. Gallinas infectadas naturalmente.....	132
b. Gallinas infectadas experimentalmente.....	134
4.5 Identificación de proteínas inmunoreactivas de <i>A. galli</i> .....	136
Discusión.....	141
<b>ESTUDIO 5: Histología de la infección por <i>A.galli</i></b>	
Objetivo.....	147
Materiales y Métodos.....	147
5.1 Aves utilizadas para el estudio.....	147
5.2 Obtención y preparación de muestras de tejido intestinal y tinción.....	148
Resultados.....	149
5.3 Estudio Histológico.....	149
Discusión.....	153
<b>CONCLUSIONES</b>	157
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	161
<b>ABREVIATURAS</b>	191
<b>ANEXOS</b>	197
<b>PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL</b>	213





## INTRODVCCIÓN

---

## INTRODVCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

---

*Ascaridia galli* es el verme intestinal de gallinas causante de la ascariidiasis aviar, enfermedad parasitaria responsable de pérdidas económicas en explotaciones de aves en todo el mundo. Actualmente, este problema se ha visto agravado en Europa por la nueva normativa sobre manejo de aves de corral, que comenzó a aplicarse el año 2012. En ella se han sentado las bases para una mejora en las condiciones del mantenimiento de las aves en los gallineros con el aumento de espacios libres accesibles para las gallinas, junto con la extensión de los sistemas alternativos de cría. Si bien estas actuaciones han mejorado las condiciones ambientales en las que viven las gallinas, también han contribuido a favorecer la transmisión de determinados patógenos, como *A. galli*, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años. Consecuentemente, la producción destinada a un mercado tan importante como el de la cría de pollos para consumo humano o el de las gallinas ponedoras, se ha visto afectado de manera no evaluada suficientemente en la actualidad.

Ante esta situación, se requieren estudios que contribuyan a un mejor conocimiento de la biología del parásito y de las relaciones parásito/hospedador. Durante el ciclo de *A. galli*, las larvas de tercer estadio penetran en la pared del intestino y los vermes adultos, a veces en número elevado, viven en la luz intestinal produciendo daños patentes en el hospedador. Sin embargo, tanto los mecanismos patogénicos del parásito, como los inmunitarios desarrollados por las aves infectadas, son escasamente conocidos. Por otra parte, tampoco se conocen con certeza las consecuencias de la infección de las madres en la siguiente generación de pollitos. Esto podría tener una gran importancia en ambientes cerrados o con espacios limitados como los de las explotaciones avícolas actuales, por la estrecha convivencia entre aves infectadas y su descendencia.

Considerando la falta de información sobre muchos aspectos de la infección por *A. galli*, las modificaciones de las condiciones de cría y la importancia económica que ha adquirido el sector avícola, hemos planteado un estudio sobre diversos aspectos de la

ascaridiasis aviar, con el objetivo de contribuir a un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en nuestra región y de diversos aspectos de las relaciones parásito/hospedador a nivel general.





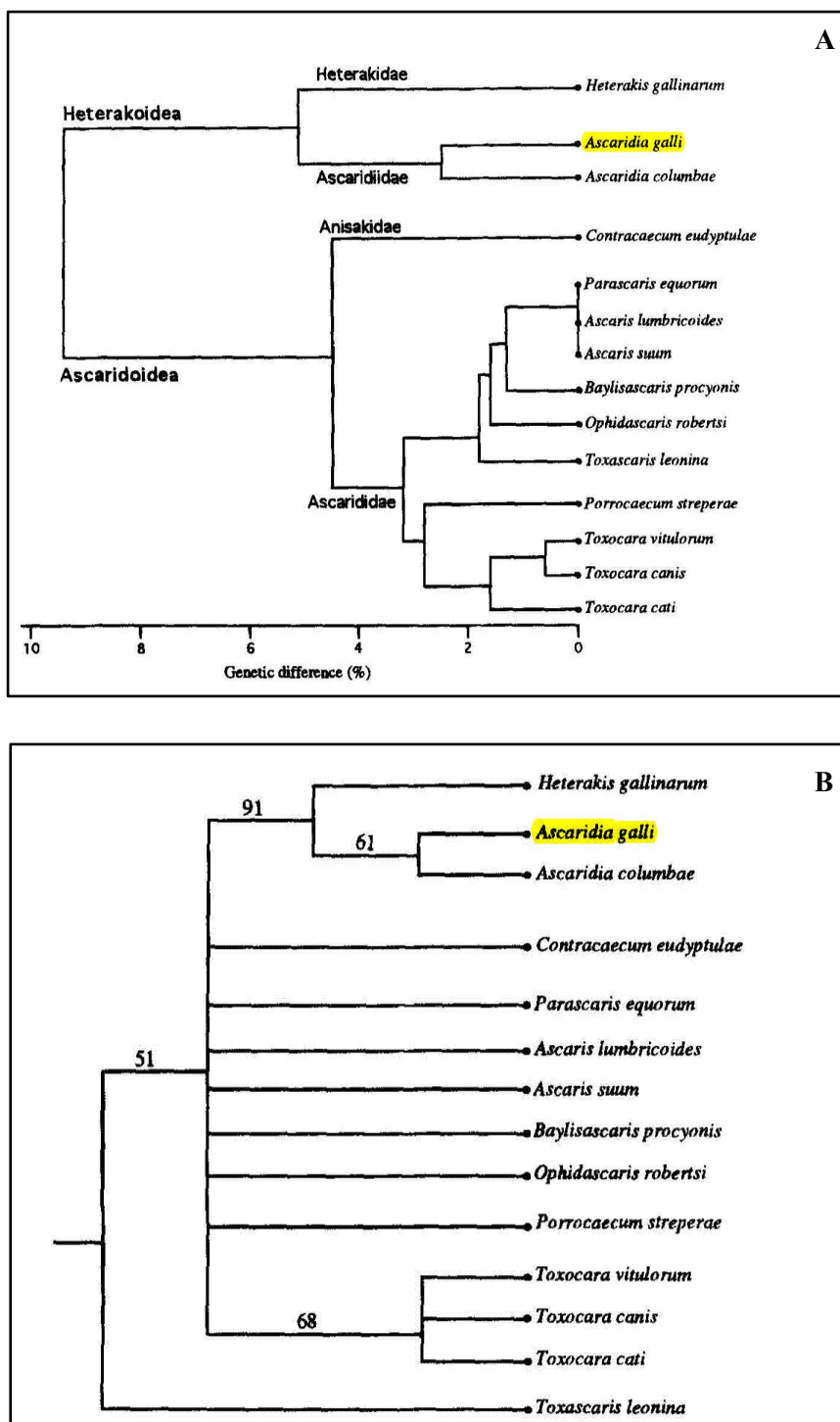
### ANTECEDENTES

#### 1. Taxonomía y sistemática

*Ascaridia galli* (Schrank, 1788) es una especie perteneciente al Phylum *Nematoda*, Clase *Secernentea*, Orden *Ascaridida*, Superfamilia *Heterakoidea*, Familia *Ascaridiidae* y Género *Ascaridia*.

La Superfamilia *Heterakoidea* se compone de dos familias: *Heterakidae*, con *Heterakis* como único género y seis especies entre las que se encuentra *Heterakis gallinarum*, y la familia *Ascaridiidae*, (Mozgovoi, 1953a y b) con el género *Ascaridia* (Dujardin, 1845) que incluye numerosas especies que parasitan a su vez, distintas especies de aves. La más común y conocida es *A. galli*, parásito intestinal de la gallina (*Gallus gallus*) (Schrank, 1788) y otras especies de aves domésticas y silvestres.

Estudios filogenéticos basados en el análisis del DNAr de varias especies de nematodos, muestran la cercanía filogenética de los géneros *Ascaridia* y *Heterakis*. (Zhu *et al.*, 1998). El fenograma que se muestra en la Figura 1, se construyó a partir de diferencias en los pares de bases mediante el programa *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA) (Sneath *et al.*, 1973) (Zhu *et al.*, 1998).

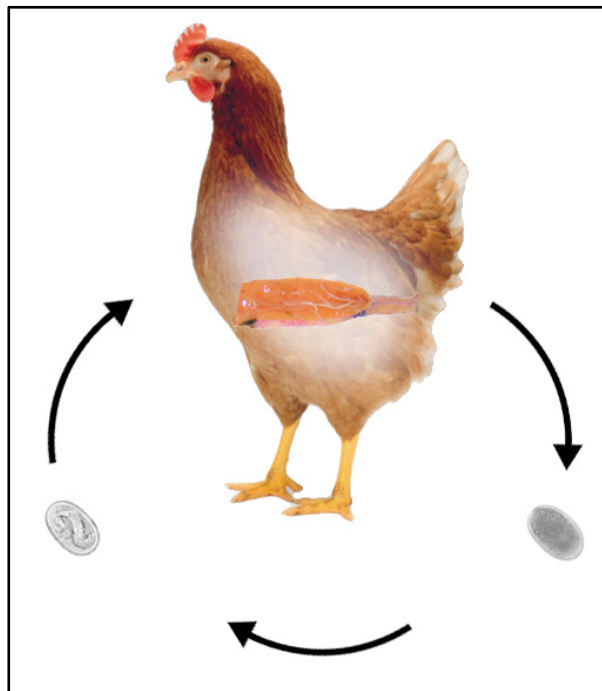


**Figura 1.** (A) Fenograma representando la similitud genética de la secuencias del ADN<sub>r</sub> del 5,8 S de las especies de los ascáridos. (B) Cladograma representando la relación filogenética de los ascáridos basado en el análisis de un máximo de parsimonia mediante PAUP. *Caenorhabditis elegans* fue usado como grupo externo (datos no mostrados) (Zhu *et al.*, 1998).



### 2. Morfología y biología

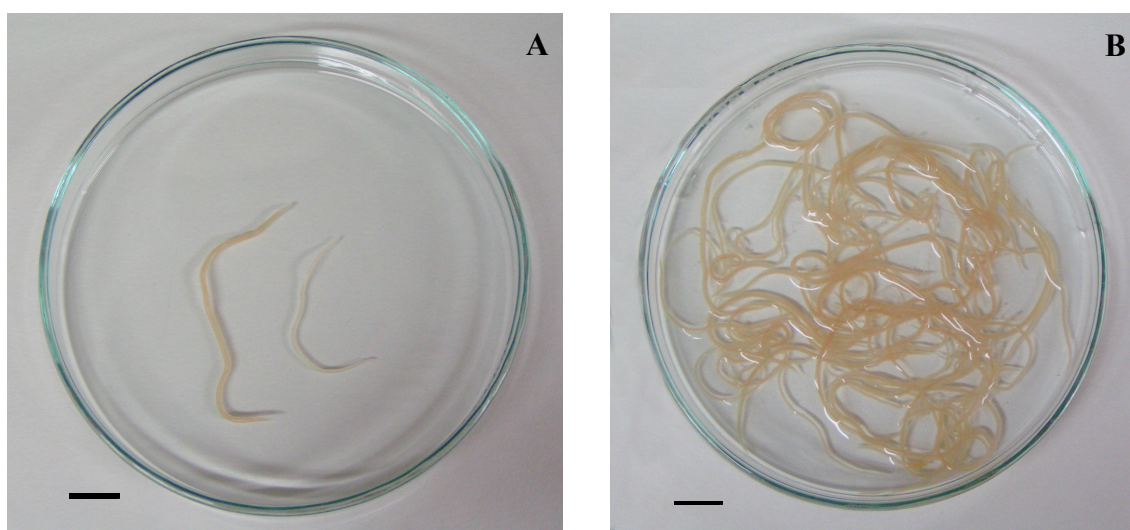
El ciclo biológico de *A. galli* es directo. Los vermes adultos se localizan en el intestino delgado. Una vez fecundadas, las hembras ponen huevos que salen al exterior con las heces de las gallinas. Embrionan en el medio ambiente contaminando el suelo de los gallineros y espacios de cría abiertos. La infección de nuevos hospedadores se produce por ingestión de huevos con larvas 2 (L2). En la luz del intestino delgado la larva sale del huevo. A continuación muda y se introduce en la mucosa. Después de otra muda, sale nuevamente a la luz intestinal en donde evolucionará hasta alcanzar la fase adulta, completándose de esta manera el ciclo.



#### 2.1 Vermes adultos

Los vermes adultos de *A. galli* son semitransparentes. Las hembras miden de 72 a 116 mm y los machos de 51 a 76 mm (Acker, 1931; Euzéby, 1981; Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999) (Figura 2). La boca se halla rodeada de tres labios,

uno dorsal, de mayor tamaño, y dos subventrales. El esófago no tiene bulbo posterior. Los machos presentan en su extremidad caudal dos alas membranosas sostenidas por diez pares de papilas, tres de ellas precloacales, y una ventosa precloacal circular provista de un anillo quitinoso. El ano se localiza a 0,48-0,85 mm del extremo caudal. Posteriormente a la ventosa preanal se encuentran dos espículas iguales de 1-2,4 mm (Ackert, 1931; Ashour, 1994). Las hembras tienen el ano localizado a 1,3-1,8 mm del extremo caudal. La vulva se localiza en la mitad anterior del cuerpo (aprox. a 31-54 mm del extremo posterior).



**Figura 2.** (A) Vermes macho y hembra de *A.galli*. La hembra es la de mayor tamaño. (B) Parásitos machos y hembras de *A. galli* extraídos de una gallina infectada. Barra: 1 cm.

### 2.2 Huevos del parásito

Los huevos de *A. galli* son elipsoidales y con las paredes laterales ligeramente abombadas, lo que le da un aspecto de barril. La pared está constituida por tres capas lisas, siendo la capa intermedia la más gruesa. Miden 75-90  $\mu\text{m}$  de longitud por 45-60  $\mu\text{m}$  de ancho (Ackert, 1931; Thienpont *et al.*, 1979) (Figura 3).

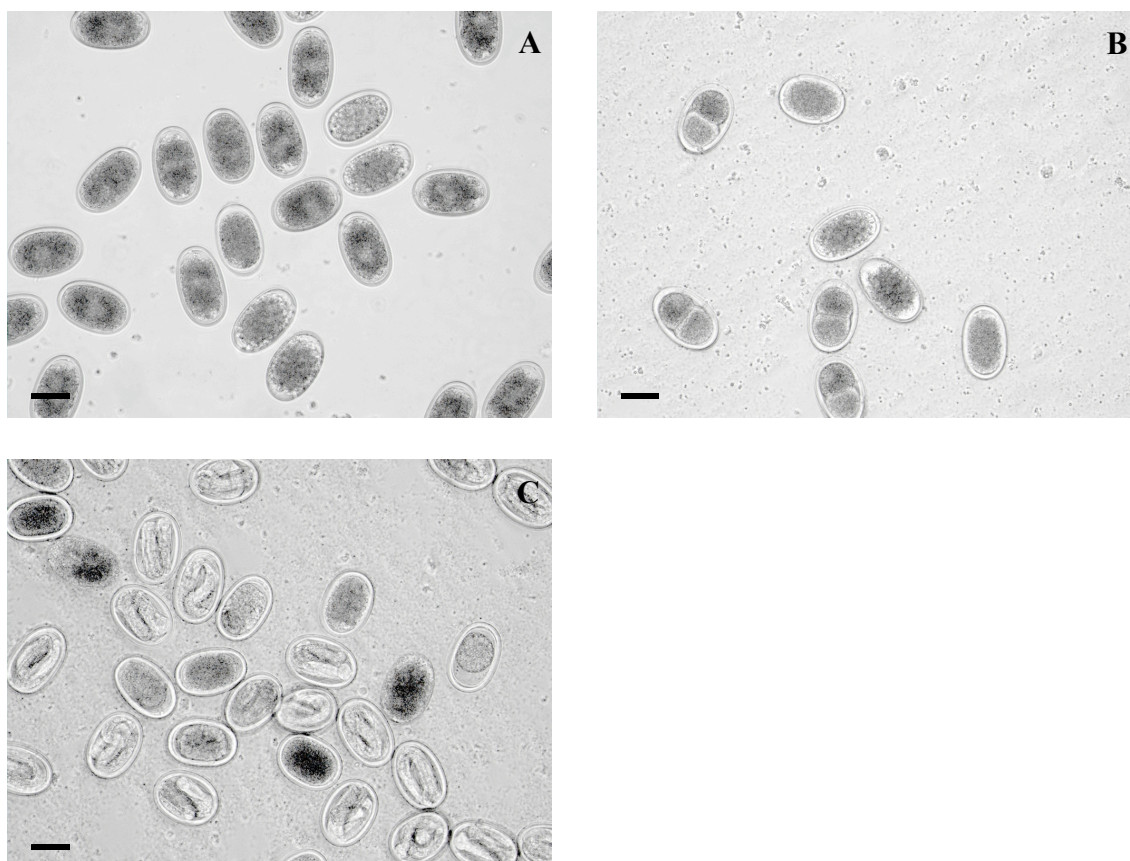
Puede existir dificultad para distinguir los huevos de *A. galli* de los de *Heterakis gallinarum*, aunque estos son ligeramente más pequeños y con las paredes lisas (Thienpont *et al.*, 1979).

Cuando los huevos se depositan en el suelo, no son infectivos. Necesitan una temperatura y una humedad determinada para que sea posible el desarrollo de la L2, o larva infectiva, en su interior. Como en todos los ascáridos, las larvas protegidas por las cubiertas del huevo son resistentes a los agentes ambientales y a los desinfectantes, aunque son sensibles a la desecación y a las congelaciones y descongelaciones repetidas. Los huevos se mantienen viables durante unos dos años en condiciones de laboratorio, pero en condiciones naturales se admite que únicamente mantienen la viabilidad durante un año (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999)

Hansen y Turner (1954) y Hansen *et al.*, (1956) sugieren que la cubierta de los huevos que rodea a las larvas de *A. galli* puede ser un factor que condicione la infección en el hospedador definitivo. Posiblemente, el efecto de los movimientos peristálticos del intestino de la gallina y el aumento en la actividad de la larva cuando aumenta la temperatura dentro del huevo sean los causantes de que eclosione más rápido “in vivo”.

Existen numerosos estudios experimentales en los que se han analizado las condiciones de embrionamiento y su relación con la capacidad de desarrollo posterior en el hospedador. Se ha comprobado experimentalmente, que huevos mantenidos a una temperatura de entre 0 °C y 10 °C no embrionan, mientras que si se mantienen en agua a 30 °C embrionan en 16 días y en agua a 33 °C se vuelven infectivos en 10 días Ackert (1931). Si son mantenidos a una temperatura constante de 5 °C, se impide el embrionamiento (Schou y Permin, 2003b). Estudios de Tarbiat *et al.*, (2015), parecen indicar que los huevos de *A. galli* se desarrollan en un intervalo de temperatura de 15 a 35 °C. Todd *et al.*, (1952) estudiaron la posible relación entre el ambiente para el desarrollo de los parásitos hasta la fase infectante, y la capacidad para producir lesiones en sus hospedadores. Según estos autores, la temperatura durante el embrionamiento y

el medio en el cual embrionan los huevos, son los factores ambientales clave para el posterior desarrollo del parásito en el hospedador.



**Figura 3.** Imágenes mostrando la evolución del embrionamiento de huevos de *A. galli*: (A) Día 1: Huevos recién extraídos del útero de una hembra. (B) Día 3. (C) Día 14: Huevos embrionados, conteniendo la L2. Barra: 50 µm.

Los huevos de *A. galli* son capaces de desarrollarse en un medio que contenga 0,5 % de formalina durante 14 días a 30 ° C en presencia de oxígeno y en agitación (Tongson y McCraw, 1967; Herd y McNaught, 1975). Por otra parte, se ha demostrado que un mantenimiento prolongado en el laboratorio, en medio ácido, limita considerablemente el establecimiento del parásito en el organismo de la gallina. Sin

embargo, si se produce una neutralización del medio de cultivo 3 días antes de su ingestión de los huevos por las gallinas, se facilita el establecimiento de las larvas en el organismo. Estos mismos autores, observaron que gallinas infectadas con huevos que habían sido mantenidos a pH 8,0, desarrollaba un número mayor de larvas (Lazdina y Grinberga, 1978).

Según un estudio realizado por Elliot (1954), en el cual se midieron los efectos de la edad en la infectividad de los huevos de *A. galli*, se comprobó que la media de vermes recuperada por pollo era mayor si provenían de cultivos de huevos recién embrionados que de cultivos más viejos. Además, los cultivos de huevos de *A. galli* mantenidos en condiciones de laboratorio demostraban una elevada infectividad, hasta aproximadamente 200 días, ocurriendo un declive importante de la capacidad infectante en los cultivos entre los días 200 y 290.

Infecciones realizadas con huevos recogidos del útero de las hembras de *A. galli* y embrionados en 0,1 N de ácido sulfúrico, dan como resultado graves infecciones, con recuentos elevados de huevos en heces (Permin *et al.* 1997; Schou y Permin, 2003a). Se ha visto que en incubaciones de huevos de *A. galli*, realizadas “in vitro” en extractos de proventrículo y de intestino delgado de gallina, embrionan mucho más deprisa porque solamente es necesario que los huevos estén en contacto con el extracto tisular durante no más de 45 minutos (Salih y Saleem, 1987). Actualmente, la forma más extendida de embrionamiento de huevos de *A. galli* es la incubación en una solución del 0,1 N de ácido sulfúrico o de 4 % de dicromato potásico a 20 ° C durante 14 días. (Gauly *et al.*, 2001; Gauly *et al.*, 2005; Abdelqader *et al.*, 2007).

### 2.3 Larvas

Las aves se infectan cuando ingieren los huevos que contienen L2 del parásito. Las lombrices de tierra, en las que se acumulan los huevos del parásito, actúan como portadoras e infectan a las aves cuando estas se alimentan de ellas (Cordero del

Campillo y Rojo Vázquez, 1999), pero no se realizan transformaciones larvarias en su interior, actuando solamente como hospedadores paraténicos (Simón Vicente, 1956), no obstante, según datos de Augustine *et al.* (1974), transcurridas 48 a 96 horas de la ingesta de los huevos por las lombrices, estos dejan de ser viables, con lo cual estas no representan un riesgo potencial de transmisión de la parasitosis.

Los huevos ingeridos por las aves, llegan al duodeno donde eclosionan dentro de las 24 horas siguientes (Ackert, 1923; Tugwell y Ackert, 1952). Estas larvas, que miden alrededor de 1mm de largo, viven en la luz intestinal y en los espacios entre las vellosidades intestinales durante los primeros 8-10 días post-infección (p.i.). En este momento, penetran en la mucosa intestinal en donde sufren una muda que las convierte en L3, llegando a alcanzar unos 4 mm de largo. Permanecen en la mucosa hasta el día 17 p.i., momento en el que mudan a L4, alcanzando los 17 mm de longitud, hacia los días 14 y 15 pi. Vuelven a migrar seguidamente a la luz intestinal y entre los días 18 a 23 días p.i. aparecen los adultos inmaduros, que completan su desarrollo alrededor del día 50 p.i. en el intestino delgado (Ackert, 1931; Tugwell *et al.*, 1952; Simón Vicente, 1956; Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999). Kerr (1955) encontró que los gusanos maduran más lentamente en gallinas viejas que en jóvenes y Ackert (1931) demostró que el período de prepatencia es de 5 a 6 semanas en gallinas de menos de 3 meses y de 8 semanas o más en gallinas más viejas.

### **3. Epidemiología**

La primera identificación de *A. galli* fue realizada en Alemania por Schrank (1788). Más tarde, Ackert (1931) confirmó la presencia de *A. galli* en Brasil, India, Zanzíbar, Filipinas, Congo Belga (Zaire), China, Canadá e Inglaterra, lo que indica que *A. galli* aparece en zonas con climas templados, subtropicales y tropicales, por lo que puede considerarse como un parásito cosmopolita (Ackert, 1931).



Edgar (1953) identificó *A. galli* en gallinas domésticas en el estado de Alabama (EEUU). Según Wilson *et al.*, (1994), pollos de engorde comerciales de Arkansas tenían una prevalencia que variaba del 0,3 al 13,7 %, dependiendo de la gestión de las granjas.

En Nicaragua se detectó una prevalencia del 34,7 % (Luna-Olivares *et al.*, 2006) y en México ha sido señalado como uno de los parásitos más frecuentes de la gallinas (Lapage, 1971; Roger *et al.*, 2001), al igual que ocurre en Chile (Alcaino y Gorma 1999).

En el continente africano, *A. galli* se identificó en un 55 % de muestras procedentes de Egipto (Gaafar, 1952). Dakkak y Houadfi (1992) examinaron 60 gallinas en Marruecos en donde también identificaron el parásito. En Sudán, *A. galli* fue identificado por Saad *et al.* (1989). En el oeste de Camerún se encontró una prevalencia del 52 % (Mpoame y Agbede, 1995). En Etiopía, el 91,01 % de un total de 267 gallinas de zonas rurales de cuatro distritos estaban infectadas con distintos parásitos, de los cuales, el 35,58 % correspondía a *A. galli*. (Eshetu *et al.*, 2001). En Nigeria, el 41 % de las gallinas comerciales mantenidas en sistema de suelo con cama de paja estaban parasitadas, mientras que la prevalencia era de sólo el 11 % en las gallinas mantenidas en terreno de pasto abierto (Okela, 1989; Fatihu *et al.*, 1991). Msanga y Tungaraza (1985) y Otaru y Nsengwa (1985), hicieron estudios de prevalencia en gallinas de Tanzania y encontraron una prevalencia que variaba entre el 23 y el 45 %. En estudios posteriores, Magwisha *et al.*, (2002), observaron que la prevalencia del parásito era significativamente mayor en pollitos que en adultos, siendo la prevalencia de 69 % en los primeros y de 29 % en los segundos. Jansen y Pandey (1989) descubrieron que el 20 % de las gallinas rurales de Zimbabwe tenían *A. galli*. En Uganda, Ssenyonga (1982) calculó la prevalencia de *A. galli* entre 8 y 44 %, dependiendo del tipo de manejo de las granjas. En Ghana (África Occidental) todas las gallinas mantenidas en sistemas extensivos, estaban infectadas con parásitos gastro-intestinales, siendo la prevalencia de *A. galli* de un 24 % (Poulsen *et al.*, 2000). En Kenia, en una zona semiárida se observó

que la prevalencia de *A. galli* era del 33,3 % (Mungube *et al.*, 2008). En Zambia, la prevalencia de *A. galli* en gallinas que viven en terreno de pasto abierto es del 28,8 %. (Phiri *et al.*, 2007). En Botswana *A. galli* y *Heterakis gallinarum* fueron los nematodos más abundantes en 30 gallinas adultas indígenas cuyas heces fueron analizadas (Mushi *et al.*, 2000).

En Europa, los estudios realizados por Schobries *et al.* (1989), en el oeste de Alemania revelaron que el 7 % de las gallinas estaban infectadas por *A. galli*. En 1990, Seller, examinó muestras de heces recogidas de granjas de Baviera (Alemania), en las cuales el 13 % contenían huevos del parásito. Estudios epidemiológicos realizados en corrales al aire libre de cuatro distritos de Austria dieron como resultado que un 64,1 % de las aves albergaban el parásito (Kutzer, 2000). En Suiza, la prevalencia de *A. galli* varía desde un 2 % a un 20 % en gallinas comerciales (Morgenstern y Lobsiger, 1993). En Dinamarca, un estudio de la prevalencia de *A. galli* en 268 gallinas adultas de 16 granjas con diferentes sistemas de producción determinó que en la forma libre-ecológica, la prevalencia era de un 63.8 %, en un sistema de baterías del 4-5% y en un sistema de corrales un 37.5 % (Madsen 1952; Permin *et al.*, 1999). Al norte de Turquía, un estudio llevado a cabo en nueve distritos, dio como resultado una prevalencia del 16 % (Kurt y Acici, 2008).

Según estudios de Abdelqader *et al.* (2008) en el norte de Jordania existe una prevalencia del 28 % de *A. galli* en gallinas sueltas con posibilidad de picotear en el suelo. En Pakistán, la prevalencia determinada por Khan *et al.* (1994) fue del 12 %.

En Tailandia, el 22 % de las gallinas estaban infectadas con *A. galli* según Kunjara y Sangvaranond (1993). En estudios realizados en Vietnam por Schou *et al.* (2007), *A. galli* era el parásito con mayor prevalencia. Yadav y Tandon (1991) determinaron que *A. galli* es el nematodo más prevalente en gallinas domésticas en la India, con un 60 %.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

En España, *Ascaridia spp.* se ha señalado en prácticamente todas las regiones como parásito de aves de presa, rapaces nocturnas (Illescas *et al.*, 1993). *A. galli* fue descrita en la provincia de Salamanca por Simón Vicente en 1956. Se ha encontrado en urogallos (*Tetrao urogallus cantabricus*) de Cantabria (Millán *et al.*, 2008), y en la perdiz moruna (*Alectoris barbara*) de la isla de Tenerife (Foronda *et al.*, 2005). En palomas salvajes (*Columba livia*) de la ciudad de Santa Cruz de Tenerife la prevalencia de *Ascaridia columbae* es del 40 % (Foronda *et al.*, 2004).

	<b>AFRICA</b>	
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Egipto	55%	Gaafar (1952)
Marruecos	no hay datos	Dakkak y Houadfi (1992)
Sudán		Saad <i>et al.</i> (1989)
Camerún	52%	Mpoame y Agbede (1995)
Etiopía	35,58%	Eshetu <i>et al.</i> (2001)
Nigeria	41 % gallinas en camas 11 % gallinas libres	Oyeka (1989) Fatihu <i>et al.</i> (1991)
Tanzania	23 - 45 %	Msanga y Tungaraza (1985) Otaru y Nsengwa (1985)
	69 % en pollitos 29 % en adultos	Magwisha <i>et al.</i> (2002)
		Ackert (1931)
Zimbabwe	20%	Jansen y Pandey (1989)
Uganda	de un 8 a un 44 %	Ssenyonga (1982)

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

<b>AFRICA</b>		
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Ghana	24%	Poulsen <i>et al.</i> (2000)
Kenia	33,3%	Mungube <i>et al.</i> (2008)
Zambia	28,8%	Phiri <i>et al.</i> (2007)
Botswana		Mushi <i>et al.</i> (2000)
Congo Belga (Zaire)		Ackert (1931)

<b>EUROPA</b>		
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Alemania	7%	Schobries <i>et al.</i> (1989)
	13%	Séller (1990)
Austria	64,1%	Kutzer (2000)
Suiza	2 % a un 20 %	Morgenstern y Lobsiger (1993)
Dinamarca	63.8 %, granja ecológica 4-5 % en baterías 37.5 % corrales	Madsen (1952) Permin <i>et al.</i> (1999)
Turquía	16%	Kurt y Acici (2008)
Inglaterra		Ackert (1931)

<b>ORIENTE MEDIO</b>		
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Jordania	28 %.	Abdelqader <i>et al.</i> (2008)
Pakistán	12%	Khan <i>et al.</i> (1994)

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

<b>ASIA</b>		
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Tailandia	22%	Kunjara y Sangvaranond (1993)
Vietnam		Schou <i>et al.</i> (2007)
India	60%	Yadav y Tandon (1991)
Filipinas		Ackert (1931)
China		Ackert (1931)

<b>AMERICA</b>		
<b>País</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
EEUU: Alabama		Edgar (1953)
EEUU: Arkansas	0,3 al 13,7 %	Wilson <i>et al.</i> (1994)
Canadá		Ackert (1931)
Nicaragua	34,7%	Luna-Olivares <i>et al.</i> (2006)
México		Lapage (1971) Roger <i>et al.</i> (2001)
Chile		Alcaino (1999)
Brasil		Ackert (1931)

<b>ESPAÑA</b>		
<b>Hospedador</b>	<b>Localización geográfica</b>	<b>Referencia</b>
Aves de presa Rapaces nocturnas	Toda España	Illescas <i>et al.</i> (1993)
Gallina común	Salamanca	Simón Vicente (1956)

	ESPAÑA	
Hospedador	Localización geográfica	Referencia
Urogallos ( <i>Tetrao urogallus cantabricus</i> )	Cantabria	Millán <i>et al.</i> (2008)
Perdiz moruna ( <i>Alectoris barbara</i> )	Tenerife (Islas Canarias)	Foronda <i>et al.</i> (2005)
Palomas salvajes ( <i>Columba livia</i> )	Santa Cruz de Tenerife (Islas Canarias)	Foronda <i>et al.</i> (2004)

**Tabla 1.** Distribución de la ascariidiasis en el mundo

#### 4. El hospedador y sistemas de cría

La gallina doméstica es el principal hospedador de *A. galli* que parasita, además, a otras aves de corral y diversas especies silvestres (Tabla 2).

Parásito	Hospedador	Referencia
<i>A. galli</i>	<i>Gallus gallus</i> (gallina doméstica)	Ackert (1931) Kates y Colglazier (1970)
	<i>Pavo spp</i> (pavo común) <i>Numida meleagris</i> (gallina de guinea) <i>Anser spp</i> (ganso) <i>Alectoris rufa</i> (perdiz común) <i>Tetrao urogallo</i> (urogallo) <i>Tetrao tetrix</i> (gallina lira) <i>Bonasia bonasia</i> (grévol) <i>Anas acuta</i> (ánade rabudo) <i>Anas platyrhynchos</i> (ánade real) <i>Phasianus colchicus</i> (faisán)	Ackert (1931) Rothschild y Fleas (1957) Kates y Colglazier (1970) Wehr (1971) Soulsby (1968) Soulsby (1968) Anderson (1992) Anderson (1992) Anderson (1992) Anderson (1992)
<i>A. columbae</i>	<i>Columba spp</i> (paloma común)	Olsen y Braun (1980)

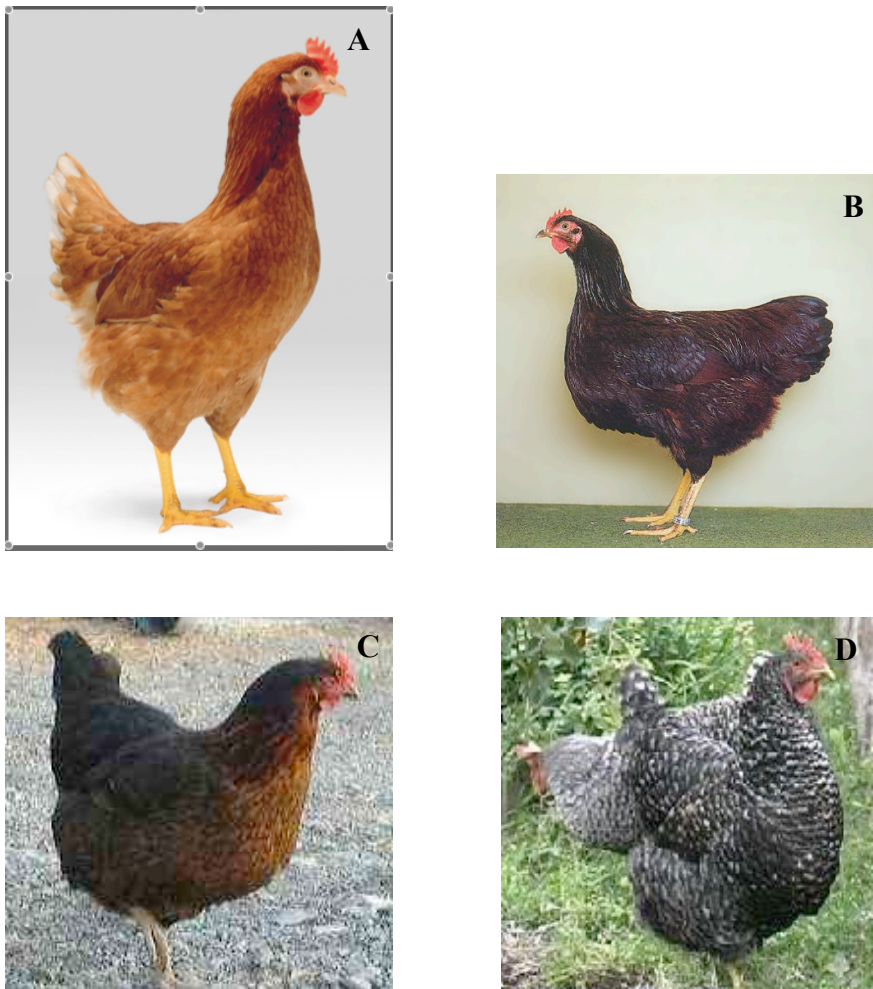
**Tabla 2.** Hospedadores de *A. galli*.

### 4.1 Categorías de las gallinas

Por su tamaño y su función zootécnica, las gallinas se dividen en tres categorías: gallinas ligeras, gallinas pesadas y gallinas semipesadas (Buxadé, 2000):

- a. Las gallinas ligeras son gallinas ponedoras. Alcanzan un peso cercano a 1700 gr cuando son adultas. El color de las plumas es blanco o marrón. Tienen un buen rendimiento alimento-tamaño-cantidad de huevos. A este grupo pertenecen las gallinas con las que hemos trabajado: Lohmann Brown, y otras razas híbridas.
- b. Las gallinas semipesadas son también gallinas ponedoras. Su peso adulto es de alrededor de 2000 gr. Su plumaje suele ser de color rojizo. A este grupo pertenecen las razas: Rhode Island Red, Plymouth Rock Barred y los cruces entre ambas: New Hampshire, Orpington, Wyandotte y Sussex.
- c. Las gallinas pesadas tienen como función producir el huevo del que nacerán los pollos de engorde para la producción de carne. Pesan más de 2000 gr. El plumaje de estas aves puede ser completamente rojo o bien de color negro con puntos blancos. Las razas más importantes son: Hubbard, Arbor Acres, Ross, Hybro, y Cobb.

Existen también las variedades locales. Las gallinas de razas locales se adaptan mejor a condiciones ambientales desfavorables porque su organismo ha sufrido un proceso de selección natural que hace más apta la cría en esas zonas. Su producción de carne y de huevos es moderada.



**Figura 4.** Ejemplos de diferentes razas de gallinas: (A) Lohmann Brown (B) Rhode Island Red (C) Arbor Acres (D) Gallina criolla.

#### 4.2 Sistemas de producción

Según la Directiva 1999/743/CE de la Unión Europea, los sistemas posibles de producción son los siguientes:

- a. En jaula: Las gallinas están en baterías, con un espacio de 750 cm<sup>2</sup>/ave y con una alimentación de tipo convencional (Figura 5). Este sistema viene marcado en los huevos con el número 3 delante del código de la granja de origen.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

- b. En suelo: Las gallinas se crían en naves sin baterías pero sin salida al exterior, con una densidad de población de 9 aves/m<sup>2</sup>. El tipo de alimentación es convencional. Se marcan con el número 2 en los huevos.
- c. Campera: Son gallinas en naves de suelo (densidad de población de 9 aves/m<sup>2</sup>) y con acceso a parques exteriores (densidad en parque de ave por cada 4 m<sup>2</sup>), el tipo de alimentación es convencional y se marcan con el número 1 en los huevos.
- d. Ecológica: Son gallinas que tienen que seguir una normativa de "producción ecológica" determinada; la densidad de población es de 6 aves/m<sup>2</sup> y la densidad en parque de ave por cada 4 m<sup>2</sup> (Figura 6). El tipo de alimentación es ecológica. Se marcan con el número 0 en los huevos. Esta denominación de "ecológica" es oficial en España, en otros países es conocida como "biológica".



**Figura 5.** Ejemplo de gallinas en baterías. (<http://sanjuandelosmorros.olx.com.ve>)





**Figura 6.** Ejemplo de granja ecológica de gallinas. (<http://www.addaong.org/>)

Actualmente los sistemas de producción alternativos, como son las granjas ecológicas y sistemas de producción de animales no-intensivos están tomando mucha importancia (Haas *et al.*, 2014; Janczak *et al.*, 2015). La plena entrada en vigor en el año 2012 de la Directiva 1999/74/CE, obligando a dejar de utilizar las actuales baterías de puesta (“convencionales”) y pasar a las “enriquecidas” o bien a algún sistema alternativo, ha justificado los cambios que se están produciendo en el sector del huevo de la Unión Europea (Castelló, 2015). España es el 2º productor de huevos de la UE y uno de los países con una mayor cantidad de granjas que tienen una menor proporción de su parque de puesta en algún sistema alternativo: el 4,3 % (MARM, 2010). En otros países de la UE, la presión de los grupos ecologistas o defensores del bienestar animal, así como de las principales cadenas de supermercados, ha obligado a los productores a cambiar a un sistema más “amigable” para las aves.

Un estudio de Hovi *et al.* (2003), realizado durante tres años, en sistemas de producción de ganadería ecológica en el que los autores concluyen que, teniendo en



cuenta que los datos disponibles son limitados y que la puesta en marcha de su regulación por la comunidad europea es relativamente reciente, hay una pequeña evidencia que sugiere que el manejo ecológico del ganado causa importantes amenazas a la salud animal y a su bienestar en comparación con sistemas convencionales (Campbell *et al.*, 2015).

La explotación de la gallina ponedora en sistemas “menos presionantes” para ella (los técnicamente mal llamados sistemas “ecológicos”, “biológicos” o “naturales”) puede tener, comercialmente hablando, su nicho de mercado (probablemente en España no excesivamente amplio; tal vez, hasta un 15-20 % de la producción total), pero claramente diferenciado, basado en el “valor psicológico” de los sistemas de producción y, por ello, disponer de un futuro positivo (Buxadé, 2000)

En contraste con las granjas convencionales, el control de las parasitosis en granjas ecológicas está afectado por varios de los cambios prescritos en el manejo de los animales, como por ejemplo el acceso al exterior en el verano, y en la mayoría de los países la prohibición del uso de antiparasitarios con fines preventivos. Diversos estudios en zonas de clima templado del norte indican que la producción en el exterior de cerdos y gallinas ponedoras, dan como resultado una gran prevalencia de infecciones por helmintos, comparadas con las producciones intensivas en condiciones de interior (Thamsborg *et al.*, 1999). En el caso de la gallina ponedora la conversión a una producción orgánica de los huevos incluye cambios en la manera de mantener los animales y en su alimentación. Los huevos de *A. galli* pueden ser ingeridos de áreas contaminadas por heces; además no requiere de hospedador intermediario en su ciclo biológico, lo cual explicaría el éxito del parásito en sistemas de gallinas en suelo con salida al exterior y en sistemas de suelo con cama (Permin *et al.*, 1999; Maurer *et al.*, 2009). Como consecuencia de todo ello, se han observado diferentes helmintos parásitos y grandes cargas parasitarias en las gallinas mantenidas en estos sistemas. Un ejemplo de esto son los estudios de Permin *et al.* (1999) realizados en granjas de Dinamarca, en

los cuales las prevalencias de *A. galli* en granjas ecológicas eran superiores a los encontrados en gallinas mantenidas en camas de paja.

En granjas ecológicas, además de las infecciones por *A. galli*, se han descrito otras patologías causadas por *Pasteurella multocida*, síndrome de la caída de la puesta (infección por aviadenovirus), la enfermedad de Newcastle, canibalismo y enfermedades secundarias por *E. coli* (Permin y Nansen, 1996). Según dicho estudio, en este tipo de sistema se produce un aumento de la infección por ecto y endoparásitos, incluidos helmintos como *A. galli*, *H. gallinarum* y *Capillaria spp.* Estudios de Chauve y Filliat (2001) también señalan a *Heterakis spp.*, *Ascaridia spp.* y *Capillaria spp.*, además de diversas especies de tenias y coccidios, como agentes de enfermedades parasitarias en granjas ecológicas, así como la aparición de otras alteraciones como fragilidad de huesos, nerviosismo de los pollitos, fallo cardíaco y poca implantación de la pluma. Bestman y Wagenaar (2003), señalan que el canibalismo en granjas ecológicas está asociada significativamente con el tipo de vivienda en donde se alojan las aves y la práctica en el manejo de las mismas.

## 5. Relaciones parásito/hospedador

### 5.1 Patología

Los efectos más típicos en las infecciones por *A. galli* se observan al final de la segunda semana post-infección, es decir, cuando las larvas se hallan dentro de la mucosa intestinal, en la que causan hemorragias y una extensa destrucción de epitelio glandular. Además, como consecuencia de la adherencia a las vellosidades de la mucosa, se puede originar una proliferación de células secretoras de mucus, con extravasaciones vasculares en el villi (Ikeme, 1971a). Se produce una enteritis hemorrágica en las infecciones intensas o una enteritis catarral en las más moderadas (Tugwell y Ackert, 1952; Madsen, 1962; Ikeme, 1971a). Las hemorragias intestinales dan lugar a anemia y a alteraciones de la absorción intestinal que, juntamente con la

disminución del apetito y la diarrea debidas a la enteritis (tanto hemorrágica como catarral) causan la detención del crecimiento y la pérdida de peso de las aves (Ikeme, 1971a; Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

Sin embargo, el mayor daño que puede llegar a causar un parásito adulto es la obstrucción del lumen intestinal. Este fenómeno ocurre habitualmente en la parte baja del intestino. No se conoce la causa por la cual los vermes se agregan ocasionando la oclusión, pero cuando ocurre y el paquete de gusanos está encajado en la mucosa, se origina una acumulación de fluidos y una obstrucción del paso de comida. Pueden permanecer en esa posición durante semanas, lo que le lleva al animal a una muerte lenta. Un examen histopatológico del epitelio en esos casos, muestra un daño extenso en las vellosidades, causado por una atrofia debida a la presión y a las toxinas que expulsan los vermes. Partes de la mucosa pueden llegar a necrosarse, con la consiguiente pérdida de la capacidad de absorción. Y en algunos casos el epitelio puede llegar a cornificarse. En ocasiones, los animales se recuperan después de alcanzar este estadio y en muchos casos la muerte es una consecuencia de la falta de alimento (Ikeme, 1971a).

Los adultos libres pueden causar también daños en el epitelio cuando están presentes en grandes cantidades, por sus movimientos a lo largo del lumen intestinal. Pueden llegar incluso a verse en la molleja, penetran en el epitelio a través de los espacios de la capa cornificada. También se han visto gusanos adultos en los ciegos, y en ocasiones saliendo por la boca, causando en este caso, gran malestar al animal. Se ha llegado incluso a producir la migración de gusanos adultos a través del lumen del intestino delgado y la cloaca y han acabado en el oviducto, en donde se han podido incorporar al huevo de la gallina (Figura 7) (Jones, 1935; Hodasi, 1963; Reid *et al.*, 1973; Reid y McDougald, 1997; Piergili Fioretti *et al.*, 2005) o incluso causar perforación intestinal y la consiguiente peritonitis (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).



**Figura 7.** Verme adulto de *A. galli* en huevo de gallina. (Hodasi, 1963).

### 5.2 Sintomatología

Los primeros síntomas se observan en las polladas hacia el final de la primera semana de la infección, momento en el cual la L2 sale del huevo y se localiza en la mucosa intestinal. El crecimiento de los pollos se detiene, dejan de comer, muestran signos de letargia, tienen las plumas erizadas y se observan excrementos diarreicos, frecuentemente sanguinolentos. Algunas aves pueden aparecer muertas, dependiendo su número del nivel de infección y de la edad de las aves. Hacia el final de la segunda semana, coincidiendo con la localización de la L3 en la mucosa intestinal, es cuando las manifestaciones son más graves y generalizadas, no aumentando después durante aproximadamente unos 8-10 días, período durante el cual la mortalidad se hace menor y se entra en una fase de cronicidad en la que se mantiene la sintomatología, cuya gravedad varía de unas aves a otras según el grado de la intensidad de la parasitación. A partir de ese momento y de manera muy desigual, comienza la fase de recuperación, que nunca llega a ser total. El crecimiento retardado se mantiene, con manifiesta desigualdad entre los pollos afectados y los sanos; se observa un índice de

transformación del pienso peor que el de los lotes no parasitados y en las pollitas de renovación se retrasa la puesta. Todos estos factores tienen un impacto económico de gran importancia. (Simón Vicente, 1956; Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999)

Cuando los vermes alcanzan el estado adulto, la enteritis catarral persiste por el estímulo mecánico de los vermes sobre la pared intestinal. En esta fase, los parásitos se alimentan del contenido intestinal del hospedador, ya que se ha comprobado que la flora bacteriana del intestino de los vermes es similar a la presente en el de las aves (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999), pero a medida que pasa el tiempo y los vermes adultos permanecen en el intestino, la flora intestinal del parásito varía (Baron *et al.*, 1960). Se ha visto que la frecuencia de microorganismos y la cantidad de bacterias en el contenido intestinal de gallinas infectadas es menor que en las no infectadas, demostrando así propiedades antibacterianas en *A. galli* (Okulewicz y Zlotorzycza, 1985). De manera experimental, se ha comprobado que la disminución de la ganancia de peso de los pollos infectados está relacionada con el número de parásitos presentes, ajustándose los datos a una curva de regresión polinómica, según la cual, la pérdida de peso en las aves es de  $1,39 \pm 0,37$  gr por cada verme durante las tres semanas siguientes a la infección (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

En infecciones masivas, *A. galli* puede causar una obstrucción parcial o total del duodeno o del yeyuno, seguida por la muerte del animal (Ikeme, 1971b; Ramadan y Abou Znada, 1991). Cuando la muerte de las aves se produce en un espacio de tiempo breve, los cadáveres presentan un estado de carnes aparentemente normal, aunque puede observarse palidez de la piel, indicativo de anemia. En infecciones de larga duración, se aprecia la delgadez y falta de acúmulo de grasa del cadáver, las plumas perianales están manchadas de excremento diarreico y la piel está pálida. Pueden aparecer hemorragias en la mucosa del intestino delgado, con contenido también hemorrágico y en infecciones crónicas, los vermes se descubren fácilmente por su tamaño, en ocasiones formando ovillos. En algún caso puede haber parásitos libres en la cavidad abdominal.

