

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS
BASADAS EN ADN PARA DIAGNÓSTICO DE NEMATODOS
GASTROINTESTINALES DE OVINOS, EN URUGUAY**

SABRINA PIMENTEL BARRETO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2020**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS
BASADAS EN ADN PARA DIAGNÓSTICO DE NEMATODOS
GASTROINTESTINALES DE OVINOS, EN URUGUAY**

SABRINA PIMENTEL BARRETO

América Esther Mederos
Director de Tesis

María Teresa Armúa
Co-director

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Gabriel Ciappesoni Scarone; Ing. Agr. Ph D.
Director Programa Investigación
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - Uruguay**

**Gonzalo Suárez; DMVT Ph D.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay**

**Virginia Golberg; DMVT MSs
División General de Laboratorios Veterinarios, MGAP- Uruguay**



ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 23 de noviembre de 2020

Tribunal: Dr. Gonzalo Suárez (Presidente), Dr. Gabriel Ciappesoni, Dra. Virginia Goldberg

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4430611-9	PIMENTEL BARRETO, Sabrina	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Gonzalo Suárez (Presidente)

FIRMA

Dr. Gabriel Ciappesoni

Dra. Virginia Goldberg

AGRADECMIENTOS

Al **Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)** por brindar sus instalaciones para llevar a cabo la investigación y a la **Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)** por el apoyo financiero para la beca de maestría. Este estudio se realizó en el marco del proyecto aprobado por el Fondo INNOVAGRO "Aumento del retorno económico, reducción del impacto ambiental y mejora del bienestar animal mediante la selección de ovinos Merino Australiano resistentes a las parasitosis gastrointestinales".

A mis tutores **América Mederos** y **María Teresa Armúa**, por todo lo enseñado y por el apoyado en todo el proceso de tesis. Por la ayuda en otros aspectos fuera del marco del trabajo tesis.

A mi amiga **Stephanie Lara** por los aportes y enseñanzas, que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. **Daniel Castells** por su brindar la cepa de *Haemonchus contortus*.

A mi esposo **Nacho** y a mi familia (**Luján, Jorge, Lucas, Santiago, Rosario y Egar**) por el apoyo incondicional. En especial a mi hija **Sofía** que me acompañó en la última etapa para darme ánimo y energía para terminar.

A mis amigos (**Beatriz Carracelas, Celeste Serrano, Luis Moreno, Gonzalo Escayola, Yovana Martínez, Tatiana Saporiti**) por estar siempre. A los compañeros de INIA Tacuarembó Sede, UEG y **La Magnolia**, por buena voluntad y apoyo en todos estos años. Gracias por hacerme sentir parte del equipo!

A todos, MUCHAS GRACIAS!

DEDICATORIA

..a María del Luján Barreto, quién estuvo siempre para apoyarme...

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	7
a) Producción ovina en Uruguay.....	7
b) Importancia de los nematodos gastrointestinales (NGI).....	8
c) Generalidades de los nematodos gastrointestinales	11
d) Epidemiología de los nematodos gastrointestinales	14
e) Diagnóstico de los nematodos gastrointestinales.....	16
i) Diagnóstico clínico de los NGI	17
ii) Diagnóstico basado en recuento de huevos de NGI en materia fecal (HPG).....	17
iii) Coprocultivo	20
iv) Diagnóstico basado en métodos bioquímicos e inmunológicos	21
v) Diagnóstico basado en identificación de NGI adultos	22
vi) Diagnóstico basado en métodos moleculares	23
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
a) Diseño experimental	34
b) Obtención de muestras de materia fecal de ovinos en pastoreo	34
c) Metodología de laboratorio.....	35
i) Recuento de huevos de nematodos gastrointestinales	36
ii) Coprocultivos	37
iii) Recuperación de huevos de NGI de la materia fecal.....	38
iv) Extracción de ADN de huevos, larvas y adultos	40
v) Condiciones utilizadas para los ensayos de PCR convencional.....	41
vi) Condiciones utilizadas para los ensayos de PCR en tiempo real	41
vii) Curva estándar para cuantificación de ADN de huevos de <i>H. contortus</i>	42
d) Análisis estadístico	42
RESULTADOS	44
a) Recuento de huevos en materia fecal (HPG).....	44
b) Resultados de coprocultivos	44
c) Resultados de recuperación de huevos de la materia fecal.....	45
d) Puesta a punto y validación de PCR convencional.....	46
e) Resultados de PCR convencional (ADN L3) vs identificación morfológica de L3	48
f) PCR convencional con ADN de huevos	49
g) Resultados de PCR en tiempo real.....	51
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	62

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	74
a) Anexo 1	74
i) Imágenes de la recuperación de huevos de NGI	74
ii) Imágenes de la extracción de ADN de huevos de NGI	74
b) Anexo 2	75
i) Protocolo de PCR convencional <i>Haemonchus contortus</i>	75
ii) Protocolo de PCR convencional <i>Trichostrongylus</i> spp.	76
iii) Protocolo de PCR convencional <i>Teladorsagia circumcincta</i>	77
c) Anexo 3	78
i) Protocolo de PCR en tiempo real <i>Haemonchus</i> sp.....	78
ii) Protocolo de PCR en tiempo real <i>Trichostrongylus</i> spp.	78
d) Anexo 4	79
i) Cebadores y sondas utilizados en el protocolo de McNally et al. 2013	79
ii) Cebadores utilizados en el protocolo de Demeler et al. 2013	80

ABREVIATURAS

ADNr ácido desoxirribonucleico ribosomal

ADNmt ácido desoxirribonucleico mitocondrial

Ct del ingles “cycle threshold”

DEP diferencia esperada en la progenie

ETS espaciador transcrito externo

HPG huevos por gramo de materia fecal

ITS-1 primer espaciador transcrito interno

ITS-2 segundo espaciador transcrito interno

L3 tercer estado larval

NGI nematodos gastrointestinales

NTS espaciador no transcrito

MF materia fecal

PCR reacción en cadena de la polimerasa

qPCR reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RESUMEN

El recuento de huevos de nematodos gastrointestinales (NGI) en heces es el método más utilizado para estimar la carga parasitaria en ovinos. La composición de las especies se realiza mediante coprocultivos y clasificación morfológica de las larvas infectantes (L3) obtenidas, lo cual es laborioso y demorado. Actualmente se dispone de métodos moleculares, los cuales proclaman ser más rápidos y eficientes. El objetivo de esta tesis fue poner a punto una PCR convencional para la tipificación de géneros y especies de NGI más prevalentes de ovinos y una PCR en tiempo real (qPCR) para la tipificación y cuantificación del género *Haemonchus*. Los ensayos se basaron en combinaciones de cebadores y sondas específicas de género de NGI derivadas de la segunda unidad de transcripción de ADN ribosómico nuclear del espaciador transcrito interno (ITS2). Como ADN molde se utilizó ADN genómico de huevos y larvas infectantes de NGI. Para ello, se obtuvieron 24 muestras de materia fecal de ovinos en pastoreo de distintas razas y categorías. En este estudio se logró exitosamente el desarrollo y validación de los protocolos de PCR convencional para *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp., identificándose bandas de 106 pb, 226 pb y 147 pb para cada uno de los respectivos NGI. Asimismo, se observó que los mejores resultados se obtienen cuando se utilizó ADN de larvas infectantes provenientes de coprocultivos. El análisis de Kappa de Cohen para concordancia entre la clasificación morfológica de las L3 y PCR fue de 82,4% ($p=0.000$) indicando excelente acuerdo entre ambos métodos. Este trabajo también indicó que es posible un diagnóstico confiable mediante qPCR de *Haemonchus* sp., utilizando ADN extraído directamente de huevos recolectados de materia fecal. Se encontró una correlación positiva y alta ($R^2= 0,75$, $p<0,05$) entre los recuentos de huevos por gramo y cuantificación de ADN de *Haemonchus* sp. en la qPCR, sugiriendo que la cuantificación de este género mediante qPCR, es factible. Sin embargo, son necesarios más estudios, fundamentalmente en la extracción de ADN de huevos de estrogilidos de ovinos y cuantificación de los otros NGI prevalentes en ovinos. En conclusión, los resultados presentados en esta tesis muestran que las pruebas moleculares pueden ser incluidos en los estudios sobre NGI de los ovinos.

Palabras clave: nematodos gastrointestinales, diagnóstico molecular, ADN fecal, PCR, qPCR, larvas infectantes, ovinos

SUMMARY

Ovine gastrointestinal nematode (GIN) fecal egg counts (FEC) in feces is the widespread method that allows estimating the parasite burden with high reliability. The GIN's genera composition is obtained by morphological classification of the infective larvae (L3) after culturing the feces and can be time consuming and prone to misclassification. Recently, molecular tests have been published as complementary diagnostic tools in the identification and quantification of parasite genera or specie. The purpose of this thesis was to set up and validate a conventional PCR technique for genera and specie of the most prevalent ovine GIN typification, and a real time PCR (qPCR) for *Haemonchus* genus typification and quantification. The PCR were developed using combinations of primers and probes targeting the second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS2) region (rDNA). Fecal samples from grazing sheep of various age and breed were obtained, and 24 pools were formed. After eggs being counted and L3 obtained and classified from copro-cultures, DNA was extracted. The PCRs was successfully set up and bands of expected size of 106 pb, 226 pb and 147pb were obtained for *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumncincta* and *Trichostrongylus* spp., respectively. The PCR performance was higher with DNA extracted from the L3. A high Cohen's Kappa value (82,4; p=0.000) in morphological classification of L3 and PCR was obtained, indicating almost perfect agreement between both methods. The qPCR was also successfully carried out, and the main results indicated a high correlation between *Haemonchus contortus* egg counts and the amount of DNA extracted from those eggs ($R^2 = 0.75$, $p < 0.05$) for each studied sample. This result suggests that the quantification of this genus using qPCR is feasible, however further studies are needed, mainly focused to improve the DNA extraction from strongylid eggs. Altogether, molecular tests appeared as a useful tool to help sheep GINs studies.

Keywords: gastrointestinal nematodes, molecular diagnosis, fecal DNA, real-time PCR, qPCR, infective larvae, ovine

INTRODUCCIÓN

Uruguay es un país (176 215 km²) que se encuentra enteramente dentro de una zona templada (30° latitud S- 35° latitud S). Tiene un clima agradable en cuanto a temperaturas y régimen de lluvias, suelos fértiles y aguadas naturales, que constituyen un excelente entorno para la ganadería. Existen alrededor de 44000 establecimientos especializados en ganadería, ocupando más de 12 millones de hectáreas de pastoreo extensivo, sobre las que se maneja ganado bovino y ovino. Cuando se habla de sistemas ganaderos extensivos se hace referencia a aquellos que tienen como base de la producción las praderas naturales, con un porcentaje reducido de campos mejorados. El tipo de sistemas de producción se caracteriza por ser mixto, con pastoreo continuo y conjunto de bovinos y ovinos (DIEA, 2018).

Este conjunto de condiciones propicias de clima, topografía y pasturas también resultan adecuadas para el desarrollo de los nematodos gastrointestinales (NGI). Las parasitosis gastrointestinales constituyen uno de los principales problemas sanitario-económicos para la producción ovina tanto en el Uruguay como en el resto del mundo. Los NGI pueden afectar adversamente a sus hospederos, ya sea de forma clínica o sub-clínica. Las enfermedades clínicas (parasitosis) se manifiestan como signos anormales en los sistemas dérmicos, gastrointestinales o cardiovasculares y pueden llegar a causar la muerte de los animales afectados (Craig, 2018). La enfermedad sub-clínica (parasitiasis) es el nivel de parasitismo que causa una menor tasa de ganancia de peso vivo, afectando desarrollo, conversión de alimento, reproducción y la producción de leche y lana. La mayoría de las pérdidas productivas son de este tipo (Castells et al. 1995; Perry & Randolph, 1999; Nieto et al. 2002). Además, el impacto económico también se produce por un aumento en el uso de antihelmínticos y mano de obra (Bonino et al. 1990; Castells et al. 2013).

En Uruguay, las parasitosis son endémicas y los ovinos presentan la mayor parte del año infecciones mixtas. Las dos categorías de ovinos que son particularmente susceptibles a las infecciones son, el cordero en crecimiento, donde todavía no ha adquirido inmunidad y la oveja de cría en el período periparto, donde comúnmente se observa una relajación en la inmunidad ya adquirida (Nari et al. 1977; Bishop & Stear, 2001). Cabe agregar, que el nivel de riesgo epidemiológico para las enfermedades parasitarias puede ser distinto en los diferentes sistemas de producción ya que puede

verse afectado por factores tales como la alimentación, presencia de categorías jóvenes, carga animal, relación ovinos/bovinos (Castells et al. 2013).

Es evidente entonces que el control de los NGI en los sistemas de producción ovina uruguayos es absolutamente necesario. Actualmente, los fármacos antihelmínticos son el principal método de control, y en el mercado existen varias familias de antiparasitarios con diferentes mecanismos de acción. Dicha estrategia de control ha sido efectiva durante varios años. Sin embargo, la dependencia total a un solo método de control ha demostrado ser poco sustentable y eficiente a largo plazo y ha generado graves problemas de resistencia antihelmíntica (Coles et al. 2006). Debido a ello, en los últimos años se han buscado distintas alternativas para el control de los NGI, con diferentes grados de progreso y efectividad. De forma general el objetivo de estas ha sido disminuir el uso de antihelmínticos y retardar el desarrollo de resistencia antihelmíntica. Algunas de las principales alternativas de control de nematodos en ovinos son el manejo del pastoreo, control biológico, selección genética, uso de vacunas, desparasitación selectiva, entre otras (citado por Medina et al. 2014).

El diagnóstico adecuado de los NGI y de la resistencia a los antihelmínticos es fundamental para el control. El recuento de huevos en materia fecal (MF) ha sido la forma más utilizada para diagnosticar gastroenteritis parasitaria en rumiantes y también para verificar la eficacia de los tratamientos antihelmínticos, entre otros. El método no invasivo (*ante mortem*) para la identificación de los NGI presentes es, hasta el momento, el examen microscópico del tercer estado larval (L3), pero la mayoría de las veces la identificación hasta el nivel de especie resulta imposible. De acuerdo con Bott et al. (2009) los enfoques parasitológicos tradicionales utilizados de rutina pueden ser laboriosos y consumir mucho tiempo. Por esa razón, en los últimos años se han propuesto las herramientas de biología molecular como una alternativa para contribuir en el diagnóstico certero de los agentes involucrados, y así, poder emplear medidas de control efectivas para la prevención de las enfermedades parasitarias. Desde hace más de dos décadas se anunció que el uso de la biología molecular en la parasitología veterinaria podría ayudar en el avance de este campo sin la necesidad de sacrificar animales y podría proporcionar buenas oportunidades para estudiar la regulación de la forma de vida parasitaria con gran precisión y especificidad (Prichard, 1997).

Las tecnologías basadas en ADN han tenido un gran impacto en muchas áreas de la parasitología, incluida la identificación de parásitos, el diagnóstico de

infecciones, la epidemiología de parásitos, el análisis de estructuras genéticas poblacionales, la expresión de genes, la organización y el estudio de la resistencia a los antihelmínticos. En particular, con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988) se revolucionó la investigación parasitológica encontrándose una amplia aplicabilidad, principalmente porque su sensibilidad permite la amplificación de genes o fragmentos de los mismos con cantidades ínfimas de material parasitario. Esto es de particular importancia porque con frecuencia es imposible obtener o aislar cantidades suficientes de material de algunos parásitos y sus diferentes etapas del ciclo de vida para los análisis convencionales (Gasser, 1999).

En el desarrollo de los ensayos de PCR para lograr la identificación de especies o cepas de parásitos se han empleado varias regiones diana, que incluyen ADN nuclear (ADNr), ADN mitocondrial (ADNmt) o elementos de ADN repetitivos (loci microsatélite) que muestran una variación considerable en el número de repeticiones dentro de los diferentes individuos (Harris & Crandall, 2000; Gasser, 2006). Esto ha proporcionado un medio para identificar huevos de nematodos y estados larvales con una confiabilidad mucho mayor de lo que generalmente ha sido posible en el pasado con los métodos tradicionales. Los primer y segundo espaciadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) del ADN nuclear han demostrado ser fuentes particularmente útiles de marcadores específicos de especie y/o género para este fin (Gasser, 1999, 2006) porque habitualmente muestran niveles moderados de variabilidad de secuencia entre especies, pero niveles relativamente bajos de variabilidad dentro de las especies. Al mismo tiempo, el ADN nuclear es particularmente susceptible de amplificación utilizando reacciones de PCR porque hay múltiples copias presentes en el genoma de la mayoría de los organismos (Hung et al. 1999).