El bazo y el hígado presentan un tamaño mayor del normal, es decir, hay espleno- y hepatomegalia. (Cordero del Campillo y Rojo Vázquez, 1999).

### **5.3 Resistencia y susceptibilidad del hospedador a la infección por *A. galli***

En líneas generales, la resistencia a las enfermedades es un fenómeno que se da en todas las especies animales debido al control genético del sistema inmunitario. Por otra parte, a medida que los hospedadores evolucionan, también lo hacen sus parásitos; de ahí que la domesticación de especies libres ocasiona una alteración de las relaciones parásito-hospedador, dando muchas veces como resultado la aparición de nuevas enfermedades. Como consecuencia de la domesticación, existe la posibilidad del aprovechamiento de la variación genética del hospedador, aumentando la frecuencia de los genes resistentes, dando lugar a una medida en el control de la enfermedad (Gray y Gill, 1993). Pero a pesar de esto, el conocimiento de la genética del hospedador (la gallina) con el que contamos actualmente es, desgraciadamente, muy pobre.

En las gallinas, es posible encontrar a menudo diferencias individuales en cuanto a la susceptibilidad a muchas enfermedades (Permin y Ranvig, 2001). Esto es lo que se denomina resistencia genética, la habilidad de ciertos individuos para responder mejor frente a la infección provocada por un patógeno. En nuestro caso, se han observado diferencias entre las razas frente a *A. galli*. Por ejemplo, se puede decir que hasta hace unos años, los avicultores elegían preferentemente ponedoras morenas para sus explotaciones, entre otras razones, por su mayor resistencia a contraer enfermedades y por su mayor tasa de supervivencia frente a las ponedoras blancas; hoy en día esta teoría no supone ninguna ventaja relativa, a causa de la aparición de nuevos problemas en las ponedoras semipesadas (Buxadé, 2000). Se puede decir, por lo tanto, que existe muy poca información disponible sobre la resistencia genética a helmintos gastrointestinales en aves de corral (Permin *et al.*, 2001).

Otros investigadores indicaron que las gallinas jóvenes, de hasta 3 meses, mostraban signos clínicos más acusados (Acker *et al.*, 1935; Kerr, 1955; Tongson y

McCraw, 1967), señalando un desarrollo de la resistencia a la infección, que aumenta con la edad de las gallinas, produciéndose, normalmente, una disminución en la carga parasitaria. (Acker *et al.*, 1935; Ackert y Edgar, 1938; Ackert *et al.*, 1939; Tugwell y Ackert, 1952; Kerr, 1955; Simón Vicente, 1956). Por otra parte, aves de 1 mes de vida son más aptas para desarrollar resistencia al parásito que otras más viejas o más jóvenes, demostrándose así que la edad de las gallinas tiene una influencia parcial en la resistencia al parásito (Idi *et al.*, 2004). Otros autores afirman que la diferencia en la resistencia a la infección parece estar causada por el estatus reproductivo y no por la diferencia de edad del hospedador, ya que el tiempo alrededor del comienzo de la puesta de huevos es crítico, y está asociado con una disminución de la resistencia al parásito (Gaully *et al.*, 2005). La cinética de la población de *A. galli* en gallinas de 25 días ha mostrado que además de la edad, el tamaño de la población de gusanos adultos en el intestino depende del tamaño de la dosis usada para infectar las aves. Cuanto más pequeña es la dosis infectante, mayor es la tasa de vermes que se desarrollan (Dhar y Raina, 1987). Estos resultados son parecidos a los observados por Sadun, (1949), Tongson y McGraw, (1967) e Ikeme, (1970), y están en consonancia con lo que ocurre con otros helmintos parásitos según Andersen *et al.* (1973), Dhar y Sharma, (1978) y Sharma y Dhar, (1979). Se ha observado, que también las hormonas sexuales femeninas pueden tener gran influencia en el desarrollo de las poblaciones de parásitos, ya que las cargas parasitarias son inferiores en las gallinas que en los gallos (Ackert y Dewhirst, 1950; Todd y Hollingsworth, 1951).

La duración de la fase histotrópica sí depende de la cantidad-dosis de gusanos y puede durar hasta 54 días después de una única infección (Ikeme, 1971b; Herd y McNaught, 1975). Es una parte normal del ciclo de vida del parásito y parece estar muy relacionada con el fenómeno de detención del desarrollo. Parece probable que la asociación entre grandes cantidades de vermes y la detención del crecimiento es reflejo simplemente de una gran estimulación antigénica y una reacción inmune debida a una exposición continuada a un gran número de vermes (Herd y McNaught, 1975). Durante

la fase histotrópica hay una pérdida de sangre, se reduce el azúcar en la sangre y los uréteres aparecen distendidos con uratos en su interior (Ackert, 1934). En gallinas más viejas, la fase histotrópica es considerablemente más larga que en animales más jóvenes. El desarrollo larvario del parásito hacia el estado adulto se detiene cuando existen grandes infecciones, no sólo debido al desarrollo de la resistencia, si no también a los mecanismos dependientes de la densidad (Tongson y McCraw 1967; Herd y McNaught, 1975). Sin embargo, estudios de Permin *et al.*, (2001), indican que la resistencia según la edad juega un papel menos importante en comparación con los denominados mecanismos de auto-cura.

#### **5.4 Interacción de *A. galli* con otros parásitos dentro de un mismo hospedador**

Además de ascaridiasis, las gallinas pueden sufrir otras parasitosis por protozoos, artrópodos y diversas especies de helmintos, así como infecciones bacterianas. Diferentes investigaciones muestran que el efecto de *A. galli* cuando va acompañado por otros patógenos es mucho más grave en comparación con las infecciones simples (Chadfield *et al.*, 2001; Dahl *et al.*, 2002). Por lo tanto, las infecciones por *A. galli* pueden traer otros problemas, especialmente cuando las condiciones higiénicas de las granjas son deficientes (Iepema *et al.*, 2009).

Estudios de Permin *et al.* (1998) y Poulsen *et al.* (2000), muestran la existencia de infecciones concomitantes producidas por *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium juxtannucleare* y el nematodo intestinal *A. galli*. Se consideran patógenos importantes de las gallinas domésticas, en las que producen anemia grave y causan altos índices de mortalidad (Soulsby, 1968; Springer, 1996). Por el contrario, y contradiciendo a la idea anterior, Juhl y Permin (2002) demostraron que una infección primaria en gallinas producida por *Plasmodium gallinaceum*, puede llevar a una reducción en el establecimiento de una infección por *A. galli*.

También se ha propuesto a *A. galli* como posible vector para la diseminación de la bacteria *Salmonella enterica* en aves de corral (Chadfield *et al.*, 2001; Eigaard *et al.*,



2006). Incluso gallinas con salida a parque tienen un alto riesgo de padecer brotes de cólera de aves de corral, producidos por la bacteria *Pasteurella multocida* (cocobacilo pleomórfico gramnegativo), cuando están infectadas con *A. galli* (Dahl *et al.*, 2002). El efecto de la coinfección con el ácaro rojo *Dermanyssus gallinae* y *A. galli* origina una disminución en la ganancia de peso, pero no se observan cambios significativos en sangre ni en el comportamiento de las aves (Kilpinen *et al.*, 2005).

### **6. Aspectos inmunitarios y de resistencia a la infección**

La dinámica de poblaciones de animales de granja está controlada por los humanos y a menudo afectan a gran cantidad de hospedadores, lo que hace que las cargas parasitarias sean mucho mayores de lo que serían estando estos en condiciones naturales. Como resultado, la inmunidad frente a la reinfección adquirida por los hospedadores es un determinante importante a la hora del estudio de la dinámica de población del parásito (Roberts, 1999), y se puede expresar también en una reducción en la fecundidad de los parásitos (Urquhart *et al.*, 1996).

Los primeros estudios demostraron que la inmunidad frente a *A. galli* estaba relacionada con la edad del hospedador, la raza, el sexo e indirectamente con el estado nutricional del hospedador (Ackert y Beach, 1933; Acker *et al.*, 1935; Ackert y Eisenbrandt, 1935; Kerr, 1955 y Lloyd, 1995). Por ejemplo, se ha visto que gallinas con una dieta basada en proteínas animales con poco o ningún contenido en proteínas vegetales, tienen menos carga parasitaria que las gallinas alimentadas básicamente con proteínas vegetales. El aumento de los niveles de lisina y de calcio hacen disminuir el número y el tamaño de los gusanos recuperados. Este mecanismo está relacionado, probablemente, con la cantidad de aminoácidos esenciales (Ackert y Beach, 1933; Ackert, 1947; Cuca *et al.*, 1968).

También es posible que en infecciones por *A. galli*, las diferencias en las cargas parasitarias sean debidas al desarrollo de inmunidad o a diferencias en la susceptibilidad a la infección debidas a la especie. Se ha observado que pavos infectados experimentalmente con *A. galli* presentan cargas parasitarias inferiores a gallinas infectadas en las mismas condiciones (Ackert y Eisenbrant, 1935; Kates y Colglazier, 1970).

En gallinas, se ha demostrado la existencia de tres clases de inmunoglobulinas (Ig) sintetizadas por las células B: IgG (también llamada IgY), IgA e IgM (Haak-Frendscho, 1994; Sharma, 1997; Carlander, 2002). Las cadenas pesadas de las Ig de las aves son más largas que las de los mamíferos porque tienen un dominio constante adicional, por lo que su peso molecular es mayor: alrededor de 190 kDa para las IgY, por 160 kDa de las IgG (Tizard, 1982; Warr, 1995). Debido a estas diferencias, se propuso la denominación de IgY para las inmunoglobulinas presentes en el suero de las aves, diferenciándolas entonces de las de los mamíferos (Warr, 1995; Camenish *et al.*, 1999). Como consecuencia de la distancia filogenética entre aves y mamíferos, los anticuerpos de las gallinas no tienen reacciones cruzadas con los anticuerpos de los mamíferos; además, producen anticuerpos muy específicos contra antígenos de mamíferos (Li *et al.*, 1998). Los anticuerpos IgY resultan adecuados para ensayos inmunológicos pues disminuyen los falsos positivos, al no interactuar con las IgG de mamíferos, con el factor reumatoide o con los receptores de fijación del complemento de los mamíferos (Montes *et al.*, 1994). La IgY es transportada desde el suero del ave a la yema del huevo, lo cual permite transferir los anticuerpos maternos a la descendencia y posibilita la adquisición de inmunidad pasiva en los polluelos. La concentración de IgY en el suero de la gallina es de aproximadamente 5-7 mg/ml (Carlander, 2002), en tanto la concentración de IgY en la yema del huevo es de 15 mg/ml, con variaciones entre 8 y 25 mg/ml (Rose *et al.*, 1974; Sunwoo *et al.*, 2002).

Por otra parte, en la mucosa se sintetizan de manera muy localizada, anticuerpos que son predominantemente del isotipo A (IgA). La función de la IgA es protectora, proporcionando una barrera inmunológica que desempeña una función importante en los líquidos corporales externos, tales como lágrimas, saliva y secreciones que bañan la mucosa entérica y respiratoria superior, produce una protección local de las superficies mucosas (Mazanec *et al.*, 1993).

Los organismos de los hospedadores inducen respuestas muy variables, incluido anticuerpos antígeno-específicos, proliferación de linfocitos y citoquinas (Malviya *et al.*, 1988; Degen *et al.*, 2005). La infección con *A. galli* inducen un aumento de los niveles de IL-4 e IL-13, pero no de IFN $\gamma$  en el intestino de gallinas al día 14<sup>o</sup> post-infección (Degen *et al.*, 2005), apoyando la hipótesis de que durante las infecciones por nematodos entéricos predomina una respuesta del tipo Th2 (Malviya *et al.*, 1988; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Wilson y Maizels, 2004; Gauly *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). La efectividad de la respuesta inmune del hospedador para controlar los parásitos entéricos es evidente por el hecho de que elimina la infección primaria y reduce los niveles de parasitación en individuos previamente expuestos o inmunizados (Malviya *et al.*, 1988; Gauly *et al.*, 2005). Hay estudios que sugieren la posibilidad de seleccionar razas de gallinas que tengan resistencia a la infección por *A. galli* (Gauly *et al.*, 2001; Permin y Ranvig, 2001), lo cual es muy importante a la hora de mantener las aves en sistemas ecológicos alternativos.

Un estudio en dos razas de gallinas, Lohmann Brown y Danish Landrace (local de Dinamarca), demostró que aves parasitadas con *A. galli* eran capaces de eliminar la infección primaria cuando eran retadas de nuevo. Se observó un descenso del número de huevos del parásito en heces, y en la expulsión de vermes adultos. Este fenómeno se denominó “auto-cura”, y no había sido descrito en relación con infecciones de *A. galli* en gallinas (Permin y Ranvig, 2001). Es un fenómeno muy conocido en ovejas parasitadas con *Haemonchus contortus*, que Soulsby y Steward (1960) describieron

como la reacción inmunológica del hospedador como consecuencia de la pérdida de carga parasitaria al tiempo que se re-infecta. Comparando la resistencia al parásito en estas mismas razas, los resultados clínicos y parasitológicos encontrados demostraron diferencias en la tasa de establecimiento del parásito entre las dos razas. Las diferencias observadas en la carga parasitaria y en la excreción de huevos del parásito en heces se atribuyó a una mejora genética de la raza Lohmann Brown. Los autores concluyeron que es posible la cría de gallinas resistentes frente a *A. galli* (Permin y Ranvig, 2001).

Comparando dos razas de gallinas, la blanca Lohmann LSL y la marrón Lohmann Brown, el porcentaje de muestras positivas en Lohmann LSL fue significativamente mayor que en Lohmann Brown, aunque no se encontraron daños clínicos en las aves parasitadas. Esto indica que el desarrollo de la inmunidad protectora en las gallinas puede explicar las diferencias entre las razas (Gauly *et al.*, 2002). Hay investigaciones que afirman la existencia de factores genéticos implicados en el establecimiento y la supervivencia del parásito en el intestino de las gallinas, aunque se insiste en la necesidad de estudios posteriores para descubrir los mecanismos genéticos que sustentan los mecanismos parasitológicos observados (Schou *et al.*, 2003a)

Estudios comparativos entre una raza criolla de Jordania y otra pura como la blanca Lohmann LSL, han dado como resultado unos valores medios de los parámetros de resistencia a la infección que son menores en las gallinas criollas: menor carga parasitaria, más lentitud en el establecimiento de la infección, menor número de huevos del parásito en heces y menor tasa de fecundidad. Estos datos sugieren que la variación de la base genética de las diferentes razas de gallinas está implicada en la resistencia a la infección por el parásito (Abdelqader *et al.*, 2007).

### 7. Diagnóstico

Las infecciones por *A. galli* son muy sencillas de diagnosticar: mediante la identificación de huevos del parásito en heces, usando el método de flotación o el método modificado de McMaster. (Soulsby, 1968). Además, se puede hacer un diagnóstico post-mortem, identificando los vermes directamente en el intestino (Soulsby, 1968).

### 8. Control

Las enfermedades producidas por helmintos son muy importantes en explotaciones aviares al aire libre. Sin embargo carecen de importancia en las explotaciones intensivas de gallinas ponedoras alojadas en baterías, dado que en este sistema, las aves no tienen acceso a sus heces y ello imposibilita que el ciclo del parásito se complete.

En 1999 la Unión Europea, bajo la Directiva 1999/74/CE, estableció las normas mínimas relativas a la protección de las gallinas ponedoras. A partir del año 2012, la normativa cambió obligando a realizar cambios en las instalaciones y los equipos utilizados en la producción de huevos, de manera que el espacio vital destinado a cada ave es significativamente mayor. La mayoría de los productores para reemplazar las jaulas convencionales han tenido que elegir principalmente, entre sistemas eficientes de jaulas acondicionadas de gran tamaño de grupo para optimizar la producción y el bienestar, los aviarios de múltiples niveles, bastante eficientes, y la cría de gallinas camperas, dirigida a un mercado más exclusivo (AECA-WPSA, 2012). En los “sistemas alternativos” también se tiende a aumentar la calidad de vida de las gallinas, mediante el establecimiento de disposiciones específicas para los sistemas de cría, que permitan a las gallinas ponedoras desplazarse libremente o acceder a espacios exteriores. Con estas medidas, la importancia de los parásitos de transmisión fecal/oral va en aumento (Buxadé, 2000).

Actualmente, no existen vacunas para tratar de controlar los parásitos intestinales de las gallinas, sólo acciones sanitarias a través de medidas higiénicas de carácter general y profilácticas mediante antihelmínticos (Ruff, 1999; Buxadé, 2000).

Estas acciones van dirigidas a evitar que el potencial hospedador entre en contacto con la fuente de infección, tal como se pretende en el caso de *A. galli*, mediante el uso de jaulas.

Las medidas sanitarias que se aconsejan frente al parásito son (Ruff, 1999; Buxadé, 2000):

- a. Medidas higiénicas de carácter general.
- b. Vacío sanitario correcto: la retirada regular de animales muertos y la restricción de movimientos del personal de trabajo, también ayuda a reducir las infecciones por *A. galli*.
- c. Mantenimiento correcto de la yacija o cama: La limpieza de las camas contaminadas seguido de una desinfección, es necesaria cuando el número de parásitos es muy alto.
- d. Exposición directa del equipo a los rayos solares cuando se desaloje la nave.
- e. Aporte de vitamina A
- f. Eliminación de factores predisponentes: Por ejemplo, las aves jóvenes no deberían de ser criadas muy próximas a las viejas, ya que estas pueden servir de reservorio. Evitar también el hacinamiento de las aves.

La quimioterapia, ya sea en forma de anti-coccidiales, antihelmínticos o insecticidas, ha sido el pilar principal para la prevención y el control de las parasitosis en aves de corral (Ruff, 1999). Cuando estos compuestos fueron introducidos su eficacia era elevada y de coste muy bajo, especialmente en relación con los espectaculares resultados que se obtuvieron. De todas maneras, el crecimiento y aumento del confinamiento de las aves en las granjas ha hecho que ya no sea posible su mantenimiento sin el uso de medicamentos, especialmente frente a coccidiosis (Ruff,

1999). Para el tratamiento de infecciones por helmintos, están disponibles un número reducido de medicamentos, porque el tamaño del mercado y la gravedad del problema no justifican el aumento del coste del desarrollo y la obtención de la licencia del nuevo medicamento. Por ejemplo, en Estados Unidos sólo se han aprobado antihelmínticos para los nematodos más importantes como: *Ascaridia spp.*, *Heterakis spp.*, *Capillaria spp.* y *Syngamus spp.* Incluso para estas especies faltan recursos para investigar nuevos compuestos. Sólo está aprobado el uso de Hygromicina B, piperazina y thiabendazol para las especies antes mencionadas, e incluso su uso está restringido de manera considerable. Ya se han documentado resistencias a estos medicamentos, especialmente a la piperazina (Ruff y Norton, 1997).

En el caso concreto del parásito *A. galli*, cabe destacar que el control de la infección por este verme mediante antihelmínticos en comida o en agua, ha reducido considerablemente las pérdidas de la industria de las aves de corral (Sharma *et al.*, 1990).

La piperazina es un antihelmíntico de elección por su gran eficacia y su baja toxicidad en el hospedador en comparación con otros medicamentos (Soulsby, 1968; Nilsson *et al.*, 1988). Frente a *A. galli* se utiliza la piperazina como adipato de piperacina y citrato de piperacina administrados en el agua de bebida. Ambas son efectivas con las formas adultas, pero no con las larvas ni con los huevos. Ello obliga a repetir el tratamiento a intervalos variables, para lograr eliminar totalmente los parásitos o incrementar las dosis. Además, en puesta causa estrés y origina disminución de la producción de huevos (Sharma *et al.*, 1987; Buxadé, 2000).

La aparición de la ivermectina atrajo considerablemente la atención por su modo de acción, por ser de amplio espectro a dosis bajas y porque se excreta a través del tracto digestivo. Ha sido probada en infecciones naturales y experimentales en animales domésticos (Todd *et al.*, 1985; Blair y Klei, 1986; Sharma y Bhat, 1990). En gallinas

infectadas de manera experimental con *A. galli* y posteriormente tratadas con ivermectina, los vermes maduros en el lumen del intestino tienen una mayor capacidad de crecimiento que en gallinas no tratadas. Además de esto, se vio que los gusanos maduros en el lumen del intestino del hospedador eran más sensibles al tratamiento que los estadios inmaduros del parásito en la fase tisular (Sharma *et al.*, 1990).

Los tratamientos antihelmínticos mejoran ciertas situaciones en las cuales las gallinas infectadas presentan cambios en el comportamiento, como falta de apetito y disminución de la actividad locomotora: después del tratamiento antihelmíntico con flubendazol, se apreció una mejoría tanto en la alimentación como en la locomoción de las aves (Gauly *et al.*, 2007). A pesar de que las relaciones entre las condiciones del hospedador y la carga parasitaria son complicadas y pueden potencialmente llegar a confundir el análisis de los datos (Medley, 2002). El mebendazol o el flubendazol se administran en el pienso y ambos tienen acción ovicida y vermicida (Buxadé, 2000).

Estudios con gallinas tratadas con betametasona e infectadas posteriormente con *A. galli*, han dado como resultado un mayor establecimiento de los vermes en el intestino, pero una menor ganancia de peso en comparación con las aves que no fueron tratadas (Dhar y Raina, 1987).

Infecciones asintomáticas por *A. galli* y tratamientos posteriores con antihelmínticos, tienen un impacto en patrones del comportamiento al detectarse altos niveles de testosterona. Los efectos están relacionados con la carga parasitaria, y esto es importante cuando las gallinas son llevadas a un ambiente de alto riesgo de infección. En ese caso, las gallinas tenderán a tener una elevada carga parasitaria y un alto número de huevos del parásito en heces, y como consecuencia de esto, una reducción del bienestar del animal que lleva asociado un impacto económico negativo. La situación mejora después de un tratamiento antihelmíntico efectivo (Gauly *et al.*, 2007).



Uno de los factores más importantes que afectan la respuesta de un animal a la vacuna o a la infección, es la compleja relación que existe entre el nivel nutricional, el sistema inmune y el organismo que causa la enfermedad (Cook, 1989; 1995). En un intento de desarrollar diferentes agentes inmunoprolácticos, se han hecho inmunizaciones de gallinas usando huevos de *A. galli* irradiados. En estos casos, se ha visto que la inmunidad mediada por células adquiere un papel en la protección frente a la infección por *A. galli* (Malviya *et al.*, 1988).

Para el estudio de los parásitos helmintos es necesaria su reproducción en el laboratorio, pero debido a la complejidad de los ciclos biológicos esto es, en la mayoría de los casos, muy complicado o imposible; necesitan, por ejemplo, desarrollarse en hospedadores muy específicos, lo cual es a menudo muy costoso, y una vez que se extraen necesitan condiciones adecuadas de mantenimiento. Por eso es importante encontrar un nematodo que pueda usarse como modelo (Holden-Dye y Walter, 2006). El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), al tener su genoma secuenciado, ofrece la posibilidad de ser un buen modelo (Bargmann, 1998). El uso de *C. elegans* como modelo para probar antihelmínticos no es nuevo, ya que está siendo usado desde hace más de 20 años (Simpkin y Coles, 1981). En muchos aspectos, es más sencillo trabajar con vermes considerados como “modelos”, pero ocurre muchas veces que se extrapolan los datos de nematodos de vida libre a especies de nematodos que son parásitos. Esto conduce a errores como los detectados en estudios realizados por Pemberton *et al.* (2001) y Holden-Dye y Walter, (2006) que examinaron la acción del glutamato y la ivermectina en la faringe de *A. galli* y los resultados fueron comparados con aquellos realizados en la faringe de *C. elegans*, utilizado como modelo para su estudio. En ambas preparaciones el glutamato provoca una despolarización e inhibición de la acción de los músculos de la faringe mucho menor en *A. galli* que en la de *C. elegans*. La acción de la ivermectina difiere sustancialmente en las dos especies, siendo, aproximadamente tres órdenes de magnitud por debajo el efecto en la faringe de *A. galli* comparada con la de *C. elegans*. Como posible estrategia de control biológico, se ha

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

llegado a explorar la posibilidad de usar el potencial de un hongo (*Nematophagus fungi*) a la hora de prevenir nematodosis causadas por parásitos con estadios larvarios de vida libre. En pruebas de campo, esta reducción ha dado paso, consecuentemente, a disminuir la infectividad en los pastos y también a una reducción de la carga parasitaria en los animales. No se debe descartar, por tanto, el uso de otros organismos, incluidos los hongos, que son capaces de atacar y matar la fase de huevo de parásitos como *Ascaridia spp*, *Ascaris spp* y *Trichuris spp*, dado que esta fase se mantiene más tiempo en el medio ambiente (Larsen *et al.*, 1997).





## Epidemiología de *A. galli* en explotaciones avícolas de Castilla y León

El objetivo de este estudio es aportar información sobre la situación epidemiológica de la ascaridiasis en gallinas ponedoras de granjas comerciales en el centro de España y explorar la posibilidad de una detección temprana de *A. galli* mediante test serológicos, como un primer paso en la implementación de las medidas de control

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.1 Obtención de las muestras de heces y sangre

El estudio se llevo a cabo en siete granjas comerciales de gallinas ponedoras del centro de España. En todas ellas las aves se mantenían en sistemas de producción en los cuales tenían contacto con el suelo. En la granja nº 1, las aves vivían en corrales abiertos con acceso al interior. En las seis restantes, las aves se mantenían en naves con salida al exterior. La edad de las gallinas de cada granja se muestra en la Tabla 1.1.

Granja	Edad de las aves (semanas)	Tipo de muestra de heces	Nº de muestras de heces individuales	Nº de muestras de sangre
1	8	Mezcla	— <sup>a</sup>	18
2	28	Individual	20	15
3	29	Individual	8	15
4	34	Mezcla	— <sup>a</sup>	18
5	42	Mezcla	— <sup>a</sup>	33
6	55	Individual	20	21
7	64	Mezcla	— <sup>a</sup>	20

**Tabla 1.1.** Características de las gallinas estudiadas y del tipo de muestras obtenidas.

<sup>a</sup> Mezcla de muestra de heces de diversas gallinas.

En tres de las siete granjas (2,3 y 6) se tomaron muestras individuales, mientras que en las cuatro restantes (1, 4, 5 y 7) se tomaron muestras mezcladas de heces por la imposibilidad de diferenciarlas individualmente (datos recogidos en la Tabla 1-1). En este caso, se hicieron 10 análisis diferentes tomando al azar 1 gr de heces de cada mezcla. Tanto las muestras individuales como las mezclas de heces fueron recogidas del suelo de manera aleatoria. Además, se tomaron 140 muestras de sangre de todas las granjas. El número de muestras analizadas en cada granja se muestra en la Tabla 1-1. Las aves se sangraron de la vena cubital. Para la obtención del suero, la sangre se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante una hora, tras lo cual se pasó a 4° C durante toda la noche para permitir la formación del coágulo. Al día siguiente, la sangre se centrifugó a 800 x g durante 10 minutos, a 4° C en centrífuga refrigerada. El suero se almacenó en eppendorffs de 1,5 ml a -80° C hasta su uso.

### 1.2 Análisis coprológico

Las muestras de heces se analizaron mediante la técnica de flotación, adaptando la metodología descrita por Soulsby (1968). Se elaboró una emulsión de 1gr de heces en agua de grifo, en botes con cierre hermético que contenían bolitas de vidrio. Se filtró la emulsión a través de un tamiz de 0,300 mm de tamaño de poro. Se recogió el filtrado en tubos de ensayo y se procedió a hacer una primera centrifugación de 3 minutos a 1000 x g, desechando el sobrenadante. Se añadió ZnSO<sub>4</sub> al sedimento hasta aproximadamente la mitad del tubo de ensayo, que se agitó mediante balanceo, evitando la formación de espuma. A continuación, se añadió más ZnSO<sub>4</sub> hasta formar un menisco y por último, se colocó un cubre objetos sobre cada tubo y se procedió a una segunda centrifugación. Al finalizar, cada cubreobjetos se colocó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio para determinar la presencia o ausencia de huevos del parásito. Estos fueron identificados con ayuda de las descripciones e imágenes contenidas en Thienpont *et al.* (1979) y Euzeby (1981).

### 1.3 Obtención de parásitos

Las gallinas parasitadas (aquellas que resultaron positivas en coprología y/o serología) fueron sacrificadas y extraído su intestino. Este se abrió con una incisión en toda su longitud y se lavó con agua destilada. El contenido se pasó a un tamiz de 100 µm de poro y a continuación se lavó de nuevo. El contenido retenido se examinó para determinar la presencia de vermes de *A. galli*. Con la ayuda de una lupa, estos se identificaron por sus características morfológicas, según la descripción de Euzéby (1981).

### 1.4 Preparación del extracto antigénico de *A. galli* (AgSA)

El extracto antigénico de *A. galli* fue obtenido siguiendo la metodología descrita por Marcos-Atxutegi *et al.* (2003). Los vermes fueron lavados en solución salina estéril. A continuación se maceraron en PBS estéril (proporción 3:1 V/P). El macerado se sonicó en hielo mediante 3 ciclos de 70 Khz durante 30 segundos a intervalos de 1 minuto. Después se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas siguiendo la metodología de Maizels *et al.* (1991) (Tabla 1.2). La suspensión resultante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora a 4° C. El sobrenadante se dializó toda la noche a 4° C frente a agua ultrapura en una tripa de diálisis, de manera que se eliminan los contaminantes iónicos que pudieran interferir con las técnicas posteriores. Después de medir la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), se alicuotó en eppendorfs y se almacenó a -80° C. Este antígeno se denominó AgSA.

Substancia	Peso molecular (KDa)	Concentración de trabajo	Enzimas inhibidas
EDTA	292,2	1 mM	Metaloproteasas
NEM	125,1	1 mM	Thiol proteasas
Pepstatin A	685,9	1 $\mu$ M	Aspartil proteasas
PMSF	174,2	1 mM	Serin proteasas
TPCK	351,9	0,1 mM	Quimiotripsina, Tiolproteasa

**Tabla 1.2.** Inhibidores de proteasas empleados en la preparación del extracto antigénico.

### 1.5 Enzimoimmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA indirecto está basada en la capacidad de detección de anticuerpos que son capaces de formar complejos con antígenos ligados a un soporte sólido. Estos complejos son marcados con un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa, produciendo una reacción enzimática con un sustrato adecuado, cuantificable por espectrofotometría (Engvall *et al.*, 1971; Voller *et al.*, 1978).

La metodología empleada fue la descrita por Marcos-Atxutegi *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Se tapizaron placas de Poliestireno de 96 pocillos con 0,8  $\mu$ g de extracto antigénico AgSA por pocillo, en 200  $\mu$ l/pocillo de tampón carbonato y se incubaron durante 16 horas a 4° C. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l/pocillo de una solución NaCl-Tween 20 0,05 %, siendo el primer lavado de 3 minutos y los otros dos de un minuto cada uno. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l/pocillo de tampón postapizante que contiene BSA al 5 %, para evitar reacciones inespecíficas, incubándose 1 hora a 37° C. Se repitió el lavado. Se incubó el anticuerpo primario en tampón diluyente y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo, durante 1 hora y a 37° C. Las placas se lavaron nuevamente. Posteriormente, en cada pocillo se incubaron 100  $\mu$ l/pocillo del anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en tampón diluyente durante 2 horas a 37° C. Se repitieron los lavados. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló empleando 100  $\mu$ l/



pocillo de tampón sustrato incubando la reacción a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de ácido sulfúrico 3 N. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 492 nm. Las muestras se analizaron siempre por duplicado.

La dilución empleada para el anticuerpo primario fue de 1:4000, y para el anticuerpo secundario: IgG-HRP 1:8000. El punto de corte se obtuvo sumando la media aritmética de las densidades ópticas y la desviación estándar de sueros de gallinas sanas y coprologicamente negativas multiplicada por 3 (18 muestras de la granja 1 y 15 muestras de la granja 2).

### **1.6 Western Blot**

Todas las muestras de suero que resultaron positivas en ELISA se analizaron mediante la técnica del Western Blot, Esta técnica se basa en la detección de proteínas utilizando anticuerpos específicos, después de separarlas en base a su peso molecular mediante electroforesis monodimensional (Winston *et al.*, 1987). La metodología empleada fue la descrita por Prieto *et al.* (2001), con algunas modificaciones.

#### **1.6.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La separación de proteínas según su peso molecular se realizó en un gel de poliacrilamida al 12 % de 1 mm de grosor, siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Para evitar el contacto de los geles con el aire, éstos se cubrieron con aproximadamente 2 ml de isobutanol. Tras la correcta polimerización de los geles, su frente se lavó abundantemente con agua ultrapura para eliminar totalmente el alcohol empleado. A continuación se colocó un peine de 10 pocillos o de un pocillo corrido, dependiendo de la finalidad del experimento. Para los pocillos simples, la cantidad de antígeno fue de 10  $\mu$ g/pocillo, con tampón de carga en proporción 1:3; en el caso del pocillo corrido fueron 200  $\mu$ g. Las muestras se

desnaturalizaron previamente, hirviéndolas en tampón de carga durante 3 minutos a 100° C para reducir los puentes disulfuro de las proteínas.

Para la realización de la electroforesis se empleó el equipo para *Western Blot Miniprotean*® (Bio-Rad). En una cubeta vertical se colocaron los geles ya preparados y se cargaron las muestras con un marcador de peso molecular. La cubeta se llenó con tampón de electroforesis y se conectó a una fuente de alimentación a 90 V, hasta que se formó el frente y a continuación a 150-200 V hasta que el frente llegó al final del gel. El tiempo que tarda en desarrollarse la electroforesis depende del peso molecular de las proteínas y del porcentaje del gel. Todo el proceso se realizó a 4° C. A continuación los geles se teñían o se realizaba la electrotransferencia y bloqueo, dependiendo de la finalidad del experimento.

#### a. Tinción del gel de poliacrilamida

Los geles resultantes de las electroforesis monodimensionales fueron teñidos con una tinción de plata, empleando el kit comercial *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante basadas en la metodología descrita por Heukeshoven y Dernick (1985).

Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y en agitación suave, utilizando siempre volúmenes finales de 50 ml de solución por gel, los cuales fueron preparados inmediatamente antes de usar (Tabla 1.3). Los geles teñidos se almacenaron a 4° C en agua ultrapura hasta su posterior digitalización.

	SOLUCIÓN	PRODUCTOS	TIEMPO
1	Fijación	Etanol 40 % Ácido acético 10 %	30 minutos
2	Sensibilización	Etanol 30 % Glutaraldehido 0,125 % Tiosulfato sódico 0,2 % Acetato sódico 6,8 %	30 minutos

	SOLUCIÓN	PRODUCTOS	TIEMPO
3	Lavados	Agua ultrapura	3 x 5 minutos
4	Plata	Nitrato de Plata 0,25 % Formaldehído 0,0148 %	20 minutos
5	Lavados	Agua ultrapura	2 x 1 minutos
6	Revelado	Carbonato sódico 2,5 % Formaldehído 0,0074 %	Variable
7	Stop	EDTA 1,46 %	10 minutos

**Tabla 1.3.** Protocolo de tinción de Plata para los geles.

#### **b. Electrotransferencia y bloqueo**

La metodología empleada está basada en la descrita por Towbin *et al.* (1979). Las proteínas separadas previamente en el gel de electroforesis, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. Para ello se utilizó la técnica de electrotransferencia semi-seca en el equipo *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Se realizó un sándwich con el gel y la nitrocelulosa entre papeles de filtro gruesos, todo empapado de tampón de transferencia y se colocó en el aparato. La transferencia se realiza a 24 V durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó la membrana con 10 ml de tampón de lavado en una cubeta, bloqueando con una solución que contiene BSA al 5 %, durante 30 minutos, para evitar posibles reacciones inespecíficas. Finalizado el bloqueo, se cortó la membrana en tiras o no, dependiendo de las muestras que se fueran a analizar.

Para la inmunodetección antigénica, las membranas se cortaron en tiras de aproximadamente 0,5 cm de ancho o se mantuvieron enteras, dependiendo de la finalidad del experimento. Inicialmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en tampón diluyente conteniendo 20 ml de BSA al 3-4 % durante 1

hora y media a 37° C o toda la noche a 4° C. Se procedió a un segundo lavado de igual manera y se incubó con el anticuerpo secundario, que es una anti IgG de gallina marcada con enzima peroxidasa de rábano (HRP), en tampón diluyente durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo durante 5 minutos con PBS pH 7,2. Las soluciones empleadas en este apartado se ajustaron a un volumen final de 16 ml en el caso de las membranas y de 1 ml en el caso de las tiras. Además, las incubaciones se llevaron a cabo siempre en agitación suave.

La dilución empleada para el anticuerpo primario fue de 1:200, y para el anticuerpo secundario: IgG-HRP 1:4000.

La reacción que se produce en la membrana se reveló con una solución que contiene 4-Cl-naftol más metanol a la que se ha añadido peroxidasa como sustrato. La reacción se para en 5-10 minutos con agua ultrapura. Posteriormente, se deja secar la membrana entre papeles de filtro para su posterior digitalización.

### **1.7 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo para evaluar si existían diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos IgG medida en ELISAs sobre las gallinas de las diferentes granjas. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Dunn de comparación múltiple se utilizaron para identificar diferencias en los niveles de anticuerpos entre las granjas. Las diferencias significativas fueron definidas como P valor de  $< 0.001$  para el test no paramétrico y de  $< 0.05$  para el test de Dunn.

## RESULTADOS

### 1.8 Prevalencia de *A. galli* en las explotaciones estudiadas

Los huevos de *A. galli* se detectaron en 5 de las 7 granjas estudiadas. El mayor recuento de huevos (> 100 huevos/gramo de heces frescas) se efectuó en gallinas de las granjas 4 y 7, seguido de la granja 5 (50-100 huevos/gr). En las granjas 3 y 6, el recuento fue bajo (< 50 huevos /gr). En las heces de las granjas 1 y 2 no se observaron huevos del parásito. En las granjas en las que se tomaron muestras individuales de heces (granjas 2, 3 y 6), se observó un aumento progresivo de la prevalencia a medida que aumentaba la edad de las aves (Tabla 1.4).

Granja	Tipo de muestra de heces	Recuento de huevos en heces	Prevalencia* (%)
1	Mezcla	0	-
2	Individual	0	0
3	Individual	Bajo	12
4	Mezcla	Alto	-
5	Mezcla	Medio	-
6	Individual	Bajo	25
7	Mezcla	Alto	-

**Tabla 1.4.** Abundancia: huevos del parásito por gramo de heces frescas y prevalencia de *A. galli* en las granjas estudiadas.

\* Porcentaje de muestras de heces que contienen al menos 1 huevo de *A. galli*.

### 1.9 Seroprevalencia

En conjunto, se detectó una seroprevalencia del 21,8 %, aunque se observaron considerables diferencias entre las granjas (Tabla 1.5). No se obtuvieron resultados

## ESTUDIO 1

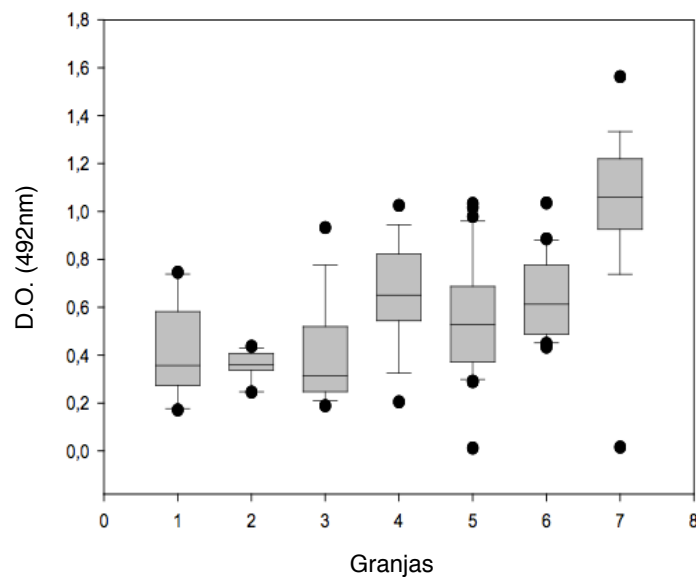
---

positivos en las granjas 1 y 2 (en las cuales tampoco se encontraron huevos en heces). En las granjas 3,4,5 y 6 se detectaron unas seroprevalencias del 7,6 %, 11,1 %, 12,1 % y 14,28 % respectivamente. La seroprevalencia más alta se alcanzó en la granja 7 con 95 %.

Granja	Muestras de sueros	Muestras positivas	Seroprevalencia (%)
1	18	0	0
2	15	0	0
3	15	1	7,6
4	18	2	11,1
5	33	4	12,1
6	21	3	14,28
7	20	19	95

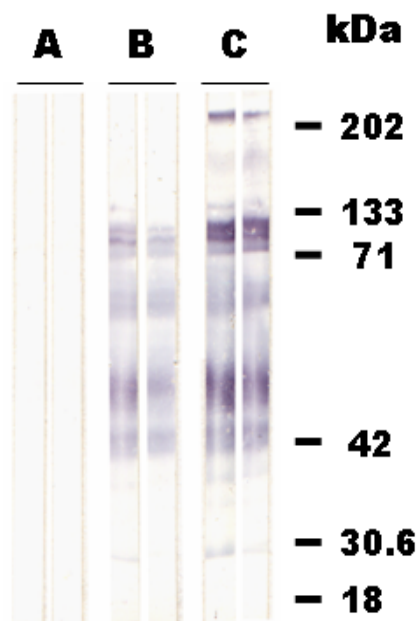
**Tabla 1.5.** Seroprevalencias observadas en cada granja incluida en el estudio.

Los niveles de reactividad de las muestras de suero de cada granja se muestran en la Figura 1.1. El test de Kruskal-Wallis muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) en la respuesta de anticuerpos, y el test de Dunn indica diferencias estadísticamente significativas entre las granjas. Hay que destacar que la granja 7 muestra valores significativamente más altos en comparación a las otras seis.



**Figura 1.1.** Respuesta de anticuerpos IgG frente a antígeno completo de *A. galli* en las gallinas de las 7 granjas. Las líneas horizontales dentro de las cajas representan las medias de las densidades ópticas. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar, y los puntos representan los valores extremos.

Los análisis mediante Western Blot se correlacionan con los datos obtenidos mediante la técnica de ELISA (Figura 1.2). Las muestras de suero que fueron positivas en ELISA (D.O. 1,00-1,30 nm) reconocen polipéptidos en todo el intervalo molecular, con mayor intensidad en aquellas de aproximadamente 210, 100-120 y 42-55 kDa. Por otra parte, muestras de suero con valores de D.O. cercanas al punto de corte, consideradas en ELISA como no positivas (D.O. 0,7-0,85 nm), reconocieron bandas entre 38 y 133 kDa, pero con menos intensidad que los sueros positivos. Las muestras de sueros de gallinas claramente negativas en ELISA (D.O. < 0,3 nm) fueron negativas en Western Blot.



**Figura 1.2.** Análisis mediante Western Blot de la respuesta de anticuerpos de 6 muestras de suero representativas frente a extracto antigénico completo de adulto de *A. galli*. (A) Controles negativos (D.O. < 0,3 nm). (B) Muestras de suero con una reactividad en ELISA cercana al punto de corte (D.O. 0,7-0,85 nm). (C) Muestra de suero positiva a análisis por ELISA (D.O. 1-1,3 nm).

## DISCUSIÓN

*Ascaridia galli* está considerado en la actualidad como un problema económico y de salud en sistemas de producción de gallinas camperas. Nosotros demostramos que las infecciones causadas por este parásito son frecuentes en granjas del centro de España, en las cuales las aves son mantenidas en el suelo, en donde también se encuentran los huevos del parásito; esto se ha demostrado en 5 de las 7 granjas estudiadas. Las diferencias en los recuentos de los huevos del parásito en heces (EPG), no pueden ser debidas al manejo de las aves, ya que los valores fueron similares en todas las granjas estudiadas, ni debidas a la edad de las aves, porque encontramos EPG similares en aves de diferentes edades (granjas 4 y 7). Las diferencias en los EPG



pueden relacionarse con otros factores, como el tiempo que ha sido mantenida el ave en el suelo, y la frecuencia con que se ha limpiado el lecho. Los datos obtenidos en la tercera granja, en la que se analizaron muestras individuales de heces, muestra un claro aumento en la prevalencia con la edad de las aves. No obstante, los resultados obtenidos mostraron bajos niveles de infección que otras observadas en estudios similares llevados a cabo en otros países europeos (Permin *et al.*, 1999; Hohenberger, 2000). Esto puede ser debido a que en las granjas estudiadas se ha recuperado la práctica de la alimentación de las aves en el suelo.

Que nosotros sepamos, hasta hoy no se habían aplicado herramientas serológicas para el diagnóstico de la ascariasis aviar. Los análisis mediante la técnica de ELISA, han sido desarrollados con un extracto antigénico de adulto de *A. galli*. Los resultados confirman los datos obtenidos por coprología. En las 2 granjas en las que no se vieron huevos de *A. galli*, tampoco se detectaron seropositivos en ELISA. Los resultados positivos se encontraron en cada una de las 5 granjas restantes. En este caso, no se observó relación entre la edad de las gallinas y su nivel de reactividad, pero sí una clara correlación entre la seroprevalencia y la edad de las aves. Esto puede ser debido a que la probabilidad de contacto con los huevos del parásito aumenta con el tiempo, como se demuestra claramente en el hecho en el que las gallinas de la granja 7 (aves de 64 semanas de vida) tienen una seroprevalencia y una respuesta de anticuerpos relativamente alta en comparación con las gallinas jóvenes de las otras granjas.

Los análisis por Western Blot confirman los datos obtenidos por ELISA. Las muestras de suero con D.O. elevadas (por encima del punto de corte) reconocen bandas en todo el intervalo molecular del antígeno empleado, mientras que los sueros negativos con niveles de D.O. cercanos al punto de corte, reconocen, con menor intensidad, un número limitado de bandas. Finalmente, aquellos con valores menores de D.O. no reconocen ninguna banda. Estos datos podrán permitir, en el futuro, el aislamiento de marcadores moleculares de la infección.

## ESTUDIO 1

---

No obstante, los datos serológicos deben de ser evaluados con precaución. En los análisis de las aves durante nuestro estudio, no detectamos infecciones por otros parásitos, pero consideramos muy necesario refinar la técnica para aquellas situaciones en las cuales *Ascaridia* coexista con otras especies de helmintos. Los valores de D.O. cercanos al punto de corte podrían indicar una infección reciente que todavía no se ha establecido, o por otra parte, sugerir una infección ya pasada. Estos factores se tienen que considerar en estudios futuros focalizados en el aislamiento de moléculas del extracto antigénico empleado.





## **Respuesta de anticuerpos contra *A. galli* en la 1ª generación de gallinas infectadas experimentalmente**

El objetivo de este estudio es determinar la dinámica de la respuesta anticuerpos IgG e IgA frente a antígenos de huevos embrionados y de adulto de *A. galli* en infecciones primarias de gallinas ponedoras Lohmann Brown.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Aves utilizadas para el estudio**

Para este estudio se utilizaron 18 gallinas Lohmann Brown de 18 semanas de vida, que fueron suministradas por Ibérica de Tecnología Avícola (Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid). Los animales nacieron y fueron criados en condiciones libres de parásitos intestinales. La ausencia de estos se confirmó mediante análisis coprológico (metodología descrita en el apartado 1.3).

#### **2.2 Localización y obtención de parásitos**

Hembras de *A. galli* obtenidas de gallinas infectadas naturalmente según la metodología del apartado 1.1 se sometieron a histerectomía para obtener huevos del parásito, los cuales se embrionaron para obtener así huevos de *A. galli* con las L2 infectantes. Parte de estos huevos fueron usados para la infección de gallinas y otra parte para la preparación del extracto antigénico de huevo embrionado con larva 2 infectante (AgHL2).

#### **2.3 Preparación de extracto antigénico de huevos embrionados (AgHL2)**

Los huevos se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos en una solución de dicromato potásico al 4 %, a 20° C y con luz natural indirecta. El proceso de embrionamiento duró aproximadamente 14 días, después de los cuales, aparece la L2

infectante. Se examinó la viabilidad de las larvas observando su movimiento en la lupa. Antes de usarlos, procedemos a su limpieza. Para ello los huevos embrionados se separaron con una pipeta Pasteur de cristal y se colocaron en tubos Coorning. Se añadió PBS estéril a pH 7,2 y se centrifugó a 800 x g durante 2 minutos a 4° C. Se realizaron varios lavados con PBS hasta que desapareció la coloración amarilla del dicromato potásico.

El extracto antigénico se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Marcos-Atxutegi *et al.* (2003) con algunas modificaciones. La suspensión con huevos embrionados de *A. galli* en PBS a pH 7,2 en un volumen final de 3 ml se sonicó manteniendo los tubos en hielo, en series de cuatro ciclos de 30 s a 70 Hz con intervalos de un minuto entre ciclo y ciclo. La suspensión resultante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se dializó frente a agua Milli-Q durante toda la noche y a 4° C. Se concentró una sola vez en centricones durante 120 minutos a 800 x g a 4° C en centrífuga refrigerada.

A continuación se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) mediante el Kit *DC protein Assay* (Bio-Rad). La absorbancia se leyó a 720 nm en un espectofotómetro *Microplate Reader-Benchmark* (Bio-Rad). La solución resultante se etiquetó y alicuotó en eppendorfs de 1,5 ml a -80° C hasta su uso. Este antígeno se denominó AgHL2.

#### **2.4 Preparación del extracto antigénico de adultos *A. galli* (AgSA)**

La preparación se realizó según la metodología descrita en el apartado 1.6.

#### **2.5 Infección experimental de gallinas y recogida de muestras**

La infección se realizó según se describe en Permin *et al.* (1997) con algunas modificaciones. En un eppendorf que contiene 1 ml de PBS pH 7,2, añadimos una solución conteniendo 250 huevos embrionados. Se agitó y se administró con una pipeta

## ESTUDIO 2

---

Pasteur de plástico por vía oral a la gallina, teniendo cuidado con no dañar la laringe (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Fotografía que muestra la infección de las gallinas vía oral.

Se infectaron 12 gallinas de raza Lohmann Brown de 18 semanas, 6 gallinas se mantuvieron sin infectar como controles negativos. Los animales fueron suministrados por Ibérica de Tecnología Avícola (Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid). Durante todo el experimento (15 semanas), las gallinas fueron mantenidas en jaulas sin salida al exterior. Les fue suministrada agua y comida *ad libitum* y eran examinadas a diario por si aparecía algún signo sugerente de enfermedad. Se puso especial cuidado en que las gallinas no pudieran entrar en contacto con las heces.

El día de la infección se consideró el día 0 del experimento, que duró 105 días, momento en el que se sacrificaron todas las aves.

### 2.6 Muestras obtenidas

- a. De cada gallina se realizó una toma semanal de peso.
- b. Para la obtención del suero, los animales se sangraron de la vena cubital (Figura 2.2). Se dejó la sangre a temperatura ambiente durante una hora, tras lo cual se mantuvo a 4° C durante toda la noche para permitir la formación del coágulo. Al día siguiente, la sangre se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos, a 4° C. El suero se almacenó en eppendorffs de 1,5 ml a -80° C hasta su uso. La obtención de las muestras de sangre se realizó semanalmente a lo largo de todo el experimento.
- c. Se procedió a la dilución de las muestras de heces recogidas de manera individual. Las heces se procesaron previamente de la siguiente manera: 2 gr de heces frescas de gallina más 10 ml de PBS a pH 7,2. La disolución se centrifugó a 2000 x g durante 2 minutos; se recogió el sobrenadante al cual se le añadieron inhibidores de proteasas (5 µl/ml). Se etiquetó y se almacenó a -20° C. Los inhibidores de proteasas se prepararon siguiendo la metodología descrita por Maizels *et al.* (1991) (Tabla 2.1). Se tomaron y se almacenaron muestras de heces de todas las gallinas desde el día 0 hasta el final del experimento (día 105 p.i.).
- d. Se recogieron dos huevos puestos diariamente por cada gallina a lo largo de todo el experimento. Se realizó un pesado individual de cada huevo y se almacenó cada yema de manera individual en una dilución 1:2 en PBS a pH 7,2 a -80° C.
- e. Al final del experimento se sacrificaron todas las aves. De los intestinos se extrajeron los vermes, siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.3. Los vermes se observaron bajo la lupa procediendo a su identificación, recuento, pesado y separación por sexos según las claves de Euzeby (1981).





**Figura 2.2.** Imagen que muestra el sangrado de la vena cubital del ala de la gallina.

Substancia	Peso molecular (KDa)	Concentración de trabajo	Enzimas inhibidas
EDTA	292,2	1mM	Metaloproteasas
NEM	125,1	1mM	Thiol proteasas
Pepstatin A	685,9	1 $\mu$ M	Aspartil proteasas
PMSF	174,2	1mM	Serina proteasas
TPCK	351,9	0,1mM	Quimiotripsina, Tiolproteasa

**Tabla 2.1.** Inhibidores de proteasas añadidas a la disolución de heces de gallinas.

## 2.7 Enzimoimmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA se realizó según la metodología descrita en el apartado 1.7. En la Tabla 2.2 se especifican las diluciones de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios, usados en los experimentos:

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Huevo embrionado	Sueros gallinas 1:200	IgG-HRP 1:10000
Somático de adulto	Sueros gallinas 1:400	IgG-HRP 1:8000
Somático de adulto	Sueros gallinas 1:15	IgA-HRP 1:10000
Somático de adulto	Heces diluidas de gallina 1:1	IgA-HRP 1:4000
Somático de adulto	Yemas de huevos 1:40	IgG-HRP 1:4000

**Tabla 2.2.** Diluciones empleadas en la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*A. galli*.

## 2.8 Western Blot

La técnica del Western Blot se realizó según la metodología descrita en el apartado 1.8. En la Tabla 2.3 se recogen las diferentes diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios empleados.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Días analizados
Huevo embrionado	Sueros gallinas 1:25	IgG-HRP 1:2500	0,14,21,42
Somático de adulto	Sueros gallinas 1:200	IgG-HRP 1:4000	0,14,21
Somático de adulto	Yemas de huevos 1:40	IgG-HRP 1:4000	0,30,60,90

**Tabla 2.3.** Diluciones empleadas en el Western Blot.

### 2.9 Análisis estadísticos

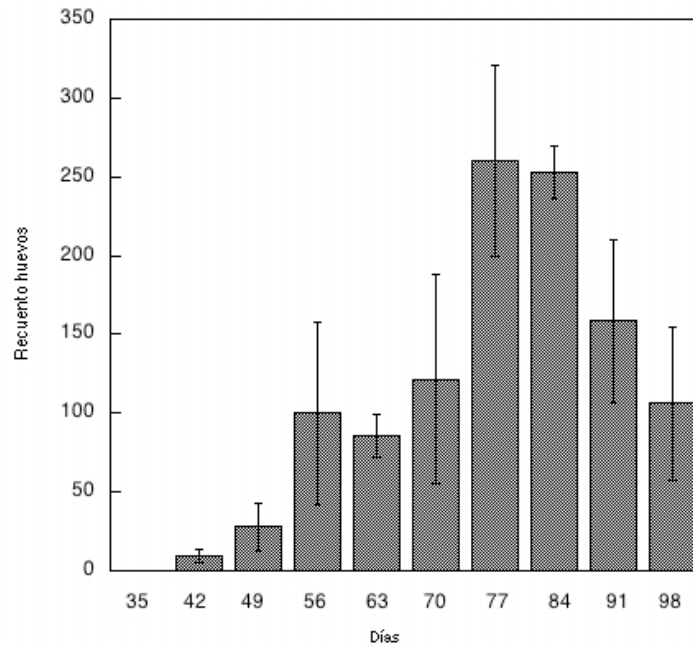
Los análisis estadísticos se llevaron a cabo para determinar si existían diferencias significativas entre las respuestas de anticuerpos IgG de las gallinas de las diferentes granjas. El test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Dunn de comparación múltiple se utilizaron para identificar diferencias en los niveles de anticuerpos entre los sueros de las gallinas infectadas y no infectadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando P presentó un valor  $< 0.001$  para el test de Kruskal-Wallis y  $< 0.05$ , para el test de Dunn.

## RESULTADOS

### 2.10 Análisis parasitológicos

Se estudiaron dos parámetros para confirmar la infección: la excreción de huevos del parásito en heces (Figura 2.3) y el número de vermes adultos encontrados en el tracto intestinal, recogidos al final del experimento (Tabla 2.4). Los huevos aparecieron por primera vez en las heces el día 42 p.i.. Entre este día y el día 84 p.i., su número se incrementó y posteriormente fue disminuyendo hasta el final del experimento. El número de huevos del parásito fue significativamente más alto los días 77 y 84 p.i. que los días 49 p.i. ( $p < 0,01$ ) y 98 ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los días 77 p.i. y 84 p.i. o entre los días 56 p.i. y 98 p.i..

## ESTUDIO 2



**Figura 2.3.** Medias de los recuentos de los huevos del parásito en heces de las gallinas infectadas experimentalmente. Las barras indican las desviaciones estándar.

Una vez sacrificadas las aves al final del experimento (día 105 p.i.) se recogieron los vermes presentes en el intestino. En la Tabla 2.4 se presentan las magnitudes relacionadas con la infección por los vermes adultos. La carga parasitaria media fue de  $5 \pm 3,36$ , siendo similar el número de machos y hembras. En dos de las gallinas no se recogió ningún parásito.

Parámetros parasitológicos	Media $\pm$ desviación estándar
Carga parasitaria	$5 \pm 3,36$
Carga parasitaria de hembras	$2,4 \pm 1,76$
Carga parasitaria de machos	$2 \pm 1,92$
Tamaño de las hembras (cm)	$6,9 \pm 1,71$

Parámetros parasitológicos	Media $\pm$ desviación estándar
Tamaño de los machos (cm)	5,3 $\pm$ 1,00
Peso de las hembras (mg)	0,124 $\pm$ 0,059
Peso de los machos (mg)	0,058 $\pm$ 0,029

**Tabla 2.4.** Parámetros parasitológicos (media $\pm$ desviación estándar) de las aves infectadas, sacrificadas el día 105 p.i.

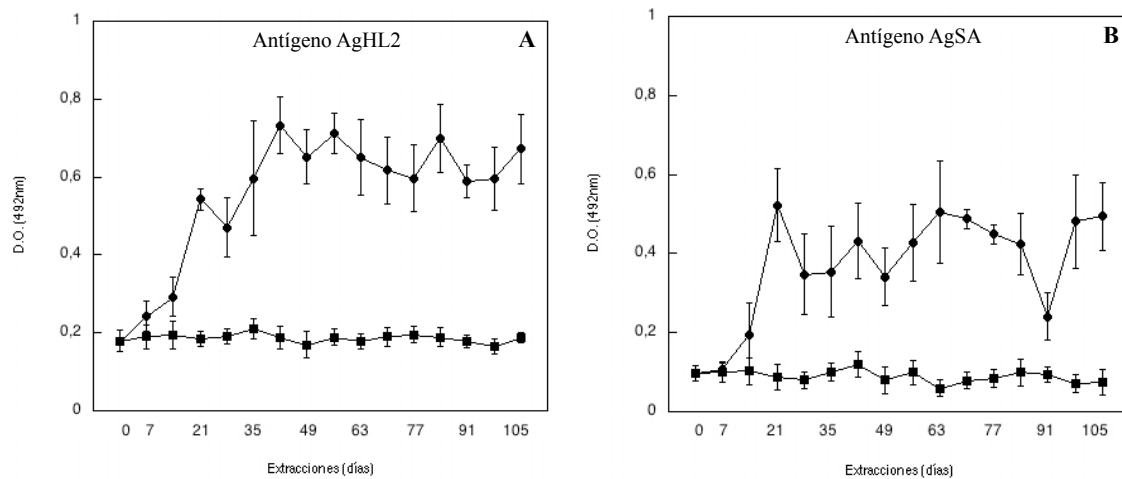
### 2.11 Respuesta de anticuerpos IgG en las muestras de los sueros de las gallinas infectadas experimentalmente

La respuesta de IgG frente a los dos antígenos (antígeno de huevos embrionados, AgHL2 y antígeno de vermes adultos, AgSA), fue analizada semanalmente hasta el final del experimento (Figura 2.4). El patrón de la respuesta contra ambos antígenos es similar, si bien, presentan ciertas diferencias tanto en la intensidad de la respuesta, que es superior contra el antígeno de huevos embrionados, como en el patrón semanal.

La media de las D.O. y de las desviaciones estándar de la respuesta de anticuerpos IgG frente al antígeno de huevos embrionados (AgHL2), se muestran en la Figura 2.4.A. Se detectó un aumento de la D.O. media desde el día 0 hasta el día 42 p.i. con una disminución no significativa el día 28 p.i. Entre los días 42 p.i. y 105 p.i., la media de las D.O. muestran periódicas fluctuaciones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los días 14 y 21 p.i. y entre los días 14 y 42 p.i. (en ambos casos:  $p < 0,01$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de D.O. después del día 42 p.i.

La respuesta de anticuerpos IgG frente a extracto antigénico de adultos de *A. galli* (AgSA) se muestra en la Figura 2.4.B. Se observó un incremento en las medias de D.O. entre el día 0 y el día 21 p.i., seguido por un ligero descenso en el día 28 p.i. Entre

el día 28 y el 84 p.i. se detectaron fluctuaciones no significativas. Las medias de las D.O. descendieron el día 91 p.i., alcanzando niveles similares a los observados entre los días 63-70 p.i. Se encontraron diferencias significativas entre las medias de las D.O. observadas en los días 14 y 21 p.i. ( $p < 0,01$ ), pero no entre las obtenidas entre los días 21 y 28 p.i. También se observaron diferencias significativas en las medias de D.O. obtenidas en el día 91 p.i. cuando son comparadas con las obtenidas en los días 84 y 98 p.i.



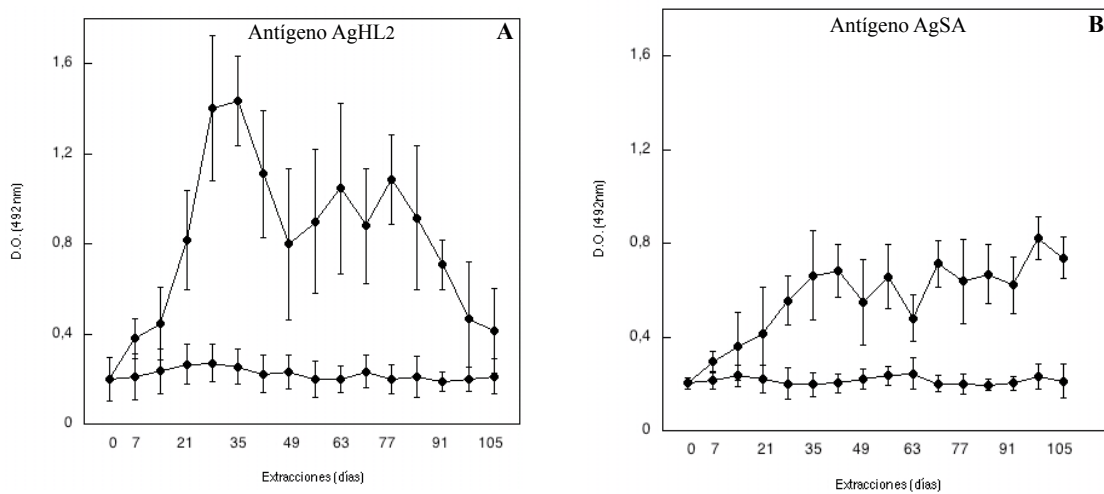
**Figura 2.4.** Evolución temporal de la respuesta específica de anticuerpos IgG frente a antígenos de *A. galli* en muestras de suero de gallinas infectadas experimentalmente y de controles negativos. (A) Respuesta de anticuerpos frente a antígeno de huevos embrionados del parásito (AgHL2). (B) Respuesta de anticuerpos frente al antígeno somático de adulto (AgSA). (■) Gallinas no infectadas usadas como control negativo en ambos test. La respuesta de anticuerpos fue medida en ELISA. Cada punto corresponde a la media de las D.O. obtenidas de 12 gallinas infectadas experimentalmente. Las barras indican las desviaciones estándar.

### **2.12 Respuesta de anticuerpos IgG en yema de huevo de gallinas infectadas experimentalmente**

La presencia de anticuerpos IgG frente a *A. galli* fue analizada en las yemas de los huevos puestos por las gallinas a lo largo de todo el experimento (Figura 2.5).

La respuesta de IgG frente a antígeno de huevo del parásito embrionado (AgHL2) se muestra en la Figura 2.5.A. Las medias de las D.O. más altas se observaron entre los días 28 y 35 p.i. A continuación, la reactividad muestra una tendencia a decrecer hasta el final del experimento. A pesar de esto, se puede apreciar un ligero aumento en las medias de las D.O. entre los días 49 y 84 p.i. Existen diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas en los días 28 y 35 p.i. cuando se comparan con los días 7, 14 y 21 p.i. ( $p < 0,01$ ), 49-77 p.i. ( $p < 0,05$ ), y 84- 105 p.i. ( $p < 0,01$ ).

La respuesta de anticuerpos IgG frente a extracto antigénico de verme adulto de *A. galli* (AgSA) se muestra en la Figura 2.5.B. En este caso, los niveles de IgG van aumentando con fluctuaciones desde el principio hasta el final del experimento. Se observaron diferencias significativas solamente entre los días 7 y 105 p.i. ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.5.** Evolución en el tiempo de la respuesta específica de anticuerpos IgG frente a antígenos de las yemas de los huevos puestos por las gallinas infectadas experimentalmente y de los puestos por las gallinas controles negativos. (A) Respuesta de anticuerpos frente a antígeno de huevos embrionados del parásito (AgHL2). (B) Respuesta de anticuerpos frente al antígeno somático de adulto (AgSA). (■) Gallinas no infectadas usadas como control negativo en ambos test. La respuesta de anticuerpos fue medida en ELISA. Cada punto corresponde a la media de las D.O. obtenidas de 12 gallinas infectadas experimentalmente. Las barras indican las desviaciones estándar.

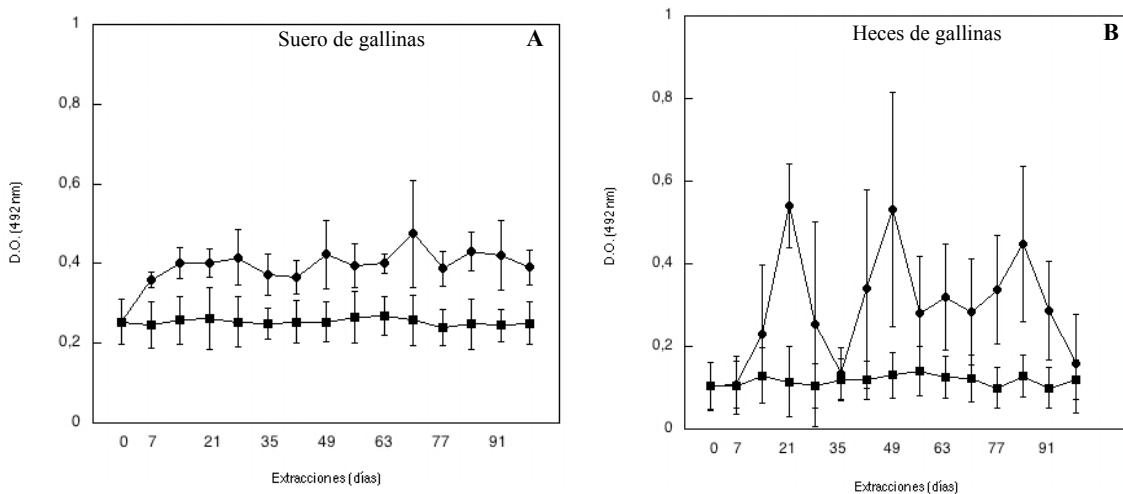
### 2.13 Respuesta de anticuerpos IgA en las muestras de los sueros y heces de las gallinas infectadas experimentalmente

La respuesta de IgA en suero y heces frente al extracto antigénico de verme adulto se muestra en la Figura 2.6.

La media de las DO y de las desviaciones estándar de la respuesta de anticuerpos IgA frente a extracto antigénico de verme adulto de *A. galli* (AgSA) en suero, se muestran en la Figura 2.6.A. La respuesta es de baja intensidad ya que las D.O. no superan 0,5 mm. Desde el inicio del experimento al día 7 p.i. se aprecia un aumento de la DO que es significativo, pero a partir de ese momento sólo se producen pequeñas fluctuaciones no significativas hasta el final del experimento. Con excepción del día 70 p.i. en el cual se produce un aumento significativo en la D.O.



La media de las D.O. y de las desviaciones estándar de la respuesta de anticuerpos IgA frente a extracto antigénico de verme adulto de *A. galli* (AgSA) en heces, se muestran en la Figura 2.6.B. Las medias significativamente más altas se observaron los días 21, 49 y 84 p.i. Los valores tienden a disminuir hasta el final del experimento (día 105 p.i.). Además de esto, se puede apreciar un ligero aumento en los días 56, 63, 70 y 77 p.i. y entre los días 21 y 49, una disminución muy acusada que corresponde al día 35 p.i.



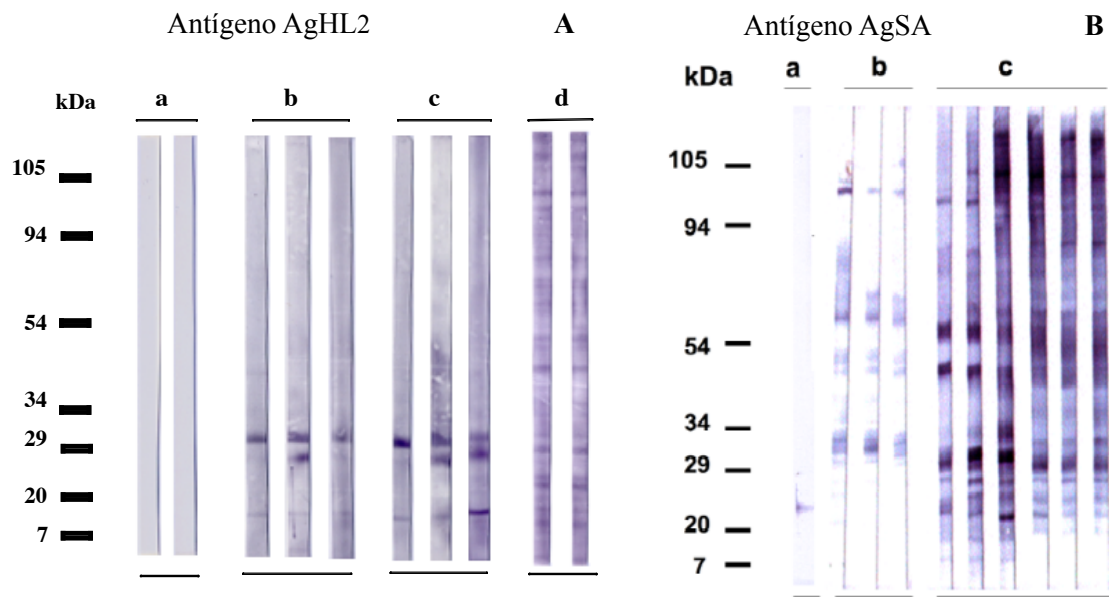
**Figura 2.6.** Evolución temporal de la respuesta específica de anticuerpos IgA frente a antígeno de vermes adultos de *A. galli* en muestras de suero y de heces de gallinas infectadas experimentalmente y de controles negativos. (A) Respuesta de anticuerpos medida en sueros de gallinas. (B) Respuesta de anticuerpos medida en heces de gallinas. (■) Gallinas no infectadas usadas como control negativo en ambos test. La respuesta de anticuerpos fue medida en ELISA. Cada punto corresponde a la media de las D.O. obtenidas de 12 gallinas infectadas experimentalmente. Las barras indican las desviaciones estándar.

### **2.14 Identificación de las moléculas implicadas en la reactividad frente a *A. galli***

Las moléculas de los antígenos del parásito implicadas en la respuesta de anticuerpos se identificaron mediante Western Blot usando antígeno de los huevos embrionados (AgHL2) y antígenos de adultos de *A. galli* (AgSA) (Figura 2.7).

La Figura 2.7.A muestra las moléculas de antígeno de huevo embrionado del parásito. El día 14 p.i. comienza el reconocimiento de un grupo de antígenos con peso molecular (pm) de aproximadamente 28-30 kDa y una molécula de 11 kDa. Esta respuesta está presente el día 21 p.i., pero se detecta además, un claro aumento en el número de moléculas que se reconocen. El día 42 p.i. se observa reactividad contra antígenos de 107, 100, 90, 50, 28-30 y 11 kDa.

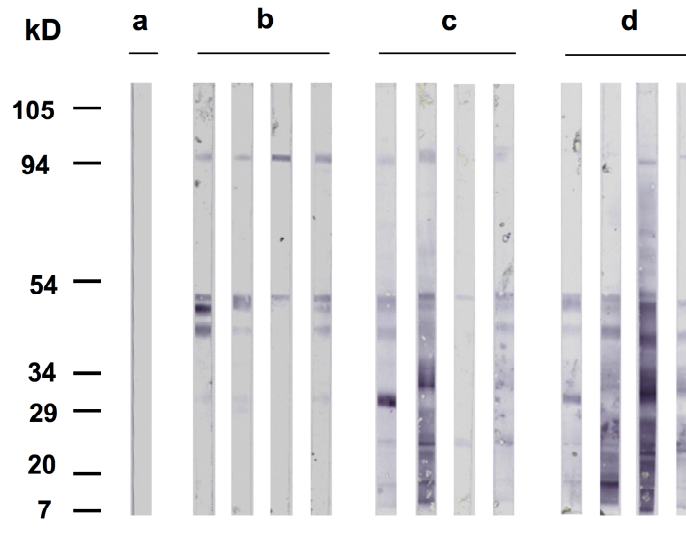
La Figura 2.7.B muestra las moléculas de extracto antigénico de adulto de *A. galli*. El día 14 p.i. se aprecia la aparición del reconocimiento de tres grupos de antígenos con pm de aproximadamente 30-34, 44-54 y 58-90 kDa respectivamente, y una molécula de 98 kDa. El día 21 p.i. la reactividad es mayor que el día 14 p.i., siendo especialmente intensa frente a los antígenos mencionados anteriormente. Además, son reconocidos antígenos de pm menor de 29 kDa.



**Figura 2.7.** Análisis mediante Western Blot, que muestra el patrón de reconocimiento de polipéptidos del antígeno de *A. galli*. (A) Respuesta frente a antígeno de huevos embrionados del parásito (AgHL2). (a) Muestras de sueros de controles negativos. (b) Muestras de sueros tomadas 14 días después de la infección. (c) Muestras de sueros tomadas 21 días después de la infección. (d) Muestras de sueros tomadas 42 días después de la infección. (B) Respuesta frente al antígeno somático de adulto (AgSA). (a) Muestras de sueros de controles negativos. (b) Muestras de sueros tomadas 14 días después de la infección. (c) Muestras de sueros tomadas 21 días después de la infección.

### 2.15 Antígenos responsables del estímulo de anticuerpos detectados en yemas de huevos puestos por las gallinas infectadas

Según se observa en la Figura 2.8, las primeras bandas son reconocidas 30 días p.i. Se aprecia una reactividad moderada producida por un grupo de antígenos de aproximadamente 42-50 kDa y una molécula de 98 kDa. A los 60 días p.i. se reconocen bandas entre 7 y 50 kDa; la banda de 30-32 kDa es especialmente intensa. El patrón de reconocimiento no cambia en yemas de huevos puestos a los 90 días p.i. en comparación con los puestos en el día 60 p.i. Sólo una de las muestras analizadas reconoce una banda por encima de 54 kDa.

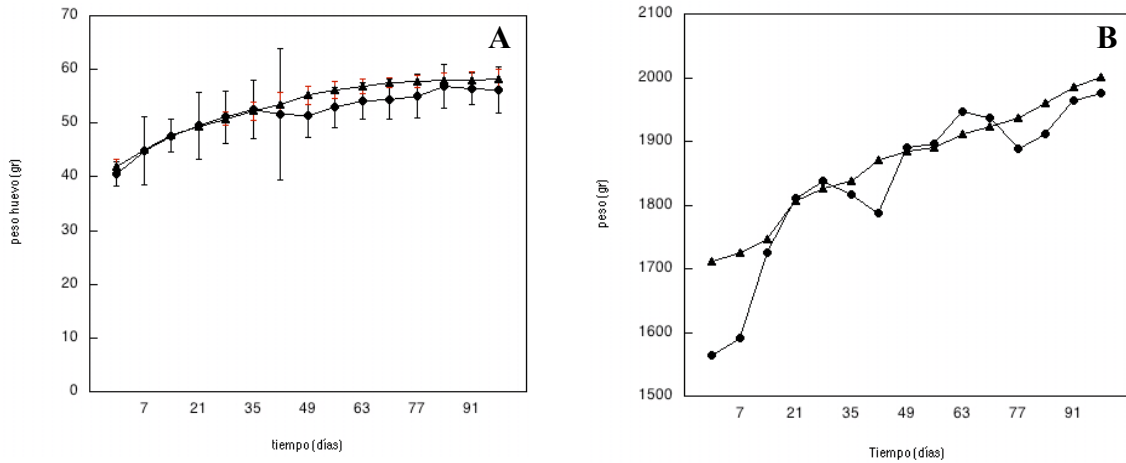


**Figura 2.8.** Análisis mediante Western Blot mostrando el patrón de reconocimiento de polipéptidos del antígeno de *A. galli* por muestras representativas de yemas de huevos puestas por las gallinas infectadas. (a) Muestras de yemas de controles negativos. (b) Muestras de yemas tomadas 30 días después de la infección. (c) Muestras de yemas tomadas 60 días después de la infección. (d) Muestras de yemas tomadas 90 días después de la infección.

### 2.16 Valores de otros parámetros del experimento

Además se midió la evolución del peso de los huevos puestos por las gallinas durante el período estudiado (Figura 2.9.A). Desde el comienzo del experimento hasta el día 42 p.i., se aprecia un aumento progresivo en el peso de los huevos similar al control negativo. A partir del día 42 p.i., el peso sigue aumentando, pero con valores ligeramente menores a los de los controles.

También se midió la evolución de los valores de los pesos de las gallinas a lo largo de todo el experimento (Figura 2.9.B). Se observa un aumento progresivo con fluctuaciones a lo largo de todo el experimento, manteniéndose los valores por debajo de los controles negativos, exceptuando a los días 28, 49 y 63 p.i. en donde los pesos de las gallinas infectadas experimentalmente superan a los controles.



**Figura 2.9.** (A) Evolución de los pesos de los huevos puestos por las gallinas. (●) Huevos puestos por las gallinas infectadas. (▲) Huevos puestos por las gallinas no infectadas. Cada punto corresponde a la media de los huevos puestos por las gallinas en esa semana. (B) Evolución de los pesos de las gallinas a lo largo del experimento (105 días). (●) Gallinas infectadas. (▲) Gallinas no infectadas usadas como control negativo en el test. Cada punto corresponde a la media de los valores de todas las gallinas.

## DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan demuestran que *A. galli* estimula una respuesta fuerte de anticuerpos en sus hospedadores. De hecho, se han detectado altas concentraciones de anticuerpos IgG específicos anti-*A. galli* en sangre y en yema de huevos de gallinas infectadas y niveles menores de IgA en heces.

Diferentes estudios sugieren que la resistencia a la infección con *A. galli* aumenta con la edad de las aves infectadas (Ackert *et al.*, 1935; Ikeme, 1973; Idi *et al.*, 2004). Esto, aparte de otras causas, es seguramente debido al aumento en la capacidad de respuesta inmune de las gallinas infectadas como consecuencia de su progresiva maduración. Por eso hemos seleccionado para nuestro estudio gallinas ponedoras Lohmann Brown de 18 semanas de vida, porque de esta manera teníamos la seguridad razonable de la existencia de una respuesta inmune medible.

Se han detectado anticuerpos específicos anti-IgG en extracto antigénico de huevo embrionado y de verme adulto. Como dato interesante, podemos decir que en ambos casos el primer aumento significativo en los niveles de anticuerpos ocurren entre los días 14 y 21 p.i.. Estos datos son consistentes con los obtenidos por Degen *et al.* (2005), que observaron que, en gallinas infectadas por *A.galli*, la expresión de citocinas relacionadas con la respuesta Th2 comenzaba a partir del día 14 después de la infección.

La respuesta de anticuerpos IgG desarrollada por las gallinas es ligeramente más fuerte frente a extracto antigénico de huevo embrionado que frente a antígeno de adulto. Esto puede ser debido a la diferencia en el comportamiento y en la localización entre la larva y el adulto durante el desarrollo del ciclo de vida endógeno en el hospedador. Las larvas invaden los tejidos profundos de la pared intestinal, en la cual producen una gran estimulación de las IgG hasta el día 42 p.i., mientras que los adultos se localizan en el lumen intestinal provocando una respuesta del IgA en heces observada el día 49 p.i., momento en el cual se completa el ciclo del parásito, y los adultos se localizan en el lumen intestinal.

La mayor excreción de huevos del parásito coincide con una caída significativa del nivel de anticuerpos frente a antígenos del parásito adulto detectados entre los días 70 y 90 p.i. No conocemos la razón de este hecho, pero la relación inversa entre los niveles de anticuerpos y la intensidad de la producción de huevos de los parásitos es evidente. Esto parece consistente con el efecto directo de la inmunidad del hospedador en la reducción de la fecundidad del helminto (Urquhart *et al.*, 1996).

Otro factor importante para el correcto entendimiento de la influencia de la respuesta inmune en la dinámica poblacional del parásito es la acumulación de IgG anti-*A. galli* en la yema de los huevos puestos por las gallinas infectadas. Esto indica que las madres transfieren a su descendencia parte de los anticuerpos anti-*A. galli* que producen cuando son infectadas, de una manera similar a los mamíferos (Carlier y Truyens,

1995). Esto no es incompatible con los datos que demuestran una alta susceptibilidad a la infección en pollitos de 1 día cuando son comparados con los observados en otras edades (Ackert *et al.*, 1935; Kerr, 1955). Serían necesarias infecciones experimentales de pollitos de madres infectadas y de madres sanas, porque nos permitirían identificar datos muy importantes como la susceptibilidad a la infección, el tamaño de los vermes y la fecundidad en ambos grupos. En relación a los huevos puestos por las gallinas, el punto a partir del cual el peso de la media de los huevos pasa a ser ligeramente menor que los valores de los huevos control corresponde con el día 42 p.i., en el cual ya se ha completado el ciclo del parásito en el hospedador.

Por otra parte, el Western Blot revela un reconocimiento muy limitado de moléculas hasta el día 21 p.i. en extracto antigénico de huevo embrionado y hasta el día 14 p.i. en extracto antigénico de adulto. Después del día 42 y 21 p.i. respectivamente, la reactividad aumenta y se amplía el intervalo de peso molecular en el que se reconocen los antígenos. A la yema de los huevos puestos por gallinas infectadas sólo pasan anticuerpos específicos frente a antígenos de medio y bajo peso molecular. Estos antígenos, en el caso de que se confirmara su actividad protectora, podrían ser considerados como posibles candidatos a formar parte de una vacuna frente a *A. galli*.

## ESTUDIO 2

### ANEXO

Tabla resumen en la que se recogen los parámetros de tamaño (mm), peso (gr) y sexo de los vermes de *A. galli* localizados en cada gallina al final del experimento (día 105 p.i.).

GALLINA Nº	MEDIDA (cm)	PESO (gr)	SEXO
1AC	7,6	0,1441	hembra
	3,8	0,0258	macho
1AS	8	0,1740	hembra
	7	0,1274	Hembra
	7,3	0,1250	hembra
	5,1	0,0635	macho
1BC	6,8	0,1238	hembra
	6,6	0,1015	hembra
	5,5	0,0598	hembra
	6	0,0918	hembra
	3,5	0,0300	hembra
	5,4	0,0428	macho
	5	0,0412	macho
	5	0,0589	macho
	5,3	0,0515	macho
	5	0,0544	macho
	4,5	0,0307	macho
	3,7	0,0131	macho



## ESTUDIO 2

---

GALLINA N°	MEDIDA (cm)	PESO (gr)	SEXO
1BS	7,7	0,1357	hembra
	6,2	0,0690	Macho
2AC	8,9	0,162	hembra
	9,4	0,212	hembra
	8,5	0,224	hembra
	8,6	0,172	hembra
	8,8	0,239	hembra
	6,3	0,076	macho
2AS	6,2	0,075	hembra
	6	0,072	macho
2BC	8,1	0,140	hembra
	4,9	0,078	hembra
	3,8	0,077	macho
	5,9	0,039	macho
2BS	4,7	0,041	macho
3BC	4,9	0,099	hembra
3BS	7,5	0,100	hembra
3AC	-	-	
3AS	-	-	

**Tabla anexo 1.** Datos de sexo, medida (mm) y peso (gr) individual de cada gallina al final del experimento (día 105 p.i.)

## ESTUDIO 2

Tabla resumen en la que se recogen los valores de las medias y las desviaciones estándar de las aves infectadas experimentalmente y de los controles negativos.

Días (p.i.)	Pesos de las gallinas (gr) media $\pm$ desviación estándar	Pesos de las gallinas C- (gr) media $\pm$ desviación estándar
0	1564,6 $\pm$ 119,4	1711,2 $\pm$ 23,45
7	1591,7 $\pm$ 130,27	1725,4 $\pm$ 24,67
14	1725,0 $\pm$ 169,89	1747,2 $\pm$ 11,38
21	1810,4 $\pm$ 142,01	1806,6 $\pm$ 36,33
28	1837,5 $\pm$ 154,29	1825,5 $\pm$ 21,89
35	1816,7 $\pm$ 117,42	1837,5 $\pm$ 9,63
42	1787,5 $\pm$ 105,26	1870,2 $\pm$ 26,83
49	1889,6 $\pm$ 116,02	1885,2 $\pm$ 44,21
56	1895,8 $\pm$ 145,32	1890,8 $\pm$ 78,23
63	1945,8 $\pm$ 137,69	1912,2 $\pm$ 43,52
70	1937,5 $\pm$ 145,19	1923,1 $\pm$ 10,28
77	1887,5 $\pm$ 147,52	1937,3 $\pm$ 83,2
84	1912,5 $\pm$ 172,38	1960,8 $\pm$ 53,16
91	1964,6 $\pm$ 174,34	1985,1 $\pm$ 43,85
98	1975 $\pm$ 147,32	2000,4 $\pm$ 20,12

**Tabla anexo 2.** Medidas de los pesos de las gallinas a lo largo del experimento.





## Susceptibilidad a *A. galli* en la 2<sup>o</sup> generación de gallinas

El objetivo de este estudio es determinar el efecto que tiene la respuesta de anticuerpos de gallinas infectadas por *A. galli* su descendencia y además, tratar de entender mejor el papel de la inmunidad en la regulación de la población de parásitos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Aves utilizadas para el estudio

Para este estudio se utilizó un grupo de 7 gallinas sanas y otro de 7 gallinas infectadas experimentalmente, ambos de 18 semanas de edad de la raza Lohmann Brown. Se utilizó también un gallo de 60 semanas de edad y de raza Macho Reproductora Lohmann Brown. En el caso del grupo de gallinas sanas y el gallo, la ausencia de parásitos se confirma mediante análisis coprológico (metodología descrita en el apartado 1.3). La infección experimental de las 7 gallinas se realizó y se comprobó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5. Todos los animales fueron suministradas por Ibérica de Tecnología Avícola (Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid).

#### 3.2 Preparación del extracto antigénico y embrionamiento de los huevos del parásito

Los parásitos se obtuvieron según el apartado 1.3 y el extracto antigénico de *A. galli* (AgSA) y la cuantificación de proteínas se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 1.4.

Los huevos de *A. galli* se embrionaron según la metodología descrita en el apartado 2.2. En este caso, se obtuvo una solución que contenía huevos embrionados en PBS pH 7,2.

### 3.3 Obtención de la segunda generación de pollitos e infecciones experimentales

Huevos de gallina fecundados se consiguieron mediante el cruce del gallo con las gallinas sanas e infectadas. El proceso de incubación de estos huevos duró 21 días. En una primera fase se incuban los huevos con volteo durante 18 días, a una temperatura de 37,6° C y 60 % de humedad. Posteriormente se pasaron a bandejas nacedoras esta vez sin volteo, en las cuales estuvieron 3 días a 35° C y 50 % de humedad, al cabo de los cuales eclosionaron y salieron los pollitos. Durante la primera semana de vida se mantuvieron a 30° C, bajándose 2 grados cada semana hasta alcanzar los 20° C en la 6ª semana de vida (Figura 3.1)



**Figura 3.1.** Incubadora con bandeja de volteo automático de huevos.

Una vez obtenida la segunda generación de pollitos (Figura 3.2.A), se dividieron en los siguientes grupos (Figura 3.3):

Pollitos de las gallinas madres infectadas con *A. galli*. Se obtuvieron 30 pollitos que se dividieron en dos grupos:

### ESTUDIO 3

---

- a. **Grupo 1 (G1-MI):** formado por 10 pollitos, que se infectaron con huevos embrionados de *A. galli* cuando tenían 10 días de vida, (día 0 del experimento) y se mantuvieron hasta el final del experimento (día 77 p.i.).
- b. **Grupo 2 (G2-MIC-):** grupo control negativo, formado por 20 pollitos. 10 se sacrificaron y se sangraron el día 0, y los otros 10 se mantuvieron hasta el final del experimento (día 77 p.i.).

Pollitos de las gallinas madres no infectadas. Se obtuvo una segunda generación de 30 pollitos, los cuales dividimos en dos grupos:

- a. **Grupo 1 (G1-NI):** formado por 10 pollitos, que se infectaron con huevos embrionados de *A. galli* cuando tenían 10 días de vida, (día 0 del experimento) y se mantuvieron hasta el final del experimento (día 77 p.i.).
- b. **Grupo 2 (G2-NIC-):** grupo control negativo, formado por 20 pollitos. 10 se sacrificaron y se sangraron el día 0 del experimento, y los otros 10 se mantuvieron hasta el final del mismo (día 77 p.i.).

Para la infección de la segunda generación de pollitos se utilizó una solución que contenía 100 huevos embrionados de *A. galli* en 0,5 ml de PBS pH 7,2 (Figura 3.2.B). Para confirmar las infecciones de los pollitos se realizaron análisis coprológicos (metodología descrita en el apartado 1.3).



**Figura 3.2.** (A) Fotografía que corresponde a pollitos de la 2<sup>a</sup> generación. (B) Infección de los pollitos de la 2<sup>a</sup> generación con huevos embrionados del parásito.

Se obtuvieron las siguientes muestras biológicas:

- a. Heces que se recogieron semanalmente durante 11 semanas y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- b. Sangre al comienzo (día 0) y al final del experimento (día 77). Se etiquetaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- c. Al final del experimento (día 77 p.i.) se realizó la autopsia de todas las aves. Se recogieron los vermes de los intestinos; se observaron a la lupa y gracias a sus diferencias morfológicas y basándonos en Euzeby (1981), se procedió a la confirmación de que sólo se encontraban vermes de *A. galli*.

### 3.4 Enzimoinmunoensayo (ELISA)

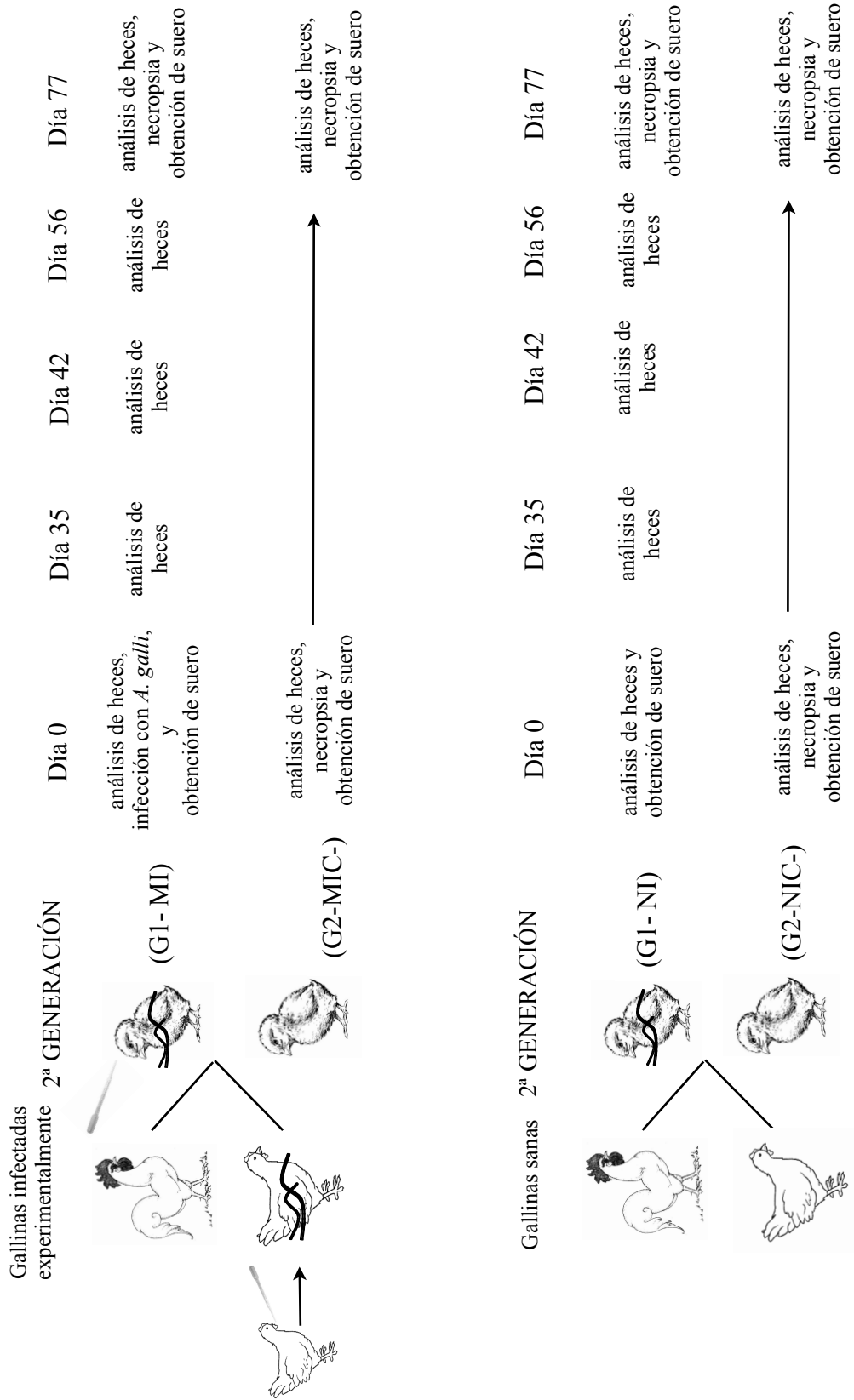
La metodología empleada es similar a la que se describe en el apartado 1.7. En este experimento se analizaron los sueros procedentes de los pollitos de la segunda generación. En el ensayo con antígeno somático de vermes adulto, las dilución



### ESTUDIO 3

---

empleada del anticuerpo primario fue de 1:400 y la del anticuerpo secundario: IgG-HRP 1:8000.

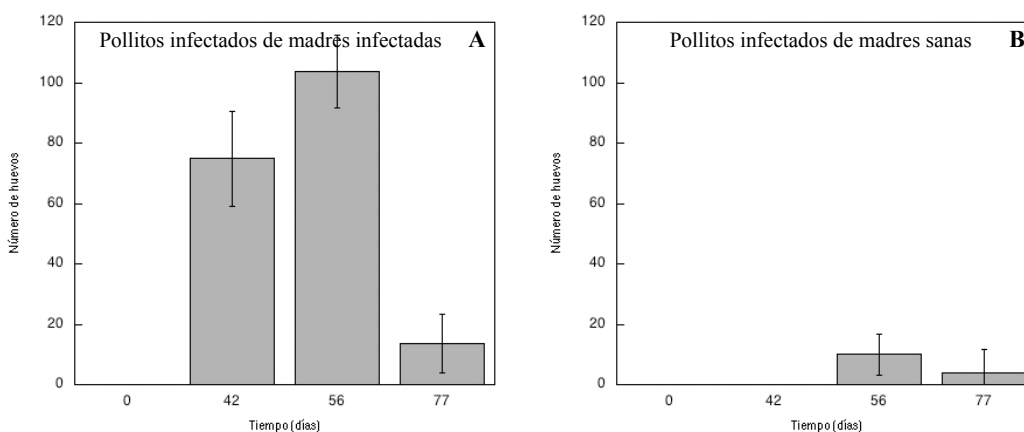


**Figura 3.3.** Esquema que muestra el desarrollo del experimento.

## RESULTADOS

## 3.5 Análisis parasitológicos

Se confirmó la infección de los dos grupos de pollitos de segunda generación por la aparición de huevos de *A. galli* en sus heces, según se muestra en la Figura 3.4. Los huevos comenzaron a observarse 12 días antes en los pollitos nacidos de madres infectadas que en los de madres sanas. A partir del día 56 p.i. el nivel de huevos de *A. galli* disminuyó drásticamente en las heces de los pollitos de ambos grupos. En pollitos de madres infectadas, los huevos del parásito aparecieron en las heces alrededor del día 42 p.i., y alcanzaron su máximo nivel de excreción el día 56 p.i. con cantidades superiores a 100 huevos/gramo de heces. En los pollitos de gallinas sanas se observó un nivel significativamente menor ( $p < 0.05$ ) de huevos de *A. galli* respecto del observado en el grupo anterior. Además aparecieron más tarde (día 56 p.i.).