Al igual que las técnicas de diagnóstico convencionales, las técnicas moleculares necesitan ser puestas a punto y ser validadas en cada laboratorio donde va a ser utilizadas con las poblaciones de estudio. Lo esperable es que la sensibilidad y especificidad de las nuevas técnicas de PCR empleadas sea mayor que el de las técnicas ya existentes y lo novedoso de ellas es que permiten el diagnóstico a nivel de especie parasitaria en el animal vivo a diferencia de las técnicas fenotípicas donde esto es posible solamente en el animal muerto.

Este trabajo tuvo como objetivo poner a punto técnicas moleculares que utilizan el ADN de NGI de ovinos para la tipificación de estos y poder identificar con mayor precisión y rapidez aquellos NGI involucrados en la resistencia antihelmíntica.

Adicionalmente, se buscó correlacionar los resultados de las pruebas fenotípicas con las moleculares.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

a) Producción ovina en Uruguay

La producción ovina ha tenido gran importancia en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay. Ha mostrado una continua evolución en lo que refiere a su orientación en respuesta a las demandas de sus principales productos, inicialmente lana y cueros, y posteriormente también la carne. Los escasos ovinos que había en el país a fines del siglo XVIII, representados por la oveja criolla, producían lana de calidad deficiente, lo que hizo necesario el cruzamiento con animales europeos (Merino) para mejorar la calidad, rendimiento y abastecer las demandas internacionales que incrementaban en esa época. Con esto, la lana se introdujo como uno de los principales rubros exportables junto al cuero y al tasajo. Fue entre 1860 y 1868 que se produjo el gran salto en la producción ovina, con una existencia estimada de 16 o 17 millones de ovinos, cifra muy superior a la que Uruguay cuenta hoy día (Barrán, 2011).

Luego de la etapa de merinización, la producción se orientó al mejoramiento de la carne de ovinos adultos, basados en cruzamientos predominantemente con la raza Lincoln, y en 1920 a la producción de carne de corderos fundamentalmente con la raza Romney Marsh y sus cruza. Así mismo, a partir de 1916 también se introdujeron los primeros ovinos Corriedale llevando esto a la estabilización de la producción hacia el doble propósito de lana y carne (Azzarini & Ponzoni, 1971). En la actualidad, además de las razas tradicionales de doble propósito, aparecen una mayor variedad de genotipos con diferente orientación (carniceros, de tipo prolífico, lechero, etc). Sin embargo, el doble propósito continúa siendo una de las características más destacadas de la producción ovina uruguaya (Castells et al. 2013).

En el último censo de la DIEA (2018) se registró una existencia de 6.6 millones de ovinos, distribuidos en su mayoría en establecimientos que corresponden a sistemas mixtos de producción, junto al rubro bovino. Durante diciembre de 2017 a noviembre 2018 ingresaron a Uruguay un total de 327 millones de dólares por concepto de exportaciones de los productos que componen el rubro ovino (lanas y productos de lana, grasa de lana, lanolina, carne ovina, pieles ovinas y ovinos en pie). El 76.5% de las exportaciones de los productos del rubro ovino, correspondieron a

lana y productos de lana, que totalizaron 250 millones de dólares, aumentando un 17.3%, con respecto al año 2017. Al analizar los otros ítems que componen el rubro, se observa que las exportaciones de carne ovina totalizaron 69 millones de dólares, aumentando un 18.5%. Las de pieles ovinas, totalizaron 2.3 millones de dólares aumentando un 17%, mientras que los ovinos en pie disminuyeron totalizando US\$ 141.676. Tanto la grasa de lana como la lanolina contribuyeron con 4.9 millones, un 37% menos que el igual periodo anterior (Boletín SUL, 2018).

En Uruguay, el principal recurso forrajero sobre el cual se maneja la producción ovina es el campo natural. Esto, asociado a un sistema de pastoreo mayoritariamente continuo, determina que la presencia de NGI sea un componente con el que los ovinos deben coexistir (Castells, 2004). Estas características de los sistemas de producción (mixto, con pastoreo conjunto de ovinos y bovinos, y desarrollado mayoritariamente sobre campo natural) junto a aspectos como nivel de alimentación, estructura de las edades, relación ovino/bovino pueden repercutir sobre el riesgo parasitario. Sin embargo, la variabilidad climática es el fenómeno que más influye en los ciclos parasitarios (Castells et al. 2013).

b) Importancia de los nematodos gastrointestinales (NGI)

Las infestaciones por NGI le cuestan anualmente a la industria mundial de pequeños rumiantes millones de dólares a través de las pérdidas productivas y costos asociados a su control. Los principales efectos de dichos NGI se traducen en desarrollo deficiente de los animales y reducciones en la producción de lana, leche y en la fertilidad (Fox, 1997; Suarez et al. 2007; Suarez et al. 2009). Ocasionalmente, las infestaciones por NGI pueden causar altas mortalidades, aunque las evaluaciones económicas muestran consistentemente que las mayores pérdidas en producción animal son sub-clínicas (Hawkins, 1993; McLeod, 1995; Perry y Randolph, 1999; Perry et al. 2002; Craig, 2018). Además de las pérdidas productivas, el impacto económico también se produce por un aumento de inversión en insumos como antihelmínticos y mano de obra (Bonino et al. 1990; Castells et al. 2013).

Estudios realizados por Castells et al. (1995) demostraron que el impacto potencial en categorías jóvenes de ovinos puede llegar hasta un 50% de mortalidad cuando no se realiza ningún tratamiento, un 23.6% de pérdida de peso vivo y afectar en un 29.4% de peso de vellón sucio, a través de una disminución en el largo de mecha y en el diámetro promedio de la fibra. Desde otra perspectiva, Fernández Abella et al. (2006) evaluaron los efectos de distintos niveles de cargas parasitarias (baja, media y

alta) sobre la tasa ovulatoria, las pérdidas embrionarias y la fecundidad. Para ello, utilizaron 48 hembras sincronizadas de la raza Ideal, con un servicio por monta a corral y luego repaso a campo. Luego del servicio se determinó tasa ovulatoria y fecundidad, mediante laparoscopia y lavado desde el cuerno uterino al oviducto, respectivamente. Para evaluar pérdidas embrionarias y fetales se realizó seguimiento ultrasonográfico. Los resultados del estudio mostraron un marcado efecto negativo en los tres niveles de carga parasitaria (baja, media y alta) sobre la tasa ovulatoria (1.21; 1.06; 1.00), las pérdidas embrionarias (5.6%; 12.5%; 20%) y la fecundidad (99,4%; 81,3%; 73%).

Del punto de vista epidemiológico, los NGI más comúnmente encontrados y con importancia económica descritos para ovinos en pastoreo en diferentes partes del mundo son: *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp. y *Chabertia* spp. (Cuadro 1) (Sutherland & Scott, 2010; Abbott et al. 2012; Castells et al. 2013; Olaechea, 2013; Sinclair et al. 2016). La gastroenteritis parasitaria rara vez se debe a la presencia de una sola especie, generalmente se caracteriza por la presencia simultánea de diferentes géneros de nematodos. Los distintos géneros difieren en su patogenicidad y, por lo tanto, la presentación clínica de los animales afectados es una expresión de varios efectos causados por esos géneros individuales en el tracto gastrointestinal (Muchiut et al. 2018).

Cuadro 1. Principales parásitos localizados en el tracto gastrointestinal de ovinos y sus efectos

Localización de adultos	Nombre específico	Lesión/Efecto
Abomaso	<i>Haemonchus contortus</i>	Pérdida de sangre Puntillado hemorrágico
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Formaciones nodulares umbilicadas
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Áreas de mucosa deprimidas y localizadas
Intestino delgado	<i>T. colubriformis/vitrinus</i>	Alteran el proceso digestivo.
	<i>Nematodirus</i> spp.	Contribuye a la diarrea de <i>T. colubriformis</i>
	<i>Cooperia</i> spp.	Daño de mucosa.
Intestino grueso	<i>Oesophagostomum</i> sp.	Daños de mucosa, nódulos
	<i>Chabertia</i> sp.	Daños de mucosa y eventual diarrea con sangre.

Las principales lesiones de los parásitos que se localizan en abomaso se describen como una reacción inflamatoria progresiva con hiperemia y aumento en la

producción de moco, hipertrofia de la mucosa, reducción de la digestión primaria, disminución de la producción de ácido clorhídrico y pepsina, dispepsia, pérdida de proteínas plasmáticas y pérdida de sangre. Las lesiones causadas por los parásitos localizados en tracto intestinal, se manifiestan como una disminución de la absorción y el transporte debido a la pérdida de agua y electrolitos con aumento del peristaltismo, pérdida de proteínas plasmáticas y malabsorción. La malabsorción está determinada por una rápida renovación de las células epiteliales. Estas nuevas células son inmaduras y carecen de las enzimas necesarias para la digestión, lo que reduce la absorción de vitaminas, aminoácidos y carbohidratos. La diarrea acompaña generalmente las infecciones parasitarias y se debe a la fermentación de carbohidratos en el intestino, cambios en el metabolismo de agua, en el tono digestivo y a un aumento en el peristaltismo. Además, los eventos inmunológicos, como la liberación de histamina, causan la separación de las uniones estrechas entre las células epiteliales, lo que permite una mayor liberación de proteínas y fluidos al lumen intestinal (Giudici et al. 2013; Craig, 2018).

Otra de las restricciones importantes en la producción de ovinos en todo el mundo es la resistencia antihelmíntica generalizada a la mayoría de los grupos químicos (Kaplan, 2004). Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas no químicas como ser manejo de la nutrición, resistencia genética y manejo del pastoreo, entre otras, para uso complementario a la administración de antihelmínticos y minimizar el efecto de los NGI (Miller et al. 2012).

Pero a pesar de los esfuerzos por generar otras alternativas de control, los antihelmínticos son, sin duda, el método de control más utilizado. Dicha estrategia de control ha sido útil por un largo tiempo, pero el uso indiscriminado, la alta frecuencia de dosificación, la subdosificación y la elección errónea de fármacos han generado el fenómeno de resistencia antihelmíntica (Medina et al. 2014). La resistencia antihelmíntica se define básicamente como la disminución de eficacia de un antihelmíntico frente a poblaciones parasitarias que normalmente y, a una dosis determinada, son susceptibles al mismo (Sangster, 1999). Esto puede ser resultado de una modificación genética o de un aumento en la frecuencia de expresión de un carácter hereditario, pero en ambos casos los nematodos que sobreviven al tratamiento transmitirán estos alelos resistentes a su progenie (Anziani & Fiel, 2015).

En la literatura existe abundante evidencia de trabajos enfocados a conocer los factores que favorecen el desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos y potencialmente tratar de desarrollar estrategias de manejo de esta. De acuerdo con

Miller et al. (2012), no es fácil proporcionar información cuantificable del impacto de la RA en los diferentes sistemas de producción debido a las variabilidades tanto de la población animal, como de la parasitaria. Estudios realizados en Nueva Zelanda indicaron pérdidas económicas de 14% asociadas a la resistencia antihelmíntica estimadas sobre el peso vivo y valor de la canal al momento de la faena (Sutherland et al. 2010). Debido a que la resistencia a los antihelmínticos continúa en aumento a nivel mundial y al parecer no es reversible, se ha vuelto necesario contar con métodos de diagnóstico precoces y más precisos para su detección (Coles et al. 2006; Kaplan & Vidyashankarb, 2012).

c) Generalidades de los nematodos gastrointestinales

Nematoda es el segundo filo animal más grande (De Ley & Blaxter, 2002), son gusanos redondos, no segmentados, presentando ejemplares de vida libre así como parásitos. A la fecha, se han descrito 256 familias con 2271 géneros y alrededor de 23.000 especies, pero se estima que puede haber gran cantidad de especies por descubrir (Gibbons, 2002).

El orden Strongylida comprende unas ocho superfamilias de las cuales Trichostrongyloidea contiene la mayoría de los géneros más frecuentes en ovinos. Dentro de esta superfamilia está la familia que comprende los nematodos más patógenos para los ovinos en Uruguay, la familia Trichostrongylidae, nematodos casi únicamente de herbívoros (Durette-Desset et al. 1999). Por tal motivo, este trabajo se centrará en algunos de los géneros pertenecientes a esta familia (*Haemonchus* sp., *Tichostrongylus* spp. y *Teladorsagia circumncincta*).

Una de las principales características de los NGI es que tienen un ciclo biológico directo (no utilizan hospedero intermediario), con una fase no parasitaria en el ambiente y la fase parasitaria en el animal. En ambas fases se realizan mudas de cutícula, pasando por cinco estados larvales hasta llegar a adulto (Figura 1). El ciclo biológico es muy similar para todos los NGI, los huevos son eliminados con las heces, los que, en condiciones de temperatura y humedad óptimas, evolucionan a larvas de primer estado (L1). Posteriormente, la L1 sufre su primera muda, evolucionando a larva de segundo estado (L2). La L2 repite la muda alcanzando el tercer estado larval (L3), estado infectante para su hospedero. Tanto L1 como L2 se alimentan de bacterias y detritos que se encuentran en el ambiente. Sin embargo, la L3 no puede alimentarse ya que mantiene la vaina de la L2. Estas deben ser ingeridas por su hospedador para poder continuar su ciclo. Las L3 ingeridas se liberan y penetran en la pared del órgano

que parasitan, realizan una muda al cuarto estado larval (L4) y vuelven al lumen del órgano respectivo para continuar su desarrollo hasta el quinto estado larval (L5) y culminar en adultos, diferenciándose en macho y hembra, los cuales se unirán para la cópula. Finalmente, las hembras iniciarán la postura de huevos, reiniciando el ciclo parasitario (Abbott et al. 2012).

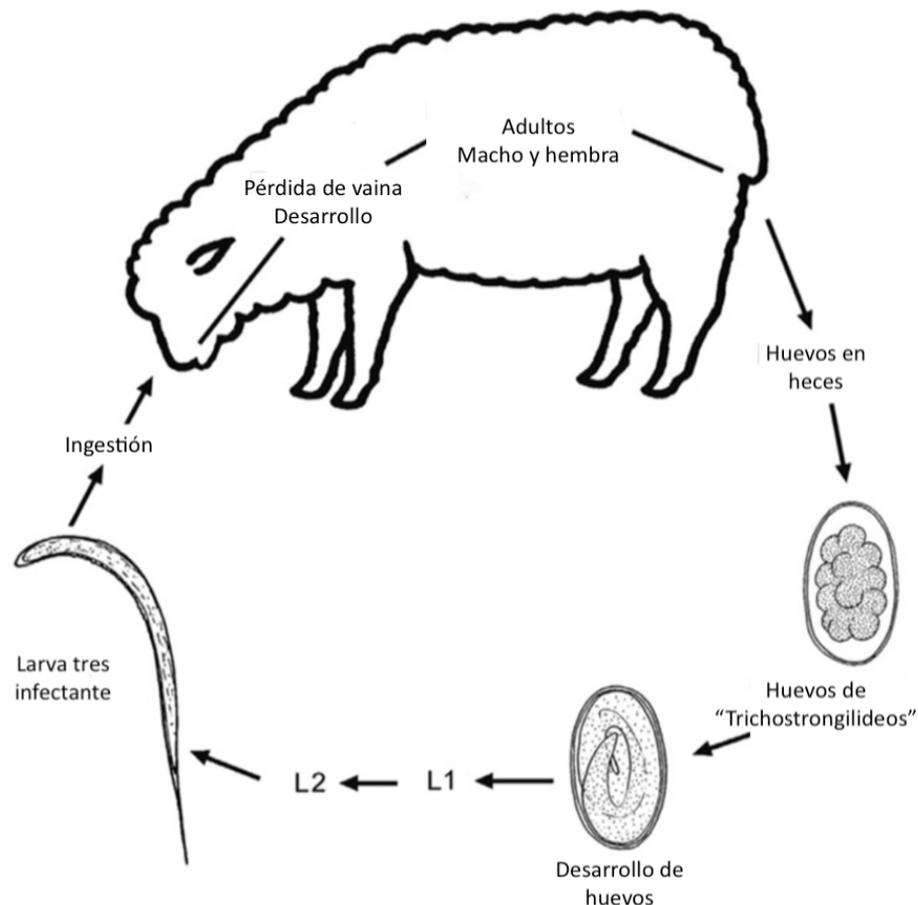


Figura 1. Ciclo biológico de nematodos gastrointestinales (orden Strongylida) de pequeños rumiantes. Las larvas de primera, segunda y tercera etapa (L1, L2 y L3, respectivamente) constituyen la fase no parasitaria. La cuarta y quinta etapa larval (L4, L5) y la fase adulta son parásitas en el tracto gastrointestinal del hospedero rumiante. Adaptado Roeber et al. (2013).