**Figura 3.4.** Medias de los recuentos de los huevos del parásito en heces. (A) Pollitos infectados de madres infectadas (G1-MI). (B) Pollitos infectados de madres sanas (G1-NI). Las barras indican las desviaciones estándar.

### 3.6 Vermes adultos

Al final del experimento se extrajeron los vermes de las aves y se analizaron los siguientes parámetros parasitológicos: sexo, longitud, peso y cantidad. Estos datos se recogen en la Tabla 3.1.

De los parámetros analizados, solamente existen diferencias significativas en el número de vermes presentes en cada grupo: los pollitos infectados de madres infectadas tienen más gusanos que los pollitos infectados de madres sanas (1,94 y 1,4 respectivamente) ( $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas ni en el tamaño ni en el peso de los vermes obtenidos de los pollitos de madres infectadas y de los de madres sanas (Tabla 3.1).

Parámetros parasitológicos	(A) Pollitos infectados de madres infectadas	(B) Pollitos infectados de madres sanas
	media $\pm$ desviación estándar	media $\pm$ desviación estándar
Carga parasitaria	1,94 $\pm$ 1,67	1,4 $\pm$ 1,89
Carga parasitaria de hembras	0,94 $\pm$ 1,02	0,6 $\pm$ 0,69
Carga parasitaria de machos	1 $\pm$ 1,22	0,8 $\pm$ 1,61
Tamaño de las hembras (cm)	6,35 $\pm$ 1,20	6,65 $\pm$ 0,70
Tamaño de los machos (cm)	5,03 $\pm$ 0,65	4,73 $\pm$ 0,38
Peso de las hembras (mg)	0,071 $\pm$ 0,018	0,063 $\pm$ 0,011

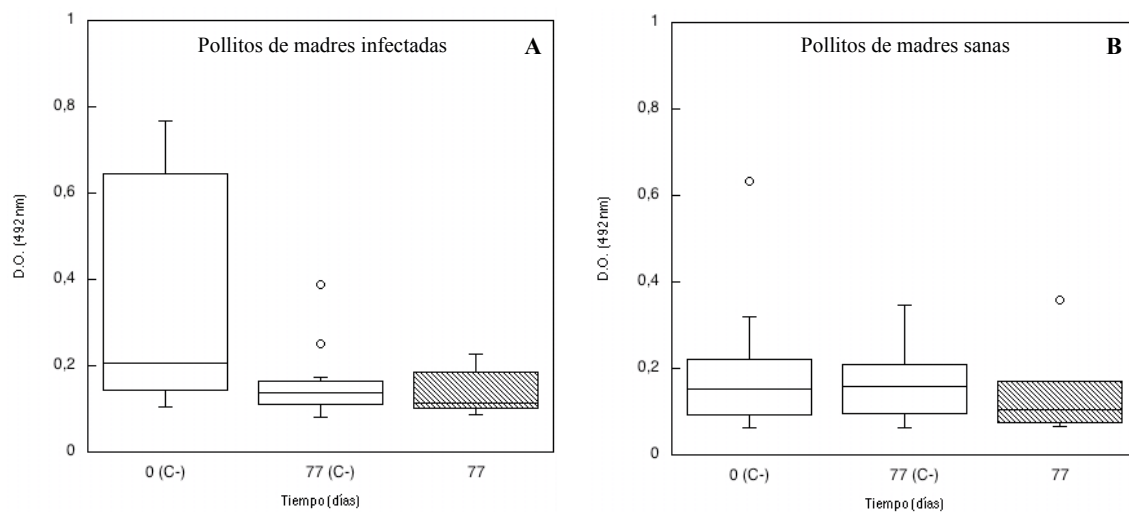
Parámetros parasitológicos	(A) Pollitos infectados de madres infectadas	(B) Pollitos infectados de madres sanas
	media ± desviación estándar	media ± desviación estándar
Peso de los machos (mg)	0,035 ± 0,011	0,025 ± 0,011

**Tabla 3.1.** Parámetros parasitológicos (media ± desviación estándar) de los vermes recogidos de los pollitos infectados. (A) Datos de los vermes de los pollitos infectados de madres infectadas. (B) Datos de los vermes de los pollitos infectados de madres no infectadas.

### 3.7 Respuesta de anticuerpos IgG

Los diferentes grupos de sueros se analizaron mediante la técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgG, dando como resultado unos valores significativamente altos de los sueros del grupo control del día 0 (Figura 3.5.A). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los análisis del día 77 p.i. de los pollitos infectados experimentalmente (G1-MI), y el día 0 del grupo control (G2-MIC-) ( $p = 0,008$ ;  $p < 0,05$ ), siendo la media de los valores de D.O. de los sueros de los pollitos infectados en torno al 0,13 nm, y los valores del grupo control G2-MIC- en torno a 0,22 nm. Dentro del grupo control G2-MIC-, también se observan diferencias significativas entre los sueros de los pollitos analizados en el día 0: DO de 0,22 mm y de los analizados el día 77 p.i.: D.O. de 0,12 mm ( $p = 0,036$ ;  $p < 0,05$ ).

Se analizaron los sueros de la segunda generación de pollitos de madres sanas (Figura 3.5.B) en los que se representan los sueros de los pollitos control G2-NIC- sacrificados el día 0 y el día 77, y los sueros de los pollitos infectados G1-NI sacrificados el día 77 p.i.. Los valores medios de D.O. para los tres grupos fueron: 0,14, 0,1 y 0,15 mm respectivamente, con lo que se observan valores similares entre sí y cercanos al 0; no hay diferencias significativas.



**Figure 3-5.** Respuesta de anticuerpos IgG medidos en los diferentes grupos de pollitos de la segunda generación. (A) Sueros de pollitos de madres infectadas. Los sueros del día 0 y los sueros del día 77 p.i. corresponden a los controles negativos: G2-MIC-. (▨) Corresponde a los sueros de los pollitos infectados: G1-MI. (B) Sueros de pollitos de madres sanas. Los sueros del día 0 y los sueros del día 77 p.i. corresponden a los controles negativos: G2-MIC-. (▨) Corresponde a los sueros de los pollitos infectados: G1-NI.

## DISCUSIÓN

Las condiciones en las que se realiza la cría de gallinas (grandes concentraciones de aves en espacios limitados), favorece la diseminación de patógenos entre las aves de una explotación. Elevadas prevalencias de *A. galli* se señalan habitualmente en explotaciones industriales de gallinas y también en aves mantenidas en explotaciones al aire libre (Thamsborg *et al.*, 1999). Además, algunos aspectos de la relación parásito/hospedador pueden contribuir a la regulación de la población parasitaria en la población del hospedador.

Diversos estudios han relacionado factores como la especie, raza, edad, sexo o estado nutricional de los hospedadores con la resistencia a la infección por *A. galli* (Ackert y Eisenbrandt, 1935; Permin y Ranvig 2001; Gauly *et al.*, 2002). No obstante, para comprender correctamente la regulación de la población parasitaria en la población

de una explotación, no sólo hay que conocer las características relacionadas con la inmunidad en las gallinas adultas, si no que es necesario determinar en qué medida, la inmunidad desarrollada por las gallinas de una generación, influye sobre la población de parásitos que se desarrolla en sus descendientes.

En el estudio previo hemos demostrado la transferencia de anticuerpos IgG anti-*A. galli* de gallinas infectadas a las yemas de los huevos producidos por dichas gallinas (Marcos-Atxutegi *et al.*, 2009). En el presente estudio, elevados niveles de IgG anti-*A. galli* son detectados en pollitos nacidos de gallinas infectadas con *A. galli*, antes de proceder a la infección experimental de dichos pollitos, pero no en pollitos de gallinas sanas. Esto sugiere que los anticuerpos generados por las gallinas infectadas, detectados previamente en los huevos, pasan a los embriones. Demostramos también que la presencia de estos anticuerpos se asocia con una alta carga parasitaria, una mayor excreción de huevos del parásito en las heces de pollitos y un comienzo más temprano de la oviposición en pollitos de madres infectadas que en los de madres sanas.

Estos datos parecen indicar que la presencia de los anticuerpos anti-*A. galli* de las gallinas madres en sus descendientes de la siguiente generación no se correlaciona con una resistencia a la infección contra el parásito sino el hecho contrario, un aumento de la susceptibilidad. Este es un hecho similar al observado en mamíferos infectados con otras especies de nematodos. Por ejemplo, niños nacidos de madres infectadas con *Wuchereria bancrofti* presentan mayor susceptibilidad a la infección en período post-natal, que los niños nacidos de madres sanas (Hightower *et al.*, 1993) Los mecanismos de la tolerancia a la infección en la descendencia de hospedadores infectados han sido revisados por Carlier y Truyens (1995) y aunque los anticuerpos de las gallinas presentan ciertas diferencias con los de los mamíferos (Warr *et al.*, 1995), similares mecanismos podrían ocurrir en las aves. Por otra parte, no hemos observado si, al igual que en mamíferos, la mayor predisposición a la infección está acompañada de atenuación de la patología en la progenie de madres infectadas.

Otro hecho de interés es el impacto que, a nivel epidemiológico, pueda tener la mayor producción de huevos de *A. galli* en pollitos infectados de madres infectadas. Probablemente, dada la facilidad de diseminación del parásito en una comunidad cerrada, como un gallinero, la infección de pollitos nacidos de madres infectadas parece reforzar el flujo de parásitos al medio ambiente, lo que aumentaría la probabilidad de contacto con otros individuos de la comunidad.

En otro estudio, hemos observado niveles altos de IgG anti-*A. galli* en gallinas de 18 semanas infectadas experimentalmente (Marcos-Atxutegi *et al.*, 2009). Por otra parte, en este estudio, ni los pollitos de madre infectadas ni los de madres no infectadas han desarrollado una respuesta de anticuerpos en el día 77 p.i. Esto sugiere que la respuesta a la infección se desarrolla más adelante. Estamos lejos de la correcta comprensión de los mecanismos de regulación del flujo de parásitos en las aves de una población cerrada, por lo que se requieren más estudios para completar su conocimiento, a pesar de la dificultad que entraña su diseño.



## ANEXO

Tablas resumen en las que se recogen los parámetros de medida (mm), peso (gr) y sexo de los vermes de *A. galli* localizados en cada pollito al final del experimento (día 77 p.i.).

Pollitos infectados de madres infectadas			
POLLITO N°	MEDIDA (cm)	PESO (gr)	SEXO
20	7,2	0,0812	hembra
22	5,3	0,0313	macho
23	6,2	0,0782	hembra
	6	0,069	hembra
24	4,1	0,0237	macho
25	7,5	0,0937	hembra
	6,9	0,0738	macho
27	4,3	0,0264	macho
	5,1	0,0336	macho
	5,6	0,0385	macho
	5,5	0,037	macho
29	4,5	0,0264	macho
30	5	0,0495	hembra
	5	0,0341	macho
31	7,5	0,0884	hembra
	8,4	0,0974	hembra
	5,2	0,0517	hembra

### ESTUDIO 3

Pollitos infectados de madres infectadas			
POLLITO N°	MEDIDA (cm)	PESO (gr)	SEXO
	4,9	0,0365	macho
32	7,1	0,0768	hembra
	8	0,0893	hembra
	5,4	0,04	macho
	5,1	0,0338	macho
	5	0,0294	macho
	5,2	0,035	macho
33	8	0,085	hembra
	5	0,0325	macho
34	7,3	0,075	hembra
	4,3	0,0356	macho
35	4,6	0,042	hembra
36	4,5	0,0373	hembra
	5,5	0,0558	hembra
	6,7	0,078	hembra
	4,4	0,0275	macho

**Tabla anexo 1.** Parámetros de los vermes extraídos de los pollitos infectados de madres infectadas.

### ESTUDIO 3

Pollitos infectados de madres sanas			
POLLITO N°	MEDIDA (cm)	PESO (gr)	SEXO
2	6,9	0,0572	hembra
	4,5	0,0221	macho
	4,6	0,0227	macho
	4,6	0,0169	macho
	4,4	0,0149	macho
	5	0,0168	macho
4	5,4	0,0499	macho
5	6,7	0,0721	hembra
6	6,1	0,0575	hembra
7	6,6	0,0782	hembra
	5	0,048	hembra
10	6,7	0,07	hembra
	4,3	0,0223	macho
	5,1	0,0306	macho

**Tabla anexo 2.** Parámetros de los vermes extraídos de los pollitos infectados de madres sanas.







## Análisis proteómico de *A. galli*

El objetivo de este estudio es la identificación de proteínas inmunoreactivas de *A. galli*, el estudio del reconocimiento en el tiempo y la posible relación entre estas proteínas con la patogenia y con los mecanismos de supervivencia que ocurren en la ascariasis aviar.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Selección de las muestras y establecimiento de los grupos de sueros

De las muestras pertenecientes a las infecciones experimentales del estudio 2, se seleccionaron ciertos días para hacer mezclas de sueros. Cada mezcla corresponde a un día elegido y está formado por volúmenes iguales de 10 muestras tomadas al azar. De esta manera, obtuvimos una mezcla de sueros negativos correspondientes a las gallinas del día 0, y tres mezclas de sueros correspondientes a los días 21, 42 y 98 p.i.

- Día 0 del experimento: se empleó un total de 10 muestras de sangre de las gallinas antes de la infección por *A. galli*.
- Día 21 p.i.: se emplearon 10 muestras de sangre que corresponden al momento en el cual la larva 4 ya ha salido de la mucosa intestinal, se localiza en la luz intestinal y muda a adulto.
- Día 42 p.i.: se emplearon 10 muestras de sangre que corresponden al momento en el cual se completa el ciclo biológico de *A. galli* y comienza la expulsión de los huevos del parásito con las heces de la gallina.
- Día 98 p.i.: se emplearon 10 muestras de sangre que se corresponden con un punto de inflexión en el nivel de anticuerpos medidos en ELISA.

De esta manera, se obtuvieron 4 grupos de sueros (Tabla 4.1):

- Grupo 1: sueros negativos, correspondientes al momento 0 del experimento.
- Grupo 2: sueros correspondientes al día 21 p.i.
- Grupo 3: sueros correspondientes al día 42 p.i.
- Grupo 4: sueros correspondientes al día 98 p.i.

## ESTUDIO 4

De las muestras analizadas por la técnica de ELISA pertenecientes a las diferentes granjas avícolas del estudio 1 se seleccionaron sueros negativos y sueros positivos de gallinas infectadas naturalmente. De esta manera, los sueros fueron clasificados en dos grupos (Tabla 4.1):

- Grupo 5: grupo de sueros negativos de gallinas.
- Grupo 6: sueros positivos correspondientes a gallinas infectadas naturalmente.

Los sueros del grupo 5 y del grupo 6 se utilizaron para hacer un mezcla de cada grupo. Cada mezcla estaba formado por la mezcla de volúmenes iguales de 10 muestras tomadas al azar.

Grupos de sueros	Características
Grupo 1 (G1)	Día 0 de la infección: sueros negativos a <i>A. galli</i>
Grupo 2 (G2)	Día 21 del ciclo biológico de <i>A. galli</i> : larva sale de la mucosa y muda a adulto
Grupo 3 (G3)	Día 42 del ciclo biológico de <i>A. galli</i> : se completa el ciclo y comienza la oviposición
Grupo 4 (G4)	Día 91 del ciclo biológico de <i>A. galli</i> : punto de inflexión en los niveles de anticuerpos
Grupo 5 (G5)	Sueros negativos de gallinas
Grupo 6 (G6)	Sueros positivos de infecciones naturales de gallinas

**Tabla 4.1.** Clasificación de los sueros basándose en análisis coprológicos y serológicos: grupos 1 al 4: sueros de gallinas infectadas experimentalmente; grupos 5: sueros control y grupo 6: sueros de gallinas infectadas naturalmente.



### 4.2 Electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE)

La electroforesis bidimensional es una técnica que permite la separación de las proteínas basándose en dos propiedades independientes: el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (Pm).

#### 4.2.1 Solubilización del extracto antigénico

Como primer paso, fue necesario purificar el antígeno y eliminar todos los productos que puedan llegar a interferir en el transcurso de la electroforesis bidimensional. Para ello se trató el extracto antigénico AgSA con el kit comercial *ReadyPrep 2-D Cleanup*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este producto facilita la precipitación y concentración de proteínas de muestras diluidas a la vez elimina detergentes iónicos, sales, ácidos nucleicos y lípidos.

El sedimento obtenido se resuspendió en un tampón de solubilización/rehidratación compatible con las tareas a realizar posteriormente.

Este tampón contiene agentes caotrópicos que eliminan las interacciones entre proteínas e inducen su desnaturalización (urea, tiourea), detergentes delipidizantes no iónicos (CHAPS), agentes reductores que destruyen los puentes disulfuro de las proteínas ayudando a que estas desplieguen sus subunidades, además de prevenir su oxidación (ditiotreitól, DTT) y moléculas anfóteras que generan un gradiente de pH (anfólitos).

Las muestras fueron divididas en alícuotas de 125  $\mu$ l de tampón de rehidratación, conteniendo cada una 25 o 40  $\mu$ g aproximadamente de proteína y almacenadas a -20° C hasta su uso.

#### **4.2.2 Rehidratación de las muestras en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG)**

Antes de proceder a la rehidratación de las muestras y con el fin de mejorar la disolución de las proteínas en el tampón de rehidratación, se llevó a cabo el siguiente protocolo de solubilización:

- a. Se agitaron las muestra que contenían 40 µg de proteína en 125 µl de tampón de rehidratación, en un agitador durante 30 segundos y a temperatura ambiente.
- b. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, para ayudar a actuar al DTT.
- c. A continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 16.000 x g y a 4° C. Con el fin de eliminar posibles precipitados de proteínas insolubles.

Una vez solubilizadas, se dispuso cada muestra en un carril de la bandeja de IEF. Se colocó la tira IPG de 7 cm encima de la muestra quedando en contacto esta con el gel, y se cubrió con 2 ml de aceite mineral, que evita la evaporación y por tanto, la precipitación de la Urea y Tiourea.

Se emplearon los métodos de rehidratación pasiva y activa. En primer lugar, se programó una rehidratación pasiva durante 1 hora y 20° C. Este es un método en el cual no se aplica un campo eléctrico durante el proceso. Provoca que las proteínas sean absorbidas por el gel de la tira. A continuación un programa de rehidratación activa durante 12 horas y 20° C. En este caso, se aplica un pequeño voltaje constante de 50 V. Ayuda a que las proteínas sean absorbidas por el gel de la tira y lo hagan de una manera más ordenada. Todo el proceso se realiza en el equipo *Protean IEF Cell*.

#### **4.2.3 Isoelectroenfoque (IEF)**

El IEF se llevó a cabo en las tiras IPG de 7 cm de diferentes intervalos de pH (3-10, 5-8 y 7-10) y en el equipo *Protean IEF Cell*, con una temperatura constante de 20° C y un

## ESTUDIO 4

amperaje máximo de 50  $\mu$ A por tira IPG. Cada programa consta de 4 etapas en las cuales se aplican diferentes voltajes dependiendo del rango de pH de la tira IPG utilizada (Tabla 4.2).

- Intervalo de pH 3-10:

	<b>Tiempo</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Rampa</b>
<b>Step 1 (S1)</b>	15 minutos	250 V	Linear
<b>Step 2 (S2)</b>	2 horas	4.000 V	Linear
<b>Step 3 (S3)</b>	14.000 V/hora	4.000 V	Linear
<b>Step 4 (S4)</b>	99 horas	500 V	Linear

- Intervalo de pH 5-8:

	<b>Tiempo</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Rampa</b>
<b>Step 1 (S1)</b>	15 minutos	250 V	Linear
<b>Step 2 (S2)</b>	2 horas	4.000 V	Linear
<b>Step 3 (S3)</b>	15.000 V/hora	4.000 V	Linear
<b>Step 4 (S4)</b>	99 horas	500 V	Linear

- Intervalo de pH 7-10

	<b>Tiempo</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Rampa</b>
<b>Step 1 (S1)</b>	15 minutos	250 V	Linear
<b>Step 2 (S2)</b>	1 hora	4.000 V	Linear
<b>Step 3 (S3)</b>	15.000 V/hora	4.000 V	Linear
<b>Step 4 (S4)</b>	99 horas	500 V	Linear

**Tabla 4.2.** Programación de las diferentes etapas del IEF dependiendo del intervalo de pH de la tira IPG utilizada (3-10, 5-8 o 7-10).

Durante este proceso, la tira se puso en contacto con los electrodos del aparato de IEF mediante unos *wicks* o papeles de filtro humedecidos con agua ultrapura. Estos *wicks*

protegen la tira del electrodo y retienen sales y otros compuestos no anfóteros incluidos en la muestra, mejorando los resultados. Al igual que en el proceso anterior, la tira se cubrió con 2 ml de aceite mineral para evitar posibles evaporaciones.

### 4.2.4 Equilibrado de las tiras IPG

Una vez finalizado el IEF, se realizó el equilibrado de las tiras IPG. Este paso consta de dos incubaciones consecutivas de las tiras en diferentes tampones que provienen de una misma solución *stock*. La primera incubación se realizó durante 20 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente. A 2,5 ml de solución stock se añadieron 0,05 g de DTT. Este paso incorpora DTT como agente reductor que conserva el estado reducido de las proteínas. En la segunda incubación se añadieron 0,0625 g de Iodoacetamida a los 2,5 ml de solución stock, y se mantuvo durante 15 minutos en agitación suave a temperatura ambiente. Este compuesto alquila los grupos tiol de las proteínas, previniendo así su posible re-oxidación durante la electroforesis. Para el equilibrado las tiras se colocaron boca arriba en una bandeja de rehidratación.

### 4.2.5 Western Blot 2D

Esta técnica, descrita en el apartado 1.8, sufre variaciones al ser aplicada a las tiras de IPG. En este caso, fue llevada a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Oleaga *et al.* (2009) con algunas modificaciones.

#### a. Electroforesis para tiras IPG

La separación de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12 %, con un grosor de 1 mm. Las tiras IPG se colocaron cuidadosamente en la parte superior de los geles, evitando así la formación de burbujas. En un extremo se colocó un *wick* humedecido en una solución de 5  $\mu$ l de patrón de pesos moleculares y 5  $\mu$ l de agarosa al 0,5 % en tampón electrolito. A continuación se cubrieron la tira y el *wick* con agarosa al 0,5 % en tampón electrolito evitando así cualquier desplazamiento y la formación de burbujas entre la tira y el gel. La electroforesis se realizó a 15 mA/gel durante 15 minutos, tiempo aproximado que

tardan las proteínas en salir del gel de la tira IPG y formar el frente, y posteriormente a 30 mA/gel hasta que el frente llegó al final del gel.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles 2D fueron teñidos con nitrato de plata o bien transferidos a membranas de nitrocelulosa para su análisis por Western Blot.

### **b. Tinción de los geles**

Los geles resultantes de las electroforesis bidimensionales fueron teñidos con la tinción de plata según metodología descrita en el apartado 1.6.1. Esta tinción es muy sensible pero no permite la identificación posterior de las proteínas extraídas del gel mediante espectrometría de masas (MS). Por lo tanto, cuando los geles se utilizaron para cortar *spots*, esta tinción de plata se modificó con el fin de hacerla compatible con la MS. En este caso, esta variación de la tinción pierde cierta sensibilidad, a cambio de adquirir compatibilidad con dicha técnica. El protocolo es similar (Tabla 4.3), pero sin añadir glutaraldehído al 0,125 % en la sensibilización (paso 2), ni formaldehído al 0,0148 % en la solución del nitrato de plata (paso 4).

Los geles teñidos fueron conservados en agua ultrapura al 1 % de ácido acético y a 4° C hasta su digitalización y posterior extracción de los *spots* de interés.

	<b>SOLUCIÓN</b>	<b>PRODUCTOS</b>	<b>TIEMPO</b>
<b>1</b>	Fijación	Etanol 40 % Ácido acético 10 %	30 minutos
<b>2</b>	Sensibilización	Etanol 30 % Tiosulfato sódico 0,2 % Acetato sódico 6,8 %	30 minutos
<b>3</b>	Lavados	Agua ultrapura	3 x 5 minutos
<b>4</b>	Plata	Nitrato de Plata 0,25 %	20 minutos

	SOLUCIÓN	PRODUCTOS	TIEMPO
5	Lavados	Agua ultrapura	2 x 1 minutos
6	Revelado	Carbonato sódico 2,5 % Formaldehído 0,0074 %	Variable
7	Stop	EDTA 1,46 %	10 minutos

**Tabla 4.3.** Protocolo de tinción de Plata compatible con la espectrometría de masas para los geles 2D.

### c. Electrotransferencia

La metodología es similar a la descrita en el apartado 1.8.1 b.

### d. Detección de *spots* inmunógenos en el extracto AgSb en sueros de gallinas infectadas por *A. galli*

Una vez finalizada la transferencia, se realizó un lavado rápido con 15 ml de tampón de lavado por membrana. El bloqueo, las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios, el revelado y la parada de la reacción se realizaron según la metodología descrita en el apartado 1.6.1. La dilución empleada para el anticuerpo primario fue de 1:8000 y para el anticuerpo secundario (IgG-HRP) fue de 1:4000.

### 4.2.6 Adquisición y análisis de las imágenes

Los geles 2D teñidos con plata y las membranas de nitrocelulosa resultantes de la técnica de Western Blot se digitalizaron con el escáner *GS-800 Densitometer* usando el software informático *Quantity One*.

Las imágenes, una vez escaneadas, fueron analizadas y procesadas utilizando el software *PDQuest*. Esta aplicación informática detecta automáticamente los *spots* localizados en las imágenes a partir de determinados parámetros conocidos, como los pesos moleculares de las proteínas del patrón. El programa asigna diferentes valores teóricos como Pm, pI,

densidad o volumen, entre otros. Posteriormente, se comprueba visualmente esta detección de proteínas añadiendo, borrando o modificando algunos *spots*. Para identificar aquellos *spots* inmunógenos presentes en los diferentes geles 2D, se emparejó automáticamente cada imagen del gel teñido con plata con sus homólogos resultantes del Western Blot, confirmando las concordancias establecidas por el programa informático.

### 4.3 Espectrometría de masas e identificación de proteínas

Los *spots* que contenían proteínas inmunógenas analizadas por Western Blot se extrajeron manualmente de los geles previamente teñidos con tinción de plata compatible con espectrometría de masas. Estas muestras se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares de Madrid (CNIC) para su identificación mediante espectrometría de masas (MS).

A continuación se detallan las técnicas y equipos utilizados en el Servicio de Proteómica del CNIC.

#### 4.3.1 Digestión de proteínas en los geles

Los *spots* fueron escindidos manualmente y transferidos a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V perforado, cargadas con agua ultrapura. Fueron digeridas de forma automática en un robot *Proteineer DP*. Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko *et al.* (2006) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM y alquilados con yodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada a una concentración de 8 ng/ $\mu$ l en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 h. Por último, se añadió ácido trifluoroacético al 0,5 % para extraer péptidos y los digeridos resultantes se transfirieron a microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V.

### 4.3.2 Espectrometría de masas (MS)

Para el análisis de masas mediante MALDI se mezclaron volúmenes iguales de digerido y de una disolución matriz compuesta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker Daltonik) en acetonitrilo acuoso al 50 % y 0,25 % de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado *AnchorChip* de 600  $\mu\text{m}$  (Schürenberg *et al.*, 2000) y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis de masas de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas *Ultraflex* MALDI-TOF/TOF, según la metodología de Suckau *et al.* (2001). En una primera etapa se midieron los espectros de masas MALDI-MS en el intervalo 800-4000 Da en modo reflector positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon 300 espectros individuales. Los espectros MALDI-MS fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con  $m/z = 842,510$  y  $m/z = 2211,105$ . En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de los iones fragmento en modo tándem (MS/MS) de aquellos iones precursores cuya relación señal-ruido en el espectro MALDI-MS superaba un valor umbral. Los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones, acumulándose 1000 espectros individuales. La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo  $m/z = 800-3200$ . El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software *flexAnalysis 2.2*. Se llevó a cabo una revisión manual de los espectros MALDI-MS y MS/MS para su readquisición, recalibración o reetiquetado en caso necesario empleando los programas mencionados más arriba y software casero.

### 4.3.3 Búsqueda en bases de datos

Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa *BioTools 3.0*, con una tolerancia en la masa del ión parenteral de 20-40 ppm y un margen de error en la medida de la masa de los fragmentos iónicos de 0,25-0,50 Da, para buscar en una



base de datos no redundante (NCBIInr) empleando el motor de búsqueda *Mascot* (Perkins *et al.*, 1999).

A cada proteína identificada se le asignó su correspondiente función molecular y se le relacionó con un determinado proceso biológico, de acuerdo con las bases de datos: *Gene Ontology database* (<http://geneontology.org>) y *Swiss-Prot/UniProt database* (<http://beta.uniprot.org>).

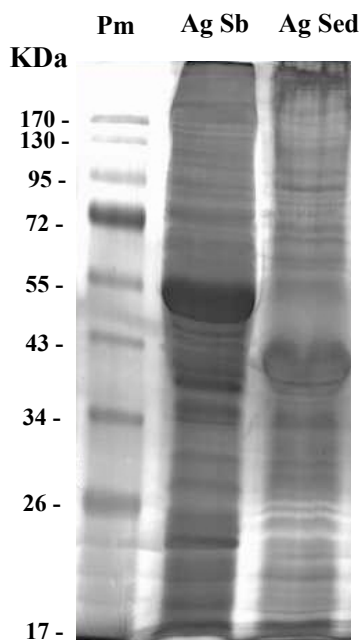
## RESULTADOS

### 4.4 Estudio protéico de la fracción AgSb del extracto antigénico de *A. galli* mediante electroforesis 2D

#### 4.4.1 Valoración cualitativa del extracto antigénico

En primer lugar, fue necesario analizar dicho extracto mediante electroforesis monodimensional, separando sus proteínas según sus pesos moleculares. De esta manera, se analizaron las dos fracciones del extracto antigénico obtenidas en la preparación del antígeno: AgSb, la fracción sobrenadante, rica en proteínas solubles, y AgSed, la fracción que corresponde al sedimento y que está formada en su mayor parte por proteínas de membrana muy insolubles (Figura 4.1).

En las técnicas de proteómica, es fundamental que las mezclas protéicas a utilizar tengan una completa solubilidad bajo las condiciones electroforéticas. Por lo tanto, para todo el estudio se empleó la fracción sobrenadante (AgSb) del extracto antigénico de *A. galli* al estar formada en su totalidad por proteínas altamente solubles. La electroforesis monodimensional de dicha fracción del antígeno, teñida con nitrato de plata, reveló más de 30 bandas con una distribución homogénea y con un amplio intervalo de pesos moleculares (17-170 kDa) (Figura 4.1).



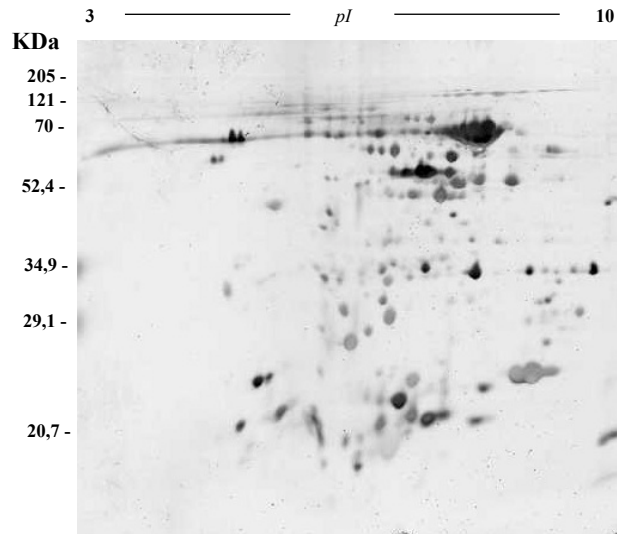
**Figura 4.1.** Electroforesis monodimensional teñida con nitrato de plata de las fracciones sobrenadante (AgSb) y sedimento (AgSed) del extracto antigénico de *A. galli*.

#### 4.4.2 Estudio protéico del extracto AgSb mediante electroforesis 2D

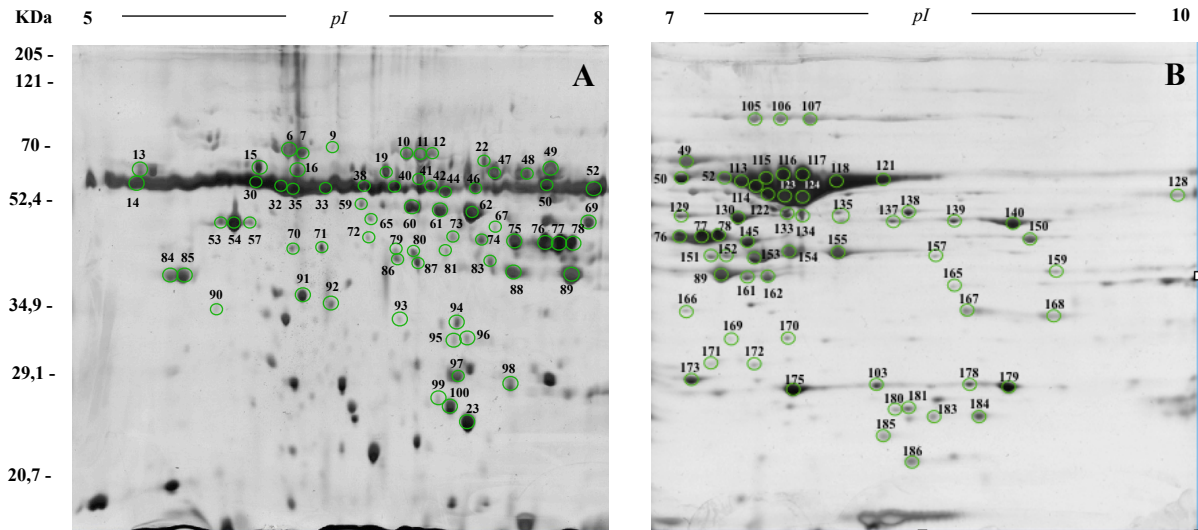
Una vez obtenidas las proteínas en electroforesis, el siguiente paso fue separarlas según diferentes gradientes de pH. En primer lugar, obtuvimos una imagen general del proteoma de *A. galli* mediante geles 2D al 12 % de acrilamida y de un intervalo amplio de pH (3-10). La tinción de plata reveló 410 *spots*, la mayor parte de los cuales localizados entre los pI 5 y 9,8 y con amplio rango de Pm (entre 10 y 170 kDa). Sólo se observaron 10 *spots* con pI < 5 (Figura 4.2).

Teniendo en cuenta esta distribución de los *spots* del proteoma de *A. galli*, se separó el extracto AgSb mediante dos intervalos más estrechos de pH 5-8 y 7-10. Dando como resultado una mejor separación y resolución de las proteínas (Figura 4.3). Con estas nuevas condiciones, se revelaron un total de 427 *spots* con un rango de Pm 10 - 170 kDa. 301 de ellos con pI comprendidos entre 5 y 8, y 126 con pI comprendidos entre 8 y 10.

## ESTUDIO 4



**Figura 4.2.** Electroforesis 2D de 25  $\mu$ g de la fracción AgSb del extracto antigénico de *A. galli*. Gel de pH 3-10 y 12 % de acrilamida teñido con nitrato de plata.



**Figura 4.3.** Electroforesis 2D de 40  $\mu$ g de extracto AgSb. Geles de pH 5-8 (A) y 7-10 (B) del 12 % de acrilamida teñidos con nitrato de plata. Los *spots* numerados fueron analizados mediante espectrometría de masas para su identificación.

#### 4.4.3 Proteínas inmunógenas de la fracción AgSb del extracto antigénico de *A. galli*

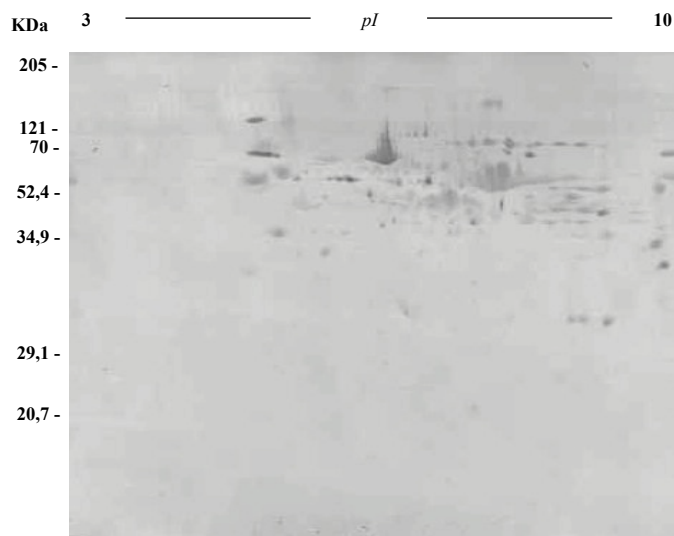
Se analizó mediante Western Blot 2D, la antigenicidad de las proteínas del extracto antigénico AgSb de *A. galli*. Los sueros utilizados fueron, en primer lugar, un mezcla de sueros de gallinas infectadas naturalmente, y en segundo lugar, mezclas de sueros de gallinas procedentes de infecciones experimentales, que corresponden a los diferentes grupos: día 0, 21, y 42 p.i.

##### a. Gallinas infectadas naturalmente

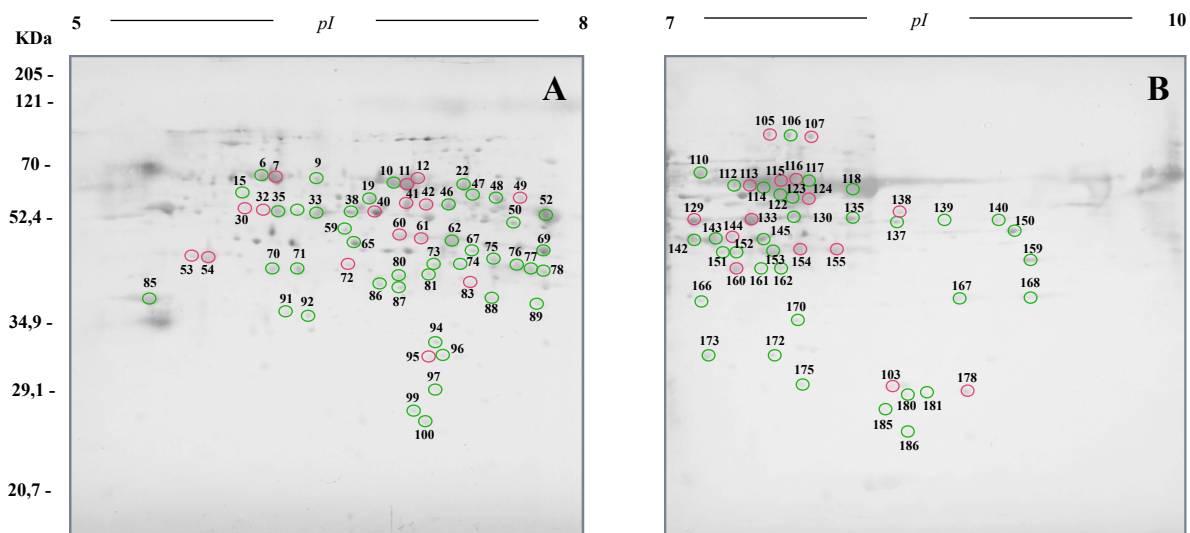
Se separaron las proteínas reconocidas por la mezcla de sueros de infecciones naturales en un rango amplio de pH (3-10). (Figura 4.4). La mayor parte de ellos en un rango de Pm de entre 121 y 30 kDa, y de un rango de pI de 5-9. Como consecuencia de esta distribución, se procedió a analizar las proteínas del extracto antigénico AgSb de *A. galli* mediante Western Blot 2D con intervalos de pH más estrechos (5-8 y 7-10), en este caso, se revelaron alrededor de 230 *spots*. (Figura 4.5). El emparejamiento de los *spots* revelados en el Western Blot con sus homólogos en los geles 2D teñidos con plata se realizó mediante el software *PDQuest*. Todos los *spots* que contenían proteínas inmunógenas fueron escindidos de los geles 2D y enviados para su análisis por espectrometría de masas. El número de *spots* coincidentes del Western Blot con su homólogo del gel 2D teñido con nitrato de plata reveló un total de 101 *spots* antigénicos de *A. galli*. Esto representa un rango de reconocimiento del 23,65 % sobre el total de *spots* revelados en el gel 2D.

La mezcla de sueros de gallinas sanas no revelaron ningún *spot* en su correspondiente Western Blot de rango 3-10 (imagen no mostrada).

## ESTUDIO 4



**Figura 4.4.** Western Blot 2D de pH 3-10 del extracto AgSb. *Spots* revelados por una mezcla de sueros de gallinas infectadas naturalmente con *A. galli*.



**Figura 4.5.** Western Blot 2D de pH 5-8 (A) y 7-10 (B) del extracto AgSb. *Spots* revelados por una mezcla de sueros de gallinas infectadas naturalmente con *A. galli*. (○) Círculos y números que indican los *spots* antigénicos que se analizaron por espectrometría de masas para su identificación y fueron reconocidos por la mezcla de sueros positivos de infecciones naturales de gallinas.

**b. Gallinas infectadas experimentalmente**

A la hora de analizar la evolución temporal del reconocimiento de antígenos a lo largo de la ascaridiasis, se procedió a enfrentar el extracto AgSb con sueros de gallinas infectadas experimentalmente con *A. galli*. Las proteínas del extracto AgSb se resolvieron en geles de intervalo de pH 5-8 y 7-10. Una vez separadas, las proteínas se enfrentaron a las mezclas de sueros de las gallinas del grupo 1 (sueros negativos de día 0 previo a la infección), grupo 2 (sueros día 21 p.i.), grupo 3 (sueros día 42 p.i.) y grupo 4 (sueros día 91 p.i.) descritos en el apartado 5.1 de este estudio.

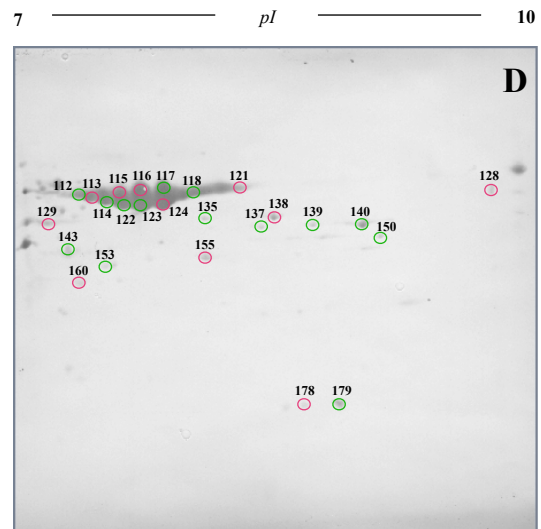
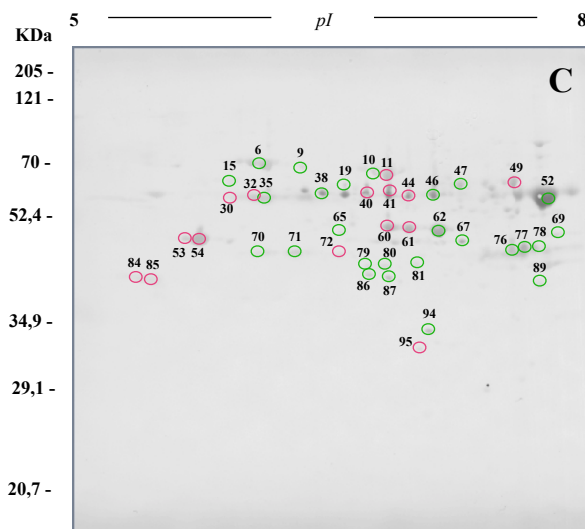
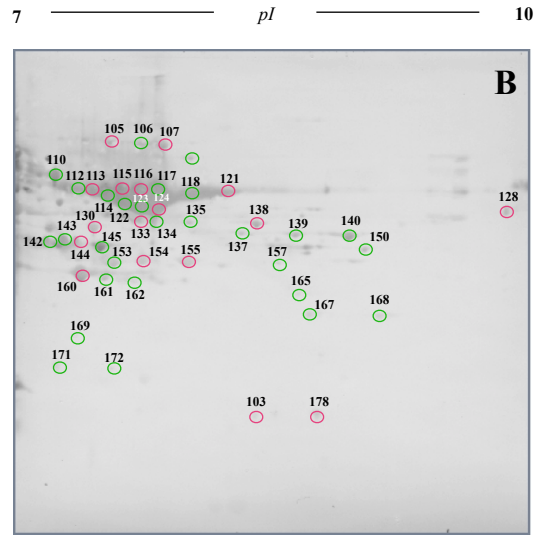
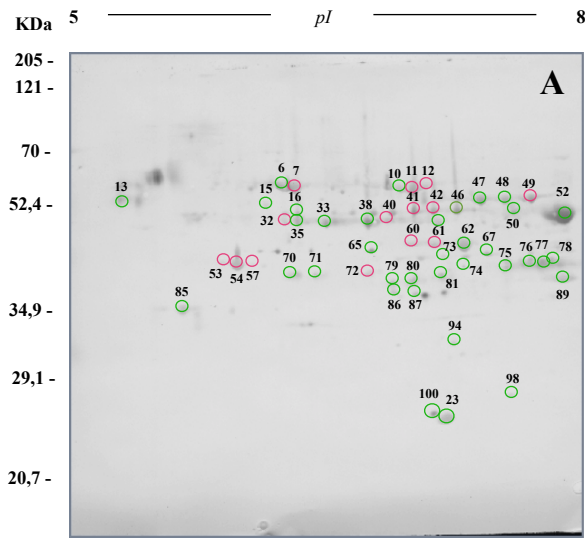
En la Figura 4.6 se muestran los Western Blot 2D en los que se incubaron las membranas con los sueros obtenidos a los 21, 42 y 91 días p.i. Estos sueros reconocieron 169 *spots* antigénicos a los 21 días p.i., 132 *spots* antigénicos a los 42 días p.i. y 155 *spots* antigénicos a los 91 días p.i. Esto representa una fuerte respuesta antigénica en el día 21 p.i. que decrece ligeramente en el día 42 p.i. y una reactivación en el día 98 p.i.

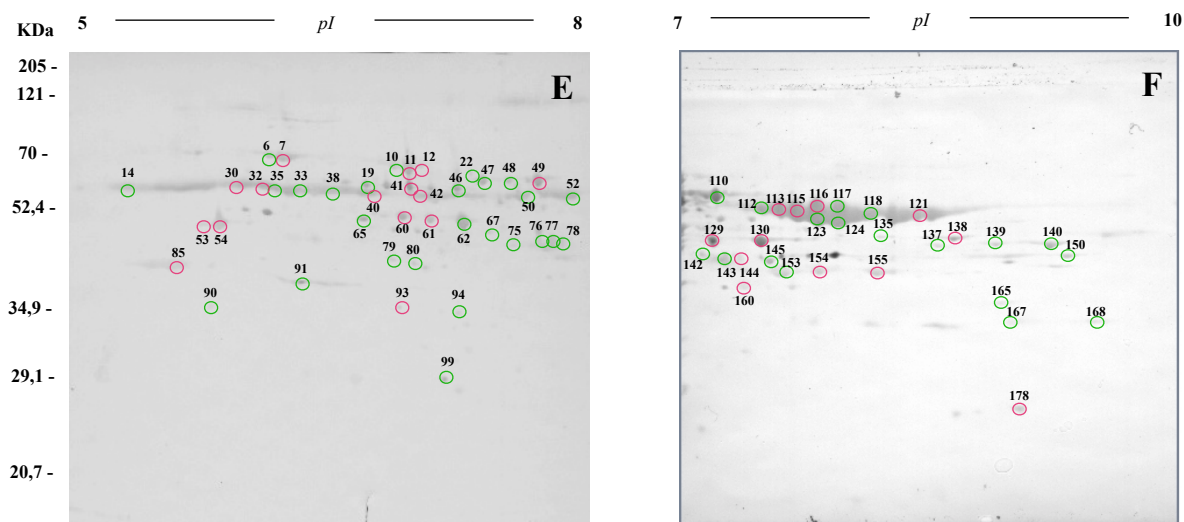
Se analizaron las imágenes 2D a esos mismos días p.i., las cuales revelaron un total de 87, 64 y 69 *spots* respectivamente. Esto representa un rango de reconocimiento del 20,37 % para el día 21 p.i., 14,98 % para el día 42 p.i. y de 16,16 % para el día 98 p.i..

El análisis por inmunotransferencia de las infecciones experimentales fue similar al de las infecciones naturales en cuanto a la distribución de los *spots* y ligeramente menor en términos de *spots* inmunogénicos. En infecciones experimentales se reconocieron solamente 17 *spots* (números: 13, 14, 16, 23, 44, 57, 79, 84, 90, 93, 98, 128, 157, 165, 169, 171 y 179). Los *spots* inmunogénicos que se expresan de los sueros de gallinas infectadas naturalmente y de gallinas infectadas experimentalmente, muestran un rango amplio de pesos moleculares y pI (entre 20-120 kDa y 5-10 kDa, respectivamente).

Los análisis de los sueros que corresponden al día 0 (controles negativos) no reconocieron ninguna proteína frente al AgSB en geles 2D (imagen no mostrada). Sólo se observaron diferencias mínimas en los geles analizados.

# ESTUDIO 4





**Figura 4.6.** Western Blot 2D de pH 5-8 (A, C y E) Y 7-10 (B, D y F) del extracto AgSb. *Spots* revelados por mezclas de sueros de gallinas infectadas experimentalmente con *A. galli* obtenidos a los 21 (A y B), 42 (C y D) y 91 días (E y F) p.i. Los círculos y números indican los *spots* antigénicos que se analizaron por espectrometría de masas para su identificación. Los *spots* indicados con un (○) fueron reconocidos por espectrometría de masas.

#### 4.5 Identificación de proteínas inmunoreactivas de *A. galli*

El emparejamiento de los *spots* revelados en los Western Blot con sus homólogos en los geles 2D teñidos con plata se realizó con el software *PDQuest*, de manera que todos los *spots* que contenían proteínas inmunógenas fueron escindidos de los geles 2D y enviados para su análisis por espectrometría de masas. Se enviaron 101 *spots* antigénicos de las infecciones naturales de gallinas, y 17 *spots* antigénicos de las infecciones experimentales de gallinas. De un total de 118 *spots* analizados se identificaron 31 proteínas (26,27 %), representando 16 proteínas diferentes.

En la Tabla 4.4 se muestran los nombres de las proteínas, sus pesos moleculares teóricos y experimentales, el código de acceso a la base de datos NCBI, el % de secuencia y el *Mascot score*. La mayoría de las proteínas identificadas mostraron diferentes isoformas (de 2 a 9). 15 de los 31 *spots* obtenidos, fueron identificados por sus similitudes con proteínas



homólogas de otras especies de nematodos (*Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyocaulus viviparus* y *Bursaphelenchus xylophilus*). Fueron identificados 9 *spots* por sus similitudes con la proteína de unión a lípidos ag-50 de *A. galli*, cuya secuencia protéica está disponible en la base de datos. 6 *spots* fueron identificados debido a ser similares a proteínas de otros grupos de metazoos y el *spot* último identificado por ser similar a proteínas de una proteobacteria.

La función molecular y los procesos biológicos relacionados con las 16 proteínas identificadas se muestran también en la Tabla 4.4. Considerando sus funciones moleculares, las proteínas fueron divididas en uno de estos grupos: estructurales, con función catalítica y proteínas de unión. Las proteínas con actividad catalítica fueron las más abundantes (11 proteínas); de estas, las enzimas glicolíticas eran las más representadas con 3 proteínas. Destacan también las proteínas de unión (3 proteínas) y 2 proteínas con actividad estructural.

Además, en la Tabla 4.4 se muestra el momento del experimento en el que cada *spot* ha sido reconocido por cada muestra de suero del experimento de gallinas infectadas experimentalmente (día 21 p.i., día 42 p.i. y/o día 98 p.i.). La mayoría de los *spots* identificados (20 de 31) fueron reconocidos en el día 21, 42 y 98 p.i.. 4 *spots* (números 103, 105, 107 y 133) se corresponden con la isoenzima 1 de la adenilato quinasa, hipotética proteína C44B7.10 y 2 enzimas de la propionil CoA carboxilasa fueron reconocidas específicamente en el día 21 p.i.. El *spot* 92 subunidad alfa del proteasoma fue específicamente reconocido en el día 42 p.i.

## ESTUDIO 4

Número de spot	Código de acceso NCBI	Proteína	Especie	Pm (kDa) Teor/exp	pI Teor/exp	% de secuencia	MASCOT score	Función molecular	Proceso biológico	Reconocimiento del tiempo (días p.i.)
<b>Actividad estructural</b>										
53	ABX82966	Actin variant 1	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	42,13/47,7	5,16/5,8	35	419	-	Mobilidad celular	21, 42, 96
54	BAI52958	Actina	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	40,47/47,4	5,66/5,9	32	244	-	Mobilidad celular	21, 42, 96
<b>Actividad catalítica</b>										
7	Q05893	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]- (Phosphoenolpyruvate carboxylase)	<i>Ascaris suum</i>	72,98/69,1	6,34/6,3	12	120	Liasa	Gluconeogénesis	21, 42, 96
11	Q05893	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>Ascaris suum</i>	72,98/67,7	6,34/7,0	9	133	Liasa	Gluconeogénesis	21, 42, 96
12	Q05893	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>Ascaris suum</i>	72,98/68,0	6,34/7,1	9	266	Liasa	Gluconeogénesis	21, 96
49	XP_001893113	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative	<i>Brugia malayi</i>	60.91/63,6	8,2/7,7	3	100	Oxidoreductasa	Metabolismo aeróbico	21, 42, 96
60	ACD75895	Enolase	<i>Dineutes sublineatus</i>	23,27/50,6	6,33/7,0	23	165	Liasa	Glicolisis	21, 42, 96
<b>Reconocimiento del tiempo (días p.i.)</b>										
61	ACD75886	Enolase	<i>Sialis sp. ALW-2008</i>	23,60/49,6	5,81/7,1	18	138	Liasa	Glicolisis	21, 42, 96
72	XP_001637526	predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i>	41,52/44,9	5,46/6,7	2	89	Deaminasa	Metabolismo nucleotídico	21,42
78	XP_001891892	Phosphoglycerate kinase	<i>Brugia malayi</i>	44,8/49,5	7,7/7,4	13	157	Transferasa	Glicolisis	21, 42, 96
129	XP_001891892	Fosfoglicerato quinasa	<i>Brugia malayi</i>	44,78/52,9	7,68/7,2	3	150	Transferasa	Glicolisis	42,96
89	ACB69605	Malato deshidrogenasa citosólico	<i>Neope bremeri</i>	14,65/42,0	8,65/7,4	12	118	Oxidoreductasa	Metabolismo aeróbico	21, 42, 96
95	XP_002014358	GL18993	<i>Drosophila persimilis</i>	31,07/32,0	6,32/7,2	11	102	Proteasa	Proceso catabólico de proteínas	42
103	XP_001894222	adenylate kinase isoenzyme 1	<i>Brugia malayi</i>	44,78/30,4	9,05/8,2	6	88	Transferasa	proceso metabólico del ATP	21
133	NP_495409	hypothetical protein C44B7.10	<i>Caenorhabditis elegans</i>	50,95/53,2	8,7/7,8	12	115	-	Proceso metabólico: Acetil-CoA	21
138	XP_001900957	Fumarasa	<i>Brugia malayi</i>	54,55/53,9	8,94/8,4	3	118	Liasa	Metabolismo aeróbico	21, 42, 96

## ESTUDIO 4

Número de spot	Código de acceso NCBI	Proteína	Especie	Pm (kDa) Teor/exp	pI Teor/exp	% de secuencia	MASCOT score	Función molecular	Proceso biológico	Reconocimiento del tiempo (días p.i.)
154	BAB68543	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Ascaris suum</i>	36,35/45,9	6,83/7,8	8	209	Oxidoreduc-tasa	Glicolisis	21, 96
155	BAB68543	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>Ascaris suum</i>	36,35/45,6	6,83/7,7	8	135	oxidoreduct-asa	Glicolisis	21, 42, 96
178	NP_102141	Adenylate kinase	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	21,16/30,5	5,61/8,7	10	89	Transferasa	proceso metabólico del ATP	21, 42, 96
<b>Proteínas de unión</b>										
30	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/57,8	7,76/6,0	36	308	Unión a lípidos	-	42,96
32	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/54,3	7,76/6,2	31	332	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
40	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/55,8	7,76/6,9	36	236	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
41	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/58,3	7,76/7,0	20	157	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
42	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/55,6	7,76/7,1	19	131	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
113	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/64,6	7,76/7,5	4	111	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
115	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/65,9	7,76/7,7	29	273	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
<b>Reconocimiento del tiempo (días p.i.)</b>										
116	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/65,2	7,76/7,8	34	288	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
124	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58,61/59,0	7,76/7,9	13	160	Unión a lípidos	-	21, 42, 96
83	AAP94889	MFP2b	<i>Ascaris suum</i>	41,40/40,9	6,27/7,4	10	123	Unión de metal iónico	Mobilidad del esperma	-
105	XP_002196217	PREDICTED: propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	<i>Taeniopygia guttata</i>	75,41/101,1	6,17/7,6	3	82	Unión a ATP	-	21
107	NP_509293	Propionyl Coenzyme A Carboxylase Alpha subunit family member (pcca-1)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	80,17/100,7	7,61/7,9	11	216	Unión a ATP	-	21

**Tabla 4.4.** Spots de proteínas antigénicas de AgSB reconocidas por mezclas de suero de gallinas infectadas naturalmente y experimentalmente con *A. galli* e identificados por espectrometría de masas: MALDI-TOF. Procesos biológicos en los que las proteínas del extracto antigénico de AgSB se encuentran involucradas según las bases de datos: *Gen Ontology* y *Swiss-Prot/Uniprot*.

## DISCUSIÓN

Las muestras de suero de aves infectadas experimentalmente, tomadas en los días 0, 21.42 y 91 días p.i. nos permitieron conocer el tiempo de evolución en el reconocimiento antigénico. El análisis del proteoma soluble de *A. galli* reveló cerca de 427 *spots*. Un 23,65 % de los *spots* fueron inmunolocalizados en Western Blot con sueros de gallinas infectadas naturalmente con *A. galli*. Finalmente, 31 *spots* fueron identificados por MS.

Según la base de datos, las proteínas inmunógenas identificadas fueron del tipo estructural, catalítico y con capacidades de unión. Las más representadas han sido aquellas con actividad catalítica (11 de las 16 proteínas identificadas). Todas ellas están relacionadas con diferentes rutas metabólicas, lo que sugiere la importancia que estas tienen para el parásito a la hora de obtener metabolitos y de generar energía. Se identificaron tres proteínas que forman parte de la glicolisis (enolasa, fosfoglicerato kinasa y GAPDH), una proteína que forma parte o interviene en la glicogénesis (fofoenolpiruvato carboxiquinasa) y dos que están involucradas en el ciclo de Krebs (malato deshidrogenasa y fumarasa). El resto de las proteínas inmunogénicas de este grupo están relacionadas con procesos del catabolismo y del metabolismo de aminoácidos o nucleótidos.

Estudios llevados a cabo en *A. suum* han revelado que la fosfoglicerato kinasa y la enolasa activan, *in vitro* la producción de óxido nítrico en células del hospedador (Andrade *et al.*, 2005). Recientemente, se ha propuesto a la proteína enolasa de *A. suum* como una posible candidata a convertirse en vacuna (Chen *et al.*, 2012). Además de esto, las tres proteínas glicolíticas (enolasa, fosfoglicerato kinasa y GAPDH) junto con la actina (actividad estructural), han sido relacionadas con proteínas de unión a plasminógeno en otros parásitos (Crowe *et al.*, 2003; Ramajo-Hermández *et al.*, 2007; Matta *et al.*, 2010; Boone *et al.*, 2011; Ghosh y Jacobs-Lorena, 2011; González-Miguel *et al.*, 2012). La activación del plasminógeno y su consecuente conversión a plasmina son los puntos clave del sistema fibrinolítico, proceso fisiológico responsable de la disolución de los coágulos de fibrina. Además, la actividad de la

fibrinolisis ha sido asociada con la degradación de las matrices extra-citoplasmáticas (Vassalli *et al.*, 1991), la cual se ha interpretado como un mecanismo que favorece la invasión celular y la migración intraorgánica en diferentes parásitos (Jolodar *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2004). Este hecho puede ser particularmente importante en un parásito como *A. galli*, cuyas larvas invaden la pared intestinal en una fase de su ciclo biológico, y vuelven después a la luz del intestino para completar su desarrollo.

Se han identificado numerosas isoformas de proteínas de unión a lípidos. Estas proteínas tienen funciones importantes asociadas con el transporte lipídico, señales celulares, transcripción genética y protección celular. Sus análogos funcionales en nematodos son la poliproteína alérgeno/antígeno de nematodo y las proteínas de unión de ácidos grasos y de ácidos retinoides. La proteína de unión a lípidos ag-50, también llamada Ag-lbp55, ha sido purificada y caracterizada recientemente por Jordanova *et al.* (2005). Su habilidad para unir cadenas largas de ácidos grasos ha sido estudiada por espectroscopía de fluorescencia. También se ha estudiado la inmunolocalización de la proteína indicando su localización extracelular y su abundancia. Los autores han llegado finalmente a relacionar la Ag-lbp55 con el tráfico y con la homeostasis de lípidos, así como con la modulación de la respuesta inmune en el hospedador. El gran número de isoformas identificadas en la proteína de unión a lípidos ag-50 sugieren que *A. galli* utiliza sistemas redundantes para asegurarse el funcionamiento de esta proteína (y probablemente de otras) y demuestran su importancia en los mecanismos de supervivencia del parásito.

Comparando estos resultados con otros obtenidos en diversos estudios de proteómica de nematodos parásitos, cabe resaltar la escasez de información que existe en la identificación de proteínas relacionadas con procesos como la detoxificación o la respuesta al estrés. Estas proteínas constituyen una parte importante de los antígenos que generan una respuesta inmune en parasitosis causadas por helmintos tisulares y sanguíneos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Oleaga *et al.*, 2009; González-Miguel *et al.*, 2010 a,b). Esto puede atribuirse a una limitación

de la técnica, pero también puede deberse a la localización intestinal de *A. galli* y la consecuente diferencia en el nivel de exposición a la respuesta inmune.

En el estudio 2 se midió la respuesta de anticuerpos IgG frente a antígeno somático de vermes adultos de *A. galli*. Se puede observar cómo esta respuesta de anticuerpos aumenta drásticamente el día 21 p.i., apreciándose una ligera disminución hacia el día 42 p.i. para seguir aumentando ligeramente el día 98 p.i. Las muestras de sueros de infecciones experimentales de gallinas nos permiten conocer la evolución temporal del reconocimiento antigénico en estos tres momentos de la infección. Los resultados de este estudio concuerdan con los del estudio 2, obteniéndose en este caso un total de 169, 132 y 155 *spot* inmunogénicos confrontados con los respectivos sueros obtenidos los días 21, 42 y 98 días p.i. Cabe destacar el gran número de antígenos reconocidos en un estadio temprano de la infección, lo cual puede tener importancia desde el punto de vista del diagnóstico en un período en el que *A. galli* todavía no ha alcanzado su forma adulta. Existen proteínas similares en los tres períodos estudiados, aunque la que se identifica con mayor frecuencia son las isoformas de las proteínas de unión a lípidos ag-50; citada anteriormente como una de las proteínas más abundantes en el proteoma de *A. galli* e importante en los mecanismos de supervivencia del parásito.







## **Histología de la infección por *A. galli***

El objetivo de este estudio fue identificar las lesiones asociadas al paso de las larvas por la mucosa intestinal y a la presencia de los vermes en la luz del intestino.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Aves utilizadas para el estudio**

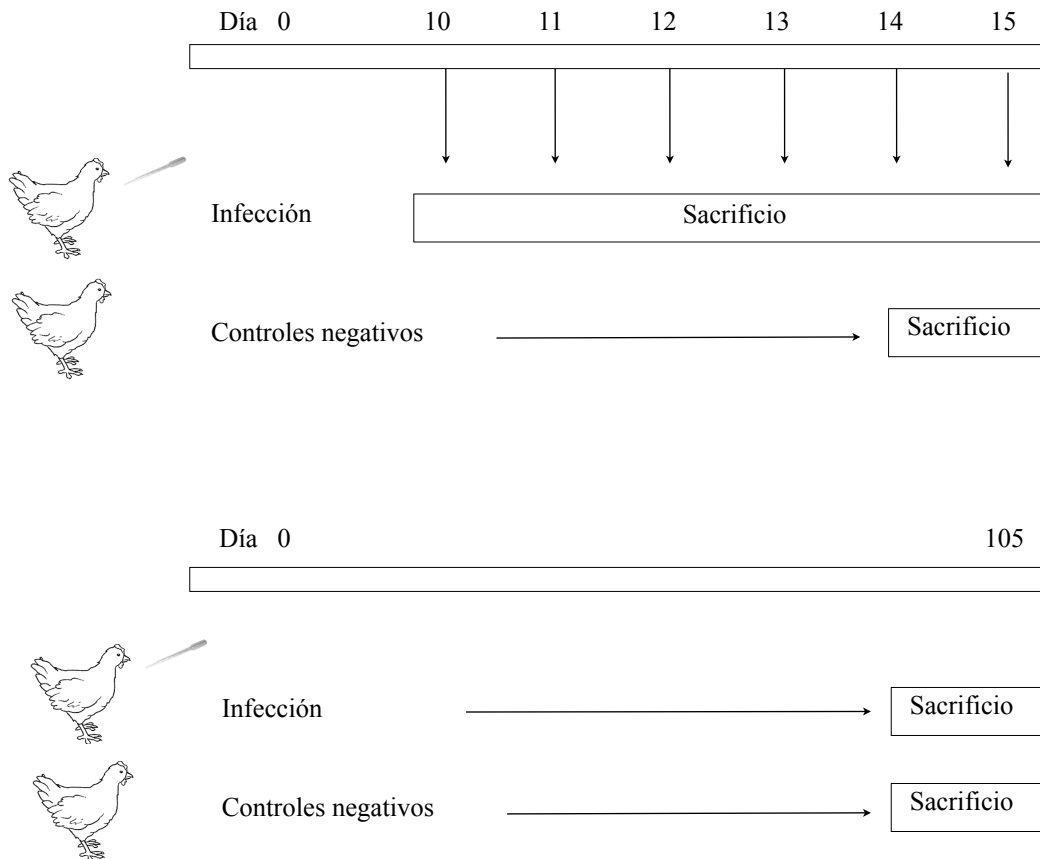
Para identificar las lesiones en la pared intestinal de las aves infectadas se emplearon 14 gallinas Lohmann Brown de 8 semanas de vida, que fueron suministradas por Ibérica de Tecnología Avícola (Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid). Los animales nacieron y fueron criados en condiciones libres de parásitos intestinales. La ausencia de estos se confirmó mediante análisis coprológico (metodología descrita en el apartado 1.3). De estas gallinas, 12 fueron infectadas experimentalmente y sacrificadas en los días 10-15 p.i. siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5, y 2 fueron mantenidas como grupo control y sacrificadas al final del experimento (día 15 p.i.).

También se emplearon gallinas Lohmann Brown de 18 semanas de vida que se infectaron experimentalmente, dejando que el parásito completara su desarrollo (105 días p.i.). Las muestras de estos intestinos corresponden a las aves del estudio 2.

Desde su nacimiento hasta su infección, las gallinas fueron mantenidas en condiciones libres de parásitos intestinales, lo que fue comprobado por medio de análisis coprológicos periódicos.

## 5.2 Obtención y preparación de muestras de tejido intestinal y tinción

Cada gallina se infectó con una dosis de 300 huevos embrionados de *A. galli* (día 0 del experimento). Las aves se sacrificaron diariamente de dos en dos entre los días 10 y 15 p.i. (Figura 5.1). Los controles negativos se sacrificaron al final del experimento. Se extrajeron los intestinos de cada ave y se seleccionaron las partes que mostraron más lesiones en un análisis macroscópico. También se procesaron los intestinos de las gallinas de 18 semanas y 105 días p.i.



**Figura 5.1.** Esquema que muestra el desarrollo del experimento.

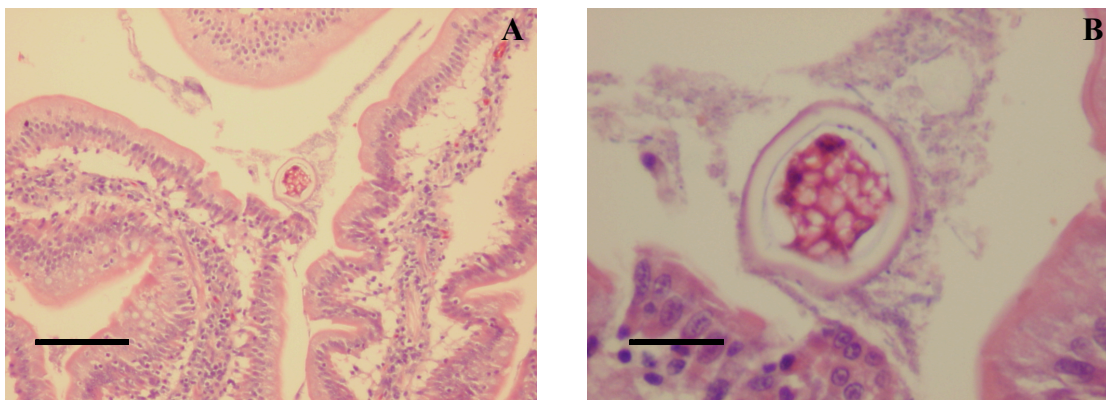
Se cortaron segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud y se fijaron con formaldehído tamponado al 4 % durante 24 horas. Los tejidos se deshidrataron sumergiéndolos en una serie de alcoholes de gradación creciente hasta llegar a alcohol etílico absoluto y seguidamente se pasaron varias veces por xileno. Posteriormente se incluyeron en parafina en una estufa a 60° C durante 24 horas, realizándose bloques que se cortaron posteriormente en secciones de 3  $\mu$ m de grosor con un microtomo. Seguidamente se depositaron los cortes en un portaobjetos de vidrio.

Una vez obtenidos los cortes se procedió a la tinción de los mismos mediante la técnica de hematoxilina-eosina: se procedió en primer lugar a eliminar la parafina con xilol y posteriormente se hidrataron mediante alcoholes de concentración decreciente (100°, 90°, 80° y 75°), pasando por último por agua destilada. A continuación se mantuvieron durante 4 minutos sumergidos en una solución de hematoxilina. Seguidamente se lavaron con agua corriente y se tiñeron con eosina durante 3 minutos. Posteriormente se deshidrataron mediante alcoholes de concentración creciente (75°, 80°, 90° y 100°) y se cubrieron con cubreobjetos empleando un medio de montaje *Tissue-Tek*.

## RESULTADOS

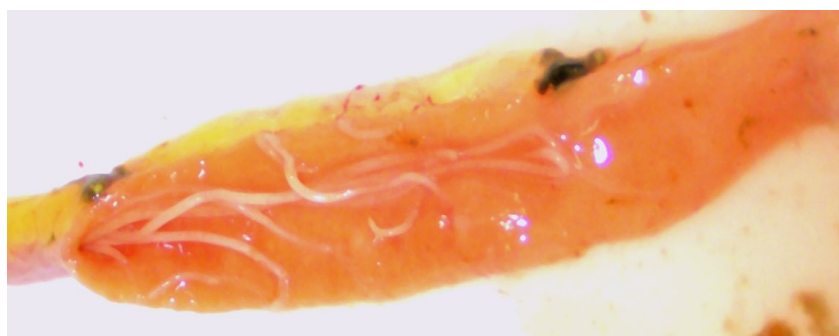
### 5.3 Estudio Histológico

En la Figura 5.2, obtenida entre los días 10 y 15 p.i., se encontró un verme cerca de la mucosa, probablemente una larva, rodeada de un material que podría ser mucosidad. La vellosidad más cercana está ligeramente dañada y en una posición inclinada que no es natural en las vellosidades sanas. Aún no se observa infiltrado de células inflamatorias.



**Figura 5.2.** Corte de intestino de gallina a los 15 días p.i. en el que se observa una sección de un verme. Posiblemente fases larvarias del parásito. (A) Barra: 200  $\mu\text{m}$ , (B) Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 5.3 se muestra el aspecto macroscópico del intestino de una gallina parasitada con pocos vermes a los 105 días p.i. A simple vista se observan zonas enrojecidas (hemorrágicas), aunque el aspecto general de la mucosa aparentemente no está muy alterado.

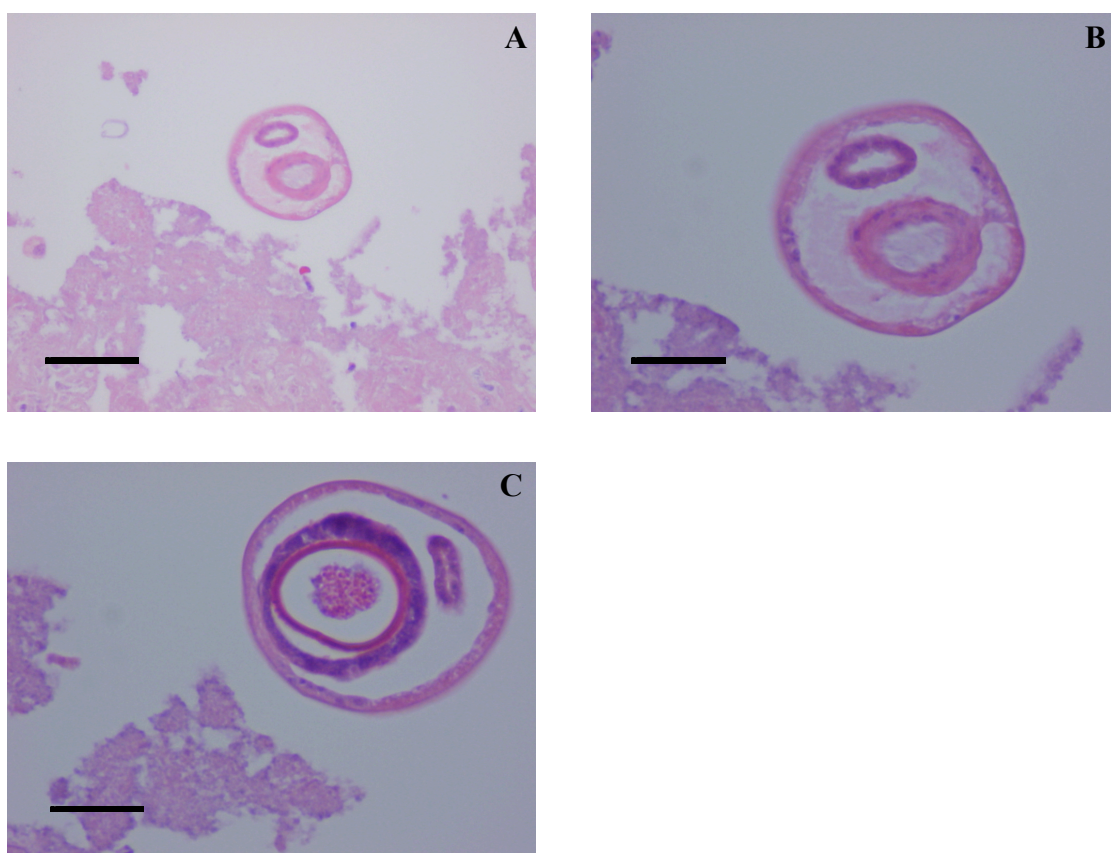


**Figura 5.3.** Aspecto macroscópico del intestino de una gallina parasitada el día 105 p.i., conteniendo 11 vermes adultos.

## ESTUDIO 5

---

En consonancia con la localización de los vermes en la luz del intestino, en la Figura 5.4 se observan cortes transversales, con distinta apariencia, de vermes adultos o en avanzado estado de maduración. Pueden corresponder a un solo verme cortado en distintos puntos, o a vermes distintos. La parte de la mucosa intestinal cercana al/los vermes aparece sin forma definida y claramente dañada.

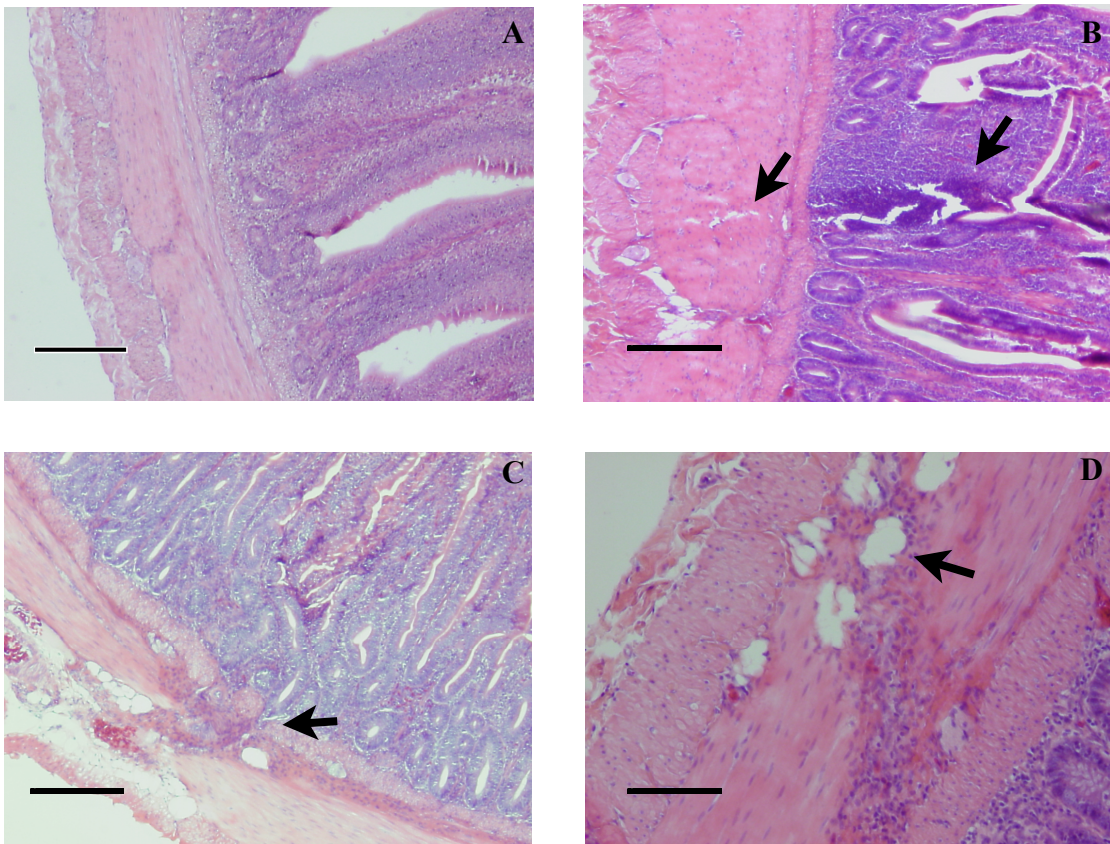


**Figura 5.4.** Corte de intestino de gallina infectada obtenido el día 105 p.i. en el que se observan secciones transversales de vermes nematodos, probablemente adultos de *A. galli*. (A) Barra: 100  $\mu\text{m}$ , (B) Barra: 50  $\mu\text{m}$  y (C) Barra: 50  $\mu\text{m}$ .



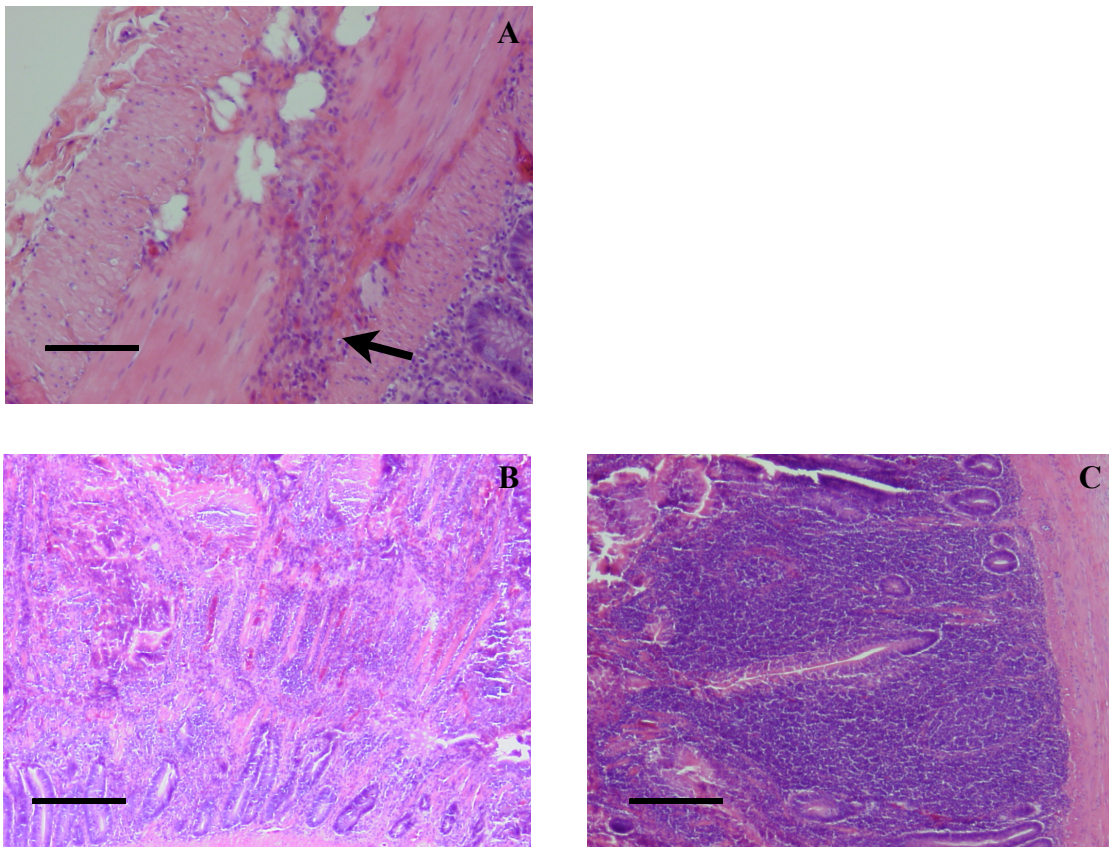
## ESTUDIO 5

En la figura 5.5 se presentan diversas fotografías tomadas el día 105 p.i., mostrando lesiones traumáticas, tanto en la mucosa como en la capa muscular, similares a trayectos causados por un cuerpo migratorio que ha dejado discontinuidades en los tejidos mucoso y muscular. La diferencia entre el aspecto de estos cortes y el de la pared intestinal de una gallina sana (Figura 5.5.A) son evidentes.



**Figura 5.5.-** Histología del intestino delgado de gallinas infectadas. (A) Pared intestinal y vellosidades de una gallina sana. (B, C y D) Lesiones traumáticas en el intestino delgado de gallinas infectadas, similares a las causadas por un cuerpo migratorio. En la Figura E la barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$  mientras que en las Figuras B, C, D, F y G es de 200  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 5.6 se muestran distintos aspectos de la reacción inflamatoria y sus consecuencias. Se aprecia una intensa infiltración leucocitaria en las inmediaciones de las lesiones traumáticas de la capa muscular que no se observa en las gallinas sanas. Hay también un intenso infiltrado de células inflamatorias en algunas criptas. Además, la capa mucosa está completamente alterada: las vellosidades han desaparecido en ciertos tramos del intestino y se observan zonas hemorrágicas que sugieren lesiones vasculares. Los leucocitos más abundantes son linfocitos y macrófagos. Al igual que en las lesiones traumáticas, no se observan infiltrados inflamatorios en el intestino de las gallinas sanas (Figura 5.5.A).



**Figura 5.6.** Infiltrado de células inflamatorias en las lesiones traumáticas y en las criptas. (A) Zonas con intenso infiltrado. (B) Capa de mucosa totalmente alterada en la que se aprecian áreas hemorrágicas y desaparición de las vellosidades intestinales. (C) Intenso infiltrado inflamatorio en la zona basal de la capa mucosa intestinal. En la Figura A la barra corresponden a 100  $\mu\text{m}$  mientras que en las Figuras B y C es de 200  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSIÓN

La ascaridiasis aviar es reconocida, desde hace décadas, como una parasitosis grave que altera la estructura y función del intestino de las aves y causa importantes pérdidas económicas en las explotaciones aviarias (Ruff, 1999). Sin embargo, son muy escasos los estudios de histología que se han realizado para describir las alteraciones anatomopatológicas causadas por *A. galli* (Lalchandama, 2010; Balqis *et al.*, 2013)

En nuestro estudio hemos incluido muestras histológicas de intestino de gallinas infectadas experimentalmente con huevos de *A. galli*, obtenidas los días 10 a 15 p.i. y 105 p.i. La razón para elegir estos tiempos después de la infección reside en que las fases de desarrollo endógeno del parásito que se han relacionado con los daños más importantes y aparentes, son la emigración de las larvas a través de la pared intestinal y la presencia de los adultos en la luz del intestino. De hecho, los estudios de Ackert (1923) y Guberlet (1924) indicaban que las aves infectadas morían de irritación intestinal y toxemia entre los días 10 y 12 p.i. y que el día 14 p.i. era el momento en que se notaba un mayor deterioro de las aves (Ackert y Herick, 1928). Los síntomas de debilidad, abatimiento y palidez se señalaron entre los días 10 y 17 p.i. en el trabajo realizado por Tugwell y Ackert (1952), que sugirieron que estos signos coincidían con el momento en que la mayoría de los vermes se localizaban en la mucosa intestinal. No obstante, no encontramos en ninguno de estos trabajos evidencias gráficas de la presencia de las larvas en la pared intestinal, ni de sus consecuencias. Esta presencia se puso de manifiesto en otros estudios experimentales mucho más recientes, en los que se realizaron infecciones experimentales de pollitos con elevadas dosis de huevos embrionados del parásito (del orden de 20.000 huevos por ave). En estos trabajos se presentaron fotografías de larvas en la pared intestinal el día 3 p.i. (Luna-Olivares *et al.*, 2010) y los días 3, 5 y 7 p.i. (Ferdushy *et al.*, 2012). Dichos trabajos no estaban publicados cuando realizamos el presente trabajo. Es probable que la ausencia de larvas en la pared intestinal en los cortes que realizamos se deba a que nuestro estudio se llevó



a cabo en una fase tardía de la emigración larvaria, cuando las larvas han retornado ya a la luz del intestino, siguiendo las indicaciones de los trabajos antiguos antes citados. Serían necesarios nuevos estudios para determinar con claridad el período de emigración larvaria y reconsiderar, en su caso, la descripción del ciclo. No obstante, son claramente distinguibles lesiones traumáticas que afectan a la mucosa y a la capa muscular, relacionables con el paso de un cuerpo extraño a través de dichos tejidos. Junto a ellas, es también claramente distinguishible un infiltrado leucocitario inflamatorio en el entorno de esas lesiones y en otras partes. Ambos hechos son consistentes con la infección helmíntica y con la emigración de las fases larvarias. Existen zonas en las que la estructura natural del tejido está completamente alterada, habiendo desaparecido las vellosidades y mostrando aspecto hemorrágico, aunque en nuestro estudio, este aspecto se observó en zonas bien delimitadas y no era generalizado. De acuerdo con esta valoración, durante el tiempo del experimento, las aves infectadas no presentaron diferencias significativas respecto de las aves control, en cuanto al peso y número de los huevos puestos. Es muy probable que, como ya se indica en otras partes de esta memoria, una baja carga parasitaria en el intestino (como es el caso de las infecciones aquí presentadas), junto con una alimentación apropiada (Permin y Ranuig, 2001), sean la causa de que no aparezcan signos graves de la enfermedad. Esto es una evidencia indirecta de que un buen manejo de las aves puede contribuir al desarrollo de una adecuada respuesta inmune humoral y celular, cuya importancia en la limitación del desarrollo de los parásitos y consecuentemente en la intensidad de parasitación, está aún por determinar.



## CONCLUSIONES

---

CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

---

1. Los datos obtenidos muestran, por primera vez, que *Ascaridia galli* está presente de manera frecuente en las explotaciones avícolas del centro de España, en las cuales se ha reintroducido la forma de cría “clásica”.
2. Se pone de manifiesto el desarrollo de una respuesta de anticuerpos frente a antígenos de huevos con L2 infectiva y de vermes adultos de *A. galli*. La técnica de ELISA con extracto antigénico de vermes adultos de *A. galli* se revela como muy útil para la detección precoz del parásito. Así mismo se identifican los polipéptidos incluidos en el intervalo de peso molecular de 45 a 54 KDa y de 75 a 120 kDa como posibles marcadores moleculares de la infección.
3. Se demuestra la transferencia de anticuerpos IgG específicos de gallinas infectadas a las yemas de los huevos de su puesta. La respuesta es detectable a partir de los 7 días p.i. y alcanza su máximo nivel entre los 15 y 35 días p.i. Los antígenos que contribuyen principalmente a esta respuesta poseen de 30 a 32 kDa y de 42 a 50 kDa.
4. La existencia de infección en las gallinas madres parece inducir una mayor susceptibilidad al parásito en la siguiente generación de pollitos nacidos de estas, en los que hay una carga parasitaria mayor, un aumento del número de huevos excretados en heces y un alargamiento del período de oviposición del parásito. Queda por determinar la incidencia real de estos hechos en la epidemiología de la ascaridiasis aviar en las explotaciones avícolas afectadas.

## CONCLUSIONES

---

5. El estudio del proteoma de *A. galli* mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas ha permitido la identificación de 16 proteínas en el antígeno somático de adultos de *A. galli*. La mayoría de ellas intervienen en procesos clave para la supervivencia del parásito como la generación de energía, la unión a y el transporte de lípidos y la unión al plasminógeno. El reconocimiento antigénico de estas proteínas es temprano, ya que ocurre fundamentalmente antes de la maduración de los vermes adultos. No sabemos el efecto real que dicho reconocimiento antigénico puede tener en la capacidad de supervivencia del parásito y si estas proteínas pueden estar relacionadas con el desarrollo clínico de la ascariasis aviar.
6. Se detectan lesiones traumáticas e infiltración inflamatoria en la pared intestinal de las gallinas infectadas experimentalmente con *A. galli*, relacionables con la emigración de las larvas y con la presencia de adultos. El hecho de que en las aves con estas lesiones no se detecte disminución de peso, ni de la puesta de huevos, ni de la existencia de síntomas y signos de la enfermedad, podría relacionarse con la baja carga parasitaria de las infecciones.

## BIBLIOGRAFÍA

---

BIBLIOGRAFÍA





### A

- Abdelqader, A., Gauly, M., Wollny, C.B.A., 2007.** Response of two breed of chickens to *Ascaridia galli* infections from two geographic sources. *Vet. Parasitol.* 145, 176-180.
- Abdelqader, A., Gauly, M., Wollny, C.B., Abo-Shehada, M.N., 2008.** Prevalence and burden of gastrointestinal helminthes among local chickens, in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 85, 17-22.
- Ackert, J.E., 1923.** On the habitat of *Ascaridia perspicillum* (Rud). *Anat. Records*, 26, 101-104.
- Ackert, J.E., Eric, C.A., 1928.** Effects of the nematodo *Ascaridia lineada* (Shneider) on growing chickens. *J. Parasitol.* 15, 1-15.
- Ackert, J.E., 1931.** The morphology and life history of the fowl nematodo *Ascaridia lineada* (Schneider). *Parasitology* 23, 360-379.
- Ackert, J.E., Beach, T.D., 1933.** Resistance of chickens to the nematodo *Ascaridia lineada*, affected by dietary supplements. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1, 51-58.
- Ackert, J.E., 1934.** Factors in the resistance of chickens to the nematodo *Ascaridia lineada* (Schneider). Department of Zoology Kansas State Agricultural University 161, 413-421.
- Ackert, J.E., Porter, D.A., Beach, T.D., 1935.** Age resistand of chickens to the nematodo *Ascaridia lineada* (Schneider). *J. Parasitol.* 21, 205-213.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ackert, J.E., Eisenbrandt, L.L., 1935.** Comparative resistance of Bronze Turkeys and White Leghorn chickens to the intestinal nematode, *Ascaridia lineada* (Schneider). J. Parasitol. 35, 200-204.
- Ackert, J.E., Edgar, S.A., 1938.** Goblet cells and age resistance to parasitism. J. Parasitol. 24, 13-14.
- Ackert, J.E., Edgar, S.A., Frick, L.P., 1939.** Goblet cells and age resistance of animals to parasitism. Trans. Am. Microsc. Soc. 58, 81-89.
- Ackert, J.E., 1947.** Soybean oil supplement effective in maintaining host resistance to Ascarids. Kuba 3, 92-94.
- Ackert, J.E., Dewhirst, L.W., 1950.** Resistance of fowls to parasitism affected by female sex hormone. J. Parasitol. 36, 16.
- AECA-WPSA, 2012.** Asociación Española de Ciencia Avícola, 49 Symposium Científico de Avicultura, 4-5 octubre, Barcelona.
- Alcaino, H., Gorma, T., 1999.** Textia. Parásitos de los animales domésticos en Chile. Parasitol. Día Ene. vol.23, no.1-2.
- Andersen, S., Jorgensen, R.J., Nansen, P., Nielsen, K., 1973.** Experimental *Ascaris suum* infection in piglets: Inverse relationship between the numbers of inoculated eggs and the numbers of worms established in the intestine. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 81, 650-656.
- Anderson, R.C., 1992.** Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CAB international. University Press, Cambridge, UK. pp 578.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Andrade, M.A., Siles-Lucas, M., López-Abán, J., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L., Muro, A., 2005.** Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 27, 235-242.

**Ashour, A.A., 1994.** Scanning electron microscopy of *Ascaridia galli* (Schrank 1788), Freeborn, 1923 and *A. columbae* (Linstow, 1903). *J. Egyptian Soc. Parasitol.* 24, 349-355.

**Augustine, P.C., Lund, E.E., 1974.** The fate of eggs and larvae of *Ascaridia galli* in earthworms. *Avian Dis.* 3, 394-398.

## B

**Balqis, U., Hambal, M., Darmawi, Utami, C.S., 2013.** Histopathological changes in intestine of chicken (*Gallus domesticus*) infected naturally by *Ascaridia galli*. Proceedings of The 3rd Annual International Conference Syiah Kuala University (AIC Unsyiah) In conjunction with The 2nd International Conference on Multidisciplinary Research (ICMR) October 2-4, Banda Aceh, Indonesia

**Bargmann, C.I., 1998.** Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028-2033.

**Baron, R.R., Hanse, M.F., Lord, T.H., 1960.** Bacterial flora of the roundworm *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) and its relationship to the host flora. *Exp. Parasitol.* 9, 281-292.

**Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 72, 248-254.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S., Marcilla, A., 2004.** Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. FEBS Lett. 563 (1-3), 203-206.

**Bestman, M.W.P., Wagenaar, J.P., 2003.** Farm level factors associated with feather pecking in organic laying hens. Livestock Production Science 80, 133-140.

**Blair, L.S., Klei, T.R., 1986.** Nematodo infections of domestic animals. Extraintestinal infections. In: W.C. Campbell and RS Rew (Editors), Chemotherapy of Parasitic Diseases Plenum Press, New Cork, NY, pp. 307-319.

**Boone, T.J., Burnham, C.A., Tyrrell, G.J., 2011.** Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. Microb. Pathogenesis 51, 255-261.

**Buxadé, C., 2000.** La gallina ponedora. Sistemas de explotación y técnicas de producción. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa.

## C

**Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R., Gassmann, M., 1999.** General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alpha. Faseb. J. 13, 81-88.

**Campbell, D.L., Makagon, M.M., Swanson, J.C., Siegford, J.M., 2015.** Litter use by laying hens in a commercial aviary: dust bathing and piling. Poultry Sci. Sep 8. pii: pev183.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Carlander, D., 2002.** Avian IgY antibody in vitro and in vivo. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Carlier, Y., Truyens, C., 1995.** Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. Parasitol. Today 11, 94-9.
- Castelló, J.A., Director de la Real Escuela de Avicultura. 2015.** Jornadas Profesionales de Avicultura, JPA, 9-12 junio, Soria.
- Chadfield, M., Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M., 2001.** Investigation of the parasitic nematode *Ascaridia galli* (Shrank 1788) as a potential vector for *Salmonella enterica* dissemination in poultry. Parasitol. Research 87, 317-325.
- Chauve, C., Filliat, C., 2001.** Les risques parasitaires en élevage biologique de volailles du genre *Gallus* et leur gestion. Bull. Group Tech. Vét. Hors-Série Elevage Agric Biol. 95-98.
- Chen, N., Yuan, Z.G., Xu, M.J., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Zhang, Y.Z., Wang, X.W., Yan, C., Lin, R.Q., Zhu, X.Q., 2012.** *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. Vaccine 30, 3478-3482.
- Cook, M.E., 1989.** Nutrient modulation of the avian immune system. Proc. Maryland Nut. Conf., pp. 6-13.
- Cook, M.E., 1995.** Nutricional control of immune-induced depresión of food intake and growth. Proc. 30th Nat. Mtg. Poultry Hlth. Process., pp. 16-22.
- Cordero de Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A., 1999.** Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana.

**Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A., Booth, N.A., 2003.** *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 47, 1637-1651.

**Cuca, M., Todd, A.C., Sunde, M.L., 1968.** Effects of levels of calcium and lisen upon growth of *Ascaridia galli* in chicks. *J. Nutr.* 94, 83-88.

## D

**Dahl, C., Permin, A., Christensen, J.P., Bisgaard, M., Muhairwa, A.P., Petersen, K.M., Poulsen, J.S., Jensen, A.L., 2002.** The effect of concurrent infections with *Pasteurella multocida* and *Ascaridia galli* on free range chickens. *Vet Microbiol.* 86, 313-24.

**Dakkak, A., Houadfi, M.E., 1992.** Faune helminthique du poulet fermier (beldi) dans les régions du Gharb er de Zaer (Maroc). In: Pandey, V.S. y Demey, F. (Eds) Village poultry production in Africa. Rabat, Morocco May, pp. 121.

**Dhar, D.N., Sharma, R.L., 1978.** *Dictyocaulus filaria* in lambs, The effect of varying single infections on subsequent larval production. *Vet. Parasitol.* 4, 221-229.

**Dhar, D.N., Raina, O.K., 1987.** Establishment of *Ascaridia galli* in Betamethasone-treated chickens. *Vet. Parasitol.* 25, 67-73.

**Degen, W.G., Daal, N., Rothwell, L., Kaiser, P., Schijns, V.E., 2005.** Th1/Th2 polarization by viral and helminto infecton in birds. *Vet. Microbiol.* 105, 163-167.

**de Haas, E.N., Bolhuis, J.E., Kemp, B., Groothuis, T.G., Rodenburg, T.B., 2014.** Parents and early life environment affect behavioral development of laying hen chickens. Plos One Mar 6;9(6):e 90577.

**Dujardin, F., 1845.** Historie naturelle des helminthes ou vers intestinaux. Paris: Librairie Encyclopédique de Roret, xvi, 654, pp. 15.

## E

**Edgar, S.A., 1953.** A preliminary check list of parasites of some domestic fowls of Alabama Poul. Sci. 32, 949-952.

**Eigaard, N.M., Schou, T.W., Permin, A., Christensen, J.P., Ekstrom, C.T., Ambrosini, F., Cianci, D., Bisgaard, M., 2006.** Infection and excretion of *Salmonella enteritidis* in two different chicken lines with concurrent *Ascaridia galli* infection. Avian Pathol. 35, 487-93.

**Elliot, A., 1954.** Relationship of aging, food reserves, and infectivity of larvae of *Ascaridia galli*. Exp. Parasitol. Vol.3, Iss. 4, pp. 307-320.

**Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P., 1971.** Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzymelabelled antigen and antibody-coated tubes. Biochim. Biophys. Acta, 251, 427-434.

**Eshetu, Y., Mulualem, E., Ibrahim, H., Berhanu, A., Aberra, K., 2001.** Study of gastro-intestinal helminths of scavenging chickens in four rural districts of Amhara region, Etiopía. Revue Scientifique et technique international Office of Epizootics. Dec; 20, 791-6.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Euzeby, J., 1981.** Diagnostic Expérimental des Helminthoses Animales-Travaux Practiques d'Helminthologie Vétérinaire, Liure I,II. Edicion: Informations Techniques des Services Vétérinaires, Paris.

### F

**Fatih, M.Y., Ogbogu, V.C., Njoku, C.O., Saror, D.I., 1991.** Comparative studies of gastrointestinal helminths of poultry in Zaria, Nigeria. *Revue D'Élevage et de Médecin Vétérinaire des Pays Tropicaux.* 44, 175-177.

**Ferdushy, T., Nejsun, P., Roepstorff, A., Stig, M., Thamsborg, Niels, C., Kyvsgaard, 2012.** *Ascaridia galli* in chickens: intestinal localization and comparison of methods to isolate the larvae within the first week of infection *Parasitol. Res.* 111, 2273-2279.

**Foronda, P., Valladares, B., Rivera-Medina, J.A., Figueruelo, E., Abreu, N., Casanova, J.C., 2004.** Parasites of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) in Tenerife (Canary Islands) and their role in the conservation biology of the laurel pigeons. *Parasite* 11, 311-6.

**Foronda, P., Casanova, J.C., Figueruelo, E., Abreu, N., Feliu, C., 2005.** The helminth fauna of the barbary partridge *Alectoris barbara* in Tenerife, Canary Islands. *J. Helminthol.* 79, 133-8.

### G

**Gaafar, S.M., 1952.** Incidence of infection with the fowl nematode *Ascaridia galli* in Egyptian chickens. *Parasitology* 38, 84-85.

**Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., 2001.** Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. *Vet. Parasitol.* 96, 301-307.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- Gauly, M., Bauer, C., Preisinger, R., Erhardt, G., 2002.** Genetic differences of *Ascaridia galli* egg output in laying hens following a single dose infection. *Vet. Parasitol.* 103, 99-107.
- Gauly, M., Omán, T., Erhardt, G., 2005.** Age-related differences of *Ascaridia galli* egg output and worm burden in chickens following a single dose infection. *Vet. Parasitol.* 128, 141-148.
- Gauly, M., Duss, C., Erhardt, G., 2007.** Influence of *Ascaridia galli* infections and anthelmintic treatments on the behaviour and social ranks of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Vet. Parasitol.* 146, 271-280.
- Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., 2011.** Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. 1), 85-90.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Simón, F., 2010a.** Identification of *Dirofilaria immitis* immunoreactive proteins recognized by sera from infected cats using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174, 78-82.
- González-Miguel, J., Rosario, L., Rota-Nodari, E., Morchón, R., Simón, F., 2010b.** Identification of immunoreactive proteins of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* recognized by sera from patients with pulmonary and subcutaneous dirofilariosis. *Parasitol. Int.* 59, 248-256.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2012.** Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181, 134-140.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Gray, G.D., Gill, H.S., 1993.** Host genes, parasites and parasitic infections. *Int. J. Parasitol.* vol. 23, No. 4, pp. 485-494.

**Guberlet, J. E., 1924.** Notes on the life history of *Ascaridia perspicillum* (Rud). *Tr. Am. Mic. Soc.* 43, 152-156.

## H

**Haak-Frendscho, M., 1994.** Why IgY? Chicken Polyclonal Antibody, an Appealing Alternative. *Promega Notes Magazine* (46): 11.

**Hansen, M.F., Turner, D.S., 1954.** Importance of the *Ascaridia galli* egg shell to the infectivity of its larvae. *J. Parasitol.* 40, 17.

**Hansen, M.F., Terhaar, C.J., Turner, D.S., 1956.** Importance of the eggs shell of *Ascaridia galli* to the infectivity of its larva. *J. Parasitol.* 42, 122-125.

**Herd, R.P., McNaught, D.J., 1975.** Arrested development and the histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. *Int. J. Parasitol.* 5, 401-406.

**Heukeshoven, J., Dernick, R., 1985.** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.

**Hightower, A.W., Lammie, P.J., Eberhard, M.L., 1993.** Maternal filarial infection, a persistent risk factor for microfilaremia in offspring? *Parasitol. Today* Nov. 9, 418-21.

**Hodasi, J.K., M., 1963.** A note on *Ascaridia galli* in a hen's egg from Manitoba. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27, 100.

**Hohenberger, E., 2000.** On the contamination of runs of outdoor laying hens due to endoparasites. Universitaetsbibliothek der Veterinaermedizinischen, Universitaet Wien, Austria, pp. 46.

**Holden-Dye, L., Walter, R.J., 2006.** Actions of glutamate and ivermectin on the pharyngeal muscle of *Ascaridia galli*: A comparative study with *Caenorhabditis elegans*, Int. J. Parasitol. 36, 395-402.

**Hovi, M., Sundrum, A., Thamsborg, SM., 2003.** Animal health and welfare in organic livestock production in Europe: current state and future challenges. Livestock Production Science 80, 41-53.

## I

**Idi, A., Permin, A., Murrell, K.D., 2004.** Host age only partially affects resistance to primary and second infections with *Ascaridia galli* (Shrank, 1788) in chickens. Vet. Parasitol. 122, 221-231.

**Ikeme, M.M., 1970.** Retarded metamorphosis in larvae of *Ascaridia galli* following repeated challenge of poultry with infective eggs. Vet. Rec. 87, 725-726.

**Ikeme, M.M., 1971a.** Observations on the pathogenicity and pathology of *Ascaridia galli*. Parasitology 63, 169-179.

**Ikeme, M.M., 1971b.** Weight changes in chickens placed on different levels of nutrition and varying negrees of repeated dosage with *Ascaridia galli* eggs. Parasitology 63, 251-260.

**Ikeme, M.M., 1973.** The significance of ageand previous experience of repeated uptake of infective eggs of *Ascaridia galli* (Schrank 1788) on the epidemiology of ascaridiosis in teh domestic chicken. Warzawa 1, 359-368.

**Illescas, M.P., Rodríguez, M., Aranda, F., 1993.** Parasitacion of falconiform, strigiform and passeriform (*Corvidae*) birds by helminths in Spain. Research and Review in Parasitology 53, 129-135

## J

**Janczak, A.M., Riber, A.B., 2015.** Review of rearing-related factors affecting the welfare of laying hens Poult Sci. 94, 1454-69.

**Jansen, J., Pandey, V.S., 1989.** Observations on helminth parasites of domestic fowls in Zimbabwe. Zimbabwe Veterinary Journal 20, 15-17.

**Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S., Brattig, N.W., 2003.** Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. Biochim. Biophys. Acta 1627, 111–120.

**Jones, R.W., 1935.** An observation of an adult intestinal round-worm, *Ascaridia lineata* (Schneider), within a hen's egg. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science for 1935.

**Jordanova, R., Radoslavov, G., Fischer, P., Torda, A., Lottspeich, F., Boteva, R., Walter, R.D., Bankov, I., Liebau, E., 2005.** The highly abundant protein Ag-lbp55 from *Ascaridia galli* represents a novel type of lipid-binding proteins. J. Biol. Chem. 280, 41429–41438.

**Juhl, J., Permin, A., 2002.** The effect of *Plasmodium gallinaceum* on a challenge infection with *Ascaridia galli* in chickens. Vet. Parasitol. 105, 11-9.

## K

- Kates, K.C., Colglazier, M.L., 1970.** Differential morphology of adult *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) and *Ascaridia dissimilis* (Pérez Viguera 1931). Proceeding of the Helminthological Society of Washington 37, 80-84.
- Kerr, K.B., 1955.** Age of chickens and the rate of maturation of *Ascaridia galli*. J. Parasitol. 41, 233-235.
- Khan, R.W., Khan, M.M., Khan, S.A., 1994.** Prevalence and gross pathology of helminth infection in domestic fowls of Hyderabad District. Proceedings of Parasitology 17, 4-7.
- Kilpinen, O., Roepstorff, A., Permin, A., Norgaard-Nielsen, G., Lawson, L.G., Simonsen HB., 2005.** Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). Br Poult Sci. 46, 26-34.
- Kunjara, N.A.C., Sangvaranond, A., 1993.** Internal parasites of alimentary tracts of adult native chickens in North-Eastern part of Thailand. Kasetsart Journal: Natural Sciences 27, 324-329.
- Kurt, M., Acici, M., 2008.** Cross-sectional survey on helminth infections of chickens in the Samsun region, Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr 115, 239-42.
- Kutzer, E., 2000.** Zur kontamination der auslaeuße von freiland-legebetrieben mit parasitaeren objekten. Veterinaermedizinische Universitaet Wien.

### L

- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227 L, 680-685.
- Lalchhandama, K., 2010.** On the structure of *Ascaridia galli*, the roundworm of domestic fowl. *Sci. Vis.* 10, 20-30.
- Lapage, G., 1971.** Hut desing could damage pigs heath. *Outdoor Production*. London: a pig farming reference guide.: 33. *Parasitología Veterinaria*. Cía Edit. Continental. S.A. México, D.F. Mackinnon J.
- Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., 1997.** Biological control of gastro-intestinal nematodos-facts, future, or fiction?. *Vet. Parasitol.* 72, 479-492.
- Lazdina, M.A., Grinberga, M.A., 1978.** Effect of the pH of *Ascaridia galli* egg culture médium on the experimental infection in chickens. *Angrew Parasitol.* 19, 202-7.
- Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H., Paek, B., Chae, H., Sim, J., 1998.** Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Sci.* 77, 266-270.
- Lloyd, S., 1995.** In ecology of infectious diseases in natural populations (Grenfell, BT and Dobson AP., eds), Cambridge University Press, pp 327-361.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

**Luna-Olivares L., Kyvsgaard, N., Rimbaud, E., Pineda, N., 2006.** Prevalencia y carga parasitaria de helmintos gastrointestinales en gallinas de traspatio (*Gallus gallus domesticus*), en el municipio de El Sauce, Departamento de León, Nicaragua. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET, Vol. VII, N° 11, Noviembre/2006.

**Luna-Olivares, L.A., Ferdushy, T., Kyvsgaard, N.C., Nejsun, P., Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Iburg, T.M., 2012.** Localization of *Ascaridia galli* larvae in the jejunum of chickens 3 days post infection. Vet. Parasitol. 185, 186-193.

### M

**Madsen, H., 1952.** A study on the nematodes of *Danish gallinaceous* game-birds. Danish Review of Game Biology 2, 1-126.

**Madsen, H., 1962.** The so-called tissue phase in nematodos. J. Helminthol. 36, 143-148.

**Magwisha, H.B., Kassuku, A.A., Kyvsgaard, N.C., Permin, A., 2002.** A comparison of the prevalence and burdens of helminth infections in growers and adult free-range chickens. Trop. Anim. Health Pro. 34, 205-14.

**Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D., Selkirk, M.E., 1991.** Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge University Press.

**Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M., 2003.** Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat. Rev. Immunol. 3, 733-44.

**Malviya, H.C., Dwivedi, P., Varma, T.K., 1988.** Effect of irradiated *Ascaridia galli* eggs on growth and cell-mediated immune response in chickens. Vet. Parasitol. 28, 137-141.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Marcos-Atxutegi, C., Kramer, L.H., Fernandez, I., Simoncini, L., Genchi, M., Prieto, G., Simón, F., 2003.** Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for Wolbachia?. Vet. Parasitol. 28, 117-130.
- Marcos-Atxutegi, C., Gandolfi, B., Aragüena, T., Sepúlveda, R., Arévalo, M. Simón F., 2009.** Antibody and inflammatory responses in laying hens with experimental primary infections of *Ascaridia galli*. Vet. Parasitol. 6, 69-75.
- MARM, Anuario de estadística 2010.** Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Matta, S.K., Agarwal, S., Bhatnagar, R., 2010.** Surface localized and extracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. Biochim. Biophys. Acta 1804, 2111-2120.
- Maurer, V., Amsler, Z., Perler, E., Heckendorn, F., 2009.** Poultry litter as a source of gastrointestinal helminth infections. Vet. Parasitol. 161, 255-260.
- Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S, Lamm, M.E., 1993.** A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. Immunol. Today 14, 430-435.
- Medley, G.F., 2002.** The epidemiological consequences of optimisation of the individual host immune response. Parasitology 125, 61-70.
- Millán, J., Gortazar, C., Ballesteros, F., 2008.** Parasites of the endangered Cantabrian capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*): correlates with host abundance and lek site characteristics. Parasitol Res. 103, 709-12.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- Montes, P., Murcia, M., Zarco, Q., 1994.** Producción de anticuerpos anti progesterona a partir de yema de huevo de gallinas y de suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. *Vet. Méx.* 25, 117-125.
- Morgenstern, R., Lobsiger, Ch., 1993.** Health of laying hens in alternative systems in practice. Proceeding of the Fourth European Symposium on Poultry Welfare. Edinburgh, September 18-21, pp. 81-86.
- Mozgovoi, A.A., 1953a.** Essentials of nematology. In *Ascaridata of animals and man and the diseases caused by them*, Vol. II, Part I, K. I. Skrjabin (ed.). Academy of Sciences of the USSR, Moscow, pp. 352.
- Mozgovoi, A.A., 1953b.** Essentials of nematology. In *Ascaridata of animals and man and the diseases caused by them*, Vol. II, Part II, K. I. Skrjabin (ed.). Academy of Sciences of the USSR, Moscow, pp. 616.
- Mpoame, M., Agbede, G., 1995.** The gastrointestinal helminth infections of domestic fowl in Dechang, Western Cameroon. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 48, 147-151.
- Msanga, J.F., Tungaraza, R., 1985.** The incidence of external and internal parasites of indigenous poultry in Mwanza municipality, Tanzania. *Tanzania Veterinary Bulletin* 7, 11-14.
- Mungube, E.O., Bauni, S.M., Tenhagen, B.A., Wamae, L.W., Nzioka, S.M., Muhammed, L., Nginyi, J.M., 2008.** Prevalence of parasites of the local scavenging chickens in a selected semi-arid zone of Eastern Kenya. *Trop. Anim. Health. Prod.* 40, 102-109.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Mushi, E.Z., Binta, M.G., Chabo, R.G., Ndebele, R., Thibanyane, T., 2000.** helminth parasites of indigenous in Oodi, Kgatleng District, Botswana. J. S. Afr. Vet. Assoc. 71, 247-8.

### N

**Nilsson, O., Alderin, A., 1988.** Efficacy of piperazine dihydrochloride against *Ascaridia galli* in the domestic fowl. Avian Pathol. 17, 495-500.

### O

**Okela, C.A., 1989.** Prevalence of intestinal helminths in poultry farms in Anambra State, Nigeria. Bulletin of Animal health and Production in Africa. 37, 217-220.

**Okulewicz, A., Zlotorzyczna, J., 1985.** Connections between *Ascaridia galli* and the bacterial flora in the intestine of hens. Angew Parasitol. 26, 151-5.

**Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Pagés, E., Marcos-Atxutegi, C., Simón, F., 2009.** Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. Mol. Biochem. Parasitol. 166, 134–141.

**Olsen, O.W., Braun, C.E., 1980.** Helminth parasites of band-tailed pigeons in Colorado. J. Wildl. Dis. Vol. 16, No 1.

**Otaru, M.M.M., Nsengwa, G.R.M., 1985.** A study on the prevalence of gastrointestinal helminth parasites of local poultry in Mtwara. Tanzania Veterinary Bulletin 7: 20-25.

P

**Pemberton, D.J., Franks, C.J., Walter, R.J., Holden-Dye, L., 2001.** Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl1- $\alpha$ 2 in the function of the native receptor. *Mol. Pharmacol.* 59, 1037-1043.

**Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2006.** Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics* 6, 226–236.

**Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell J.S. 1999.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.

**Permin, A., Nansen, P., 1996.** Parasitological problems in organic poultry production. [Danish] Beretning Fra Statens Husdyrbrugsforsog. Danish Institute of Animal Science, Tjele, Denmark 729, 91-96.

**Permin, A., Rearman, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1997.** An investigation on different media for embrionation of *Ascaridia galli* eggs. *Helminthologia* 34, 75-79.

**Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1998.** *Ascaridia galli* infections in free-range layers fed on diets with different protein contents. *Br. Poult. Sci.* 39, 441-445.

**Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., Kold, J., Nansen, P., 1999.** Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poult. Sci.* 40, 439-43.

**Permin, A., Ranvig, H., 2001.** Genetic resistance to *Ascaridia galli* infections in chickens. *Vet. Parasitol.* 102, 101-111.

**Phiri, I.K., Phiri, A.M., Ziela, M., Chota, A., Masuku, M., Monrad, J., 2007.** Prevalence and distribution of gastrointestinal helminths and their effects on weight gain in free-range chickens in Central Zambia. *Trop. Anim. Health Prod.* 39, 309-15.

**Piergili, F., Veronesi, D.P.F., Diaferia, M., Franciosini, M.P., Proietti, P.C., 2005.** *Ascaridia galli*: A report of erratic migration. *Ital. J. Anim. Sci.* 4, 310-312.

**Poulsen, J., Permin, A., Hindsbo, O., Yelifari, L., Nansen, P., Bloch, P., 2000.** Prevalence and distribution of gastro-intestinal helminths and haemoparasites in young scavenging chickens in upper eastern region of Ghana, West Africa. *Prev. Vet. Med.* 45, 237-45.

**Prieto, G., McCall, J.W., Venco, L., Genchi, M., Simon, F., Genchi, C., 2001.** IgG response against infective larvae of *Dirofilaria immitis* in experimentally infected cats. *Vet. Res.* 32, 93-6.

## R

**Ramadan, H.H., Abou Znada, N.Y., 1991.** Some pathological and biochemical studies on experimental ascariidiasis in chickens. *Die Nahrung* 35, 71-84.

**Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2007.** *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp. Parasitol.* 115, 83-91.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Reid, W.M., Mabon, J.L., Harshbarger, W.C., 1973.** Detection of worm parasites in chicken eggs by candling. *Poult. Sci.* 52, 2316-2324.
- Reid, W.M., McDougald, L.R., 1997.** Cestodes and trematodes. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald L.R., Saif Y.M. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa pp. 850-864.
- Roberts, M.G., 1999.** The immunoepidemiology of nematode parasites of farmed animals: A mathematical approach. *Parasitol. Today* 15, 246-251.
- Roger, I., Rodríguez-Vivas, Cob-galera, Domínguez-Alpizar J.I., 2001.** Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. *Rev. Biomed.* Jan./Mar. vol.12, no.1.
- Rose, M., Orlans, E., Buttres, N., 1974.** Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
- Rothschild, M., Fleas, T C., 1957.** *Flukes and cuckoos; a study of bird parasites.* New York, Macmillan, pp. 183, 285.
- Ruff, M.D., Norton, R.A., 1997.** Nematodos and Acanthocephalans. In Calnek, B.W., Barnes, H.J., Barnes, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M., (Eds.) *Diseases of Poultry*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 815-850 .
- Ruff, M.D., 1999.** Important parasites in poultry production systems. *Vet. Parasitol.* 84, 337-347.

S

- Saad, M.B., El Sadig, A.A., Shammatt, A.M., 1989.** Helminth Parasites of the local breed of poultry in Kordofan Region. Sudanese Journal of Veterinary Science and animal husbandry 28, 54-55.
- Sadun, E.H., 1949.** The effect of single infections of variable size on the resistance of chickens to the nematode, *Ascaridia galli*. Am. J. Hyg. 49, 117-126.
- Salih, N.E., Saleem, K.M., 1987.** In Vitro hatching of the infective eggs of *Ascaridia galli* in tissue extracts. Vet. Parasitol. 24, 263-268.
- Schobries, Hvon., Schultz, L., Meyer, A., 1989.** Der Gesundheitsstatus individuell gehaltener Hühner. Monatshefter für Veterinar Medizin 44, 506-509.
- Schou, T., Permin, A., Roepstorff, A., Sorensen, P., Kjaer, J., 2003a.** Comparative genetic resistance to *Ascaridia galli* infections of four different commercial layer-lines. Br. Poult. Sci. 44, 182-185.
- Schou, T.W., Permin, A., 2003b.** The effect of Stalosan F on selected poultry parasites. Helminthologia 40,1.
- Schou, T.W., Permin, A., Juul-Madsen, H.R., Sørensen, P., Labouriau, R., Nguyễn, T.L., Fink, M., Pham, S.L., 2007.** Gastrointestinal helminths in indigenous and exotic chickens in Vietnam: association of the intensity of infection with the Major Histocompatibility Complex. Parasitology 134, 561-73.
- Schrank, P.F.Von., 1788.** Verzeichniss der bisher hinlänglich bekannten Eingeweidewürmer, nebst einer Abhandlung ubre ihre Anverwandtschaften. München, pp. 116.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Schürenberg, M., Luebbert, C., Eickhoff, H., Kalkum, M., Lehrach, H., Nordhoff, E., 2000.** Prestructured MALDI-MS Sample Supports. *Anal. Chem.* 72, 3436-3442.
- Sharma, R.K., Singh, K., Saxena, K.K., 1987.** The effect of piperazine adipate and parbendazole on the carbohydrate metabolism of *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinae*. *Angew Parasitol.* 28, 207-10.
- Sharma, J.M., 1997.** The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet. Hung.* 45, 229-38.
- Sharma, R.L., Dhar, D.N., 1979.** Population kinetics of primary *Oesophagostomum columbianum* infections in lambs. *Indian J. Anim. Sci.*, 49, 203-208.
- Sharma, R.L., Bhat, T.K., Hemaprasanth, 1990.** Anthelmintic of ivermectin against experimental *Ascaridia galli* infection in chickens. *Vet. Parasitol*, 37, 307-314.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Vorm, O., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. 2006.** In gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856-2860.
- Simón Vicente, F., 1956.** Estudio de las parasitosis de la ganadería de la provincia de Salamanca, y su profilaxis. Junta Provincial de Fomento Pecuario de Salamanca, Ministerio de Agricultura. Dirección General de Ganadería.
- Simpkin, K.G., Coles, G.C., 1981.** The use of *Caenorhabditis elegans* for antihelmintic screening. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 31, 66-69.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973.** Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman.

**Soulsby, E.J.L., Steward, D.F., 1960.** Serological studies of the self-cure reaction in sheep infected with *Haemonchus contortus*. Aust. J. Agric. Res. 11, 595-603.

**Soulsby, E.J.L., 1968.** Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Eds. Baillière, Tindall and Cassell (London).

**Springer, W.T., 1996.** Other blood and tissue protozoa. In: Calnek BW, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of Poultry. Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 900–911.

**Ssenyonga, G.S.Z., 1982.** Prevalence of helminth parasites of domestic fowl (*Gallus domesticus*) in Uganda. Trop. Anim. Health Prod. 14, 201-204.

**Suckau, D., Resemann, A., Schuereberg, M., Hufnagel, P., Franzel, J., Holle, A., 2001.** A novel MALDI LIF-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. Anal. Bioanal. Chem. 376, 952-965.

**Sunwoo, H., Le, E., Menninen, E.K., M. Zurres, M., Sim, J., 2002.** Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. J. Food Sci. 67, 1486-1494.

## T

**Tarbiat, B., Jansson, D.S., Höglund, J., 2015.** Environmental tolerance of free-living stages of the poultry roundworm *Ascaridia galli*. Vet. Parasitol. 209, 101-107.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999.** Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Vet. Parasitol.* 84, 169-186.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.L., 1979.** Diagnóstico de las helmintosis por medio del examen coprológico. Jansen Research Foundation, Laboratorios Dr. Esteve S.A.
- Tizard, I., 1982.** An introduction to veterinary immunology. 2nd Edition. W. B. Saunders. Philadelphia.
- Todd, A.C., Hollingsworth, K.P., 1951.** Host sex as a factor in development of *Ascaridia galli*. *Exp. Parasitol.* vol 1, Iss 3, pp 303-304.
- Todd, A.C., Crowds, D.H., Wyant, Z.N., 1952.** Experimental embrionation of the egg and development of *Ascaridia galli* in its chicken host. *Exp. Parasitol.* vol 1, Iss 2, pp 176-183.
- Todd, K.S., Mansfield, M.E., Dipietro, J.A., Blagburn, B.L., 1985.** Anthelmintic activity of ivermectin against immature gastrointestinal nematodes of sheep. *Am J Vet Res.* 46, 2354-2355.
- Tongson, M.S., McCraw, B.M., 1967.** Experimental ascaridiasis: Influence of chicken age and infective egg dose on structure of *Ascaridia galli* populations. *Exp. Parasitol.* 21, 160-172.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Tugwell, R.L., Ackert, J.E., 1952.** On the tissue phase of the life cycle of the fowl nematode *Ascaridia galli* (Schrank, 1788). *J. Parasitol.* 38, 277-288.

### V

**Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996.** *Veterinary Parasitology*, 2nd Edition, Blackwell Science Ltd., London, UK, pp. 307.

### V

**Vassalli, J.D., Sappino, A.P., Belin, D., 1991.** The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88, 1067-1072.

**Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E., 1978.** Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* 31, 507-520.

### W

**Warr, G., Magor, K., Higgins, D., 1995.** IgY: clues to the origin of modern antibodies. *Immunol. Today* 16, 392-398.

**Wehr, E.E., 1971.** *Enfermedades infecciosas y Parasitarias de las aves silvestres*. Ed. Acribia. Zaragoza.

**Winston, S.E., Fuller, S.A. and Hurrell, J.G.R., 1987.** *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., Eds.), *Western Blotting Vol. 2*, Wiley Interscience, MA., pp. 10.8.1–10.8.6.

**Wilson, K.I., Yazwinski, T.A., Tucker, C.A., Jonson, Z.B., 1994.** A survey into the prevalence of poultry helminths in Northwest Arkansas commercial broiler. *Avian Dis.* 38, 158-160.

## BIBLIOGRAFÍA

---

**Wilson, M.S., Maizels, R.M., 2004.** Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* 26, 35-50.

### Y

**Yadav, A.K., Tandon, V., 1991.** Helminth parasitism of domestic fowl (*Gallus domesticus L.*) in a subtropical high-rainfall area of India. *Beitr. Trop. Landwirtschaft. Veterinarmed.* 29, 97-104.

### Z

**Zhu, X., Passer, R.B., Chilton, N.B., 1998.** Differences in the 5.8s rDNA sequences among ascarid nematodes. *Int. J. Parasitol.* 28, 617-622.







## ABREVIATURAS

---

**μA:** Microamperio

**μg:** Microgramo

**μl:** Microlitro

**μm:** Micrometro

**2D SDS-PAGE:** Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

***A. galli:*** *Ascaridia galli*

**Ag SB:** Antígeno de *A. galli* procedente del sobrenadante

**Ag Sed:** Antígeno de *A. galli* procedente del sedimento

**ag-50:** Proteína de unión a lípidos de *A. galli*, también llamada: Ag-lbp55

**AgHL2:** Extracto antigénico de huevo embrionado con larva 2 infectante

**AgSA:** Extracto antigénico de vermes adultos de *A. galli*

**BSA:** Albúmina de suero bovino

***C. elegans:*** *Caenorhabditis elegans*

**C-:** Control negativo

**CHAPS:** Sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano

**cm:** Centímetro

**CNIC:** Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid

**D.O.:** Densidad óptica

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetracético

**ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay*)

**EPG:** Recuento de huevos del parásito en heces

**G1-MI:** Grupo 1 de pollitos que se infectaron, de madres infectadas

**G1-NI:** Grupo 1 de pollitos que se infectaron, de madres no infectadas

**G2-MIC-:** Grupo 2 de pollitos control negativo, de madres infectadas

**G2-NIC-:** Grupo 2 de pollitos control negativo, de madres no infectadas

**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**gr:** Gramo

## ABREVIATURAS

---

**HRP:** Peroxidasa de rábano

**IEF:** Isoelectroenfoque

**IFN $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$

**Ig:** Inmunoglobulina

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IgY:** Inmunoglobulina Y

**IL-13:** Interleucina 13

**IL-4:** Interleucina 4

**IPG:** Tiras de gradiente de pH inmovilizado

**kDa:** Kilodalton

**Khz:** Kilohercios

**L2:** Larva de 2<sup>o</sup> estadio de *Ascaridia galli*

**L3:** Larva de 3<sup>er</sup> estadio de *Ascaridia galli*

**L4:** Larva de 4<sup>o</sup> estadio de *Ascaridia galli*

**MALDI-TOF:** Ionización/Desorción láser favorecida por matriz-tiempo de vuelo

**mg:** Miligramo

**ml:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**MS:** Espectrometría de masas

**NCBI $n$ r:** Base de datos no resundante del *National Center for Biotechnology Information*

**nm:** Nanómetros

**PAUP:** *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*

**p.i.:** Días post infección

**PBS:** Tampón fosfato salino

**pI:** Punto isoeléctrico

**pm:** Peso molecular

**Respuesta Th2:** Respuesta T *Helper* 2



## ABREVIATURAS

---

**UPGMA:** Programa Unweighted Pair Group Method

**V:** Voltios

**x g:** Aceleración de la gravedad







### **Tampón general**

#### **Tampón fosfato (PBS) pH 7,2**

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro 1,07 gr  
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato 0,39 gr  
Cloruro sódico 8,5 gr  
Agua destilada hasta 1L  
Mantener a 4°C

### **Tampónes inhibidores de proteasas**

#### **EDTA 1 M**

EDTA: 2,92 g  
Agua ultrapura: 10 ml  
Ajustar a pH 8

#### **NEM 1 M**

NEM: 0,125 g  
Agua ultrapura: 1 ml

#### **Pepstatina A 1 mM**

Vial con 5 mg y añadir etanol 7,3 ml

#### **PMSF 0,33 M**

PMSF 581 mg  
Etanol 10 ml

#### **TPCK 0,1 M**

Vial con 100 mg y añadir etanol 2,8 ml

## **Tampones para ELISA de IgG e IgA**

### **Tampón carbonato pH 9,6**

Sodio carbonato anhidro 1,59 gr

Sodio hidrógeno carbonato 2,93 gr

Agua bidestilada hasta 1L

Mantener a 4°C.

### **Solución de lavado**

Cloruro sódico 8,5 gr

Tween<sub>20</sub> 0,5 ml

Agua destilada hasta 1L

### **Tampón diluyente**

Cloruro sódico 1,7 gr

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro 0,426 gr

Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato 0,078 gr

BSA 2 gr

Tween 20 0,05 ml

Agua destilada hasta 200 ml

Mantener a 4°C

### **Tampón OPD pH 5**

Ácido cítrico 1-hidrato 2,14 gr

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro 6,54 gr

Agua bidestilada hasta 200 ml

### **Tampón Tween 20**

Tween 20 0,5 ml

PBS estéril hasta 1L

**Ácido sulfúrico 3 N**

Ácido sulfúrico 95-98% 80 ml

Agua destilada 920 ml

**Tampón sustrato**

Tampón OPD pH 5 15 ml

OPD 0,0042 gr

Agua oxigenada 33% 0,006 ml

Mantener a 4° C.

**Solución postapizante 1X**

BSA 0,25 g r

PBS 25 ml

**Tampones para Western blot**

**Acrilamida 30% /Bisacrilamida 0,8%**

Acrilamida 29,02 gr

Bisacrilamida 0,8 gr

Agua bidestilada hasta 100 ml

**Tris 1 M pH 6,8**

Tris-aminometano 12,11 gr

Agua destilada Hasta 100 ml

**Tris 1,5 M pH 8,8**

Tris-aminometano 36,63 gr

Agua destilada hasta 200 ml

**Persulfato amónico (PSA) 10 %**

PSA 1 gr

Agua destilada 10 ml

**TRIS 2 M pH 6,8**

Tris-aminometano 24,22 gr

Agua bidestilada Hasta 100 ml

**Gel de poliacrilamida**

*Gel de electroforesis al 12% (20 ml/2 geles)*

Agua bidestilada 6,6 ml

Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0,8% 8,0 ml

Tris 1,5 M pH 8,8 5,0 ml

PSA 10% 0,2 ml

TEMED 0,008 ml

*Gel de carga (4 ml/gel)*

Agua bidestilada 2,7 ml

Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0,8% 0,67 ml

Tris 1,0 M pH 6,8 0,5 ml

PSA 10% 0,04 ml

TEMED 0,004 ml

**Tampón de transferencia 1X pH 8,3**

Glicina 14,26 gr

Tris-aminometano 2,4 gr

Agua destilada Hasta 1 L



**Tampón de electroforesis 1X pH 8,3**

Glicina 14,4 gr

Tris-aminometano 3,02 gr

SDS 1 gr

Agua destilada Hasta 1L

**Tampón de lavado**

Tween20 0,125 ml

PBS 300 ml

**Solución de bloqueo de la nitrocelulosa**

Tween20 0,300 ml

PBS 100 ml

BSA 0,5 gr

**Tampón diluyente**

Tween20 0,020 ml

PBS 100 ml

BSA 1gr

**Tampón de carga 4X**

b-mercaptoetanol 20  $\mu$ l

SDS 2 gr

Glicerol 10 ml

Tris 2 M (pH 6,8) 3,12 ml

Azul de bromofenol 1-2 mg

Agua bidestilada Hasta 25 ml

Glicina 14,4 gr

SDS 1 gr

Tris-aminometano 3,02 gr

Agua destilada hasta 1 L

### **Solución de revelado**

*Solución A:* PBS 40 ml

*Solución B:* 0,025 gr de 4-Cloro Naftol + 10 ml de Metanol

*Solución C:* la Solución B se añade lentamente sobre la Solución A manteniendo esta en agitación y antes de su uso se añaden 0,020 ml de agua oxigenada.

### **Tampones proteómica**

**Tampones de rehidratación** solución *stock*

#### **Tampón Urea**

Para un volumen de 25 ml:

- Urea 8 M: 12 g
- CHAPS: 1 g
- Agua (enrasar hasta): 25 ml
- Azul de bromofenol: trazas

#### **Tampón Urea/Tiourea**

Para un volumen de 25 ml:

- Tiourea 3,8 M: 12 g
- Urea 7 M: 10,5 g
- CHAPS: 1 g
- Agua (enrasar hasta): 25 ml
- Azul de bromofenol: trazas

Estas soluciones se guardan en alícuotas de 150  $\mu$ l a -20°C. Posteriormente y sólo en el momento de su utilización se añaden el DTT y los anfolitos.

**DTT solución *stock* 5 M**

DTT: 771 mg

Agua ultrapura: 1 ml

La concentración final es 100 x y se guarda a -20°C. Se añade 1 µl por cada 100 µl de tampón de rehidratación a utilizar en la electroforesis.

**Tampón de equilibrado solución *stock***

Para un volumen de 100 ml:

- Urea 6 M: 36 g
- SDS 2%: 20 ml (Añadir el SDS de una solución previa al 10% (2 gr SDS + 20 ml H<sub>2</sub>O))
- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,05 M: 25 ml
- Glicerol 30%: 20 ml
- Agua (enrasar hasta): 100 ml
- Azul de bromofenol: trazas

La solución *stock* de equilibrado se guarda en alícuotas de 5 ml a -20°C.

**Tampón para tinción Hematoxilina-Eosina**

**Carboxilol**

Xilol: 750 ml

Fenol: 250 ml

## A

4-Cloro-naftol: HRP Color development Reagent (BIO-RAD, 170-6534)

Aceite mineral (BIO-RAD, 163-2129)

Acetato sódico (SIGMA, S3272)

Acetonitrilo (calidad HPLC; MERCK)

Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (BRUKER DALTONIK)

Ácido cítrico 1-hidrato (PANREAC, 141018)

Ácido sulfúrico 95-98% (PANREAC, 141058.1611)

Ácido sulfúrico 95-98 % (PANREAC, 141058)

Ácido trifluoroacético 99.5% (SIGMA)

Acrilamida (PANREAC, 163309)

Adyuvante completo de Freud (SIGMA, F-5881)

Adyuvante incompleto de Freud (SIGMA, F-5506)

Agitador magnético Asincro (SELECTA)

Agitador magnético LAB-Mix 10 (HEIDOLF)

Agua oxigenada 33% (PANREAC, 141077)

Agujas y jeringuillas: OMNIFIX ®-F (BRAUN)

Anfolitos 3-10 *Bio-Lyte 3-10 Ampholyte* (BIO-RAD, 163-2094)

Anfolitos 5-8 *Bio-Lyte 5-8 Ampholyte* (BIO-RAD, 163-1192)

Anfolitos 7-10 *Bio-Lyte 7-10 Ampholyte* (BIO-RAD, 163-2093)

Autoclave (SELECTA MEDICLAVE)

Azul de Bromofenol (BIO-RAD, 161-0404)

## B

Balanza BL600 (SARTORIUS)

Balanza de precisión ACCULAB (SARTORIUS GROUP)

Bicarbonato amónico al 95% (SIGMA CHEMICAL)

Bisacrilamida (BIO-RAD, 1610200)

Bisturí estéril (AESCU LAP®, 24691)

Bolas de vidrio (LUIS APARICIO S.L.)

Bortex Janke & Kunkel, (IKA ®-LABORTECHNIK)

Botes de 200ml de capacidad (DUEROLAB, 202807)

β-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH, 51673-2)

## C

CHAPS (BIO-RAD, 161-0460)

Centricones *Centricon Centrifugal Filter Devices with YM-3* (MILLIPORE, AMICON)

Centrífuga refrigerada 5702 para eppendorfs (EPPENDORF)

Centrífuga refrigerada para tubos de 1,5ml: (JOUAN, BR4i)

Centrífuga SORVALL TC 6 (DU PONT)

Cloruro sódico (PANREAC, 141659)

Congelador de -20°: (IGNIS)

Congelador horizontal de -80°: MDF-393 *Ultra Low* (SANYO)

Contenedores de plástico de 100ml para la recogida de muestras de heces de las gallinas. (DELTALAB Eurotubo ®, 2012-03).

Cubreobjetos de 21 x 26 mm (MENZEL-GLAZER ® BB021026A1)

## D

Destilador DESA 0075 (POBEL)

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (PANREAC, 141679)

Dodecil sulfato sódico (SDS) (SIGMA-ALDRICH, L-5750)

DTT (DL-Dithiothreitol para electroforesis) (SIGMA, D9163)

## E

EDTA (inhibidor de proteasas) (SIGMA, ED-2SS)

EDTA (tinción de plata) (SIGMA, ED-134)

Electrotransferencia semi-seca, mediante el equipo Trans-Blot® SD Semi-Dry (BIO-RAD)

Eosina (PANREAC, 131299)

Eppendorfs de 1,5 ml (DELTALAB, 200400P)

Equipo MilliQ 165 PLUS (MILLIPORE)

Escáner GS-800™ *Calibrated Densitometer* (BIO-RAD)

Espectofotómetro *Microplate Reader-Benchmark* (BIO-RAD)

Espectofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD)

Espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (BRUKER DALTONIK)

Estufa 6060 (HARAEUS)

Estufa con agitación vigorosa (HARAEUS)

Etanol absoluto (EtOH) (PANREAC, 141086.1214)

## F

Fenol (PANREAC, 141322)

Formaldehido 4% tamponado a pH 7 (PANREAC, 252931)

Formaldehido 34-38% (PANREAC, 141328)

Formol tamponado (LABOLAN, 12001617)

Fotomicroscopio Olympus Provis AX70 equipado para microscopía a campo claro, campo oscuro, Nomarski y epifluorescencia con objetivos PlanApo 1.25x (N.A. 0.04) y UPlan Fl 4x (N.A. 0.13), 10x (N.A. 0.30), 20x (N.A. 0.50), 40x (N.A. 0.75) y 100x N.A. (0.6-1.3) (OLYMPUS OPTICAS Co., LTD)

Fuentes de alimentación Power Pac™ Basic (BIO-RAD)

Fuentes de alimentación Power Pac™ Universal (BIO-RAD)

## G

Glicerol (glicerina) (PANREAC, 141339)

Glicina (PANREAC, 141340)

Glutaraldehido 25% (PANREAC, 163857)

## H

Hematoxilina (SIGMA-ALDRICH 51275)

## I

IgA de cabra anti-gallina (SEROTEC, AAI28P)  
IgG de conejo anti-gallina (SIGMA, A-9046)  
Incubadora de huevos de gallina: modelo OK31 (OSAKA)  
Iodoacetamida (SIGMA, I6125)  
Isobutanol (PANREAC, 161089)

## K

Kit BCA (PIERCE, 23225)  
Kit DC protein Assay, (BIO-RAD, 500-0116)

## L

Lupa EZ4D (LEICA)  
Lupa S6E (LEICA)

## M

Marcador de pesos moleculares: prestained SDS-page (BIO-RAD, 161-0318)  
Membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® *Transfer Medium* (0,45 µm) (Bio-Rad 162-0115)  
Micropipeta 0,2-2 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)  
Micropipeta 1-10 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)  
Micropipeta 1-20 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)  
Micropipeta 10-100 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)  
Micropipeta 100-1000 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)  
Micropipeta multicanal 20-100 µl (SOCOREX, CALIBRA® *DIGITAL* 852)  
Microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V perforado (BRUKER DALTONIK)  
Microplacas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en V (GREINER BIO-ONE)  
Microscopio invertido (LEICA DM IRB)

Microscopio SE (NIKON)

Microtomo HM-310 (MICRON)

Mini Protean® II Cell (BIO-RAD)

Motor de búsqueda *Mascot* (MATRIX SCIENCE)

## N

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (BIO-RAD, 1610800)

NEM (N-Ethylmaleimide) (SIGMA, E-3876)

Nevera (KOXKA)

Nitrato de plata (PANREAC, 131459)

## O

Ortofenildiamina (OPD) (PANREAC, 254113)

## P

Papel *Whatman* (WHATMAN, 1001917)

Parafina (PANREAC, 253211)

PDQuest 2-D Analysis Software (BIO-RAD)

Pepstatin A (SIGMA, P-4265)

Persulfato amónico (PSA) (SIGMA-ALDRICH, A-3678)

Pipetas 10 ml (FALCON, 357551)

Pipetas 25 ml (FALCON, 357525)

Pipetas 5 ml (FALCON, 357543)

Pipetas Pasteur de 1 y 3ml (DELTALAB EUROTUBO ®, 905027)

Placas de cultivo de 24 pocillos: 24 Well Cell Culture Cluster N° 3524. (CORNING Inc. Costar ®, USA)

Placas de ELISA de Poliestireno de 96 pocillos, (COSTAR 3369, Corning Incorporated, EEUU)

PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (SIGMA, P-7626)

Portamuestras MALDI pretratado *AnchorChip* de 600 µm (BRUKER DALTONIK)



Portaobjetos 25x67x26 mm (MENZEL-GLASER, D-38116)

Programa *BioTools 3.0* (BRUKER DALTONIK)

Protean® IEF Cell (BIO-RAD, 165-4000)

## Q

Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD)

## R

ReadyPrep™ 2-D Cleanup kit (BIO-RAD, 163-2130)

Recipiente de plástico con asa (DUEROLAB, 195701)

Robot Proteineer DP (BRUKER DALTONIK)

## S

SDS (Dodecil sulfato sódico) (SIGMA, L4509)

Sodio carbonato anhidro (PANREAC, 141648)

Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato (PANREAC, 141677)

Sodio hidrógeno carbonato purísimo (PANREAC, 141638)

Software flexAnalysis 2.2 (BRUKER DALTONIK)

Solución de hematoxilina (BIOGENEX LABORATORIES, San Ramón, EEUU)

Sonicador VC 50 (VIBRA CELL™)

Sulfato de Zinc al 33% (PANREAC, 141787.1211)

## T

Tamiz analítico de tela metálica Zonytest de tamaño de poro de 0,300 mm

Thiourea (SIGMA, T8656)

Tinción de plata: kit comercial PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE HEALTHCARE)

Tiras 3-10 (IPG *Strips* 7 cm, pH 3-10) (BIO-RAD, 163-2000)

Tiras 3-6 (IPG *Strips* 7 cm, pH 3-6) (BIO-RAD, 163-2003)

Tiras 5-8 (IPG *Strips* 7 cm, pH 5-8) (BIO-RAD, 163-2004)

## ANEXOS

---

Tiras 7-10 (IPG *Strips* 7 cm, pH 7-10) (BIO-RAD, 163-2005)

Tiosulfato sódico (SIGMA, S6672)

TPCK (N-p-Tosyl-L-phenylalanine) (SIGMA, T4376)

Transfer Cell (BIO-RAD)

Tripa de diálisis: talla 6, Dia 27/32", 21,5 mm. MWCO 12-1400 Daltones.  
(MEDICELL INTERNATIONAL Ltd.)

Tris-aminometano (PANREAC, 141940)

Tubo al vacío de 3 ml para la extracción de sangre (VENOJECT, VT-053STK)

Tubo de 15 ml estéril (CORNING®, 430052)

Tubo de 15ml estéril (CORNING Inc., 430766)

Tubo de 50 ml estéril (BECTON DICKINSON, 352098)

TPCK (SIGMA, T-4376)

Tubo de policarbonato estéril (DUEROLAB, 91106)

Tubos de ensayo (DUEROLAB, 901075)

Tween 20% (PANREAC, 212312)

## V

Urea (BIO-RAD, 161-0730)

## W

*Wicks* (proteómica) (BIO-RAD, 165-4071)

## X

Xilol puro (PANREAC, 141769)

## Y

Yodoacetamida (SIGMA CHEMICAL)

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA  
TESIS DOCTORAL



## A Coprological and Serological Survey for the Prevalence of *Ascaridia* spp. in Laying Hens

J. R. MARTÍN-PACHO<sup>1</sup>, M. N. MONTOYA<sup>2</sup>, T. ARANGÜENA<sup>3</sup>, C. TORO<sup>3</sup>, R. MORCHÓN<sup>1</sup>, C. MARCOS-ATXUTEGI<sup>1</sup> and F. SIMÓN<sup>1,4</sup>

Addresses of authors: <sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Avda. Campo Charro s/n, 37007 Salamanca, Spain; <sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; <sup>3</sup>Ibérica de Tecnología Avícola (IBERTEC), Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid, Spain; <sup>4</sup>Corresponding author: Tel.: +34 923 294535; fax: +34 923 294515; E-mail: fersimon@usal.es

With 3 figures and 3 tables

Received for publication March 3, 2005

### Summary

*Ascaridia galli* is a common nematode found in the intestine of domesticated chickens. The objectives of the study were to conduct a coprological and serological survey on the prevalence of ascaridiosis in laying hens of commercial farms. The farms recently adopted a breeding programme, where the hens have access to outdoor pens. Different amounts of *Ascaridia* eggs were detected in five of seven studied farms, while the other two farms were found to be free from the parasite. Serological tests revealed a seroprevalence of 21.8% (range 7.6–95%). No positive serum samples were detected in the same farms with previous negative coprological analysis. Western blot analyses confirmed the results obtained by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test. In four experimentally infected hens, a progressive increase of the IgG antibody levels was observed, surpassing the cut-off point established for ELISA test 6 weeks post-infection. Serological tests are able to detect the infection before the eggs of the parasite appear in the faeces of infected hens, providing a useful tool to detect infections with *Ascaridia* spp. in avian farms.