Subfamilia Haemonchinae

Dentro de la familia Trichostrongylidae están incluidas subfamilias de interés veterinario como la subfamilia Haemonchinae que incluye géneros que se alojan en el abomaso de numerosas especies de ungulados y son de distribución cosmopolita. Los adultos tienen una longitud de 10-30 mm, por lo que son visibles a simple vista. Poseen una pequeña cápsula bucal con una formación neodóntica (Giudici et al.

2013). *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) es el nematodo que más perjuicios ocasiona a la ganadería ovina en todo el mundo por su alta patogenicidad. Debido a que son hematófagos y tienen un alto potencial biótico (que le da la capacidad de lograr aumentos rápidos en la población parasitaria) produce frecuente mortalidad en ovinos. Los últimos estados larvarios y los parásitos adultos pueden succionar entre 30-50 μ l de sangre por animal/día, causando anemia que se manifiesta generalmente luego de dos semanas de infección (Besier et al. 2016). Cada hembra de *H. contortus* puede eliminar al ambiente entre 5000-12000 huevos por día, lo que puede conducir a una rápida contaminación de las pasturas (Emery et al. 2016). El período entre la ingestión de larvas infectantes y la primera producción de huevos se denomina período prepatente. Para la mayoría de los NGI el período prepatente es de 3 a 4 semanas (Hansen & Perry, 1994). En ovinos, el período prepatente de *H. contortus* es de 18-21 días, los estadios adultos tienen una corta vida, sobreviviendo solo por algunos meses (Baker et al. 1959). Debido a estas características, este parásito se garantiza una variación genética lo suficientemente alta como para permitir cambios rápidos de adaptación al clima, hospederos y tratamientos (Emery et al. 2016).

Subfamilia Trichostrongylinae

Este grupo está conformado por gusanos filamentosos muy pequeños, de menos de 7mm de longitud y con ausencia de cápsula bucal, corona o dientes. Una hembra produce alrededor de 100-200 huevos por día, los cuales son más alargados y estrechos que los de otros NGI (Bowman, 2003; Craig, 2009). Estos parásitos se alimentan de tejidos y bacterias y se caracterizan por formar úlceras de tipo crateriforme en la mucosa abomasal e intestinal (Barker, 1975). Están presentes en un amplio rango de hospederos y se encuentran en el tracto digestivo de aves, rumiantes, lagomorfos y roedores, pudiendo afectar ocasionalmente al hombre (Durette-Desset et al. 1999). Dentro de esta subfamilia en rumiantes se encuentra *Trichostrongylus axei* que parasita ovinos y se aloja en abomaso y sus larvas penetran en las criptas de la mucosa gástrica y emergen 15 días luego de la infección, causando cambios en la mucosa (Bowman, 2003). También puede ser hallado en bovinos, equinos y suinos. *Trichostrongylus colubriformis*, otro nematodo de esta familia, se localiza en intestino delgado y los principales efectos patogénicos son causados por las L3 desenvainadas que se entierran entre las vellosidades intestinales y conducen a la formación de túneles subepiteliales (Beveridge et al. 1989). Los nematodos jóvenes que se desarrollan en estos túneles salen 10-12 días después de la infección. Esta salida causa

daños extensos a la mucosa del intestino y produce signos de enteritis generalizada, incluyendo hemorragia, edema y pérdida de proteínas plasmáticas hacia la luz intestinal y posterior hipoalbuminemia e hipoproteinemia (Taylor et al. 2007).

Subfamilia Ostertagiinae

Estos parásitos afectan principalmente a bovinos, ovinos, caprinos y cérvidos (Durette-Desset et al. 1999). Son de pequeño tamaño, con un rango entre especies que oscila entre 6,5 y 12 mm. *Teladorsagia circumcincta* es la principal especie que parasita el abomaso de ovinos y cabras, aunque también fue encontrada en rumiantes salvajes. Esta especie tiene una postura de huevos diaria por hembra de 100-200 y se alimenta de los nutrientes que obtienen de mucinas, células epiteliales o residuos celulares (Young et al. 1995). Sus principales efectos patogénicos son causados por las etapas larvales, estas se desarrollan en las glándulas gástricas abomasales, lo que conduce a la formación de nódulos en la mucosa del abomaso y al daño extenso de las células parietales. Comúnmente, ocurren infecciones moderadas o subclínicas que causan diarrea, pérdida de peso vivo y producción reducida de lana (Zajac, 2006). El período prepatente de este parásito es de aproximadamente tres semanas y los parásitos adultos sobreviven solo unos pocos meses (Taylor et al. 2007).

d) Epidemiología de los nematodos gastrointestinales

Los NGI presentan un ciclo biológico monoxeno, ya que su forma infectante se desarrolla en el medio ambiente y la transmisión es exclusivamente horizontal (Bowman, 2003). El desarrollo de las etapas parasitarias de vida libre en el ambiente depende las condiciones climáticas de la temperatura y humedad. En los países que se encuentran en zonas tropicales y subtropicales las condiciones favorables permanentes son óptimas para el desarrollo continuo de los parásitos, mientras que en zonas templadas durante el invierno las temperaturas pueden caer por debajo de las ideales, y afectar las poblaciones de vida libre, sobre todo para el desarrollo del género *Haemonchus*. Bajo condiciones naturales de campo el período en que tardan en eclosionar los huevos de esta familia oscila entre 2 y 3 semanas. Por otro lado, la temperatura ideal para el desarrollo larvario de muchas especies oscila entre 22°C y 26°C. Algunas especies de parásitos pueden continuar su desarrollo a temperaturas más bajas, pero a un ritmo más lento. Lo mismo ocurre a temperaturas más altas, pero a más de 30°C aumenta la tasa de mortalidad larvaria. La humedad ideal para el desarrollo larvario es de 100%.

Otro factor que afecta la supervivencia de las larvas en el medio ambiente es la exposición a la luz solar. Dependiendo de las condiciones climáticas mencionadas, las larvas infectantes pueden sobrevivir alrededor de 6 semanas, o incluso más cuando se mantienen en la materia fecal, la cual las protege de la desecación. De las tres etapas larvales, la larva infectante L3 es la más resistente a las condiciones ambientales, ya que mantiene una vaina protectora del estadio anterior (Hansen & Perry, 1994).

Para quedar expuestas a la ingestión por los rumiantes, las larvas tienen que migrar o ser transportadas desde las heces hasta la pastura. Tal movimiento ocurre de dos maneras: transporte/migración horizontal y transporte/migración vertical. La distancia horizontal en la que la L3 migrará activamente no suele superar los 5-10cm. Una vez en el forraje, las larvas infectantes migran hacia arriba o hacia abajo de las hojas de la pastura de acuerdo con la cantidad de humedad. Durante la lluvia y cuando hay rocío, las larvas pueden migrar a la parte superior del forraje. Después de la evaporación, las larvas migran a la base del forraje e incluso descienden hacia el suelo. Luego de ingeridas, las larvas infectantes continúan su desarrollo en el tracto digestivo del animal, sin embargo este puede detenerse temporalmente en la mucosa abomasal e intestinal, lo que ocurre generalmente cuando el medio ambiente se torna desfavorable para la supervivencia. Este periodo donde las larvas enquistadas en la mucosa detienen su desarrollo manteniendo un metabolismo basal se conoce como hipobiosis. Cabe destacar que el fenómeno de hipobiosis puede ser facultativo u obligatorio dependiendo del clima. En el Uruguay, *H. contortus* es la única especie que parasita ovinos que ha sido reportada con hipobiosis invernal. Luego de alcanzado la etapa adulta, las hembras copulan y producen huevos.

El nivel de producción de huevos de las hembras de NGI depende también del estado inmunitario del hospedero y la categoría. Los corderos y las ovejas en el período peri-parto son las categorías más afectadas y epidemiológicamente más relevantes en la diseminación de huevos al ambiente (Besier et al. 2016). El desarrollo de inmunidad natural en los ovinos se completa al año y medio de edad, pero los intensos cambios metabólicos que ocurren en la oveja próximos al parto y en las primeras semanas de lactancia determinan una caída en la inmunidad, que junto con un aumento en la fecundidad de las hembras parásitas y salida de larvas hipobióticas que rápidamente alcanzan la madurez sexual, se traduce en aumento de la eliminación de huevos, fenómeno conocido como “alza de lactación” (Ayalew & Gibbs, 1973; Nari et al. 1977).

En Uruguay, resultados de un estudio epidemiológico realizado en varias regiones del país durante los años 2007 a 2009, demostraron que las especies de NGI más prevalentes en ovinos fueron *H. contortus* y *T. colubriformis*, representando un 35,1% y 31,9%, respectivamente del total de NGI identificados (Castells et al. 2011). Dicho estudio también reafirmó los conocimientos previos de la frecuencia de aparición de los diferentes géneros de nematodos a lo largo del año, con variaciones que dependieron principalmente de las condiciones climáticas. Por lo tanto, *H. contortus* que es de clima cálido, presenta los mayores niveles de parasitosis a inicios de otoño y en verano si estos son lluviosos. Si el verano se presenta seco se frena el desarrollo de la enfermedad, lo mismo ocurre en inviernos muy fríos. El mencionado estudio mostró además que en invierno los niveles de nematodos adultos de *H. contortus* son sensiblemente bajos, pero en ningún momento los recuentos de dicho parásito disminuyeron a cero en el período estudiado. Por otro lado, Pereira et al. (2006) estudiaron el nivel de infectividad del campo natural contaminado por huevos de *H. contortus* en diferentes estaciones del año, los resultados revelaron que *H. contortus* encuentra en otoño las mejores condiciones para el desarrollo y persistencia en el tiempo de sus formas libres.

El *Trichostrongylus* spp. es un NGI de clima templado a frío, por lo que aumenta su proporción a finales de otoño y comienzos del invierno principalmente, presentando valores más bajos el resto del año. La especie *Teladorsagia circumcincta* es de clima frío y se desarrolla entre 7°C y 20°C con adecuados niveles de humedad, condiciones que se dan en invierno y principios de primavera. Los valores medios de *Teladorsagia circumcincta* hallados durante el trabajo realizado por Castells et al. (2011) fueron relativamente bajos, aunque en ningún momento del año llegaron a cero. El género *Nematodirus* es típico de climas fríos, por lo que aumenta su frecuencia de aparición a fines de invierno y principios de primavera. Los trabajos realizados indican que existen diferencias entre lugares y animales, pero que en general las medias de nematodos adultos se mantienen bajas. El género *Cooperia* registra los valores más altos en invierno, aunque habitualmente se halla en bajos niveles en ovinos y se encuentra principalmente en ovinos que comparten pastoreo con bovinos (Castells et al. 2011; Castells et al. 2013).

e) Diagnóstico de los nematodos gastrointestinales

En la actualidad varios enfoques están disponibles para la identificación de los NGI. Desde los métodos convencionales de identificación morfológica, hasta las más

complejas tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento (Seesao et al. 2017). Para lograr un diagnóstico preciso, realizar estudios epidemiológicos, evaluar la eficacia de medicamentos antihelmínticos, así como para la rutina de monitoreo de los establecimientos ganaderos son deseables metodologías de laboratorio sensibles, confiables y rentables (Demeler et al. 2012). Aún se utilizan de manera rutinaria los métodos fenotípicos tradicionales que comprenden principalmente la microscopía, sin embargo, estos se han complementado con una variedad de nuevas técnicas y herramientas, como lo son las herramientas de diagnóstico molecular (Gasser et al. 2008).

Varios son los métodos empleados para el diagnóstico *ante mortem* de infecciones por NGI, los más comunes se basan en la observación de signos clínicos de la enfermedad (combinados con la anamnesis), el examen microscópico de la MF de hospederos infectados y enfoques de diagnóstico bioquímicos y/o serológicos (Roeber et al. 2013). Los métodos que se usan de forma generalizada son el recuento de huevos de NGI por gramo de materia fecal (HPG) y el coprocultivo e identificación de los estadios infectantes. Como lo indica Gasser et al. (2008), las técnicas tradicionales de diagnóstico tienen muchas limitaciones, son laboriosas y muchas veces no dan un resultado preciso del tipo de NGI que está presente.

i) Diagnóstico clínico de los NGI

Algunas veces el diagnóstico de las infecciones causadas por nematodos se puede hacer en base a signos clínicos como diarrea, anemia, disminución de la fertilidad, pérdida de la condición corporal, disminución de la producción de carne, leche y/o lana y en casos graves la muerte del animal. El tipo y el grado de la manifestación clínica va a ser dependiente de factores como las especies parasitarias presentes, la carga parasitaria, el estado inmunológico y reproductivo del animal (Kenyon et al. 2009). Se han desarrollado varios enfoques para interpretar estos signos clínicos y así lograr identificar a aquellos animales que necesitan tratamiento. Estos enfoques incluyen a modo de ejemplo la evaluación del grado de anemia mediante el método FAMACHA® que determina el grado de coloración de la mucosa ocular (van Wyk y Bath, 2002), grado de suciedad en cuartos traseros causado por diarrea o Dag score (Larsen et al. 1994) y condición corporal (Russel et al. 1969; Kenyon et al. 2009).

ii) Diagnóstico basado en recuento de huevos de NGI en materia fecal (HPG)

El recuento de huevos ha sido utilizado para estimar la intensidad de la infección (McKenna, 1987; McKenna & Simpson, 1987), para la toma de decisiones de tratamientos y evaluar la efectividad de los antihelmínticos (Waller et al. 1989). Además, es un parámetro importante para distinguir entre fenotipos de ovinos susceptibles y resistentes a los NGI. En Uruguay, se incluyó a finales de la década de los 90 la resistencia genética a NGI en las evaluaciones genéticas poblacionales de las razas Merino y Corriedale; publicándose el valor genético como diferencia esperada en la progenie (DEP) para HPG. El DEP para HPG es resultado del análisis de los recuentos de HPG de la progenie de los carneros evaluados en cada establecimiento (Castells & Gimeno, 2010).

El HPG es una de las técnicas más utilizada y se emplea con frecuencia para el diagnóstico parasitológico. Es una técnica económica, de fácil aplicación y baja tecnología, lo que la hace adecuada para su uso como diagnóstico de rutina (Demeler et al. 2012). Durante años han estado disponibles distintos protocolos de HPG, como los métodos de flotación simple, la técnica de McMaster modificada, la técnica de flotación de Wisconsin, el método de flotación centrífuga directa de Lane (1922) y la técnica de dilución de Stoll (1923) (MAFF, 1986). El HPG consiste en mezclar un cierto peso de MF con un volumen conocido de una solución con una alta densidad específica (la más empleada es la solución sobresaturada de cloruro de sodio, densidad: 1.2) para hacer flotar los huevos de parásitos (NGI y cestodos) en la superficie de la suspensión. De los métodos mencionados arriba, el más utilizado es la técnica de McMaster modificado, desarrollada en Australia y originalmente utilizada para el recuento de huevos de nematodos en ovinos (MAFF, 1986).

Recientemente, se dispone de las técnicas como FECPAK®, FLOTAC® y Mini-FLOTAC® que tienen una mayor sensibilidad. FECPAK® se basa en un enfoque de McMaster modificado con un límite de detección de 30 HPG. Esta técnica se desarrolló en Nueva Zelanda para proporcionar un método simple y rápido de recuento de huevos en los establecimientos y así tomar decisiones de tratamiento o para evaluar la eficacia antihelmíntica (Bosco et al. 2014). La técnica FLOTAC® y Mini-FLOTAC® son métodos coprológicos relativamente nuevos y que ha mejorado significativamente la sensibilidad, con un límite de detección de 1 HPG en bovinos y 5 en ovinos (Rinaldi et al. 2011). La técnica FLOTAC® se basa en la flotación centrífuga de la muestra y el posterior traslado de la capa superior de la suspensión de flotación (Cringoli et al. 2010), lo que facilita la lectura en el microscopio ya que la mayoría de los residuos ya no están en la trayectoria de la luz. Para que esta técnica

pueda ser aplicada en estudios de mayor escala en laboratorios que no disponen de equipos de centrifugación, se ha desarrollado una versión más simplificada denominada Mini-FLOTAC®. Con Mini-FLOTAC®, la suspensión fecal se adiciona a las cámaras de flotación, cada una capaz de contener 1 ml de suspensión. Después de reposar durante 10 minutos, la parte superior del disco de lectura se traslada y se cuentan los huevos de la cámara trasladada. Presenta un límite de detección de 5 HPG en bovinos y 10 en ovinos (Cringoli et al. 2013).