### Introduction

*Ascaridia* spp. is one of the most widespread intestinal parasites found in avian farms. This nematode affects both domestic (chicken, turkey and goose) and wild (partridge, capercaillie, duck, pheasant and common buzzard) birds (Tarazona Vilas, 1999). Symptoms and signs like enteritis, diarrhoea and blood loss are associated with the presence of worms in the digestive tract (Simón Vicente, 1956). Other effects such as a decrease in the level of glycogen and protein in muscles are related to the parasite's capacity to survive on host metabolites (Ramadan and Abou-Znada, 1991). Consequences of infection include reduction in growth rates, weight loss and eventually death of affected individuals. Free ranging and floor breeding of laying hens and broilers facilitate the dissemination of the parasite among birds. These are infected by the ingestion of parasite eggs present in soil and litters, or by eating earthworms. Several studies on the epidemiology of *Ascaridia galli* from different parts of the world have been published in recent years: in Africa, estimates of incidence ranging between 24% and 69% have been reported (Mpoame and Agbede, 1995; Permin et al., 1997; Poulsen et al., 2000; Eshetu et al., 2001; Magwisha et al., 2002); in India, *A. galli*

was the most prevalent species in domestic fowls (Yadav and Tandon, 1991); in Arkansas (USA), the presence of *A. galli* in different farms of two commercial broiler companies was studied (Wilson et al., 1994); the parasite was observed in the 37.3% and 3.9% of the farms from each company respectively.

The current European rules related to the rearing of laying hens obliges farmers to maintain them on soil, after years of breeding in battery cages. From a parasitological point of view, this return to 'traditional' breeding, implies a considerable increase in the risk of infections by different agents like *A. galli*, the infective stages of which develop in the soil. A recent study by Permin et al. (1999) in farms of Denmark illustrates the influence of different breeding systems on the incidence of *A. galli* in laying hen populations. These authors observed that in free-range/organic systems the prevalence was 63.8%; in deep-litter systems 41.9% and in battery cages 5%. Thus, ascaridiosis is currently considered as an important economic problem (Gauly et al., 2000). Until now, diagnosis used to be carried out by the detection of eggs in faeces or through post-mortem examinations. This is only possible after the development of larvae or adult worms, when most damage from infection has already been done.

The aim of this paper is to report information on the epidemiology of ascaridiosis in laying hens from commercial farms and to explore the possibility of the early detection of *Ascaridia* spp. by serological tests as a first step in the implementation of control measures.

### Materials and Methods

#### Farms

The study was carried out in seven laying hen commercial farms of central Spain. In all farms, the hens were kept in production systems where they were in direct contact with the soil. In farm 1, the hens were housed in a farmyard with access to indoor areas. In the remaining six farms, the hens lived indoors with access to outdoor areas. In farm 5, the examined hens were the first flock on the farm given access to outdoor areas. The age of the hens from each farm is given in Table 1.

#### Sampling of faeces

Both individual and pooled faecal samples were randomly collected directly from the soil. On three of seven farms (2, 3

Table 1. Characteristics of hens studied and number and type of faeces and blood samples

Farm	Age of birds (weeks)	Type of faeces sample	No. of individual faeces samples	No. of blood samples
1	8	Pool	— <sup>a</sup>	18
2	28	Individual	20	15
3	29	Individual	8	15
4	34	Pool	— <sup>a</sup>	18
5	42	Pool	— <sup>a</sup>	33
6	55	Individual	20	21
7	64	Pool	— <sup>a</sup>	20

<sup>a</sup>In each of these pools, 10 analyses on different, randomly chosen faeces samples (1 g per pool), were performed.

and 6) individual faeces samples were taken, while in the other four (1, 4, 5 and 7) pooled faecal samples were collected (Table 1). In the latter, 10 different analyses of 1 g faeces per pool, were carried out at random.

### Blood samples

A total of 140 blood samples were taken from the seven flocks. The number of samples per farm is given in Table 1.

### Experimental infections

Four young Lohmann Brown hens (3 months of age) were orally infected using a plastic Pasteur pipette as described by Permin et al. (1997) with individual doses of 150 eggs of *Ascaridia* spp. Eggs were isolated from faeces and washed in 0.1% merthiolate and in sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2; five times) to eliminate the antiseptic solution (Guillén-Llera et al., 1986). After that, the eggs were incubated in PBS (pH 7.2) supplemented with streptomycin and nistatin, at 37°C and ambient light, until the appearance of infective larvae (17 days). Individual faeces and blood samples were taken before infection (week 1) and weekly until 9 weeks post-infection (week 10).

### Analyses

Faeces were analysed using the McMaster technique (Permin et al., 1997) to count the eggs/g faeces. Three levels of egg counts per gram of faeces (EPG) were used: low EPG (mean < 50 eggs/g faeces), medium EPG (50–100 eggs/g) and high EPG (> 100 eggs/g). For calculation of prevalence, each sample containing at least an egg was considered positive. The characterization of *Ascaridia* spp. eggs was made following Thienpont and Vanparijs (1979) and Euzeby (1981).

The analysis of somatic antigen was performed as follows: adult worms were washed, macerated and sonicated (three cycles of 70 kHz, 30 s) in sterile saline solution. The homogenate was centrifuged at 16 000 g for 30 min. The supernatant was dialysed against 0.01 N of PBS (pH 7.2). The protein concentration was measured (Bradford, 1976) and adjusted to 4 µg/µl final solution. All procedures were carried out at 4°C. The antigen was stored at –20°C until use. IgG antibodies were analysed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test performed as described by Prieto et al. (1997) with some modifications, on serum samples from farms and from experimentally infected hens. In brief, polystyrene microplates were

coated overnight at 4°C with 0.8 µg/well of somatic antigen from *Ascaridia* spp. adult worms, prepared as described by Simón et al. (1991). Serum samples were tested at 1:200 dilutions and an anti-chicken IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) was employed at 1:8000 dilution. Optical densities (OD) were measured at 492 nm using Easy-Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cut-off point (0.85) was obtained as OD arithmetical means (+ 3SD) for clinically healthy coprologically negative birds (farms 1 and 2). All serum samples that were found positive in the ELISA analysis, were also analysed by Western blot (WB), employing somatic antigen from *Ascaridia* spp. Serum samples from negative birds of the two farms in which no *Ascaridia* infections were observed (farms 1 and 2), were employed as negative controls. Western blot was carried out as described by Tsang et al. (1985). Proteins were separated on 12% gel slabs, in accordance with the method of Laemli (1970) in a Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Inc.). All samples were treated with 0.15 g dithiothreitol, 2% sodium dodecyl sulphate, 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol and 0.2% bromophenol blue. Samples were heated to 100°C for 3 min in a water bath and then transferred to nitrocellulose. Sera were used at 1:400 dilution. Anti-chicken IgG conjugated to horseradish peroxidase was employed at a 1:6000 dilution.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed to assess differences in IgG antibody response measured by the ELISA test among the hens from different farms. The non-parametric Kruskal–Wallis test and the multiple-comparison Dunn test were used to identify differences in the antibody levels between farms. Significant differences were defined as *P*-value of < 0.001 and < 0.05 respectively.

## Results

### Faeces analysis

*Ascaridia* eggs were detected in five of seven farms. The highest EPG (> 100 eggs/g faeces) were found in hens from farms 4 and 7, followed by farm 5 (50–100 eggs/g). In farms 3 and 6, the EPG were low (< 50 eggs/g). Farms 1 and 2 were found to be free of *Ascaridia* (Table 2).

In the farms in which individual faecal samples were taken (farms 2, 3 and 6), prevalences progressively increased with age of the birds (Table 2). In 28-week-old hens (farm 2), the parasite was not detected, while the prevalence was 12% in hens of 29 weeks of age (farm 3) and 25% in hens of 55 weeks (farm 6).

Table 2. Abundance: eggs per gram of faeces (EPG) and prevalence of *Ascaridia* spp. in the farms studied

Farm	Type of sample	EPG	Prevalence (%) <sup>a</sup>
1	Pool	0	–
2	Individual sample	0	0
3	Individual sample	Low	12
4	Pool	High	–
5	Pool	Medium	–
6	Individual sample	Low	25
7	Pool	High	–

<sup>a</sup>Percentage of faecal samples containing at least one egg of *Ascaridia*.

Table 3. Seroprevalences observed in each farm studied

Farm	Serum samples	Positive samples	Seroprevalence (%)
1	18	0	0
2	15	0	0
3	15	1	7.6
4	18	2	11.1
5	33	4	12.1
6	21	3	14.28
7	20	19	95

### Serological analyses

A total of 140 blood samples were analysed for IgG antibodies using an ELISA test. An overall seroprevalence of 21.8% was found. Considerable variation was observed among farms (Table 3). No positive results were obtained in farms 1 and 2 (these farms also had a negative EPG). Farms 3, 4, 5 and 6 had a seroprevalence of 7.6%, 11.1%, 12.1% and 14.28% respectively. Farm 7 had a seroprevalence of 95%. The reactivity level of the serum samples of each farm is shown in Fig. 1. The Kruskal–Wallis test showed statistically significant differences ( $P < 0.001$ ) in the median antibody responses, and the Dunn test defined significant differences among farms. Specifically, farm 7 showed significantly higher values compared with the other six.

The WB analysis was correlated with the data obtained by the ELISA test (Fig. 2). The serum samples that were positive in ELISA (OD 1.00–1.30) recognized polypeptides in the entire molecular range, with stronger intensity to those of approximately 210, 100–120 and 42–55 kDa. Serum samples with OD values near the cut-off, considered not positive for ELISA (OD 0.7–0.85), recognized bands between 38 and 133 kDa but with less intensity than positive sera. Serum samples from hens with clearly negative ELISA (OD  $> 0.3$ ) were negative for WB.

The evolution of the IgG antibody response in experimentally infected hens is shown in Fig. 3. A progressive increase in the OD was observed in the experiment, this increase being

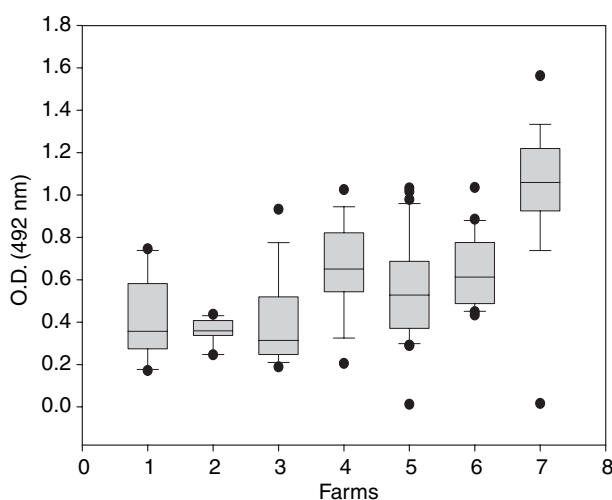


Fig. 1. IgG antibody response to *Ascaridia* spp. antigenic complex in the hens from the seven farms. Horizontal lines inside the boxes represent the mean optical density (OD). Vertical lines represent the standard deviations and points represent the outliers.

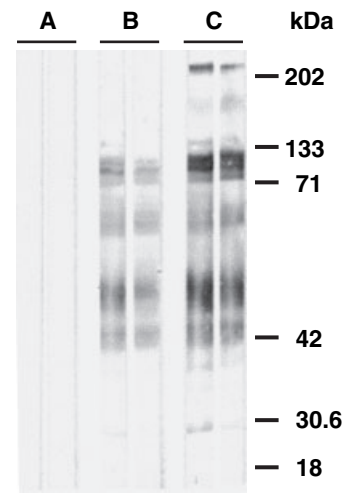


Fig. 2. Western blot analysis of antibody response of six representative serum samples against an antigenic complex from *Ascaridia* spp. adult worms. (A) Negative controls (OD  $< 0.3$ ). (B) Serum sample with ELISA reactivity close to the cut-off (OD 0.7–0.85). (C) Serum sample with positive-ELISA analysis (OD 1–1.3).

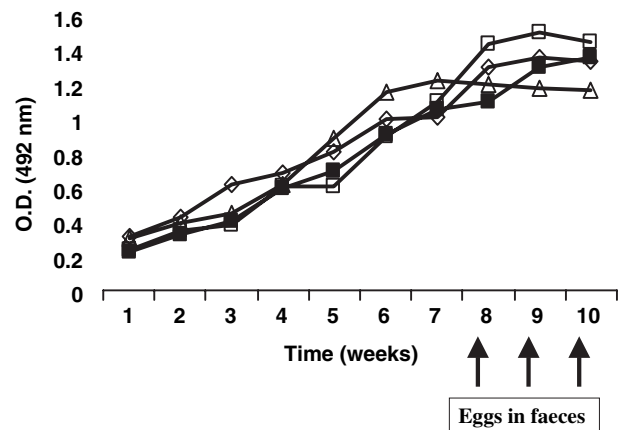


Fig. 3. Time course of IgG antibody response, measured by ELISA in four experimentally infected hens. Single doses of 150 eggs of *Ascaridia* spp. were administered to each hen. The presence of eggs in faeces was studied by weekly coprological analysis.

more intense between weeks 5 and 8 (4–7 weeks post-infection); afterwards, the reactivity remained high with very little changes until the end of the experiment. Eggs of *Ascaridia* were detected by week 8 (7 weeks post-infection), while by week 6 (5 weeks post-infection) all sera surpassed the established cut-off point (0.85).

### Discussion

*Ascaridia galli* is currently considered as an important economic and health problem in free-range commercial poultry production systems. We demonstrate that infections caused by *Ascaridia* spp. are frequent in avian farms in central Spain, where hens are maintained in the soil with eggs of the parasite having been found in five of seven farms studied. Differences in

EPG cannot be attributed either to different handling practices, because they were similar in all the farms, or to the age of the birds, because we have found similar EPG in hens with different ages (farms 4 and 7). Differences in EPG may be related to other factors such as the duration that hens have been kept on soil and the frequency with which the ground is cleaned. The data obtained in the three farms in which individual faeces samples were analysed show a clear increase in prevalence with the age of the hens. However, the results obtained demonstrated lower levels of infection than those observed in similar studies carried out in other European countries (Permin et al., 1999; Hohenberger, 2000). This could be because of the fact that the return to the soil breeding is a recent practice in the farms studied.

To our knowledge, serological tools for the diagnosis of avian ascariidiosis have not been applied until now. ELISA analyses performed with an adult-derived *Ascaridia* spp. antigenic complex confirm the data obtained by coprology. No seropositive cases were found in the two farms in which eggs of *Ascaridia* spp. were not seen. Positive results were found in each of the other five farms. In this case, no correlation was observed between the age of hens and their reactivity level, but a clear correlation between the seroprevalence and the age of the birds was observed. This could be because of the fact that the likelihood of contact with parasite eggs increases with time, as is clearly demonstrated by the fact that hens from farm 7 (64-week-old hens) had very high seroprevalence and a significantly higher antibody response than the younger ones from the other farms. Western blot analyses confirm data obtained by ELISA. Serum samples with high OD (above the cut-off point) recognize bands in the entire molecular range of the antigen employed, while negative sera with OD levels close to the cut-off only recognize, with less intensity, a limited number of bands. Finally, those with the lowest OD values did not recognize any bands. These data could permit, in the future, the isolation of molecular markers of infection. The results obtained in experimentally infected hens, despite the low number of individuals studied, show that parasite antigens stimulate the immune system of the birds early, providing a useful tool for the diagnosis like in other infectious diseases (Lobbedey and Schlatterer, 2003). This could be of great interest because preventive measures can be applied before the appearance of parasite eggs in the faeces of infected birds, avoiding the spread of the disease on the farms.

However, serological data must be evaluated with caution. During our study, we did not detect other nematode infections in analysed hens, but it is clearly necessary to refine the technique for use in those situations where *Ascaridia* coexists with other helminth species. On the contrary, OD values near the cut-off and therefore considered negative, could indicate a recent infection that has not yet established itself, or may suggest a past infection. These facts must be taken into consideration in future studies focused on the isolation of molecules from the antigenic complex employed.

In conclusion, the data presented show for the first time that *Ascaridia* may be frequent in laying hens from farms of central Spain where the 'classic' breeding has been recently adopted. Moreover, an ELISA test with *Ascaridia* somatic antigen has been shown to be useful in early detection of the parasite. Initial studies made using the WB technique have demonstrated that some polypeptides could serve as possible

molecular markers of infection. Nevertheless, further studies using antigens from different stages of *A. galli* are needed in order to refine serological tests for the detection of this parasite.

### Acknowledgements

This work has been supported by the Art. 83 LOU between Ibertec and the University of Salamanca. We thank Dr Laura Helen Kramer of the University of Parma (Italy) for the critical revision of the manuscript.

### References

- Bradford, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Eshetu, Y., E. Mulualem, H. Ibrahim, A. Berhanu, and K. Aberra, 2001: Study of gastro-intestinal helminths of scavenging chickens in four rural districts of Amhara region. *Rev. Sci. Tech.* **20**, 791–796.
- Euzéby, J., 1981: Diagnostic experimental des helminthoses animales. *Travaux pratiques d'helminthologie veterinaire. Edition 'Informations techniques des services veterinaires'*. Ministère de l'Agriculture, Paris.
- Gauly, M., C. Bauer, C. Mertens, and G. Erhardt, 2000: Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. *Vet. Parasitol.* **96**, 301–307.
- Guillén-Llera, J. L., C. Cuellar del Hoyo, and C. Aguila de la Puente, 1986: Fotodependencia del desarrollo embrionario de *Toxocara canis* (Werner, 1782) Stiles, 1905. *Rev. Ibér. Parasitol.* **46**, 67–74.
- Hohenberger, E., 2000: On the Contamination of Runs of Outdoor Laying Hens Due to Hen Endoparasites. *Universitaetsbibliothek der Veterinaermedizinischen, Universitaet Wien, Austria*, 46 pp.
- Laemli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lobbedey, L., and B. Schlatterer, 2003: Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and serum of their offspring. *J. Vet. Med. B* **50**, 81–85.
- Magwisha, H. B., A. A. Kassuku, N. C. Kyvsgaard, and A. Permin, 2002: A comparison of the prevalence and burdens of helminth infections in growers and adult free-range chickens. *Trop. Anim. Health Prod.* **34**, 205–214.
- Mpoame, M., and G. Agbede, 1995: The gastro-intestinal helminth infections of domestic fowl in Dschand, western Cameroon. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **48**, 147–151.
- Permin, A., H. Magwisha, A. A. Kassuku, P. Nansen, M. Bisgaard, F. Frandsen, and L. Gibbons, 1997: A cross-sectional study of helminths in rural scavenging poultry in Tanzania in relation to season and climate. *J. Helminthol.* **71**, 233–240.
- Permin, A., M. Bisgaard, F. Frandsen, M. Pearman, J. Kold, and P. Nansen, 1999: Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poultry Sci.* **40**, 439–443.
- Poulsen, J., A. Permin, O. Hindsbo, L. Yelifari, P. Nansen, and P. Bloch, 2000: Prevalence and distribution of gastro-intestinal helminths and haemoparasites in young scavenging chickens in upper eastern region of Ghana, West Africa. *Prev. Vet. Med.* **45**, 237–245.
- Prieto, G., L. Venco, F. Simón, and C. Genchi, 1997: Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections. *Vet. Parasitol.* **70**, 209–217.
- Ramadan, H. H., and N. Y. Abou-Znada, 1991: Some pathological and biochemical studies on experimental ascariidiosis in chickens. *Nahrung* **35**, 71–84.
- Simón, F., A. Muro, M. Cordero, and J. Martín, 1991: A seroepidemiologic survey of human dirofilariasis in western Spain. *Trop. Med. Parasitol.* **42**, 106–108.



- Simón Vicente, F., 1956: Estudio de las parasitosis de la ganadería de la provincia de Salamanca y su profilaxis. Ministerio de Agricultura, Dirección General de Sanidad, Salamanca, Spain, pp. 99–101.
- Tarazona Vilas, J. M., 1999: Ascariidiosis. In: Cordero del Campillo, M., and F. A. Rojo Vázquez (eds), *Parasitología Veterinaria*, pp. 791–794. McGraw Hill-Interamericana, Madrid.
- Thienpont, D., and O. Vanparijs, 1979: La Toxocarose en Europa occidentale. *Bull. Soc. Path. Exot.* **62**, 401–406.
- Tsang, V. C. W., G. E. Bers, and K. Hancock, 1985: Enzyme linked immunoelectrotransfer blot. In: Ngo, T. T., and H. M. Lenhoff (eds), *Enzyme Mediated Immunoassay*, pp. 389–414. Plenum Press, New York.
- Wilson, K. L., T. A. Yazwinski, C. A. Tucker, and Z. B. Johnson, 1994: A survey into the prevalence of poultry helminths in northwest Arkansas commercial broiler chickens. *Avian Dis.* **38**, 158–160.
- Yadav, A. K., and V. Tandon, 1991: Helminth parasitism of domestic fowl (*Gallus domesticus* L.) in a subtropical high-rainfall area of India. *Beitr. Trop. Landwirtschaft Veterinarmed.* **29**, 97–104.





## Antibody and inflammatory responses in laying hens with experimental primary infections of *Ascaridia galli*

C. Marcos-Atxutegi<sup>a</sup>, B. Gandolfi<sup>a,b</sup>, T. Arangüena<sup>c</sup>, R. Sepúlveda<sup>d</sup>, M. Arévalo<sup>e</sup>, F. Simón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Univerità degli Studi di Milano, scholarship Leonardo da Vinci, Spain

<sup>c</sup> Ibérica de Tecnología Avícola (IBERTEC), Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid, Spain

<sup>d</sup> Dpto. de Estadística, Universidad de Salamanca, Spain

<sup>e</sup> Dpto. de Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Salamanca, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 May 2008

Received in revised form 25 November 2008

Accepted 3 December 2008

#### Keywords:

*Ascaridia galli*

Antibody

Blood

Yolk

Inflammatory response

Intestinal mucous

### ABSTRACT

*Ascaridia galli*, an intestinal nematode that affects hens and other domestic and wild birds, causes economic losses in avian exploitations. The present work shows that *A. galli* stimulates a strong antibody response as well as an intense inflammatory reaction, in the intestinal mucous of experimentally infected Lohmann Brown laying hens. IgG antibodies against soluble extracts of *A. galli* embrionated eggs and adult worms, were detected in both blood and yolks eggs from infected hens during a period of 105 days after the infection. This indicates that hens transfer to their offspring a part of the IgG antibodies produced when they become infected. The antigens responsible for the stimulation of specific IgG were molecules of 30–34, 44–54 and 58–90 kDa, while in the yolk eggs of infected hens a reactivity directed against antigens of molecular weight ( $M_w$ ) lower than 50 kDa was detected. Histology revealed traumatic lesions with leukocyte infiltration, and inflammation of the intestinal wall of the infected hens after 105 days of initial infection.

The possible influence of the immune and inflammatory response on the population dynamics of the parasite is discussed.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In recent years, the changes in the consumer's demands have resulted in an increase of the number of laying hens kept in alternative production systems (Gauly et al., 2002). The environmental characteristics extant in these systems have resulted in a re-emergence of some helminthic infections, like ascaridiasis, caused by *Ascaridia galli* (Permin et al., 1997). This worldwide-distributed parasitic nematode locates itself in the small intestine of different domestic and wild birds (Chadfield et al., 2001). It is

responsible for economic losses due to the growth and weight reductions it causes in its hosts (Gauly et al., 2005). In traditional exploitations, that maintain birds in soil and in alternative systems, prevalence of ascaridiasis is high. For example, in traditional free-range systems of central Spain we have recently observed a mean seroprevalence of 21.8% (ranging from 7.6% to 95%) (Martín-Pacho et al., 2005). Prevalence is also high in other countries, such as Austria, where the 64.1% of 609 laying hens analyzed eliminate eggs of *A. galli* in their feces (Hohenberger, 2000). In Denmark, the prevalence of *A. galli* in chickens raised in free-range systems was 63.8%, 41.9% in deep litter systems, 37.5% in backyard system, and 55% in battery cage systems (Permin et al., 1999).

*A. galli* has a direct life cycle. Infection occurs when hosts ingest embrionated eggs. Afterward, L3 invade the intestine wall where they moult to L4. Adult worms

\* Corresponding author at: Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Avda. Campo Charro s/n, 37007 Salamanca, Spain.  
Tel.: +34 923 294535; fax: +34 923 294515.

E-mail address: [fersimon@usal.es](mailto:fersimon@usal.es) (F. Simón).

mature in the intestinal lumen where fertilized females produced unembryonated eggs that are excreted in the feces of infected birds (Ackert, 1931; Todd and Crowder, 1952; Araujo and Bressan, 1977; Chadfield et al., 2001). The immune response developed by hosts against ascarid worms and its impact on the regulation of intestinal helminth populations have been extensively studied in mammals (Cooper et al., 2000; Miquel et al., 2005). In avian ascariidiasis, studies on the population dynamics of *A. galli* have been conducted to investigate the possible existence of host genetic or age related resistance to the parasite. Some studies indicate that the age of birds has a limited role in resistance to the infection (Idi et al., 2004), while hormonal and immune status related to laying activity seems to have a negative impact on resistance (Gauly et al., 2005). Recently, it has been demonstrated that chickens experimentally infected with *A. galli* eggs, develop a typical Th2-type cytokine pattern, 14 days post-infection (p.i.) (Degen et al., 2005). Nevertheless, as far as we know, no studies have been conducted to identify the specific antibodies and cells involved in the response against *A. galli*.

The objective of this study is to determine the dynamics of the IgG antibody response against larval and adult *A. galli* antigens in primary infections of Lohmann Brown laying hens, and to correlate this response to the parasitologic characteristics of the infection, as well as to provide initial data on the inflammatory alterations caused by the parasite in the intestine of infected birds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites

*A. galli* eggs were recovered from the uteri of gravid female worms, obtained from naturally infected hens. Eggs were incubated at 20 °C in a 4% potassium-bichromate solution until they became infective, according to the procedure of Gauly et al. (2002).

### 2.2. Experimental infections

Twelve 18 weeks old, Lohmann Brown laying hens (procured from Ibertec, Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid), born and raised in helminth free conditions, were employed. The absence of helminth parasites was confirmed by faecal analysis. The hens were orally infected using a plastic Pasteur pipette as described by Permin et al. (1997) with individual doses of 250 eggs of *A. galli*. Six hens were maintained uninfected as negative control. All animals received water and food “ad libitum”. They were followed on a daily basis and examined clinically for signs of the disease. Individual fecal and serum samples were collected before the infection (day 0), and weekly until the end of the experiment, 105 days p.i.

Eggs produced by hens were also collected during the experiment. Yolks were separated, mixed 1:2 in a 0.1 M PBS pH 7.2 solution and stored at –20 °C, until used.

On day 105 of the experiment, all hens were slaughtered and the gastrointestinal tracts were removed, opened in a longitudinal section, and washed with tap

water. The contents were poured onto a sieve with a mesh aperture of 100 µm and then washed. The remains of the screen were examined for the presence of adult and immature *A. galli* using a stereomicroscope. Worms were identified, sexed, counted and weighed.

### 2.3. Antigen preparation

Soluble antigenic extracts from embryonated eggs and from *A. galli* adult worms were prepared as follows: embryonated eggs and adult worms were washed, macerated and sonicated (three cycles of 70 kHz, 30 s) in sterile saline solution. The homogenate was centrifuged at 16,000 × g for 30 min. The supernatant was dialyzed against 0.01 M PBS, pH 7.2. The protein concentration was measured (Bradford, 1976) and adjusted to a 4 µg/µl final solution. All procedures were carried out at 4 °C. Both antigens were stored at –20 °C, until used.

### 2.4. Faecal egg counts (FEC)

Individual fecal samples were analyzed using a modified McMaster technique (MAFF, 1986) with saturated sodium chloride solution and the MSD counting chamber.

### 2.5. ELISA for the detection of anti-*A. galli* IgG antibodies

Anti-*A. galli* IgG antibodies were analyzed on serum samples and egg yolks from experimentally infected hens and 6 non-infected hens by an enzyme immunoassay tests (ELISA) performed, with some modifications, as described by Marcos-Atxutegi et al. (2003). Briefly, polystyrene microplates were coated with 0.8 µg/well of each antigen, overnight at 4 °C. Serum samples were examined at day 0 and weekly until the end of the experiment (day 105 p.i.). They were tested at 1/200 and 1/400 dilutions, and an anti-IgG anti-chicken antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Sigma) was employed as secondary antibody at 1/10,000 and 1/800 dilutions, respectively, to test reactivity against both antigens. Optical densities (OD) were measured at 492 nm in an Easy-Reader, Bio-Rad. To test the IgG response against antigens of *A. galli* adult worms in yolk samples, these were analyzed at 1/40 dilution and the anti-chicken IgG was employed at 1/4000.

### 2.6. Western blot

Western blot (WB) was carried out as described by Tsang et al. (1985). Proteins of the soluble antigen extract from embryonated eggs and from *A. galli* adult worms were separated on 12% gel slabs, in accordance to Laemmli's method (1970) in a Miniprotean II (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). All samples were treated with 0.15 dithiothreitol, 2% SDS, 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol and 0.2% bromophenol blue. Samples were heated in a 100 °C water bath for 3 min and then transferred to nitrocellulose.

Serum samples were tested at 1/25 and 1/200 dilutions for each antigen and the anti-chicken IgG-HRP was employed at 1/2500 and 1/4000 dilution, respectively.

Yolks samples were tested at 1/40 dilutions and the anti-chicken IgG-HRP was employed at 1/4000 dilution.

Taking into account the antibody response revealed by ELISA, serum samples were examined at days 0, 14, 21 and 42 p.i. against soluble antigen extract from embrionated eggs and at days 0, 14 and 21 against soluble antigen extract from *A. galli* adult worms. Days 0, 30, 60 and 90 p.i. were chosen in the case of yolks.

## 2.7. Histology

On day 105 p.i., the gastrointestinal tracts were removed, and different pieces were trimmed and fixed by immersion in 4% buffered formalin for 24 h. The blocks, obtained were dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in paraffin. Three micrometers thick sections were cut, mounted on glass slides and counter-stained with hematoxylin–eosin for light microscopy analysis.

## 2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed to assess differences in IgG antibody response, measured by the ELISA test, among the hens. The non-parametric Kruskal–Wallis test and the multiple-comparison Dunn test were used to identify differences in the antibody levels between post-infectious days. Significant differences were defined when  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively.

## 3. Results

Parasitological analysis—Two parameters were studied to confirm the infection: the excretion of parasite eggs in hen's feces (Fig. 1) and the number of adult worms in the gastrointestinal tract at the end of the experiment (Table 1). Parasite eggs in hen's feces were detected for the first time, on day 42 p.i. Between this day and day 84 p.i., an increase in the number of eggs was detected. Following this, the number of eggs decreased until the end

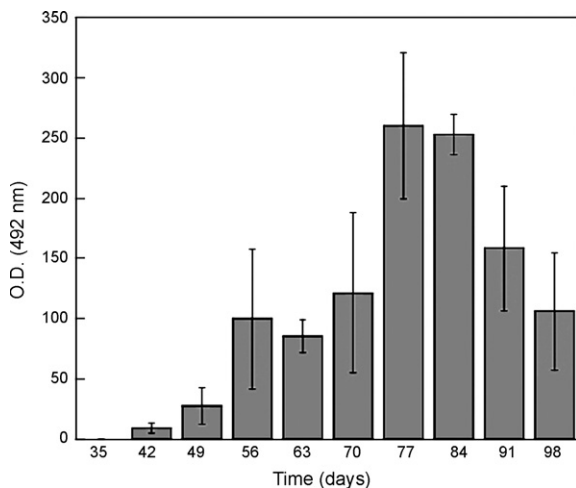


Fig. 1. Mean fecal parasite egg count in the 12 experimentally infected hens. The Bars indicate standard deviations.

Table 1

Parasitological parameters (mean  $\pm$  standard deviation) in infected hens slaughtered on day 105 p.i.

PARAMETER	Mean $\pm$ standard deviation
Worm burden (total)	5 $\pm$ 3.36
Female worm burden	2.4 $\pm$ 1.76
Male worm burden	2 $\pm$ 1.92
Female worm length (cm)	6.9 $\pm$ 1.71
Male worm length (cm)	5.3 $\pm$ 1.00
Female worm weight (mg)	0.124 $\pm$ 0.059
Male worm weight (mg)	0.058 $\pm$ 0.029

of the experiment. The number of parasite eggs was significantly higher on days 77 and 84 p.i. than on days 49 p.i. ( $P < 0.01$ ) and 98 ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences between days 77 p.i. and 84 p.i. or between days 56 p.i. and 98 p.i. At the end of the study (day 105 p.i.) the birds were slaughtered.

The mean of total worm burden was 5  $\pm$  3.36, being similar the number of male and female worms (Table 1).

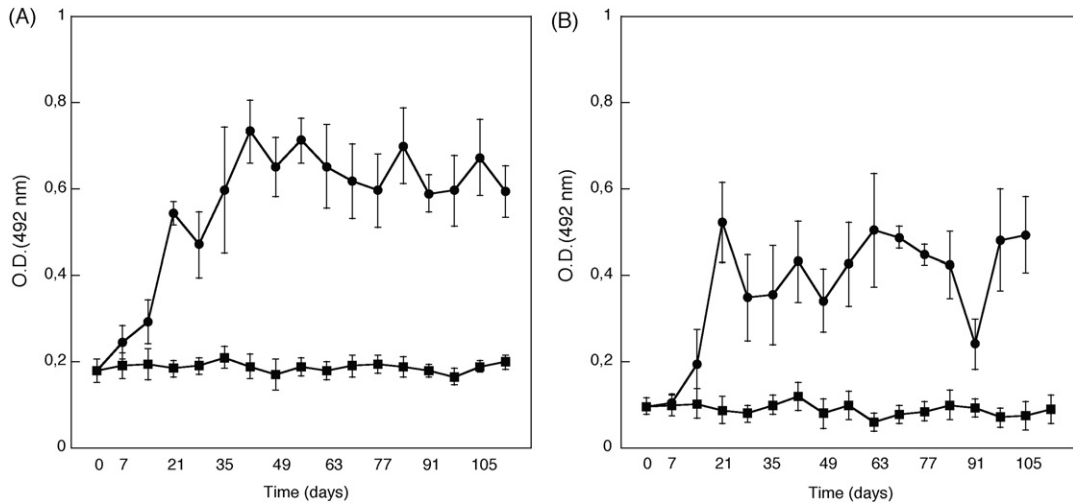
IgG antibody response in serum samples from experimentally infected laying hens. The IgG response against both antigens was analyzed weekly until the end of the experiment (Fig. 2). The mean OD and standard deviations (SD) of the IgG antibody response against antigens of embrionated eggs are shown in Fig. 2A. An increase in the mean OD was detected from day 0 until day 42 p.i., with a non-significant and transient decrease on day 28 p.i. between days 42 and 105 p.i. mean ODs showed periodical fluctuations. There were statistical differences between days 14 and 21 p.i. and between days 14 and 42 p.i. ( $P < 0.01$  in both cases). There were no significant differences between the mean ODs observed after day 42.

The IgG response against adult worm antigen are shown in Fig. 2B. A rise in the mean ODs between day 0 and 21 p.i. is observed, followed by slight decrease on day 28 p.i. Between day 28 and day 84 p.i. some non-significant fluctuations were detected. Mean ODs fall on day 91, reaching similar levels to those observed on days 63–70 p.i. afterwards. There were significant differences between mean ODs observed on days 14 and 21 p.i. ( $P < 0.01$ ), but not between those obtained on days 21 and 28 p.i. Significant differences were also observed in mean ODs obtained on day 91 p.i. when compared with those observed on days 84 and 98 p.i.

Antibody response in yolks from infected hens. The presence of IgG antibodies against *A. galli* was analyzed in yolks from laying hens eggs until day 105 p.i. (Fig. 3). IgG antibody response against antigens of embrionated eggs is shown in Fig. 3A. The highest mean ODs were observed on days 28 and 35 p.i.

Afterwards reactivity showed a tendency to decrease until the end of the experiment. However, there was a slight increase in mean OD between days 49 and 84 p.i. There were significant differences between mean ODs obtained on days 28 and 35 p.i. when compared to days 7, 14 and 21 p.i. ( $P < 0.01$ ), 49–77 p.i. ( $P < 0.05$ ), and 84–105 p.i. ( $P < 0.01$ ).

IgG antibody response against antigens from *A. galli* adult worms appears in Fig. 3B. In this case, IgG increased, with some fluctuation, from the beginning to the end of the



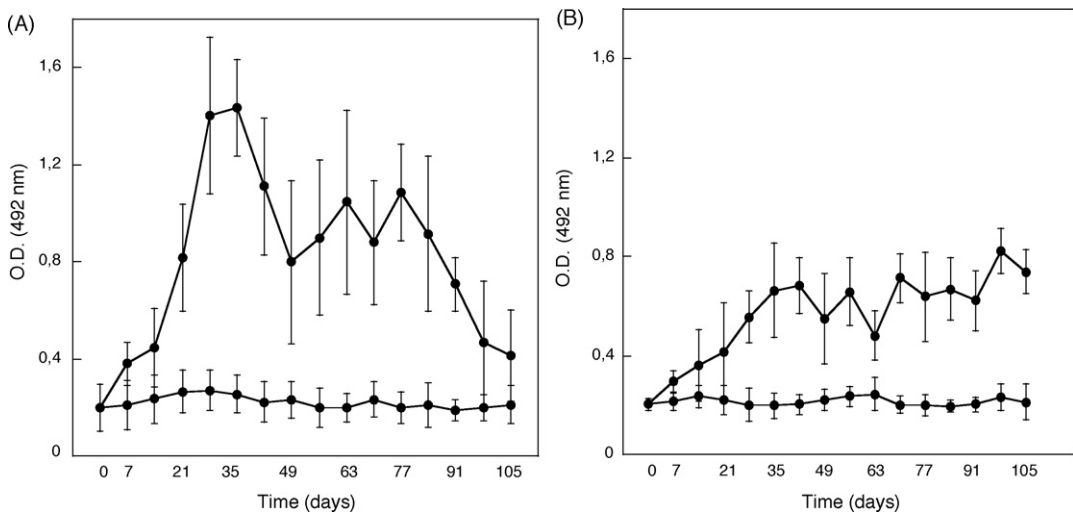
**Fig. 2.** Time evolution of the specific IgG antibody response against *A. galli* antigens in blood samples from the experimentally infected and control hens. (A) Antibody response against embryonated egg antigen. (●) Infected hens. (■) Non-infected hens. (B) Antibody response against adult somatic antigen. (●) Infected hens. (■) Non-infected hens. The antibody response was measured by ELISA. Each point corresponds to the mean OD obtained from 12 individual experimentally infected hens. The Bars indicate standard deviations.

experiment. Significant differences were only observed between days 7 and 105 p.i. ( $P < 0.05$ ).

Identification of molecules involved in reactivity against *A. galli*. Molecules from *A. galli* embryonated eggs and adult worms antigens involved in the antibody stimulus at the blood level were identified by Western blot (Fig. 4A and B respectively). Molecules from antigens of *A. galli* embryonated eggs. Fourteen days p.i., there was a small increase in the reactivity stimulated by groups of antigens with  $M_w$  of approximately 28–30 kDa and a molecule of 11 kDa. This response is still present in day 21 p.i. but a clear increase in the number of molecules recognized is detected 42 p.i. At this time reactivity around

107, 100, 90, 50, 28–30 and 11 kDa antigens was observed (Fig. 4A). Molecules from antigens of *A. galli* adult worms. Fourteen days p.i., there was an obvious but moderate increase in the reactivity stimulated by three groups of antigens with  $M_w$  of approximately 30–34, 44–54 and 58–90 kDa, respectively, and a molecule of 98 kDa. Twenty-one days p.i. reactivity increase, being specially intense against the antigens detailed before. Furthermore, antigens of  $M_w$  lower than 29 kDa were recognized intensely, at this time (Fig. 4B).

Antigens responsible for the antibody stimulus, detected on yolk eggs from infected laying hens, are shown in Fig. 5. The first bands were precipitated 30 days



**Fig. 3.** Time evolution of the specific IgG antibody response against *A. galli* antigens in egg yolk samples from the experimentally infected hens. (A) Antibody response against embryonated egg antigen. (●) Infected hens. (■) Non-infected hens. (B) Antibody response against adult somatic antigen. (●) Infected hens. (■) Non-infected hens. The antibody response was measured by ELISA. Each point corresponds to the mean OD obtained from 12 individual experimentally infected hens. The Bars indicate standard deviations.

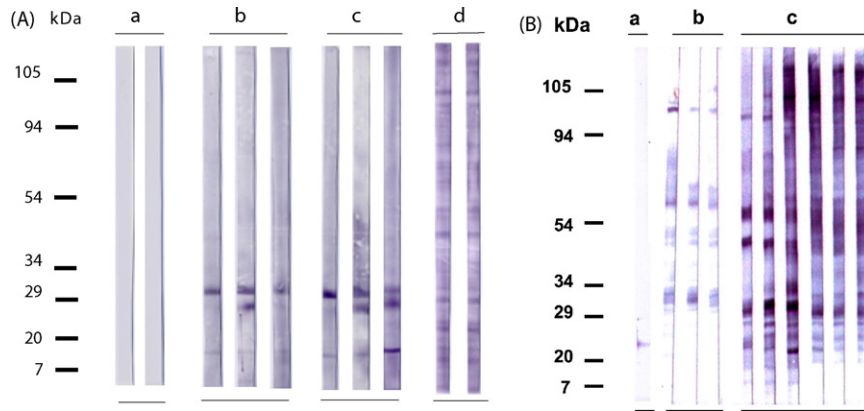


Fig. 4. Western blot analysis showing the recognition pattern of polypeptides of the *A. galli* antigens. (A) Response against embryonated eggs antigens. (a) Negative control serum sample. (b) Serum samples taken 14 days after infection. (c) Serum samples taken 21 days after infection. (d) Serum samples taken 42 days after infection. (B) Response against adult worms antigens. (a) Negative control serum sample. (b) Serum samples taken 14 days after infection. (c) Serum samples taken 21 days after infection.

p.i. A moderate reactivity produced by a group of antigens of approximately 42–50 kDa and by the 98 kDa molecule, was observed. Bands between 7 and 50 kDa were recognized 60 days pi.; the band of 30–32 kDa was specially intense. The recognition pattern did not change in yolks from eggs laid 90 days p.i. in comparison to those laid 60 days p.i. Only one of the analyzed samples showed recognition of antigen bands over 54 kDa.

**Histology**—The histological study of the gastrointestinal tract of infected laying hens is shown in Fig. 6. Fig. 6A shows a macroscopic longitudinal section of the small intestine from an infected laying hen containing some *A. galli* adult worms. No morphological lesions were observed on the wall and intestinal villi of healthy hens (Fig. 6B). On the contrary, small intestines of infected hens showed intense anatomic alterations consistent of traumatic lesions in the wall similar to stretch produced by a strange migrant body, that continue in the mucous layer (Fig. 6C and D). In some parts, these stretches appear infiltrated by

inflammatory cells (Fig. 6E). The mucous layer was completely altered; the villi disappeared and it showed hemorrhagic areas indicating vascular lesions (Fig. 6F). Moreover, an intense inflammatory cell infiltration in the basal zone of some villi was observed (Fig. 6G). The most common leukocytes observed were lymphocytes and macrophages.

#### 4. Discussion

The results presented here demonstrate that *A. galli* stimulates a strong immune response in their hosts. In fact high concentrations of specific IgG anti-*A. galli* antibodies were detected in both blood and egg yolks from infected laying hens. Moreover, an inflammatory reaction at the level of the intestinal wall, with the appearance of an intense cellular infiltration in the mucous and submucous membrane, was observed.

Different studies suggest that the resistance to *A. galli* infection increases with the age of the infected birds (Ackert et al., 1935; Ikeme, 1973; Idi et al., 2004). This fact is probably due, among other causes, to the increase in the capacity of immune response of the infected hens. Thus, we have selected for our study 18 weeks old Lohmann Brown laying hens, to have a reasonable confidence that the experimental infections stimulate an accurate and measurable immune response. All hens were infected and all excreted parasite eggs in their feces. The parasitological parameters obtained (rate of establishment, size of the worms and egg number) were slightly lower than those observed by other authors in comparable conditions (Permin and Ranuig, 2001; Gaulty et al., 2005). This could be due, at least in part, to the length of the experiment and the dose of infection (Idi et al., 2004).

Specific IgG antibodies against antigens of embryonated eggs as well as adult worms antigens have been detected. Interestingly, in both cases the first significant increase in the antibody level occurs between 14 and 21 days p.i. This data is consistent with that obtained by Degen et al. (2005), which observed the expression of the Th2-related cytokines in *A. galli* infected hens, 14 days after the infection.

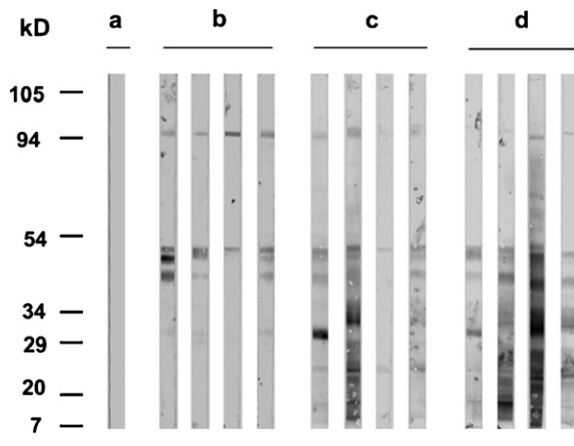
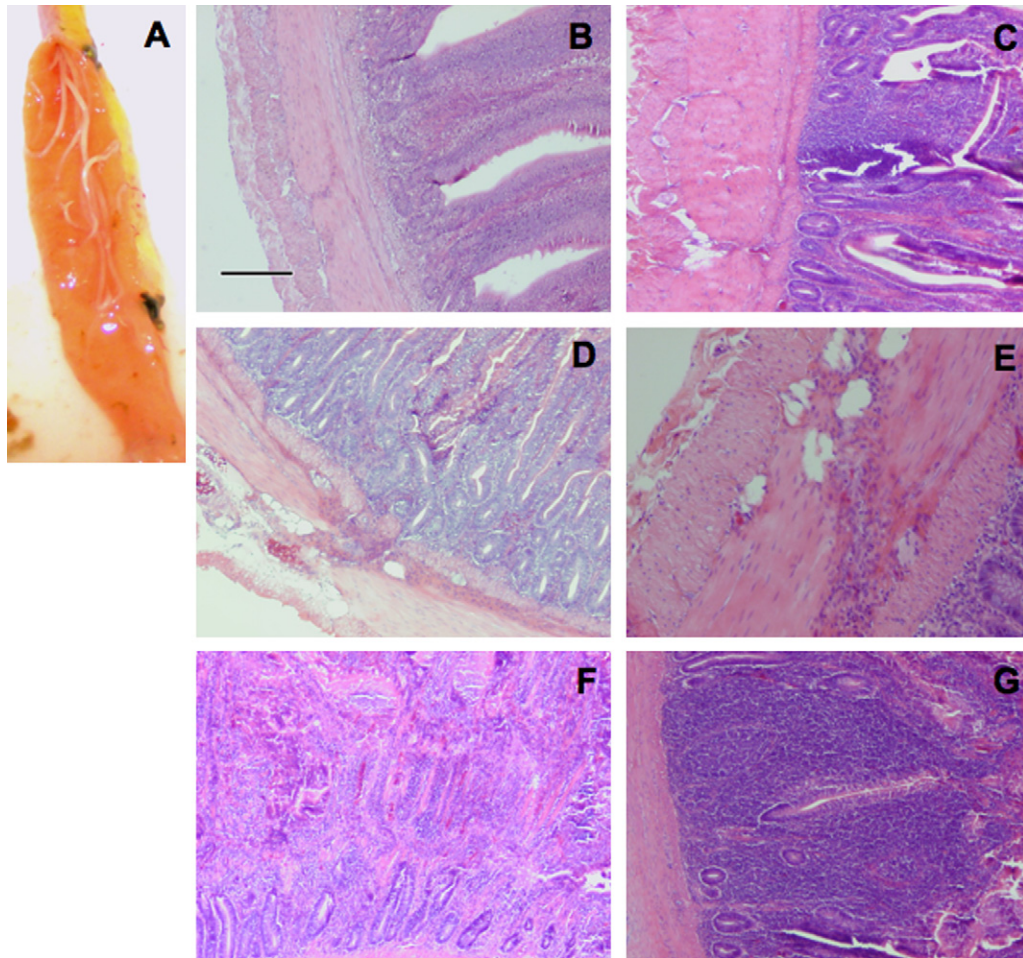


Fig. 5. Western blot analysis showing the recognition pattern of polypeptides of the *A. galli* somatic antigen by representative samples of egg yolks laid by the infected hens. (A) Negative control serum sample. (B) Yolk samples taken 30 days p.i. (C) Yolk samples taken 60 days p.i. (D) Yolk samples taken 90 days p.i.