Más allá de las ventajas que presentan estos métodos, es importante considerar algunos factores que pueden limitar la interpretación de los resultados, entre ellos están el almacenamiento y factores biológicos como la fecundidad y el contenido de agua en la MF. Previo al examen coprológico es necesario un correcto almacenamiento de las muestras de MF, para de esta forma, se retarde la eclosión de los huevos y degradación biológica (Nielsen et al. 2010). Se han desarrollado distintas estrategias para evitar este problema, como la refrigeración (Nielsen et al. 2010) y el almacenamiento al vacío (Rinaldi et al. 2011).

Otro factor por considerar es el contenido de agua en MF, ya que este puede diluir o concentrar el número de huevos afectando el recuento de una muestra (Le Jambre et al. 2007). Por todo lo anteriormente dicho, los resultados de HPG no se deben interpretar de forma aislada, sino que deben ser considerados en conjunto con la información sobre el estado nutricional, la edad y el manejo de los animales. Aunque se han realizado avances recientes para mejorar el procedimiento, es probable que algunas limitaciones del HPG no se puedan resolver en el corto plazo (Roerber et al. 2013).

Varios autores concuerdan que existe una relación entre el HPG y la carga total de parásitos adultos, estando influidos por muchos factores, como el potencial biótico del género parasitario, la nutrición, la edad e inmunidad del animal (Tarazona, 1986; Rowe et al. 2008). Se ha demostrado que para especies con alto potencial biótico, como *H. contortus* existe una buena correlación (Roberts & Swan, 1981). Sin embargo, la correlación es menor para aquellos géneros de menor fecundidad como *T. circumcincta* (Martin et al. 1985) y *Trichostrongylus* spp. (Sangster et al. 1979). El problema es aún más complejo en infecciones naturales ya que es habitual que las infecciones parasitarias en el campo sean mixtas y en estos casos la correlación entre el HPG y la carga de parásitos es aún menor (Amarante, 2000). Por lo antes expuesto, se debe considerar con cuidado el valor diagnóstico del HPG para estimar la carga de parásitos en el animal.

iii) Coprocultivo

Como se mencionó previamente, no es posible diferenciar microscópicamente la mayoría de los géneros de NGI por coprología, a excepción de algunos con una morfología distintiva de huevos como ser *Nematodirus* spp. (8 células en la mórula y un tamaño de 150 μm de largo y 100 μm de ancho). En la actualidad, el método comúnmente utilizado para identificar los géneros de nematodos trichostrongilídeos en la MF es mediante coprocultivos que demoran entre 10 a 14 días en su procesamiento, ya que se basa en la obtención de L3 para su posterior identificación microscópica. Mediante la utilización de diferentes claves, las L3 se puede identificar a nivel de género o en algunos casos, aunque muy raramente, a nivel de especie (Niec, 1968; van Wyk & Mayhew, 2013).

La identificación fenotípica de las L3 tiene varios inconvenientes ya que además de ser un método laborioso y demorado, requiere de personal entrenado en identificar correctamente las diferencias morfológicas entre los géneros (Lichtenfels et al. 1997). Además, el desarrollo de los distintos géneros de NGI puede variar para un mismo rango de temperatura, humedad y período, lo que es importante teniendo en cuenta que el coprocultivo se utiliza para estimar la contribución de diferentes especies a infecciones mixtas (Rossanigo & Gruner, 1994).

La identificación específica de las larvas cultivadas también representa un desafío. Se han descrito varios enfoques para la identificación de las L3 infectantes a nivel de especie o género. Los métodos comúnmente empleados se basan en detectar características morfológicas detalladas en las claves de identificación como: la longitud total, el número de células intestinales, la longitud de la cola, la longitud de la vaina de la cola y morfología cefálica (Niec, 1968; MAFF, 1986; van Wyk & Mayhew, 2013).

Los estudios basados en la morfología de las L3, confirmaron que generalmente es posible distinguir la mayoría de los géneros nematodos que estaban presentes en rumiantes basándose en atributos relativamente constantes (Zarlenga et al. 2016). Niec (1968) utilizó para la diferenciación morfológica, principalmente el largo de la cola de la vaina. Según el largo de ésta formó tres grupos principales: a) larvas con cola de vaina corta, b) larvas con cola de vaina mediana y c) larvas con cola de vaina larga. En el grupo a, de cola de vaina corta, se hallan las larvas de: *Trichostrongylus* spp. y *Teladorsagia circumcincta*. En el grupo b, de cola de vaina mediana, ubicamos a *Haemonchus* spp. y *Cooperia* sp. Al grupo c, de cola de vaina

larga, pertenecen los géneros *Nematodirus* spp., *Oesophagostomum* spp. y *Chabertia ovina*.

van Wyk & Mayhew (2013), por su lado, desarrollaron un enfoque simplificado que utiliza la longitud media de la extensión de la cola de la vaina y un enfoque adicional que utiliza un filamento delgado y terminal de la cola de la vaina larval.

iv) Diagnóstico basado en métodos bioquímicos e inmunológicos

Se han evaluado enfoques bioquímicos e inmunológicos para el diagnóstico específico de las infecciones por NGI. Existen parámetros como las concentraciones de pepsinógeno y gastrina o anticuerpos circulantes que podrían ser indicativos de infecciones parasitarias y ser de utilidad en el diagnóstico parasitológico (Eysker & Ploeger, 2000).

Las células principales del fondo gástrico producen el pepsinógeno proenzimático, que se convierte en su forma activa que es la pepsina. Esta transformación está mediada por el ácido producido por las células parietales. Cuando se destruyen las glándulas parasitadas de la mucosa gástrica, la producción de ácido clorhídrico de las células parietales disminuye, dando como resultado una falla para convertir el pepsinógeno en pepsina activa. El pepsinógeno acumulado puede escapar a la sangre entre las uniones de las células que están dañadas (Berghen et al. 1993). Este aumento de pepsinógeno en sangre se ha asociado con el daño causado por el desarrollo de las etapas larvales de *Teladorsagia circumcincta*. Sin embargo, Berghen et al. (1993) encontraron que puede haber otras causas parasitarias o no parasitarias de aumento de la concentración de pepsinógeno en sangre. Otros trabajos realizados encontraron que los parásitos abomasales como *Trichostrongylus axei* y *Haemonchus* sp. producen aumentos inconsistentes en el pepsinógeno en la sangre, por lo que serían necesarios más trabajos para confirmar la utilidad de medir el pepsinógeno en sangre (Ross et al. 1967; Shoo & Wiseman, 1986).

La gastrina es una hormona producida por las células G presentes principalmente en la parte media de las glándulas de la región pilórica antral del abomaso. Anderson et al. (1985), observaron un aumento en los niveles de gastrina en ovinos infectados artificialmente con *Teladorsagia circumcincta*. Estos autores también sugieren que el propio parásito podría estimular de forma directa las células G para producir gastrina. Sin embargo, todavía se necesitan estudios epidemiológicos

extensos antes de que estos parámetros se puedan implementar de forma rutinaria para monitorear la salud de las majadas (Eysker & Ploeger, 2000).

Durante mucho tiempo se ha determinado que el sistema inmunológico desempeña un papel importante en la resistencia a la infección por NGI (Presson et al. 1988). Para esta respuesta inmune intervienen células, citoquinas y anticuerpos. Los anticuerpos asociados a infecciones parasitarias son IgG1, IgE e IgA, pudiendo ser producidos a nivel local o periférico. La detección de una respuesta de estos anticuerpos frente a una infección por NGI constituye otra estrategia potencial de diagnóstico.

Está disponible comercialmente una prueba de saliva para la detección de la infección por NGI en ovinos. La prueba mide los anticuerpos (IgA), que se consideran dirigidos contra las larvas del parásito en la mucosa intestinal de los ovinos (CARLA™ test). Se ha demostrado que los animales con títulos de anticuerpos altos tienen recuentos de HPG más bajos y mejores tasas de crecimiento (Demeler et al. 2012).

Para la detección serológica e inmunológica de infecciones por NGI, se han descrito diversos métodos basados en ELISA para diferentes especies, principalmente *Haemonchus contortus* y *Teladorsagia circumcincta*. Se desarrollaron varios ELISA séricos para la detección de infecciones por *H. contortus* (Schallig et al. 1995; Kooyman et al. 1997; Gómez-Muñoz et al. 2000; Kandil et al. 2017), *T. circumcincta* (Huntley et al. 2001; Molina et al. 2009), *Trichostrongylus* spp. (Shaw et al. 1998; Bendixsen et al. 2004) u *Oesophagostomum* spp. (Jas et al. 2010). Una limitación significativa de estos enfoques serológicos es que no pueden distinguir de manera confiable entre las infecciones recientes y anteriores.

v) Diagnóstico basado en identificación de NGI adultos

El recuento y tipificación de NGI de rumiantes es un procedimiento parasitológico estándar comúnmente empleado para una variedad de diagnósticos, como ser diagnóstico de la eficacia antihelmíntica y estudios epidemiológicos. La recuperación de NGI, generalmente implica la necropsia del ovino y extracción de abomaso, intestino delgado e intestino grueso, lavado del contenido de cada órgano a través de un tamiz y obtención de alícuotas representativas para el conteo e identificación de los NGI de cada órgano (MAFF, 1986). Además del sacrificio del animal, esta técnica presenta como desventaja que es muy laboriosa y que necesita personal entrenado para la identificación de los NGI.

vi) Diagnóstico basado en métodos moleculares

Desde de la década de 1980, los enfoques tecnológicos basados en ADN han tenido gran impacto en muchas áreas de parasitología (McManus & Bowles, 1996; Gasser, 1999). La molécula de ADN presenta ciertas características que la convierten en una herramienta verdaderamente útil. Es una molécula biológica extremadamente estable, de larga vida, que se puede recuperar de material biológico, incluso cuando este está dañado. Otra característica importante es que se encuentra en todos los tejidos o fluidos biológicos que tienen células nucleadas (o células no nucleadas con plásmidos y/o mitocondrias), lo que permite su recuperación de casi todos los tipos de sustratos biológicos (Ahmed et al. 2011), lo que podría extrapolarse en parasitología a las distintas etapas del ciclo biológico (huevos, larvas y parásitos adultos).

A fines de la década de 1980, Mullis y sus colegas desarrollaron la PCR (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988), un método *in vitro* capaz de amplificar específicamente las regiones de ADN a partir de cantidades limitadas de ADN molde. El advenimiento de la PCR significó que poca cantidad de ADN ya no era una limitante en la investigación en biología molecular o en los procedimientos de diagnóstico. De hecho, es difícil encontrar publicaciones en ciencias biológicas que no hagan referencia a la aplicación de la PCR de una forma u otra. En parasitología no ha sido distinto y se han desarrollado gran cantidad de métodos diagnósticos acoplados a la PCR (Gasser, 1999).

La elección de una o más regiones objetivo o diana es fundamental para el desarrollo de un método basado en PCR para la identificación de un determinado parásito. La secuencia de la región de ADN seleccionada debe ser lo suficientemente variable para permitir la identificación de parásitos al nivel taxonómico requerido y por otro lado, debe mostrar una variación baja o nula dentro de una especie. En cambio, es necesario que exista un grado considerable de variación en la secuencia dentro de una misma especie, si se desea identificar variantes de población, es decir “cepas” o genotipos. A pesar de todas estas exigencias, se ha encontrado un rango de regiones diana en los genomas nucleares y mitocondriales para lograr la identificación de parásitos a nivel de especies o cepas (Blouin, 2002).

El ribosoma es un organelo intracelular que sintetiza proteínas o cadenas polipeptídicas. El propio ribosoma está constituido por proteínas y ARN ribosomal, este último es codificado por el ADN ribosomal (ADNr). El ADNr de eucariotas

consta de repeticiones en tándem de un segmento unitario llamado operón que se compone de espaciador no transcrito (NTS), espaciador transcrito externo (ETS), 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2 y 28S (Figura 2) (Nierhaus, 2004).

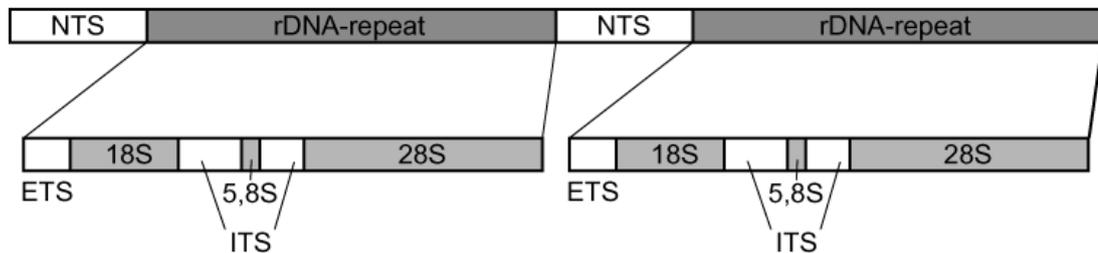


Figura 2. Diagrama esquemático de repeticiones en tándem de ADN ribosomal (ADNr). El segmento génico del ADNr eucariota contiene trectos 18S, 5.8S y 28S y forma un grupo repetitivo en tándem. NTS=espaciador no transcrito, ETS=espaciador transcrito externo, ITS=espaciadores transcritos internos 1 y 2.

Los genes y espaciadores ribosómicos nucleares son de naturaleza ubicua y se puede amplificar fácilmente mediante PCR, lo que los hace ideales para la caracterización molecular de parásitos morfológicamente similares y para estudiar la variación genética dentro de una especie (Ahmed et al. 2011). De todas las regiones espaciadoras, la ITS-1 ubicada entre las regiones 18S y 5.8S es la más conservada y reconocida como un excelente marcador genético para la identificación de diferentes especies de nematodos trichostrongilídeos. Además de ITS-1, el ITS-2 ubicado entre las regiones 5.8S y 28S también se ha utilizado con mucha frecuencia como marcador genético para la identificación a nivel de especie de varios parásitos (Gasser et al. 2008). Muchos estudios han demostrado consistentemente que el ITS-1 y el ITS-2 del ADNr nuclear proporcionan marcadores genéticos confiables para la identificación específica de nematodos strongylídeos, incluidas especies de *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Teladorsagia circumcincta* (Gasser et al. 2008). Por otro lado, la magnitud de la variación de la secuencia tanto en el ITS-1 como en el ITS-2 dentro de una especie es considerablemente menor (generalmente < 1.5%) que los niveles de diferencias de secuencia entre las especies, proporcionando la base para la identificación específica en trichostrongilídeos (Gasser et al. 2008).

Al igual que el ADNr, el ADNmt también se ha empleado para la identificación y diferenciación de especies de parásitos y/o diferenciación de parásitos en subespecies. El ADNmt consta de 5 a 10 anillos de ADN y lleva cerca de 16.500 pares de bases con 37 genes (13 proteínas, 22 ARNt y dos ARNr) que están encargados de la producción de proteínas involucradas en la respiración (Hu et al.

2004). En el genoma mitocondrial, el gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (cox I) y el gen de la subunidad 4 de la nicotinamida deshidrogenasa (nad4), han demostrado ser objetivos apropiados para la identificación y diferenciación de parásitos dentro de especie (Blouin et al. 1998), dado que evoluciona más rápidamente que el ITS.

La tecnología del ADN ha tenido un gran impacto en muchas áreas de la parasitología, incluida la identificación y la sistemática de parásitos, el diagnóstico de infecciones, la epidemiología, el análisis de estructuras genéticas poblacionales, la expresión de genes y la organización, el estudio de la resistencia a los medicamentos y el desarrollo de vacunas. En particular, el advenimiento de la PCR (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988) ha revolucionado la investigación parasitológica y ha encontrado una amplia aplicabilidad principalmente porque su sensibilidad permite la amplificación de genes o fragmentos de ellos con cantidades mínimas de material parasitario (Gasser, 1999).

PCR convencional

Podríamos definir a la PCR como una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Cuando se realiza una reacción de PCR, se necesitan varios componentes. El primero de ellos es el ADN molde u objetivo, que contiene la región del fragmento de ADN a amplificar. Para lograr la amplificación de dicha región, se diseñan dos cebadores (pequeños fragmentos específicos de ADN sintético), que determinan el comienzo y el final de la región a amplificar por la ADN polimerasa. Los cebadores o primers son secuencias de oligonucleótidos (típicamente de 15-30 pares de bases) obtenidos por síntesis química. Son dos secuencias diferentes, una denominada “forward” o sentido y otra “reverse” o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el ADN objetivo y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la ADN polimerasa en dirección 5’-3’ (como sucede endógenamente). Otro componente fundamental de la reacción es la ADN polimerasa, es una enzima termoestable que puede soportar las altas temperaturas requeridas (hasta 100°C). La enzima más comúnmente utilizada es Taq ADN polimerasa que se obtiene a partir de una bacteria termófila llamada *Thermusaquaticus* sp. El papel de la ADN polimerasa

en la PCR es copiar las moléculas de ADN. La enzima se une al ADN de una sola hebra y sintetiza una nueva hebra complementaria a la cadena original. Las ADN polimerasas requieren una región corta de ADN de doble cadena para empezar su trabajo, en la PCR, esto es proporcionado por los cebadores unidos a la cadena molde. De esta manera los cebadores dirigen la ADN polimerasa para copiar solo la secuencia de ADN objetivo. Los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados: adenina, timina, citosina y guanina), son los “ladrillos” o “materia prima” que utiliza la enzima para formar la nueva cadena de ADN. Además, la ADN polimerasa necesita un cofactor para aumentar el rendimiento de la reacción (Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)), un buffer o solución amortiguadora, que proporciona un entorno químico adecuado para que realice la amplificación, y agua destilada libre de enzimas (Winter, 2005).

El proceso de PCR consiste en una serie de 25-40 ciclos. Cada ciclo consta de tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión. Antes del primer ciclo, el ADN habitualmente se desnaturaliza durante un tiempo prolongado para garantizar que tanto el ADN molde como los cebadores se hayan separado completamente (una sola cadena), a esta etapa se le denomina desnaturalización inicial. Durante la desnaturalización el ADN de doble cadena debe calentarse a $94^{\circ}C-96^{\circ}C$ para separar las cadenas y romper los enlaces de hidrógeno que conectan las dos cadenas de ADN. En la hibridación, después de separar las cadenas de ADN, la temperatura se reduce rápidamente para que los cebadores puedan unirse a las regiones de ADN complementarias. La temperatura de esta etapa depende de las características de los cebadores y suele oscilar entre $45^{\circ}C-65^{\circ}C$. Esta temperatura es crítica, ya que de utilizarse una temperatura incorrecta durante este paso puede dar como resultado que los cebadores no se unan al ADN molde, o se unan al azar (generando amplificaciones inespecíficas). En la fase de extensión, la ADN polimerasa tiene que rellenar las hebras faltantes. Comienza en el cebador (primer) hibridado y continúa su camino a lo largo de la cadena de ADN en dirección de la síntesis de ADN, es decir $5'$ a $3'$. La temperatura de extensión depende de la ADN polimerasa, pero suele ser entre $68^{\circ}C$ a $72^{\circ}C$ ya que a esa temperatura la funcionalidad de la enzima es óptima. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores. Estos están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios son controladas (Pestana et al. 2010).

Una vez que se completa la reacción de PCR, para corroborar si se amplificó la secuencia objetivo de interés, los productos de la PCR, también llamados amplicones, se pueden identificar por su tamaño mediante la electroforesis en gel. La

electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida (agarosa) que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Si bien existen varios tipos de matrices para separar moléculas, la agarosa es la más utilizada con ácidos nucleicos. La agarosa cuando se solidifica forma una matriz porosa. El diámetro de los poros es inversamente proporcional a la concentración o porcentaje de agarosa empleada, es decir, a mayor concentración de agarosa, menor será el diámetro de los poros. Así es que, para pequeños fragmentos de ADN (<300pb), se utilizan concentraciones mayores de agarosa (por ejemplo, 2%). Cada muestra es colocada en pequeños pocillos dentro del gel.

Para conocer el tamaño del producto de la PCR, se incluye un marcador molecular de ADN que contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido. Para favorecer la transmisión eléctrica y la separación de las moléculas, el gel debe estar sumergido en un buffer o tampón que puede ser TAE (Tris, acetato y EDTA) o TBE (Tris, borato y EDTA). Los ácidos nucleicos tienen carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran desde el polo negativo hacia el polo positivo. Como resultado, las cadenas de ADN más pequeñas se mueven más rápido que las cadenas más grandes a través del gel, quedando en la parte más inferior del mismo luego de la corrida. Es imprescindible agregar en el gel un agente intercalante tal como Bromuro de Etidio, GelRed® o GelGreen®. Dicho intercalante se une al ADN de doble cadena durante la migración. Este agente, al unirse al ADN y cuando es excitado con luz UV emite una luz que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo en un equipo transiluminador (Serrato et al. 2014; Fierro, 2014).

PCR en tiempo real

Como se mencionó anteriormente, después de la amplificación, la electroforesis en gel se utiliza para analizar los productos de PCR amplificados, la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) supera este problema, ya que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. El término “en tiempo real” se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo, a veces utilizado para este método, hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la

qPCR, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa como ocurre en la PCR convencional.

Dicha química requiere el uso de un método para detectar el producto formado en cada ciclo y de un equipo termociclador que esté adaptado para registrar los resultados obtenidos en cada ciclo de amplificación en una forma de tiempo real. Además de los componentes químicos ya mencionados para la PCR convencional, se debe incluir un sistema reportero de fluorescencia (fluoróforos) que marcará los amplicones que se van generando en cada ciclo. Estos fluoróforos varían y dependen del sistema de qPCR y termociclador se utilice. Muchas veces, ya vienen incluidos con el «Master mix», una mezcla que contiene la ADN polimerasa, el tampón, los dNTPs, el $MgCl_2$ y fluoróforos, por lo que se deberá adicionar solamente los cebadores y el ADN molde (Pestana et al. 2010).

Los equipos para llevar a cabo la qPCR están compuestos por un termociclador y un lector de fluorescencia para monitorear el progreso de la reacción de amplificación, así como un Hardware y un Software para la captura y el análisis de los datos, respectivamente. La tecnología incluida en los termocicladores de qPCR debe lograr excitar a la molécula que emite fluorescencia, capturar la señal de emisión de este y realizar el análisis cuantitativo. El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión) (Aguilera et al. 2014).

La cinética de la qPCR se puede dividir en cuatro fases principales (Figura 3): fase lineal, fase exponencial temprana, fase exponencial y fase de meseta (Tichopad et al. 2003). Durante la fase lineal (generalmente los primeros 10 a 15 ciclos), la PCR recién está comenzando y la emisión de fluorescencia en cada ciclo aún no ha aumentado por encima de la línea de base. La fluorescencia basal se calcula en este momento. En la fase exponencial temprana, la cantidad de fluorescencia ha alcanzado un umbral donde es significativamente mayor que los niveles de base. El ciclo en el que ocurre esto se conoce como Ct, del inglés “cycle threshold”, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación de los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas de ADN que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN objetivo haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor

inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN y a partir de este valor se logra la cuantificación. El valor de Ct puede ser asignado de manera automática por el Software del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual (Heid et al.1996). Durante la fase exponencial, la PCR alcanza su período de amplificación óptimo con el producto de la PCR duplicándose después de cada ciclo en condiciones de reacción ideales. Finalmente, la etapa de meseta se alcanza cuando los componentes de la reacción se limitan y la intensidad de la fluorescencia ya no es útil para el cálculo de los datos (Wong & Medrano, 2005).

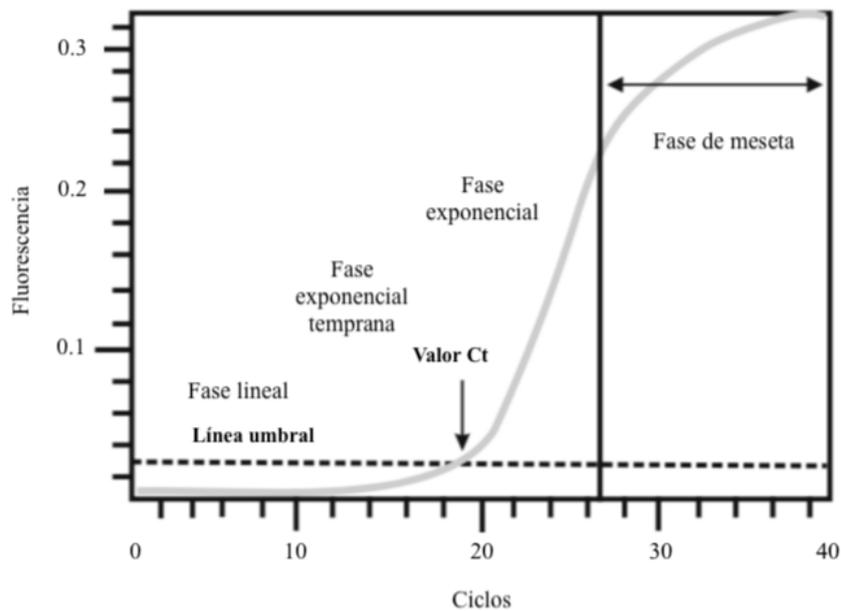


Figura 3. Cinética de amplificación de la PCR. Durante los ciclos iniciales de la PCR no hay cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia emitida, por lo que es indistinguible el ADN amplificado y el ruido basal, pero permiten fijar la línea base (fase lineal). En la siguiente etapa, aumenta la cantidad del ADN amplificado y la señal fluorescente. El punto donde se observa un sensible incremento en la fluorescencia se conoce como fase exponencial temprana, la cual es el origen de la fase exponencial. Finalmente, se llega a la fase de meseta donde el producto obtenido permanecerá constante, aunque se aumente el número de ciclos (Adaptado Pestana et al. 2010).

El rendimiento general de la qPCR se determina mediante el uso de diluciones en serie de un control de ADN molde, procedimiento conocido como curva estándar. La curva estándar ayuda a determinar la eficiencia, precisión y sensibilidad de los cebadores y las sondas. La eficiencia de una PCR es una medida de la velocidad a la que la polimerasa convierte los reactivos en amplicones, el aumento máximo de amplicón por ciclo es el doble, lo que representa una reacción que es 100% eficiente. Es importante medir la eficiencia de la reacción pues la misma es indicativa de la calidad de las reacciones y sirve para detectar resultados artificiales. Las reacciones

de baja eficiencia (< 90%) pueden ser causadas por inhibidores de la ADN polimerasa, temperatura de hibridación alta o subóptima, ADN polimerasa vieja o inactiva, cebadores mal diseñados o amplicones con estructuras secundarias. La alta eficiencia de reacción (> 110%) es generalmente el resultado de dímeros de cebadores o amplicones no específicos. Las causas más comunes de las eficiencias de reacción altas y bajas son pipetas mal calibradas o una técnica de pipeteo deficiente (Taylor et al. 2010).

Para la curva estándar se realizan diluciones en serie de dos a diez veces del ADN objetivo. Se recomiendan diluciones en serie por triplicado para evaluar la reproducibilidad y los posibles errores de pipeteo. Después de la amplificación de qPCR, la eficiencia se calcula utilizando la pendiente de la curva estándar. Una buena eficiencia se logra cuando la cantidad de control de ADN objetivo se duplica con cada ciclo. La gráfica de curva estándar se construye trazando el registro de la cantidad inicial de ADN en función de los valores Ct obtenidos y debe generar un ajuste lineal con una pendiente entre -3.1 y -3.6, lo que indica una eficiencia de reacción del 90%–110% (Pestana et al. 2010).

Idealmente, la dilución en serie producirá curvas de amplificación con réplicas ajustadas que están espaciadas uniformemente. Si se produce una duplicación perfecta con cada ciclo de amplificación, el espaciado de las curvas de fluorescencia se determinará mediante la ecuación $2^n = \text{factor de dilución}$, donde n es el número de ciclos entre las curvas en el umbral de fluorescencia (en otras palabras, la diferencia entre valores Ct de las curvas).

La ecuación de la línea de regresión lineal, junto con el coeficiente de correlación de Pearson (r) o el coeficiente de determinación (r^2), se puede usar para evaluar si el ensayo de qPCR está optimizado. El valor r o r^2 de una curva estándar representa qué tan bien los datos experimentales se ajustan a la línea de regresión, es decir, qué tan lineales son los datos. La linealidad, a su vez, proporciona una medida de la variabilidad entre las réplicas de ensayo y si la eficiencia de amplificación es la misma para diferentes números de copia del ADN de inicio. Una diferencia significativa en los valores de Ct observados entre réplicas disminuirá el valor de r o r^2 (Taylor et al. 2010).

Aplicaciones de la PCR en tiempo real en parasitología

Desde que los avances logrados en la tecnología de ADN permitieron un mayor uso de la qPCR, muchos trabajos han evaluado la posibilidad de realizar la

identificación de NGI *ante mortem* mediante qPCR, a partir de huevos obtenidos de MF, evitando la necesidad de realizar coprocultivos y posterior identificación morfológica (Bott et al. 2009; Roeber et al. 2012a; Demeler et al. 2013; McNally et al. 2013).

En algunos trabajos, el aislamiento de ADN de los huevos de MF no fue precedido por la purificación de mismos, es decir, se realizó directamente de las heces. Por ejemplo, Sweeny et al. (2011) utilizaron el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (Mol-Bio, West Carls-bad, CA, Estados Unidos) y lograron realizar con éxito PCR específica para nematodos con ADN aislado directamente de materias fecales ovinas. Dichos autores observaron altos niveles de concordancia con la técnica de flotación utilizada, donde el HPG tenía un límite de detección > 50 HPG; sin embargo, no se realizaron coprocultivos en el intento de confirmar los datos de la PCR. Años más tarde, McNally et al. (2013) desarrollaron un método para extraer ADN de heces de ovinos que implica deshidratación en etanol, homogenización, batido y centrifugados para romper muestras fecales y extracción de ADN con perlas magnética, seguido de qPCR multiplex a nivel de género para cuantificar huevos de *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* spp. y de *Teladorsagia circumcincta*.

Por otro lado, algunos estudios mostraron que al realizar la purificación previa de los huevos de la MF y/o la dilución de ADN para reducir la cantidad de inhibidores, se lograba una mejora en la sensibilidad (Bott et al. 2009; Roeber et al. 2012a; Demeler et al. 2013). von Samson-Himmelstjerna et al. (2002) fueron unos de los primeros en desarrollar qPCR para la cuantificación de NGI de ovinos. Dichos autores diseñaron sondas y cebadores específicos de género de NGI derivados de la región ITS-2 para los nematodos comunes de pequeños rumiantes. Los ensayos reportados mostraron una buena sensibilidad y especificidad para la detección de los géneros evaluados utilizando ADN genómico derivado de L1. Posteriormente, Bott et al. (2009) desarrollaron una metodología de qPCR acoplada al análisis de la curva de disociación para siete diferentes trichostrongilídeos de ovinos utilizando un único primer reverse conservado con cebadores forward específicos de especie y género. El ensayo mostró una correlación positiva entre los valores de Ct en la qPCR y el recuento de HPG, lo que permitió la semicuantificación del ADN del parásito en MF. Más tarde esta metodología se aplicó en Australia a infecciones adquiridas naturalmente en ovinos, mostrando una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, resultado que apoyó la idea de complementar o sustituir los coprocultivos e

identificación morfológica de las L3 por los análisis de base molecular (Roeber et al. 2011).

Lo más reciente en diagnóstico ha sido el desarrollo de plataformas robóticas que permiten la separación de los huevos de la MF, obteniendo ADN de buena calidad para la amplificación y, finalmente, producen un resultado que indica el grado de infección de las diferentes especies de parásitos comúnmente encontrados en infecciones mixtas (Roeber et al. 2012b).