**Fig. 6.** Small intestines histology of infected hens. (A) Macroscopic section of intestine containing *A. galli* adult worms. (B) Intestinal wall and villi of a healthy hen. (C and D) Traumatic lesions in the small intestines of infected hens similar to those that can be caused by a strange migrant body. (E) Inflammatory cell infiltrate in the traumatic lesions. (F) Completely altered mucous layer showing hemorrhagic areas and absence of villi. (G) Intense inflammatory infiltrate in the basal zone of the intestinal mucous layer. Figure E Bar is 80 mm length while figures B, C, D, F and G is 200 mm length.

The IgG antibody response developed by hens was slightly stronger against embryonated eggs than adult antigens. This could be attributed to the different behavior and location of the larvae and adult worms during the development of the endogenous life cycle in the host. Larvae invade the intestinal wall, thus they may produce a stronger stimulation of IgG, while the adult worms locate themselves in the intestinal lumen, which probably stimulate a predominant antibody response of the IgA isotype, not studied in this work. The highest excretion of parasite eggs coincides with a significant fall of the antibody level against adult antigens detected between 70 and 91 days p.i. We do not know the reason of this finding, but the inverse relationship between the antibody level and the intensity of egg production by the parasites is evident. This is consistent with the direct effect of the host immunity on the reduction of helminth fecundity (Urquhart et al., 1996).

Another important fact for the correct understanding of the influence of the immune response on the parasite population dynamics is the accumulation of anti-*A. galli*

IgG in the egg yolks of the infected hens. This indicates that mothers transfer to their offspring a part of the anti-*A. galli* antibodies produced when they became infected, in a similar way to mammals (Carlier and Truyens, 1995). This fact is not in contradiction to the data demonstrating a high susceptibility to the infection in 1-day-old chickens when compared to that observed in other ages (Ackert et al., 1935; Kerr, 1955). Experimental infections of chickens from *A. galli* infected and non-infected hens that will allow us to identify establishment rate, worm size and fecundity in both groups, are necessary to demonstrate the protective effect of the transferred antibodies and its influence in the parasite population dynamics. On the other hand, Western blot reveals a very limited molecules recognition until 21 days p.i. in embryonated eggs antigens and until 14 days p.i. in adult somatic antigen. After 42 and 21 days p.i., respectively, reactivity increase and many antigens are recognized in the entire  $M_w$  range. Only specific antibodies against antigens of medium/low  $M_w$  pass into the yolk eggs of infected hens. Clearly, these antigens could be candidates to be part of a hypothetical



vaccine against *A. galli*, if their protective activity is confirmed.

Histology reveals severe traumatic lesions in the small intestinal wall, together with an intense cellular infiltration by lymphocytes and macrophages. In some areas the normal structure of the mucous membrane became completely altered, the villi and crypts disappearing. Nevertheless, considering the time elapsed from the invasion of the intestine wall by the larvae to the histological study, the lesions observed can be interpreted as residual alterations caused by the migrating larvae and/or damages caused by the adult worms located in the intestine. An interesting question is whether this cellular as well as the antibody response detected, could play a role in the control of larvae that complete their development into adults. Moreover, despite these alterations, the infected birds manifested neither symptoms nor signs nor weight loss or decrease in their egg output rates (data not shown), during the time of the experiment. It is probable that, as indicated in other studies, a low number of adult worms in the intestine together with an appropriate feeding keep the hosts away from the appearance of illness signs, stressing the importance of a good feeding in the resistance against *A. galli* (Permin and Ranuig, 2001). Nevertheless, the existence of infected asymptomatic hens in commercial farms can be extremely dangerous for other members of the avian community, as they are a source of parasite eggs.

In conclusion, for the first time, data demonstrating the development of both an antibody and cellular inflammatory response against *A. galli* infective eggs and adult worms, have been obtained. Moreover, transference of specific IgG antibodies to the yolk eggs of infected hens is shown. The role of these antibodies, as well as the inflammatory reactions, on events like the arrest of larval development in the intestine wall and the parasite population control on an infected bird population, must be investigated in the future for an accurate understanding of the protective mechanisms developed by the birds against *A. galli*.

## Acknowledgments

This work has been supported by a research contract between Ibérica de Tecnología Avícola (IBERTEC) S.L. and the University of Salamanca through a project granted by the Agencia de Desarrollo Económico de Castilla y León (FEDER-founds, 2005).

## References

Ackert, J.E., 1931. The morphology and life history of the fowl nematode *Ascaridia lineada* (Schneider). *Parasitology* 23, 360–379.

- Ackert, J.E., Porter, D.A., Beach, T.D., 1935. Age resistance of chickens to the nematode *Ascaridia lineada* (Schneider). *J. Parasitol.* 21, 205–213.
- Araujo, P., Bressan, C.R.V., 1977. Consideration sur la deuxième mue des larves d'*Ascaridia galli*. *Ann. Parasitol.* 5, 531–537.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 72, 248–254.
- Carlier, Y., Truyens, C., 1995. Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol. Today* 11 (3).
- Chadfield, M., Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M., 2001. Investigation of the parasitic nematode *Ascaridia galli* (Schrank 1788) as a potential vector for salmonella enterica dissemination in poultry. *Parasitol. Res.* 87, 317–325.
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M.W., Urban Jr., J.F., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2000. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *J. Infect. Dis.* 182 (4), 1207–1213.
- Degen, W.G.J., van Daal, N., Rothwell, L., Kaiser, P., Schijns, V.E.J.C., 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.* 105 (3–4, 25), 163–167.
- Gauly, M., Bauer, C., Preisinger, R., Erhardt, G., 2002. Genetic differences of *Ascaridia galli* egg output in laying hens following a single dose infection. *Vet. Parasitol.* 103, 99–107.
- Gauly, M., Omán, T., Erhardt, G., 2005. Age-related differences of *Ascaridia galli* egg output and worm burden in chickens following a single dose infection. *Vet. Parasitol.* 128, 141–148.
- Hohenberger, E., 2000. On the contamination of runs of outdoor laying hens due to hen endoparasites. *Universitätsbibliothek der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Austria*, 46 pp.
- Idi, A., Permin, A., Murrell, K.D., 2004. Host age only partially affects resistance to primary and secondary infections with *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) in chickens. *Vet. Parasitol.* 122 (3, 14), 221–231.
- Ikeme, M.M., 1973. The significance of age and previous experience of repeated uptake of infective eggs of *Ascaridia galli* (Schrank 1788) on the epidemiology of ascaridiosis in the domestic chicken. *Warzawa* 1, 359–368.
- Kerr, K.B., 1955. Age of chickens and the rate of maturation of *Ascaridia galli*. *J. Parasitol.* 41, 233–235.
- Laemli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227 L, 680–685.
- MAFF, 1986. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*, Reference Book 418, third ed. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Marcos-Atxutegi, C., Kramer, L.H., Fernández, I., Simoncini, L., Genchi, M., Prieto, G., Simón, F., 2003. Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: a possible role for *Wolbachia*? *Vet. Parasitol.* 112, 117–130.
- Martín-Pacho, J.R., Montoya, M.N., Arangüena, T., Toro, C., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Simón, F., 2005. A coprological and serological survey for the prevalence of *Ascaridia* spp. in laying hens. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52 (June (5)), 238–242.
- Miquel, N., Roepstorff, A., Bailey, M., Eriksen, L., 2005. Host immune reactions and worm kinetics during the expulsion of *Ascaris suum* in pigs. *Parasite Immunol.* 27, 79–88.
- Permin, A., Magwisha, H., Kassuku, A.A., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., Gibbons, L., 1997. A cross-sectional study of helminths in rural scavenging poultry in Tanzania in relation to season and climate. *J. Helminthol.* 71, 233–240.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Rearman, M., Nansen, P., Rold, J., 1999. The prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poult. Sci.* 40, 439–443.
- Permin, A., Ranuig, H., 2001. Genetic resistance to *Ascaridia galli* infections in chickens. *Vet. Parasitol.* 102, 101–111.
- Todd, A.C., Crowder, D.H., 1952. Factors influencing growth of a parasitic nematode. *Trans. Am. Microbiol. Soc.* 2, 102–108.
- Tsang, V.C.W., Bers, G.E., Hancock, K., 1985. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot. In: Ngo, T.T., Lenhoff, H.M. (Eds.), *Enzyme Mediated Immunoassay*. Plenum Press, New York, pp. 389–414.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996. *Vet. Parasitol.*, second ed. Blackwell Science Ltd., London, UK, 307 pp.





# Proteomic analysis of *Ascaridia galli*. Identification of immunoreactive proteins in naturally and experimentally infected hens

Javier González-Miguel<sup>a,\*</sup>, Cristina Marcos-Atxutegi<sup>a</sup>,  
Roberta Bottari de Castello<sup>b</sup>, Sara Carpani<sup>b</sup>,  
Rodrigo Morchón<sup>a</sup>, Fernando Simón<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy and Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> University of Milan, Leonardo da Vinci Program, Milan, Italy

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 9 January 2013

Received in revised form 7 March 2013

Accepted 13 March 2013

### Keywords:

*Ascaridi galli*

Hens

Mass spectrometry

Soluble proteome

## ABSTRACT

*Ascaridia galli*, intestinal parasite of domestic fowl, is responsible of economic losses in avian exploitations. However, molecular mechanisms that govern avian ascaridiasis remain largely unknown. The aim of the present work was to identify proteins of *A. galli* recognized by the immune system of naturally and experimentally infected hens, using two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS). Sixteen immunoreactive proteins of *A. galli* were identified. These proteins are mainly related to different metabolic processes, cell motility and binding activities. The timing evolution of this recognition pattern was studied using serum samples from experimentally infected hens, allowing us to observe an early recognition of many of these antigens. Many of them were isoforms from lipid and plasminogen-binding proteins. Moreover, plasminogen-binding activity has been related in other parasites with the facilitation of intra-organic migration, which represents an important fact in avian ascaridiasis. This work represents the first proteomic study of *A. galli* and could contribute to explain some aspects of parasite/host relationships of avian ascaridiasis.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Ascaridia galli* (Schrank, 1788) is an intestinal nematode of domesticated chickens, causing avian ascaridiasis, parasitosis with worldwide distribution in poultry (Wilson et al., 1994; Permin et al., 1999; Magwisha et al., 2002; Martín-Pacho et al., 2005; Luna-Olivares et al., 2006; Marín-Gómez and Benavides-Montano, 2007). The birds become infected after ingesting embryonated eggs which

are deposited on the ground with the feces of other infected hosts. The eggs hatch in the small intestine releasing the second stage larvae that live in the intestinal lumen and migrate to the intestinal mucosa to the tenth day post-infection (pi). After two successive molts the larvae back into the intestinal lumen at 17 days pi, reaching sexual maturity and beginning the egg-laying at 50 days pi (Tarazona-Vilas, 1999). The presence of worms in the digestive tract of birds causes diarrhea and bleeding (Simón Vicente, 1956), which produce weight loss and reduction in both growth rate and feed conversion efficiency affecting the poultry production (Ackert and Herrick, 1928; Ramadan and Abou Znada, 1991; Skallerup et al., 2005).

The information available about the molecular aspects of the parasite/host relationships in avian ascaridiasis

\* Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, Laboratory of Parasitology, University of Salamanca, C/del Licenciado Méndez Nieto s/n, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294535; fax: +34 923294515.

E-mail address: [jglez@usal.es](mailto:jglez@usal.es) (J. González-Miguel).

is scarce. The immune response developed by the host against ascarids has been widely studied in mammals (Cooper et al., 2000; Miquel et al., 2005). However, there are no similar studies in avian ascaridiasis infections. The study of the IgG antibody response in experimentally infected hens versus soluble extracts from both embryonated eggs and adult worms of *A. galli*, has revealed a strong response against parasite antigens of 30–34, 44–54 and 58–90 kDa. Moreover, histological analysis revealed an intense inflammatory reaction with leukocyte infiltration in the intestinal wall of parasitized birds (Marcos-Atxutegi et al., 2009). Recently it has been shown that infection by *A. galli* affected the electrogenic transport of alanine and glucose in the gut of the host, where local immune response is also observed caused by infiltration of different populations of T cells in the lamina propria and accumulation of CD4+ lymphocytes in the epithelium (Schwarz et al., 2011). Regarding the identification of parasite/host relationships relevant proteins of *A. galli*, there is a very limited information. It has focused on the purification and characterization of lipid-binding proteins (Timanova et al., 1999; Jordanova et al., 2005a, b). In recent years, the development of different techniques of protein separation and identification has allowed the publication of numerous papers, which identify a large number of proteins of other nematodes analyzing the comprehensively proteome of these species (Robinson et al., 2007; Hewitson et al., 2008; Oleaga et al., 2009; González-Miguel et al., 2010a, b; Moreno et al., 2011; Sotillo et al., 2012).

The objective of this work is the identification of immunoreactive proteins from *A. galli*, the study of the time evolution of their recognition and the possible relationship of these proteins with the pathogenic and survival mechanisms that occur in avian ascaridiasis. For this purpose, proteomic, immunomic and MS techniques were employed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sera

Sera included samples from 10 hens naturally infected with *A. galli* and 10 uninfected hens. Parasitological status of infected hens was tested by ELISA to detect antibodies against *A. galli* (Martín-Pacho et al., 2005), and by coprological assay. Sera from 10 experimentally infected hens collected at 0, 21, 42 and 96 days pi were also used. Experimental infections were performed as described by Marcos-Atxutegi et al. (2009) with minor modifications. Briefly, ten 18 weeks old, Lohmann Brown laying hens (procured from Ibertec, Parque Tecnológico de Boecillo, Valladolid, Spain), born and raised in helminth free conditions, were employed. The hens were orally infected using a plastic Pasteur pipette with individual doses of 250 eggs of *A. galli*. Six hens were maintained uninfected as negative control. All animals received water and food *ad libitum*. Finally, they were followed on a daily basis and examined clinically for signs of the infection. At the end of experiment the disease was confirmed by necropsy.

### 2.2. Parasite extracts and preparation of samples for 2-D gel electrophoresis

*A. galli* adult worms were collected from naturally infected hens. Worms were homogenized in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and sonicated in ice with 5 cycles of 75 kHz, 1 min each. A mixture of protease inhibitors was added to the resulting suspension (1 mM EDTA, 1 mM NEM, 1  $\mu$ M Pepstatin A, 1 mM PMSF and 0.1 mM TPMSF) (Maizels et al., 1991) and the homogenate was centrifuged at 100,000  $\times$  g for 1 h at 4 °C. The supernatant was dialyzed against distilled water for 24 h. The obtained extract, called AgSB, was assessed for protein concentration with the DC protein assay kit (Bio-Rad). The extract was then concentrated and purified with the ReadyPrep 2-D Cleanup kit (Bio-Rad), and then solubilized in the 2-D rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS). The samples, containing 40  $\mu$ g of protein, were finally divided into 125  $\mu$ l aliquots and stored at –20 °C until use.

### 2.3. Two-dimensional electrophoresis and Western blot

The 2-DE of AgSB was performed as described by González-Miguel et al. (2010b). Briefly, AgSB aliquots were supplemented with ampholites and DTT, incubated and centrifuged to remove all particulate material, and then applied to 7-cm IPG strips (Bio-Rad) with linear pH ranges of 3–10, 5–8 and 7–10, using a Protean IEF Cell (Bio-Rad) for isoelectric focusing (IEF). After IEF, strips were reduced and alkylated, and second dimension was done in 12% acrylamide gels. Gels were then silver stained with the PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare) or transferred to nitrocellulose membranes for Western blot with the Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). The 2-D images were scanned with the GS-800 Densitometer (Bio-Rad) and analyzed with the Quantity One Software v.4.6.5 (Bio-Rad).

Immunoblot was performed as described before (González-Miguel et al., 2010b). Briefly, membranes were blocked in 2% BSA–0.05% Tween 20 in PBS and then incubated either with a pool of 10 sera from uninfected hens, a pool of 10 sera from naturally infected hens and 4 pools of 8 sera each from experimentally infected hens collected at different time points pi (above-mentioned), at 1:800 dilution. After three washes, blots were incubated with a horseradish peroxidase-labeled anti chicken IgG (Sigma) at 1:4000 dilution. Immunoblots were developed with 4-chloro naphthol. The 2-D images of immunoblots and their homologous silver-stained gels were aligned to isoelectric points (pI) and molecular weights (MW) and then matched with the PDQuest Software v.8.0.1 (Bio-Rad) to identify the antigenic spots in the gels.

Samples were analyzed in triplicate to assess the overall reproducibility of the protein and immunogen spot patterns.

### 2.4. MS and protein identification

In gel digestion of proteins and MS analysis were done as described by González-Miguel et al. (2010b). The spots containing immunogenic proteins were excised manually

from the gels and sent to the Unit of Proteomics of the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid, Spain) for MS analysis. For peptide mass fingerprinting and the acquisition of LIFT TOF/TOF spectra, an aliquot of the digestion of each spot was deposited onto a 600 µm AnchorChip MALDI probe (Bruker-Daltonics). Peptide mass fingerprint spectra were measured on a Bruker Ultraflex TOF/TOF MALDI mass spectrometer (Bruker-Daltonics) (Suckau et al., 2003) in positive-ion reflector mode. The measured tryptic peptide masses were transferred through the MS BioTools program (Bruker-Daltonics) as inputs to search the National Centre for Biotechnology Information non-redundant database (NCBI nr) using Mascot software (Matrix Science, London, UK). When necessary, MS/MS data from the LIFT TOF/TOF spectra were combined with MS peptide mass fingerprint (PMF) data for database searches. The percentage of sequence coverage and the Mascot score were also retrieved for each identified protein. The sequence coverage is the percentage of protein sequence covered by identified peptides that fit the same fraction of the complete protein sequence identified by MS and the Mascot score is the score given as  $S = -10 \times \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match would be a random event. Mascot score values above 80 are considered significant ( $P < 0.05$ ). The molecular function and biological process involvement of the identified proteins were assigned according to the gene ontology database (<http://www.geneontology.org>) and the Swiss-Prot/UniProt database (<http://beta.uniprot.org>).

### 3. Results

#### 3.1. Two-dimensional gel electrophoresis

To obtain an overall view of all the proteins of the AgSB, these extract was first electrofocused using 3–10 linear immobilized pH gradient strips. Silver nitrate staining of these 2-D gels revealed about 410 spots in the proteome of *A. galli*, many sparsely settled, with  $pI$ s between 5 and 9.8, and a broad range of MWs (10–170 kDa). Only 10 spots were observed in the proteome of *A. galli* with  $pI < 5$  (not shown).

In order to improve spot resolution and detection, once the spot MW and  $pI$  ranges were determined, the AgSB were electrofocused in 5–8 and 7–10 IPG strips. With these new conditions, silver staining revealed a total of 427 spots over a broad range of MW (10–170 kDa), 301 of them with  $pI$ s between 5 and 8 and 126 with  $pI$ s between 8 and 10 (Fig. 1A and B).

#### 3.2. Antigenic proteins recognized by sera from naturally and experimentally *A. galli* infected hens

Immunoblot analysis of the AgSB carried out with serum samples from naturally infected hens revealed around 230 major antigenic spots (Fig. 1C and D). The matching of spots detected by western blotting with their homologous in the silver nitrate stained 2-D gels allowed us to select a total of 101 antigenic spots of *A. galli*. This represents a recognition rate of 23.65% over the total of protein spots revealed on the 2-D gels.

The timing evolution of the recognition pattern during the course of infection was studied using serum samples from experimentally infected hens at 21, 42 and 96 days pi. These sera respectively recognized 169, 132 and 155 major antigenic spots (Fig. 2). This represents a strong antigen recognition at 21 days pi, a slight decrease in the antibody response at 42 days pi and a reactivation at 96 days pi.

Analysis of the 2-D images allowed the localization of 87, 64 and 69 spots, respectively. This represents recognition rates of 20.37, 14.98 and 16.16%. The immunoblot analysis in experimental infections was similar to natural infections in the distribution of the spots and slightly lower in terms of number of immunogenic spots. Seventeen spots (numbers 13, 14, 16, 23, 44, 57, 79, 84, 90, 93, 98, 128, 157, 165, 169, 171 and 179) were recognized only in experimental infections.

Immunogenic spots developed by sera from naturally and experimentally infected hens showed a wide range of apparent MW and  $pI$ s (between 20–120 kDa and 5–10, respectively). Serum samples from uninfected animals (negative control) and from experimentally infected hens before infection did not recognize any AgSB protein in 2-D gels (data not shown). Only minor differences were observed among both gel or immunoblot triplicates.

#### 3.3. Identification of *A. galli* immunoreactive proteins

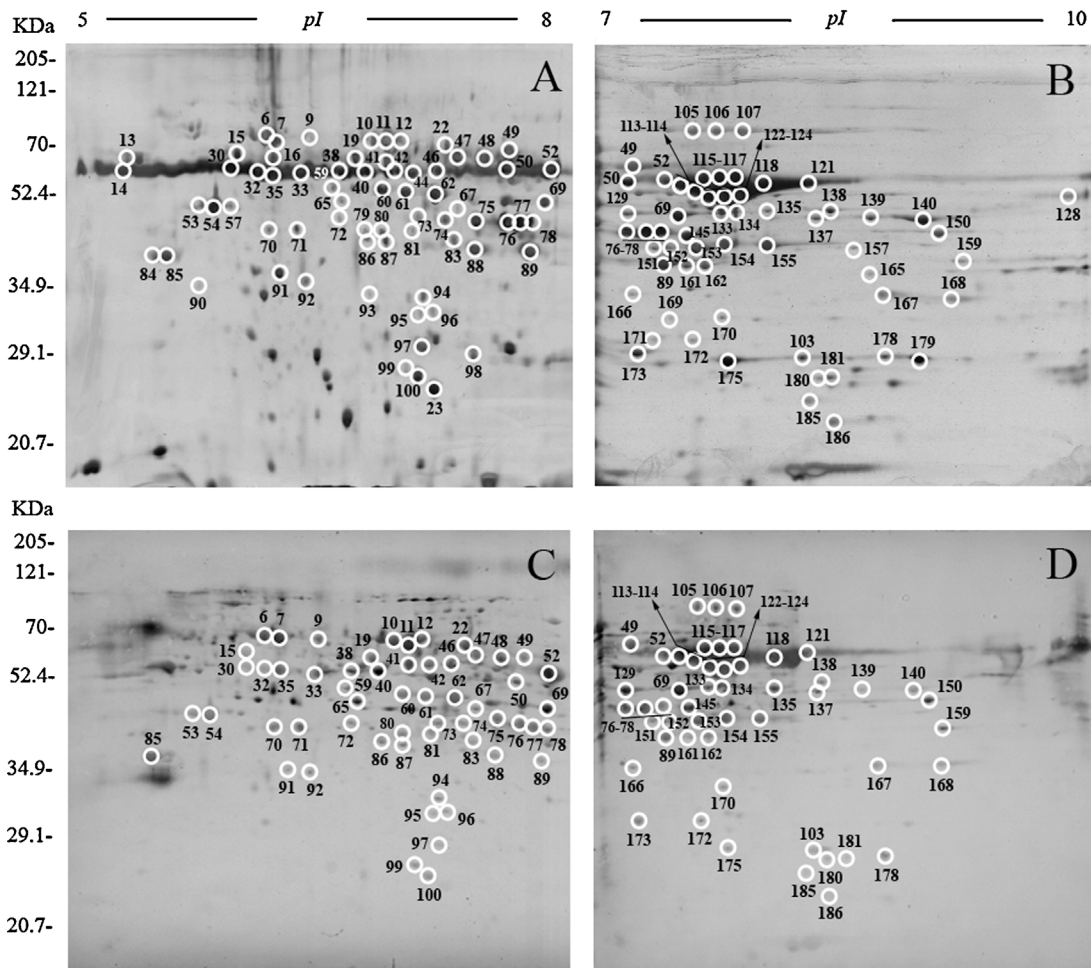
The antigenic spots localized by matching and recognized by naturally infected hens ( $n = 101$ ) and additionally those specifically recognized by experimentally infected hens ( $n = 17$ ) were manually excised from 2-D gels and submitted to analysis by MS. Up to 31 of the 118 analyzed spots (26.27%) were identified, representing 16 different proteins.

Table 1 shows the name of these proteins and their MWs and  $pI$ s (theoretical and experimental), the number of access to similar information available in the NCBI database, the sequence coverage and the Mascot score. The majority of the identified proteins showed several isoforms (from 2 to 9). Fifteen of the 31 spots obtained were identified by their similarity to homologous proteins from other species of nematodes (*Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyocaulus viviparus* and *Bursaphelenchus xylophilus*), while 9 spots were identified by their similarity to the lipid binding protein ag-50 from *A. galli*, whose protein sequence is available in databases. Six of the remaining spots were identified due to their similarity with proteins from other groups of metazoa and another spot with a protein from a proteobacteria.

The molecular function and biological processes in which the 16 proteins identified are involved are also shown in Table 1. Regarding their molecular function, the proteins were grouped as structural, catalytic and binding activity. The proteins with catalytic activity were the most abundant (11 proteins); of these, glycolytic enzymes were the most represented with 3 proteins, followed by proteins with binding activity (3 proteins) and 2 proteins with structural activity.

In addition Table 1 shows the moment in which each spot is recognized by the serum samples from experimentally infected hens (21, 42 and/or 96 days pi). The majority





**Fig. 1.** Representative two-dimensional electrophoresis of 40  $\mu$ g of the AgSB extract from adult *A. galli* worms (A and B). The gels were in the 5–8 and 7–10 pH ranges, 12% polyacrylamide and silver-stained, and two-dimensional Western blot showing the antigenic spots of the AgSB extract (C and D) revealed by pools of serum samples from naturally infected hens. Reference molecular masses are indicated on the left. The antigenic spots analyzed by mass spectrometry are circled and numbered.

of the identified spots (20 of 31) were recognized at 21, 42 and 96 days pi. Four spots (numbers 103, 133, 105 and 107) corresponded to adenylate kinase isoenzyme 1, hypothetical protein C44B7.10 and two enzymes of the propionyl CoA carboxylase were specifically recognized at 21 days pi. Spot 92 (proteasome subunit alpha type) was specifically recognized at 42 days pi.

#### 4. Discussion

The aim of this study was to identify immunogenic proteins recognized by the immune system of hens naturally infected with *A. galli*, within the context of parasite/host relationships in avian ascariasis. Serum samples from experimentally infected hens taken at 0, 21, 42 and 91 days pi were also used allowing us to know the time evolution of antigen recognition. Soluble proteome analysis of *A. galli* resolved about 427 spots. A 23.65% of the spots were immunolocalized in western blots performed with serum samples from naturally infected hens with *A. galli*. Finally, thirty-one spots were identified by mass spectrometry.

According databases identified immunogenic proteins showed structural, catalytic and binding activity. The most widely represented are those with catalytic activity (11 of 16 identified proteins) (see Table 1). All of them are related to different metabolic pathways, highlighting the importance for the parasite of obtaining metabolites and energy generation. Three proteins involved in glycolysis (enolase, phosphoglycerate kinase and GAPDH), one in glycogenesis (phosphoenolpyruvate carboxykinase) and two in the Krebs cycle (malate dehydrogenase and fumarase) were identified. The rest of the immunogenic proteins of this group are related to different processes like protein catabolism and nucleotide or amino acid metabolism.

Studies conducted in *A. suum* have revealed that both the phosphoglycerate kinase and enolase activate “in vitro” the nitric oxide production in host cells (Andrade et al., 2005). Recently it has been proposed that *A. suum* enolase is a potent vaccine candidate (Chen et al., 2012). Furthermore, the three glycolytic proteins (enolase, phosphoglycerate kinase and GAPDH) together with the actin (structural

**Table 1**

Antigenic protein spots of AgSB extract recognized by pools of sera from naturally and experimentally infected hens with *A. galli* and identified by MALDI-TOF MS. Biological process in which the antigenic proteins of AgSB extract are involved was assigned according to the Gen Ontology and Swiss-Prot/Uniprot databases. Exp, experimental; theo, theoretical; PEP carboxykinase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Spot number	Accession code	Protein definition	Species	MW (kDa) theor/exp	pI theor/exp	Sequence coverage (%)	Mascot score	Molecular function	Biological process	Recognition time (days pi)
53	ABX82966	Actin variant 1	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	42.1/47.7	5.2/5.8	35	419	<u>Structural activity</u> –	Cell motility	21, 42, 96
54	BAI52958	Actin	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	40.5/47.4	5.7/5.9	32	244	–	Cell motility	21, 42, 96
7	Q05893	PEP carboxykinase	<i>Ascaris suum</i>	73.0/69.1	6.3/6.3	12	120	<u>Catalytic activity</u> Lyase	Gluconeogenesis	21, 42, 96
11	Q05893	PEP carboxykinase	<i>Ascaris suum</i>	73.0/67.7	6.3/7.0	9	133	Lyase	Gluconeogenesis	21, 42, 96
12	Q05893	PEP carboxykinase	<i>Ascaris suum</i>	73.0/68.0	6.3/7.1	9	266	Lyase	Gluconeogenesis	21, 96
49	XP.001893113	Glutamate dehydrogenase, mitochondrial precursor, putative	<i>Brugia malayi</i>	60.9/63.6	8.2/7.7	3	100	Oxidoreductase	Aerobic metabolism	21, 42, 96
60	ACD75895	Enolase	<i>Dineutes sublineatus</i>	23.2/50.6	6.3/7.0	23	165	Lyase	Glycolysis	21, 42, 96
61	ACD75886	Enolase	<i>Sialis sp. ALW-2008</i>	23.6/49.6	5.8/7.1	18	138	Lyase	Glycolysis	21, 42, 96
72	XP.001637526	Predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i>	41.5/44.9	5.5/6.7	2	89	Deaminase	Nucleotide metabolism	21, 42
78	XP.001891892	Phosphoglycerate kinase	<i>Brugia malayi</i>	44.8/49.5	7.7/7.4	13	157	Transferase	Glycolysis	21, 42, 96
129	XP.001891892	Phosphoglycerate kinase	<i>Brugia malayi</i>	44.8/52.9	7.7/7.2	3	150	Transferase	Glycolysis	42, 96
89	ACB69605	Cytosolic malate dehydrogenase	<i>Neope bremeri</i>	14.6/42.0	8.6/7.4	12	118	Oxidoreductase	Aerobic metabolism	21, 42, 96
95	XP.002014358	Proteasome subunit alpha type	<i>Drosophila persimilis</i>	31.1/32.0	6.3/7.2	11	102	Protease	Protein catabolic process	42
103	XP.001894222	Adenylate kinase isoenzyme 1	<i>Brugia malayi</i>	44.8/30.4	9.0/8.2	6	88	Transferase	ATP metabolic process	21
133	NP.495409	Hypothetical protein C44B7.10	<i>Caenorhabditis elegans</i>	50.9/53.2	8.7/7.8	12	115	–	Acetyl-CoA metabolic process	21
138	XP.001900957	Fumarase	<i>Brugia malayi</i>	54.5/53.9	8.9/8.4	3	118	Lyase	Aerobic metabolism	21, 42, 96
154	BAB68543	GAPDH	<i>Ascaris suum</i>	36.3/45.9	6.8/7.8	8	209	Oxidoreductase	Glycolysis	21, 96
155	BAB68543	GAPDH	<i>Ascaris suum</i>	36.3/45.6	6.8/7.7	8	135	Oxidoreductase	Glycolysis	21, 42, 96
178	NP.102141	Adenylate kinase	<i>Mesorhizobium loti</i>	21.2/30.5	5.6/8.7	10	89	Transferase	ATP metabolic process	21, 42, 96
30	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/57.8	7.8/6.0	36	308	<u>Binding activity</u> Lipid binding	–	42, 96
32	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/54.3	7.8/6.2	31	332	Lipid binding	–	21, 42, 96
40	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/55.8	7.8/6.9	36	236	Lipid binding	–	21, 42, 96

Table 1 (Continued)

Spot number	Accession code	Protein definition	Species	MW (kDa) theor/exp	pI theor/exp	Sequence coverage (%)	Mascot score	Molecular function	Biological process	Recognition time (days pi)
41	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/58.3	7.8/7.0	20	157	Lipid binding	-	21, 42, 96
42	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/55.6	7.8/7.1	19	131	Lipid binding	-	21, 42, 96
113	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/64.6	7.8/7.5	4	111	Lipid binding	-	21, 42, 96
115	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/65.9	7.8/7.7	29	273	Lipid binding	-	21, 42, 96
116	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/65.2	7.8/7.8	34	288	Lipid binding	-	21, 42, 96
124	AAT84605	Lipid binding protein ag-50	<i>Ascaridia galli</i>	58.6/59.0	7.8/7.9	13	160	Lipid binding	-	21, 42, 96
83	AAP94889	MFP2b	<i>Ascaris suum</i>	41.4/40.9	6.3/7.4	10	123	Metal ion binding	Sperm motility	-
105	XP_002196217	Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	<i>Taeniopygia guttata</i>	75.4/101.1	6.2/7.6	3	82	ATP binding	-	21
107	NP_509293	Propionyl CoA Carboxylase Alpha subunit (family member (pcca-1))	<i>Caenorhabditis elegans</i>	80.2/100.7	7.6/7.9	11	216	ATP binding	-	21

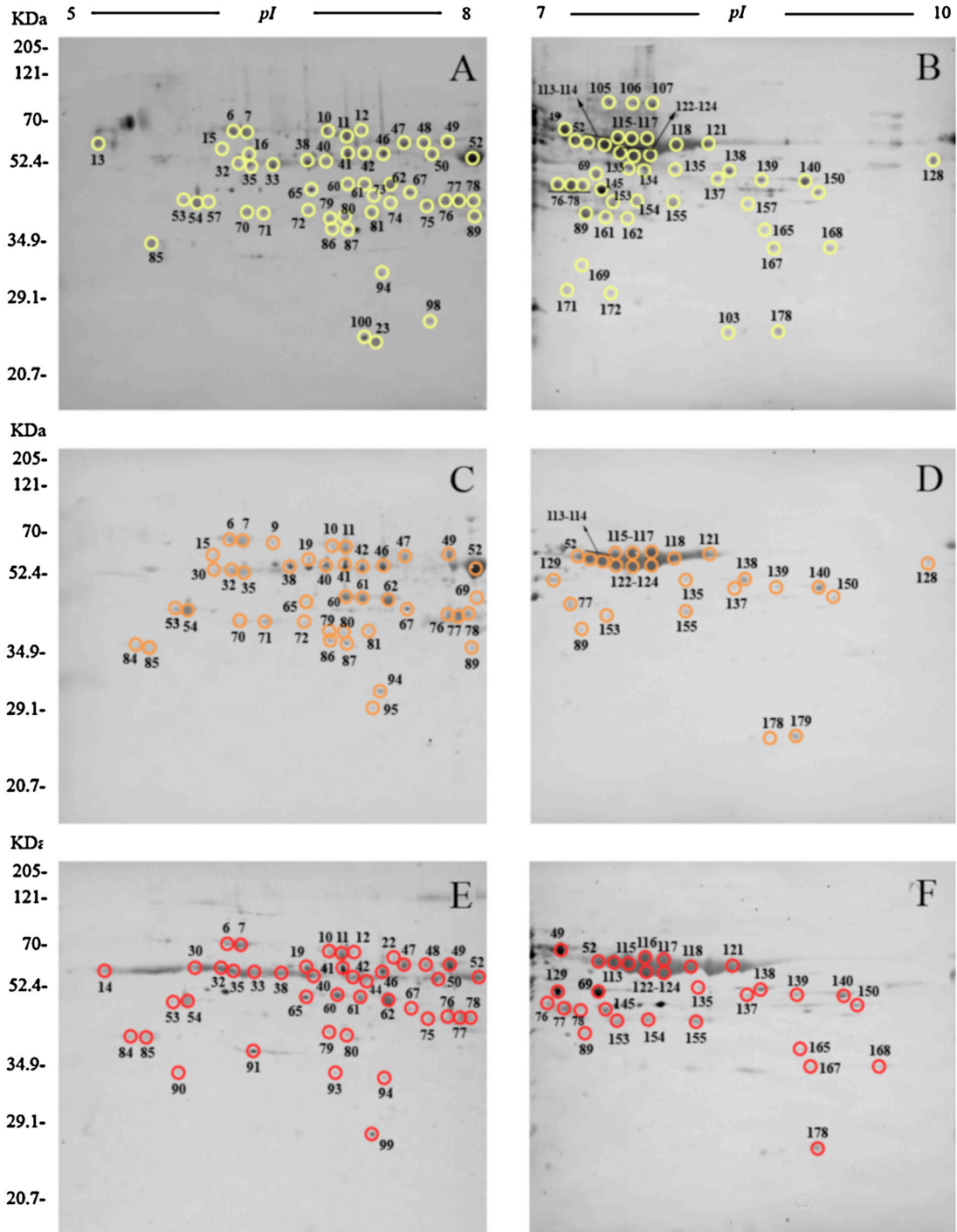
activity) have been related to plasminogen binding activity in other pathogens (Crowe et al., 2003; Ramajo-Hernández et al., 2007; Matta et al., 2010; Boone et al., 2011; Ghosh and Jacobs-Lorena, 2011; González-Miguel et al., 2012). Plasminogen activation and subsequent conversion to plasmin are the key points of the fibrinolytic system (physiological process responsible for the dissolution of fibrin clots). Furthermore, activation of fibrinolysis has been associated with degradation of extra-cytoplasmic matrices (Vassalli et al., 1991), which has been interpreted as a mechanism that promotes cellular invasion and intra-organic migration in different parasites (Jolodar et al., 2003; Bernal et al., 2004). This could be particularly important in a parasite like *A. galli*, whose larvae must migrate through the intestinal wall during a part of their life cycle.

A great number of lipid-binding proteins isoforms have been identified. These proteins have important functions associated with lipid transport, cell signaling, gene transcription and cytoprotection. Their functional analogs in nematodes are the nematode polyprotein allergens/antigens and the fatty acid and retinoid-binding proteins. The lipid-binding protein ag-50, also called Ag-lbp55, has recently been purified and characterized by Jordanova et al. (2005b). Its ability to bind long-chain fatty acids has been studied by fluorescence spectroscopy. Immunolocalization of the protein indicating their extra-cellular location and demonstrating their abundance was also performed. The authors finally relate the Ag-lbp55 to the traffic and homeostasis of lipids, as with the modulation of the immune response in the host. The large number of isoforms identified of the lipid-binding protein ag-50 suggests that *A. galli* uses redundant systems to ensure the working of this protein and demonstrates its importance in the parasite survival mechanisms.

Comparing these results with those obtained in other proteomic studies of parasitic nematodes, highlights the failure to identify any protein related to processes like detoxification or stress response. These proteins are an important part of the antigens that generate an immune response in parasitosis caused by blood and tissue helminths (Pérez-Sánchez et al., 2006; Oleaga et al., 2009; González-Miguel et al., 2010a,b). This could simply relate to a limitation of the technique, but also with the intestinal localization of *A. galli* and the consequent difference in the level of exposure to the immune response. However, there may also be differences between the immune system of mammals and birds.

In a previous work, Marcos-Atxutegi et al. (2009) studied the response of IgG antibodies to somatic antigens of adult worms of *A. galli*. This antibody response dramatically increased at 21 days pi, declined slightly at 42 days pi and then slightly increased again at 96 days pi. Serum samples from experimentally infected hens allowed us to know the time evolution of antigenic recognition in these three different phases (or time points) of the infection. Our results are in accordance with those previously described obtaining a total of 169, 132 and 155 immunogenic spots from *A. galli* confronted to sera respectively obtained at 21, 42 and 96 days pi. Highlights the large number of antigens recognized at an early stage of infection which may be important from the point of view of diagnosis in a period in which





**Fig. 2.** Western blot showing the antigenic spots of the AgSB extract revealed by pools of serum samples from experimentally infected hens collected at 21 (A and B), 42 (C and D) and 96 (E and F) days pi. Reference molecular masses are indicated on the left. The antigenic spots analyzed by mass spectrometry are circled and numbered.

*A. galli* has not reached the adult stage. As for the type of proteins identified, these are similar in all the three periods studied, although a progressive intensity recognition of different protein isoforms of the lipid-binding protein ag-50 is observed (cited above as one of the most abundant proteins

in the proteome of *A. galli* and significant to the parasite survival mechanisms)

In conclusion, 16 proteins of *A. galli* recognized by sera from infected hens were identified. Most of them are involved in key processes for parasite survival and are

mainly related to energy generation, lipid transport and lipid and plasminogen-binding. The antigen recognition of these proteins is early and mainly occurs before maturation of the worms of *A. galli* and fluctuates along infection. We not know the real effect of this antigen recognition in the survival capacity of the *A. galli* adult worms and whether these proteins could be related to the typical disease processes of avian ascariidiasis. Future studies should focus on solving these and other key issues in parasite/host relationships in avian ascariidiasis.

## Acknowledgements

This research was supported by Agencia de Desarrollo Económico de Castilla y León (cofinanced with FEDER funds), Junta de Castilla y León (grant SA090/A09), Spain.

## References

- Ackert, J.E., Herrick, Ch.A., 1928. Effects of the nematode *Ascaridia lineata* (Schneider) on growing. *J. Parasitol.* 15, 1–13.
- Andrade, M.A., Siles-Lucas, M., López-Abán, J., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L., Muro, A., 2005. Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 27 (6), 235–242.
- Bernal, D., de la Rubia, J.E., Carrasco-Abad, A.M., Toledo, R., Mas-Coma, S., Marcilla, A., 2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett.* 563 (1–3), 203–206.
- Boone, T.J., Burnham, C.A., Tyrrell, G.J., 2011. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. *Microb. Pathog.* 51 (4), 255–261.
- Chen, N., Yuan, Z.G., Xu, M.J., Zhou, D.H., Zhang, X.X., Zhang, Y.Z., Wang, X.W., Yan, C., Lin, R.Q., Zhu, X.Q., 2012. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* 30 (23), 3478–3482.
- Cooper, P.J., Chico, M.E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M.W., Urban Jr., J.F., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2000. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *J. Infect. Dis.* 182 (4), 1207–1213.
- Crowe, J.D., Sievwright, I.K., Auld, G.C., Moore, N.R., Gow, N.A., Booth, N.A., 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 47 (6), 1637–1651.
- Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., 2011. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (Suppl. 1), 85–90.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Simón, F., 2010a. Identification of *Dirofilaria immitis* immunoreactive proteins recognized by sera from infected cats using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 174 (1), 78–82.
- González-Miguel, J., Rosario, L., Rota-Nodari, E., Morchón, R., Simón, F., 2010b. Identification of immunoreactive proteins of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* recognized by sera from patients with pulmonary and subcutaneous dirofilariosis. *Parasitol. Int.* 59 (2), 248–256.
- González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., 2012. Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181 (2), 134–140.
- Hewitson, J.P., Harcus, Y.M., Curwen, R.S., Dowle, A.A., Atmadja, A.K., Ashton, P.D., Wilson, A., Maizels, R.M., 2008. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory–secretory products. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160 (1), 8–21.
- Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Büttner, D.W., Hammerschmidt, S., Brattig, N.W., 2003. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1627 (2/3), 111–120.
- Jordanova, R., Radoslavov, G., Fischer, P., Liebau, E., Walter, R.D., Bankov, I., Boteva, R., 2005a. Conformational and functional analysis of the lipid binding protein Ag-NPA-1 from the parasitic nematode *Ascaridia galli*. *FEBS J.* 272 (1), 180–189.
- Jordanova, R., Radoslavov, G., Fischer, P., Torda, A., Lottspeich, F., Boteva, R., Walter, R.D., Bankov, I., Liebau, E., 2005b. The highly abundant protein Ag-lbp55 from *Ascaridia galli* represents a novel type of lipid-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 280 (50), 41429–41438.
- Luna-Olivares, L., Kyvsgaard, N., Rimbaud, E., Pineda, N., 2006. Prevalencia y carga parasitaria de helmintos gastrointestinales en gallinas de traspatio (*Gallus gallus domesticus*), en el municipio de El Sauce, departamento de León, Nicaragua. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET VII*, 1695–7504.
- Magwisha, H.B., Kassuku, A.A., Kyvsgaard, N.C., Permin, A., 2002. A comparison of the prevalence and burdens of helminth infections in growers and adult free-range chickens. *Trop. Anim. Health Prod.* 34 (3), 205–214.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D., Selkirk, M.E., 1991. Parasite Antigen Parasite Genes: A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Marcos-Atxutegi, C., Gandolfi, B., Arangüena, T., Sepúlveda, R., Arévalo, M., Simón, F., 2009. Antibody and inflammatory responses in laying hens with experimental primary infections of *Ascaridia galli*. *Vet. Parasitol.* 161 (1/2), 69–75.
- Marín-Gómez, S.Y., Benavides-Montano, J.A., 2007. Parásitos en aves domésticas (*Gallus domesticus*) en el Noroccidente de Colombia. *Vet. Zootec.* 1 (2), 43–51.
- Martín-Pacho, J.R., Montoya, M.N., Arangüena, T., Toro, C., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Simón, F., 2005. A coprological and serological survey for the prevalence of *Ascaridia spp.* in laying hens. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 52 (June (5)), 238–242.
- Matta, S.K., Agarwal, S., Bhatnagar, R., 2010. Surface localized and extracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (11), 2111–2120.
- Miquel, N., Roepstorff, A., Bailey, M., Eriksen, L., 2005. Host immune reactions and worm kinetics during the expulsion of *Ascaris suum* in pigs. *Parasite Immunol.* 27, 79–88.
- Moreno, Y., Gros, P.P., Tam, M., Segura, M., Valanparambil, R., Geary, T.G., Stevenson, M.M., 2011. Proteomic analysis of excretory–secretory products of *Heligmosomoides polygyrus* assessed with next-generation sequencing transcriptomic information. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (10), e1370.
- Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Pagés, E., Marcos-Atxutegi, C., Simón, F., 2009. Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 166 (2), 134–141.
- Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2006. Proteomic analysis of the tegument and excretory–secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics* 6 (1), 226–236.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearson, M., Kold, J., Nansen, P., 1999. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poult. Sci.* 40, 439–443.
- Ramadan, H.H., Abou Znada, N.Y., 1991. Some pathological and biochemical studies on experimental ascariidiasis in chickens. *Nahrung* 35, 71–84.
- Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A., 2007. *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp. Parasitol.* 115 (1), 83–91.
- Robinson, M.W., Greig, R., Beattie, K.A., Lamont, D.J., Connolly, B., 2007. Comparative analysis of the excretory–secretory proteome of the muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 37 (2), 139–148.
- Schwarz, A., Gaulty, M., Abel, H., Daş, G., Humburg, J., Rohn, K., Breves, G., Rautenschlein, S., 2011. Immunopathogenesis of *Ascaridia galli* infection in layer chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 35 (7), 774–784.
- Simón Vicente, F., 1956. Estudio de las Parasitosis de la Ganadería de la Provincia de Salamanca y su Profilaxis. Ministerio de Agricultura, Dirección General de Sanidad, Salamanca, Spain, pp. 99–101.
- Sotillo, J., Trellis, M., Cortés, A., Valero, M.L., Del Pino, M.S., Esteban, J.G., Marcilla, A., Toledo, R., 2012. Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats. *Parasitol. Int.* 61 (4), 561–564.
- Skallerup, P., Luna, L.A., Johansen, M.V., Kyvsgaard, N.C., 2005. The impact of natural helminth infections and supplementary protein on growth performance of free-range chickens on smallholder farms in El Sauce, Nicaragua. *Prev. Vet. Med.* 69, 229–244.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 952–965.

- Tarazona-Vilas, J.M., 1999. Parasitosis del aparato digestivo, Nematodosis. In: Cordero del Campillo, M., Rojo-Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill, Madrid, pp. 791–808.
- Timanova, A., Müller, S., Marti, T., Bankov, I., Walter, R.D., 1999. *Ascaridia galli* fatty acid-binding protein, a member of the nematode polyprotein allergens family. *Eur. J. Biochem.* 261 (2), 569–576.
- Vassalli, J.D., Sappino, A.P., Belin, D., 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88 (4), 1067–1072.
- Wilson, K.L., Yazwinski, T.A., Tucker, C.A., Johnson, Z.B., 1994. A survey into the prevalence of poultry helminths in northwest Arkansas commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 38, 158–160.