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Las parasitosis gastrointestinales son una de las limitantes sanitarias más importantes en los pequeños rumiantes a nivel mundial (Perry & Randolph, 1999). Los NGI favorecen de manera importante a reducir la productividad en términos de carne, leche y lana en los animales (Fox, 1997; Suarez et al. 2007; Suarez et al. 2009). El control de los NGI se realiza principalmente mediante tratamiento antihelmíntico donde la elección del tipo y momento de tratamiento se definen después del diagnóstico, es decir la identificación y cuantificación de la parasitosis (Miller et al. 2012). Para ello se utilizan métodos fenotípicos (HPG y coprocultivos), pero según Lichtenfels et al. (1997) existen limitaciones al momento de identificar todas las etapas del desarrollo de los NGI, lo que obstaculiza el diagnóstico y el control. Para superar este problema, las técnicas moleculares aparecen como una alternativa promisorio para la identificación de especies de NGI y resultarían en una herramienta de apoyo para los métodos basados en microscopía (Gasser et al. 2008).

La tecnología de ADN podría proporcionar vías para superar estas limitaciones y ayudar a desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles y confiables para NGI en ovinos (Bott et al. 2009). Hasta la fecha, se ha reportado en la literatura varios ensayos de PCR para la identificación o diferenciación de huevos o larvas de strongilídeos que han mostrado ser de utilidad (Bott et al. 2009; Roeber et al. 2012a; Demeler et al. 2013; McNally et al. 2013). Estas metodologías necesitan ser puestas a punto y validadas en cada laboratorio donde van a ser utilizadas. Lo esperable es que la sensibilidad y especificidad de las nuevas técnicas de PCR desarrolladas sea mayor que el de las técnicas ya existentes y lo novedoso de ellas es que permiten el diagnóstico a nivel de especie parasitaria en el animal vivo a diferencia de las fenotípicas donde esto es posible solamente en el animal muerto.

Con este trabajo se buscó en primer lugar poner a punto técnicas de PCR convencional y qPCR que utilizan el ADN extraído de huevos y larvas de NGI de ovinos, y en segundo lugar realizar una comparación de los resultados obtenidos con métodos fenotípicos (MiniFLOTAC®, coprocultivos) y moleculares (PCR convencional y qPCR).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El empleo de técnicas moleculares podría ser una herramienta más precisa y rápida que la clasificación fenotípica de los nematodos gastrointestinales realizada en los ovinos *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Puesta a punto y validación de protocolos de PCR convencional y de PCR en tiempo real para la tipificación y cuantificación de géneros y especies de NGI de ovinos.

Objetivos Específicos

1. Puesta a punto y validación de PCR convencional para el diagnóstico y tipificación a nivel de especie de NGI a partir de ADN extraído de larvas infectantes de ovinos.
2. Puesta a punto y validación de PCR en tiempo real para el diagnóstico y tipificación a nivel de géneros de NGI a partir de ADN extraído de huevos.
3. Comparar los resultados obtenidos de métodos fenotípicos (MiniFLOTAC®) y moleculares (qPCR) para la cuantificación de NGI en ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Diseño experimental

Para la realización del presente trabajo, se efectuó una investigación analítica observacional, durante el período comprendido de setiembre de 2017 a mayo de 2018. Las muestras utilizadas fueron MF obtenidas de ovinos en pastoreo de distintas categorías (corderos, borregos, ovejas). Se utilizaron animales de distintas razas (Merino, Merino dohne, Corriedale y cruza) pertenecientes a la Unidad Experimental Glencoe (UEG) de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en Tacuarembó y cuatro establecimientos comerciales ubicados en la región norte de Uruguay con el objetivo de obtener variabilidad de las poblaciones parasitarias. En la UEG se realizaron cuatro muestreos y se obtuvieron 3 pools de MF en cada oportunidad (n=12). Dichos muestreos se realizaron en los períodos setiembre y octubre de 2017 y en enero y abril de 2018. En cada establecimiento comercial se realizó un muestreo y se obtuvieron un promedio de 3 pools de MF en cada lugar (n=12). Las categorías de ovinos muestreadas en los cinco establecimientos fueron corderos (n=80), borregos (n=70) y ovejas (n=90). Se realizaron 144 recuentos de HPG (6 repeticiones), 48 coprocultivos para recuperación y tipificación de L3 (2 repeticiones) y 48 recuperaciones de huevos (2 repeticiones). Dos de los establecimientos comerciales se muestrearon en diciembre de 2017 y dos en mayo de 2018. Dichos muestreos abarcaron primavera, verano y otoño que son las estaciones de mayor abundancia de NGI.

b) Obtención de muestras de materia fecal de ovinos en pastoreo

Cada pool de MF estuvo constituido por muestras provenientes de diez ovinos de la misma categoría. Las muestras se extrajeron directamente del recto de los animales y se colocaron en una única bolsa polietileno (Figura 5). El peso mínimo de cada pool fue de 60g (aproximadamente 6g/animal). Inmediatamente de tomadas las muestras, se homogenizó y se dividió en dos sub-muestras, una de 20g y otra $\geq 40g$ utilizando balanza digital. A cada sub-muestra se le aplicó un método de conservación distinto, la primer sub-muestra de 20g se conservó en condiciones de anaerobiosis, para evitar de esta manera el desarrollo celular de la mórula de los huevos (Schnieder et al. 1999; Demeler et al. 2013). A su vez, la submuestra para conservación en anaerobiosis fue dividida en 2 porciones de 10g cada una. Cada muestra fue colocada en frasco de plástico de boca ancha de 100 ml de volumen, se completó con agua de

la canilla a temperatura ambiente y se homogenizó hasta que la MF estuvo disuelta, se retiró el aire y se cerró herméticamente. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. La segunda sub-muestra (≥ 40 g) se conservó refrigerada en bolsa de polietileno cerrada evitando la presencia de aire. Ambas fueron llevadas en conservadora al Laboratorio de Sanidad Animal de INIA, Tacuarembó.

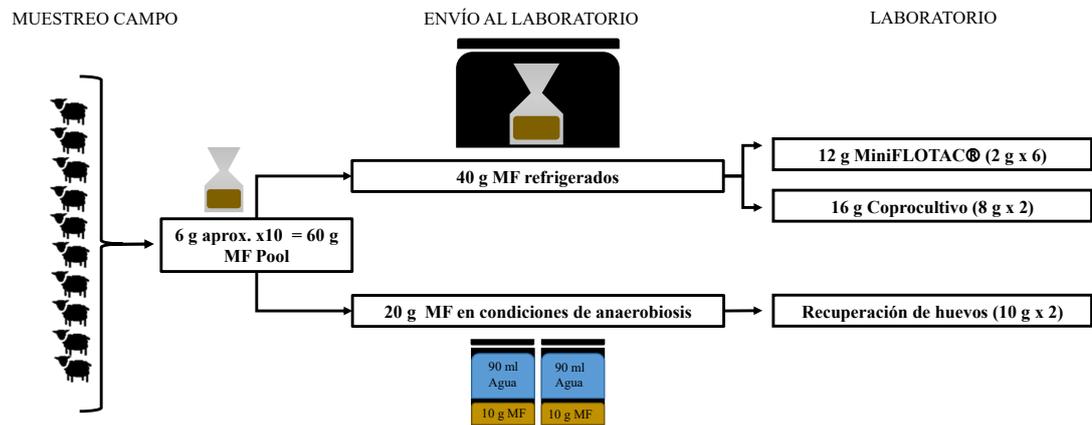


Figura 4. Esquema de muestreo para obtención del pool de materia fecal de ovinos en pastoreo. Se indica la cantidad de animales (n=10), los procesos en la toma y acondicionamiento de las muestras de materia fecal (MF) y técnicas de laboratorio a las cuales fueron sometidas (MiniFLOTAC®, coprocultivo y recuperación de huevos de materia fecal).

c) Metodología de laboratorio

En el laboratorio, cada pool de muestra (n=24) fue sometido a los siguientes análisis de laboratorio (Figura 5):

- Recuento de huevos por gramo de MF (HPG) mediante método de MiniFLOTAC®
- Coprocultivos y determinación del porcentaje de géneros presentes en el coprocultivo
- Extracción de ADN de las L3 de *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp. para PCR convencional
- Recuperación y conteo de huevos recuperados por gramo de la muestra de MF en anaerobiosis
- Extracción de ADN de huevos y qPCR (Ct) para *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp.
- PCR convencional realizada con el ADN de huevos para *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus* spp.

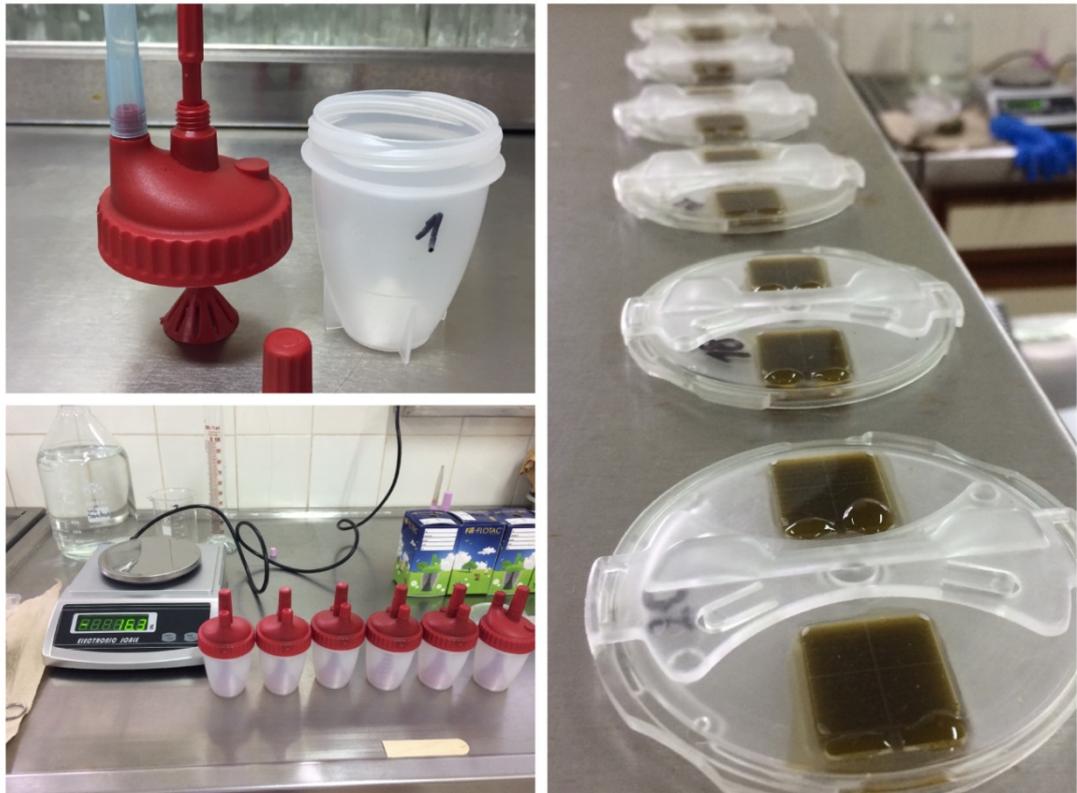


Figura 6. Método de Mini-FLOTAC® (Cringoli et al. 2013). Izquierda abajo, balanza digital, solución sobresaturada de NaCl y recipientes Fill-FLOTAC. Izquierda arriba, Fill-FLOTAC y a la derecha Mini-FLOTAC con sus dos cámaras llenas con la solución de cada muestra.

ii) *Coprocultivos*

Los coprocultivos se procesaron siguiendo la técnica descrita por Henriksen y Korsholm (1983) y modificada por Fernández et al. (1999). Brevemente, luego de homogenizar la MF proveniente de cada pool, se colocaron 8g en un recipiente plástico y se agregaron 4g de vermiculita y 5 ml de agua destilada. Luego de homogeneizar, se cubrió el recipiente con gasa, el recipiente fue invertido y se hicieron pequeñas perforaciones en la base para permitir la aireación. Dicho recipiente fue colocado sobre un recipiente plástico de mayor tamaño conteniendo 15 ml de agua. Luego se colocó en estufa a 24°C - 26°C. Las muestras se procesaron en duplicado y se dejaron 14 días en incubación. Luego, las L3 fueron recuperadas por el método de Baermann (MAFF, 1986) durante 24 hs y recogidas en tubo cónico Falcon™ de 15 ml y almacenadas en heladera a 4°C hasta su lectura (Figura 7). Para la tipificación de los géneros parasitarios se emplearon las claves de Niec (1968) y van Wyk & Mayhew (2013).



Figura 7. Coprocultivo y recuperación de larvas infectantes. Izquierda arriba, recipiente plástico conteniendo 8g de materia fecal de ovinos más 4g de vermiculita. Izquierda abajo, recipiente con perforaciones para aireación. Medio arriba, coprocultivos ubicados en estufa. Medio abajo, recuperación de larvas mediante el método de Baermann (MAFF, 1986). Derecha, tubo cónico Falcon™ de 15 ml con larvas infectantes recuperadas.

iii) *Recuperación de huevos de NGI de la materia fecal*

Para la recuperación de huevos de NGI de la MF se utilizó el procedimiento descrito por Demeler et al. (2013). El contenido de cada frasco fue filtrado por tamiz de 150 μm colocado sobre otro tamiz de 25 μm . El material fue retenido en el filtro de 25 μm . El contenido del tamiz de 25 μm fue centrifugado a 140xg por 5 min, luego se re-suspendió el pellet en 15 ml de solución saturada de NaCl volviendo a centrifugar a 190xg por 5 min. Posteriormente, se transfirieron los 5ml superiores en un nuevo tubo. Se diluyó con agua de la canilla hasta 50 ml y se centrifugó nuevamente a 190xg por 5 min para eliminar los restos de NaCl, repitiéndose 3 veces este procedimiento quedando con una muestra final de 15 ml.

Para limpiar la muestra de restos vegetales, en una segunda etapa se utilizó un gradiente de azúcar con concentraciones de 10%, 25% y 40%. En un tubo Falcon™ de 50 ml, se colocaron 10 ml de cada concentración de manera tal que el orden de las distintas soluciones de arriba hacia abajo fuera 10%, 25% y 40%. Se depositaron 15 ml de la suspensión de huevos obtenida sobre la superficie del gradiente (capa superior, 10%). Luego se centrifugó a 190xg y se recolectaron los huevos que quedaron en el borde entre la parte inferior de la capa superior (10%) y la parte superior de la capa del medio (25%). La suspensión de huevos se pasó a un tamiz de 25 μm y se lavó con agua para remover los restos de sacarosa. Finalmente, el material retenido en el filtro fue colocado en un tubo de 15 ml, se centrifugó a 190xg por 5 minutos y se lavó 2 veces con agua destilada estéril. Luego, se re-suspendió el pellet en 1 ml de agua destilada y se transfirió a un microtubo de 2 ml.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de huevos obtenidos en 1 ml de suspensión y se calculó el número de huevos por gramo de MF recuperado (número de huevos obtenidos en 1ml de suspensión/10). Las suspensiones de huevos obtenidas por cada pool (2 microtubos con 1ml cada uno) fueron identificaron y se conservaron en freezer a -20°C para su posterior extracción de ADN (Figura 8).

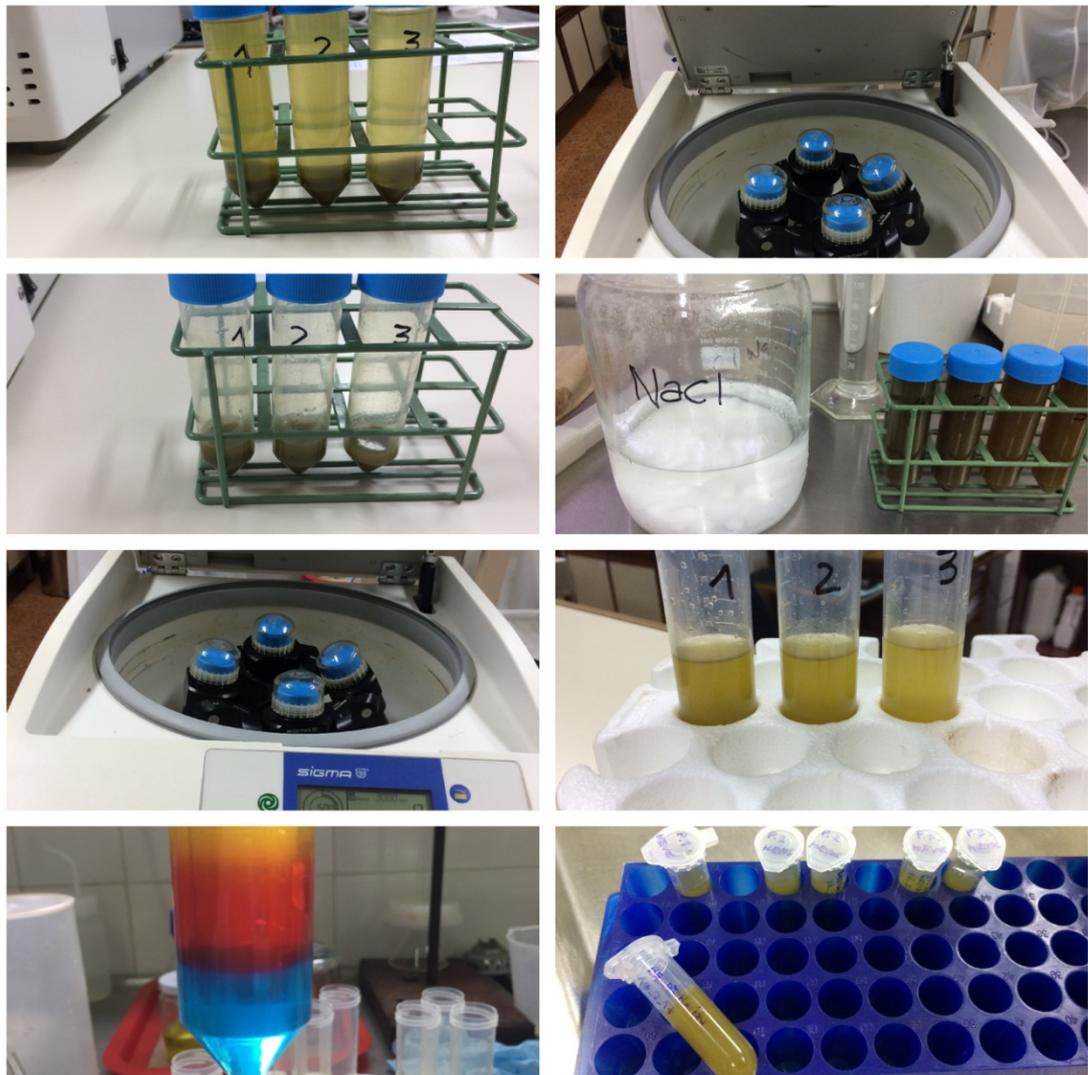


Figura 8. Imágenes del procedimiento de recuperación de huevos de nematodos gastrointestinales de materia fecal de ovinos en pastoreo según protocolo descrito por Demeler et al. (2013).

iv) *Extracción de ADN de huevos, larvas y adultos*

Para la extracción de ADN de huevos de NGI se utilizó la metodología descrita por Demeler et al. (2013). Brevemente, se realizó la lisis de los huevos mediante cinco ciclos de congelado freezer a -80°C por 10 min (ThermoScientific, Freezer vertical Serie 900 -86°C , USA) y calentamiento en baños seco a 105°C por 10 min (Barnstead Thermolyne, Type 17600 Dri-Bath, Iowa, USA), agitando con vórtex entre los intervalos (Labnet International Inc., Vortex Mixer 230 V EU PLUG, USA). Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología Forestal de INIA Tacuarembó. A continuación se realizó una dilución 1/10 y se conservó a -20°C para su posterior utilización.

Los ejemplares adultos de NGI (machos y hembras) fueron obtenidos de necropsias parasitarias de ovinos que se realizaron con otro propósito en animales

sacrificados en frigorífico. Se realizó su tipificación y se utilizaron alrededor de 10 individuos del mismo sexo en cada extracción (Urquhart et al.1996).

La extracción de ADN de las L3, obtenidas de los coprocultivos, y de los parásitos adultos se realizó mediante el kit Nucleos Spin Tissue® (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Para la determinación de la concentración de ADN (ng/ul) se utilizó un espectrofotómetro (ThermoScientific NanoDrop 2000c, UV Vis Spetctrophotometer, USA). El ADN recuperado de las L3 y adultos se conservó a -20°C hasta su utilización. El ADN de NGI adultos se destinó como control positivo para la PCR convencional y la qPCR.

v) *Condiciones utilizadas para los ensayos de PCR convencional*

Para poner a punto la PCR convencional se utilizó el ADN procedente de L3 de los dos coprocultivos obtenidos por cada pool formado en el campo. El protocolo se hizo de acuerdo con lo descrito por Demeler et al. (2013). La PCR se realizó en un termociclador (Bio-Rad T100™ ThermalCycler, Bio-Rad Company, USA) con una desnaturalización inicial a 98°C durante 30s, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10s, 30s de hibridación a la temperatura específica de cada cebador y 30s de extensión a 72°C, y una extensión final a 72°C durante 10 min (ver Anexo 2 y 4). Finalmente se efectuó la electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X, con adición de intercalante (Biotium GelRed Nuclei Acid Stain). Finalmente, se obtuvo la imagen del gel a través del transiluminador Gel Logic 112 y software Carestream Molecular Imaging. El producto de amplificación se observa como una banda en el gel y consta de un alto número de moléculas del mismo tamaño y con la misma secuencia que la secuencia blanco, en este caso el tamaño esperado de las bandas para *Trichostrongylus* spp., *Haemonchus contortus* y *Teladorsagia circumcincta* era de 106 pb, 226 pb y 147 pb respectivamente. Como control positivo se utilizó ADN de NGI adultos previamente tipificados y como control negativo se utilizó agua ultrapura libre de ADN.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Sanidad Animal y en el Laboratorio de Biotecnología perteneciente al Programa Nacional Forestal, ambos en INIA Tacuarembó.

vi) *Condiciones utilizadas para los ensayos de PCR en tiempo real*

La qPCR para determinación y cuantificación de ADN género *Haemonchus* y determinación del género *Trichostrongylus* se realizó según el protocolo descrito por

McNally et al. (2013). Para ello se trabajó con ADN de huevos de NGI. La reacción se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus™ de Applied Biosystems con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min y 45 ciclos de 95°C durante 30s y 56°C durante 60s (ver Anexo 3 y 4). Los umbrales de detección de fluorescencia fueron fijados por el software del equipo, y superado el umbral, se obtuvo el Ct indicando que la muestra contenía ADN de *Haemonchus* sp. o de *Trichostrongylus* spp. Para ambos protocolos se utilizó como control positivo ADN de NGI adultos de *H. contortus* y de *Trichostrongylus* spp. respectivamente y como control negativo se utilizó agua ultrapura.

vii) Curva estándar para cuantificación de ADN de huevos de *H. contortus*

Como ya se mencionó anteriormente, la qPCR se utilizó para cuantificación del ADN de huevos del género *Haemonchus*. Para cada una de las muestras donde estaba presente este género, se obtuvo un valor de Ct. A fin de conocer la cantidad de ADN inicial, se realizaron transformaciones matemáticas mediante una curva de calibración. Para esto se realizó una curva estándar de ADN de huevos de *Haemonchus* sp. El material proveniente de ovinos portadores de infestaciones mono-específicas de *Haemonchus contortus* fue aportado por el Dr. Daniel Castells del Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alejandro Gallinal del Secretariado Uruguayo de la Lana, Florida. Las muestras de MF utilizadas tuvieron recuentos de HPG moderados a altos.

Los huevos de *H. contortus* se cosecharon de muestras fecales mediante la técnica de recuperación de huevos descrita anteriormente y el número de huevos recuperado fue estimado mediante microscopía. Se prepararon submuestras de aproximadamente 14.000 huevos/ml y se extrajo el ADN mediante el procedimiento descrito antes (Demeler et al. 2013). Se realizaron diluciones en serie con agua estéril en una proporción de 1:2 para obtener 14 concentraciones (inicial de 14.000 huevos/ml hasta la dilución final equivalente a aproximadamente 2 huevos/ml). Se realizaron dos réplicas para cada concentración de la muestra de ADN y se calcularon los valores Ct.

d) Análisis estadístico

La comparación de los resultados obtenidos por PCR convencional y clasificación morfológica de L3 se realizó mediante el método estadístico de kappa

de Cohen (Dohoo et al., 2009) para determinar acuerdo de resultados entre dos o más técnicas de diagnóstico en ausencia de una técnica de oro. Para ello, los resultados de clasificación de los géneros parasitarios fueron categorizados como positivos o negativos, tanto para morfología como para PCR. El análisis se realizó con el paquete estadístico STATA 15 (StataCorp LLC).

Para realizar los análisis estadísticos de la qPCR se utilizó el software del equipo StepOnePlus™ en el programa asignado por defecto, se calcularon el número de ciclos (Ct) en cada reacción de qPCR realizada. El software también se utilizó para realizar la curva estándar, se hizo un análisis de regresión y las pendientes e intercepciones se compararon estadísticamente. Se espera obtener valores de r^2 mayores a 98% y una eficiencia de reacción mayor a 80%.

Las comparaciones de resultados obtenidos por qPCR (Ct) y recuento de huevos por gramo (HPG) se realizó solo para el género *Haemonchus* siguiendo el mismo método utilizado por McNally et al. (2013). Para ello, los valores de HPG promedio de cada pool, fueron multiplicados por la proporción de L3 de *Haemonchus* sp. del coprocultivo, obteniéndose así el valor de HPG correspondiente a este género parasitario. Posteriormente, dichos HPG fueron transformados logarítmicamente (LOG₁₀ (HPG+1)) para disminuir la dispersión en la distribución de los datos y como resultado se obtuvo LOG₁₀ Haem+1.

Por otro lado, asumiendo falta de normalidad en los valores de Ct de muestras de campo, se realizó la transformación de los resultados de la qPCR para obtener una distribución normal aproximada e invertir la pendiente $(51-Ct)^2$. Los resultados transformados de la qPCR $((51-Ct)^2)$ se compararon con los resultados de LOG₁₀ Haem+1. Las variables se vincularon utilizando Regresión Lineal en Microsoft Excel (McNally et al. 2013).

RESULTADOS

a) Recuento de huevos en materia fecal (HPG)

Las medias de HPG de los 24 pooles variaron de 3 a 6872 HPG como se muestra en la Figura 9, observándose gran variabilidad como es lo descrito para el conteo de huevos.

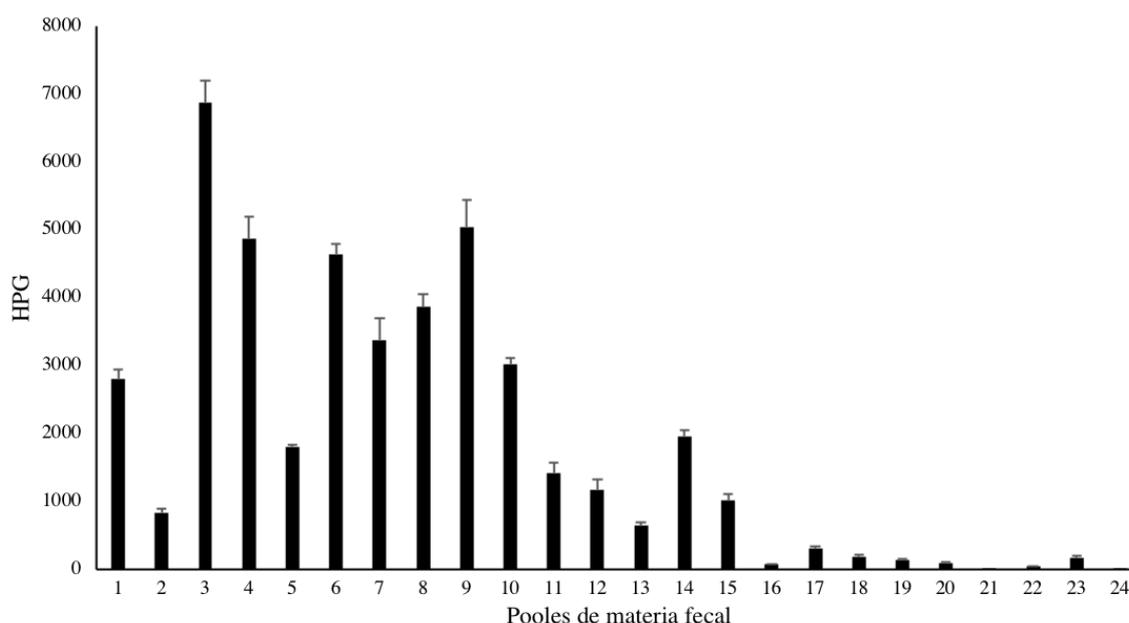


Figura 9. Resultados de las medias y error estándar de HPG de 24 pooles de muestras de materia fecal de ovinos en pastoreo.

b) Resultados de coprocultivos

Los géneros parasitarios identificados en los coprocultivos fueron *Haemonchus* sp., *Trichostrongylus* spp. (Figura 10), *Oesophagostomum* spp., *Teladorsagia* sp. y *Cooperia* spp. El género *Haemonchus* estuvo presente en todos los pooles, mientras que *Trichostrongylus* se encontró en 23 de los 24 pooles. Estos dos géneros fueron los que se hallaron en mayor proporción en todas las muestras. En cuatro pooles (16,6%) se halló *Teladorsagia circumcincta* (Figura 11), tres de los cuales provenían del mismo establecimiento y pertenecían a diferentes categorías de ovinos (corderos, borregos y ovejas). En 16 pooles (66,7%) estuvo presente el género *Oesophagostomum* spp. y solamente en uno se detectó *Cooperia* spp. Un 17% de los pooles presentó cuatro géneros parasitarios, un 50% presentó tres géneros parasitarios y un 33% presentó dos géneros parasitarios. Solamente en un pool *Haemonchus* sp. fue el único género identificado.

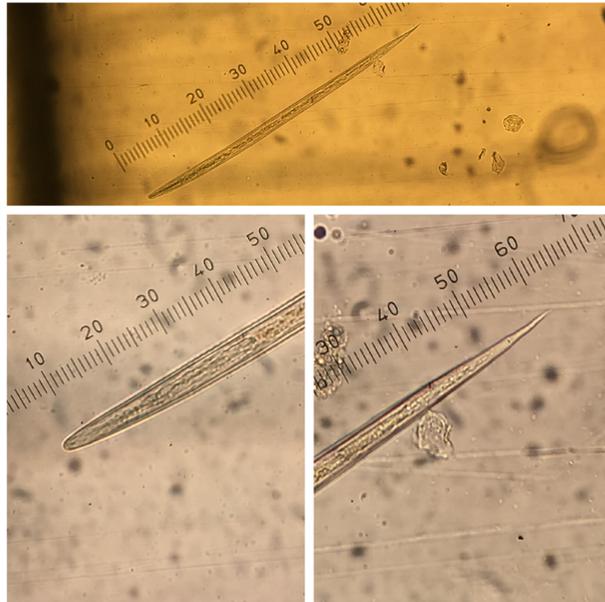


Figura 10. Arriba, Larva infectante (L3) del género *Trichostrongylus* spp. Derecha abajo, extremidad posterior, izquierda abajo, extremidad anterior.



Figura 11. Abajo, Larva infectante (L3) de *Teladorsagia circumcincta*; izquierda arriba, extremidad anterior y derecha arriba, extremidad posterior.

c) Resultados de recuperación de huevos de la materia fecal

El número de huevos recuperados por gramo de MF para cada pool varió entre 4 y 6156. El resultado de la comparación entre HPG inicial y número de huevos recuperados por gramo de MF de cada pool después de los lavados, mostró una alta correlación ($r = 0.93$; $r^2 = 0.86$) (Figura 12).

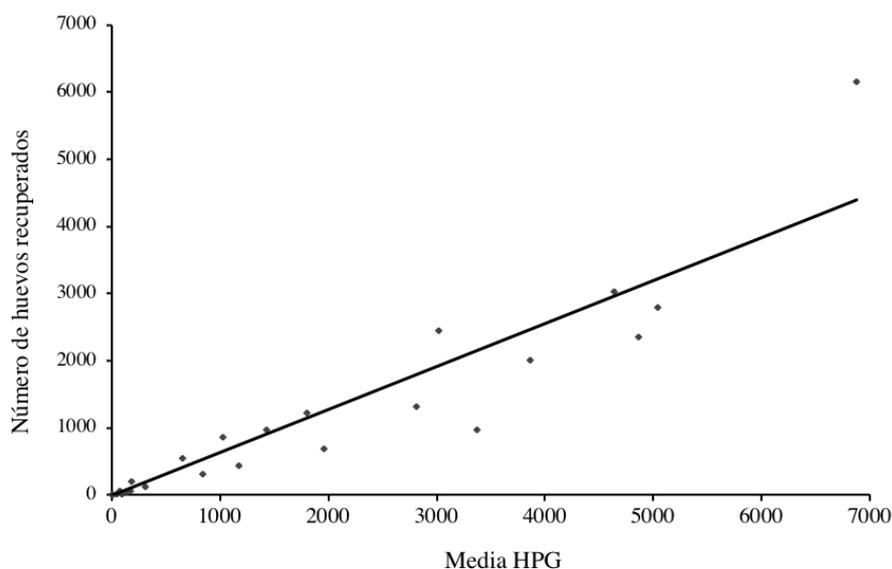


Figura 12. Correlación entre media de los valores de recuento de huevos por gramo en materia fecal (HPG) inicial y número de huevos recuperados en los lavados, para cada pool. El coeficiente de determinación tiene un valor r^2 de 0.86.

d) Puesta a punto y validación de PCR convencional

Se logró la puesta a punto del protocolo de PCR convencional realizada con el ADN obtenido de NGI adultos (machos y hembras) y de L3, manteniendo las mismas condiciones (concentraciones de cebadores, buffer, dNTPs, enzima, temperaturas de desnaturalización, alineación, extensión, tiempo ciclado, etc) empleadas en el protocolo descrito por Demeler et al. (2013). Se obtuvieron los productos de amplificación en el gel de agarosa de tamaño esperado para el ADN de adultos y L3 de *Trichostrongylus* spp. (106 pb), *Haemonchus contortus* (226 pb) y *Teladorsagia circumcincta* (147 pb). No hubo amplificaciones inespecíficas a pesar de que la totalidad de las muestras de ADN de L3 utilizadas presentaban ADN de más de un género parasitario.

En los 24 pooles donde se identificó *Haemonchu* sp., se encontraron productos de amplificación correspondientes a *Haemonchus contortus* (226 pb) y en la Figura 14 se presentan algunas de las muestras.

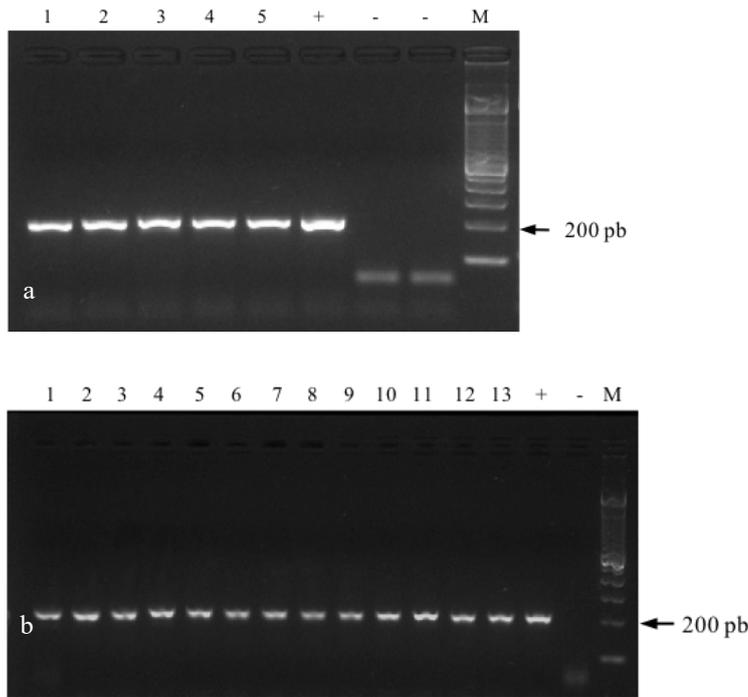


Figura 14. Identificación cualitativa de *Haemonchus contortus* a partir de ADN de larvas infectantes de ovinos. Se observan bandas de amplificación a la altura de los 226 pb para las muestras del 1 al 5 (a) y 1 al 13 (b). Control negativo, agua ultra pura (-), control positivo, ADN de machos adultos de *Haemonchus contortus* (+) y marcador de peso molecular 100 pb (M).

Por otro lado se detectó ADN de *Trichostrongylus* spp. (106 pb) en los 24 pooles (Figura 15).

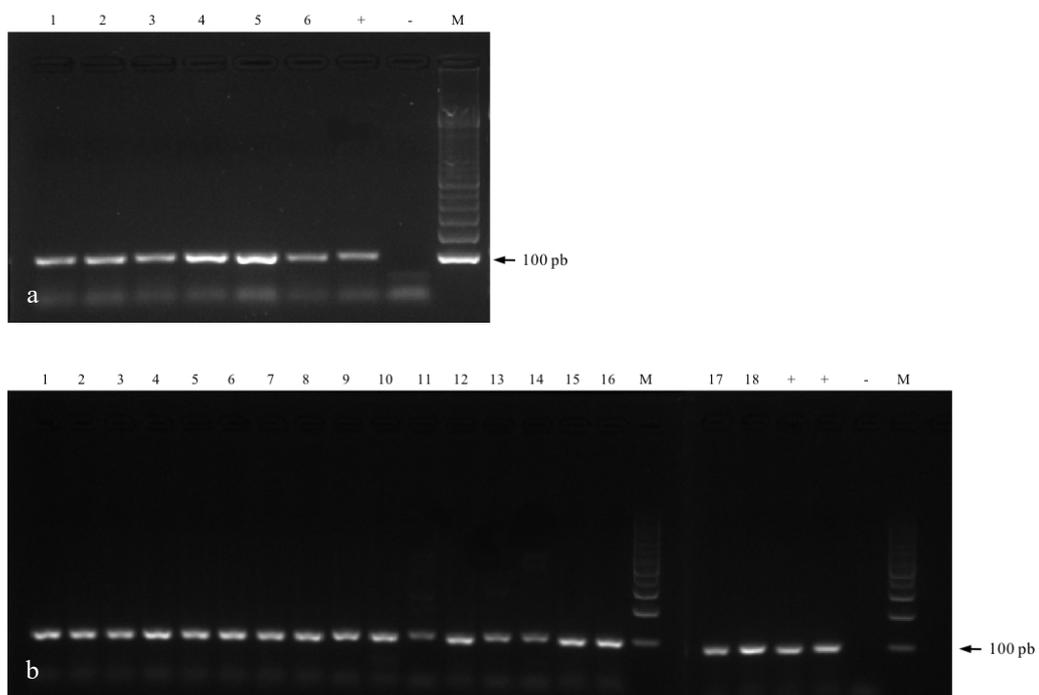


Figura 15. Identificación cualitativa de *Trichostrongylus* spp. a partir de ADN de larvas infectantes de ovinos en pastoreo. Se observan bandas de amplificación a la altura de los

106 pb para las muestras del 1 al 6 (a) y 1 al 18 (b). Control negativo, agua ultra pura (-), control positivo, ADN de adultos de *Trichostrongylus* spp. (+) y marcador de peso molecular 100 pb (M).

En cinco (20,8%) de los 24 pooles se obtuvieron productos de amplificación correspondientes a *Teladorsagia circumcincta* (147 pb) (Figura 16), tres de los cuales coinciden con los resultados de los corpocultivos.

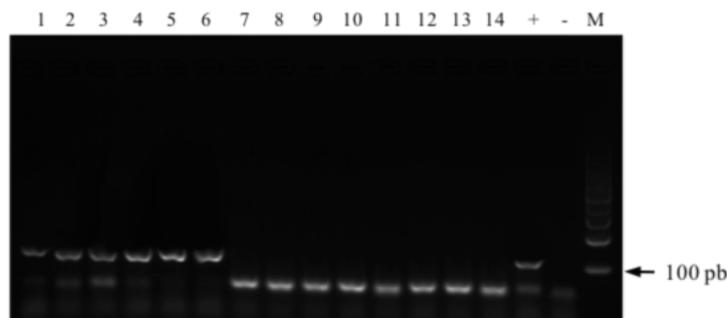


Figura 16. Identificación cualitativa de *Teladorsagia circumcincta* a partir de ADN de larvas infectantes de ovinos en pastoreo. Se observan bandas de amplificación a la altura de los 147 pb para las muestras del 1 al 6, que corresponden a los pooles 17, 18 y 19 con sus respectivas repeticiones. Control negativo, agua ultra pura (-), control positivo, ADN de larvas infectantes de *Teladorsagia circumcincta* (+) y marcador de peso molecular 100 pb (M).

e) Resultados de PCR convencional (ADN L3) vs identificación morfológica de L3

En la Tabla 1, se muestra el resultado general de la clasificación morfológica y por PCR convencional para todas las especies de NGI analizadas que coinciden y difieren en clasificación positiva o negativa dada por cada una de las técnicas de diagnóstico. Para los tres parásitos se evaluaron los 24 pooles de muestras, es decir la comparación incluye n= 72 muestras.

Tabla 1. Resultados de la clasificación cruzada entre las pruebas de PCR convencional e identificación morfológica de larvas infectantes (L3) sin discriminación de género en el total de muestras analizadas.

	PCR +	PCR -	Total
L3 +	50	2	52
L3 -	3	17	20
Total	53	19	72

El resultado del test de Kappa fue de 82,4% (p=0.000), revelando alto acuerdo entre la clasificación morfológica y la PCR convencional para los tres parásitos evaluados. Del total de muestras analizadas, 50 coincidieron en resultado positivo por las dos clasificaciones y 17 coincidieron en un resultado negativo.

Al analizar los resultados discriminados por género/especie parasitaria, para *T. circumcineta*, se observó que el valor de Kappa fue de 49,5% ($p=0.007$), indicando un acuerdo moderado entre la clasificación morfológica y la técnica de PCR empleada (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la clasificación cruzada entre las pruebas de PCR convencional e identificación morfológica de larvas infectantes (L3) de *Teladorsagia circumcineta*.

	PCR +	PCR –	Total
L3 +	3	2	5
L3 –	2	17	19
Total	5	19	24

Para *Haemonchus contortus*, ambas pruebas coincidieron en la totalidad de las muestras ($n=24$), es decir, *H. contortus* tuvo un resultado positivo en todas las muestras para ambas técnicas, por lo cual no es posible realizar la comparación mediante el test de Kappa.

El mismo resultado se obtuvo para *Trichostrongylus* spp., donde solamente en una de las muestras no coincidió la identificación morfológica con la PCR.

f) PCR convencional con ADN de huevos

Los resultados obtenidos mediante PCR convencional mostraron productos de amplificación en el gel de agarosa de tamaño esperado para *Trichostrongylus* spp. (106 pb), *Haemonchus contortus* (226 pb) y *Teladorsagia circumcineta* (147 pb). No se detectaron bandas de amplificación inespecíficas.

En los 24 pooles se hallaron productos de amplificación correspondientes a *Haemonchus contortus* (Figura 17).

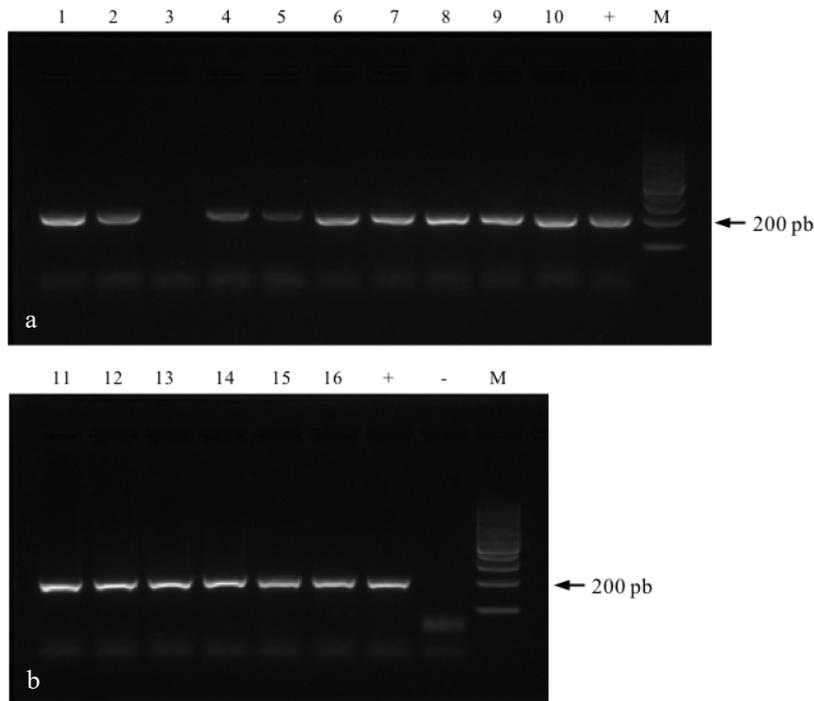


Figura 17. Identificación cualitativa de *Haemonchus contortus* a partir de ADN de huevos de nematodos trichostrongíldeos de ovinos en pastoreo. Se observan bandas de amplificación a la altura de los 226 pb para las muestras del 1 al 2 y 4 al 10 (a) y 11 al 16 (b). No se logró la amplificación de la muestra 3 (a). Control negativo, agua ultra pura (-), control positivo, ADN de machos adultos de *Haemonchus contortus* (+) y marcador de peso molecular 100 pb (M).

Se detectó ADN correspondiente a *Trichostrongylus* spp. en la totalidad de las muestras (n= 24 pooles). Cabe aclarar que en aproximadamente un 30% de las muestras no siempre se obtuvo un resultado positivo en la primera repetición del test de PCR (Figura 18).

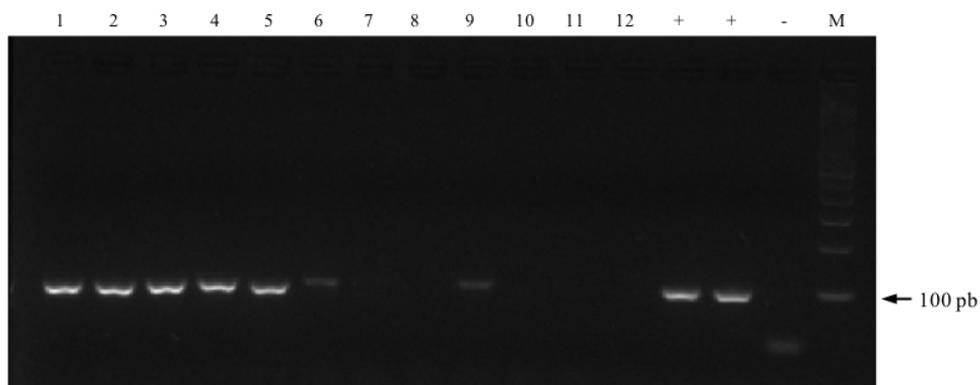


Figura 18. Identificación cualitativa de *Trichostrongylus* spp. a partir de ADN de huevos de nematodos trichostrongíldeos de ovinos en pastoreo. Se observan bandas de amplificación a la altura de los 106 pb para las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9. En esta PCR no se logró la amplificación de las muestras 7, 8, 10, 11 y 12. Control negativo, agua ultra pura (-), control positivo, ADN de adultos de *Trichostrongylus* spp. (+) y marcador de peso molecular 100 pb (M).

En dos de los 24 pooles (8,33%) se obtuvieron productos de amplificación correspondientes a *Teladorsagia circumcincta*, estos dos pooles no coincidieron con los cuatro pooles positivos para *T. circumcincta* en los coprocultivo, ni con los cinco pooles que fueron positivos para este género en la PCR convencional utilizando ADN de L3.

g) Resultados de PCR en tiempo real

Se logró la puesta a punto y validación del protocolo de qPCR para *Haemonchus* sp. realizado con el ADN obtenido de huevos de NGI y se obtuvieron los valores de Ct para las 24 muestras evaluadas (valores de Ct entre 18 a 35).

No fueron necesarias modificaciones en las condiciones (concentraciones de cebadores, sonda, enzima, temperaturas de desnaturalización, alineación, tiempo de ciclado, número de ciclos, etc) de la qPCR propuestas en el protocolo descrito por McNally et al. (2013).

Los resultados obtenidos de la curva estándar (Figura 17) realizada con el ADN obtenido de huevos de *Haemonchus* sp., mostró un ajuste lineal con una pendiente de -3.8, un intercepto de 20.8, un valor de R² de 97% y una eficiencia de la reacción de 84.2%, indicando un buen ajuste de la técnica.

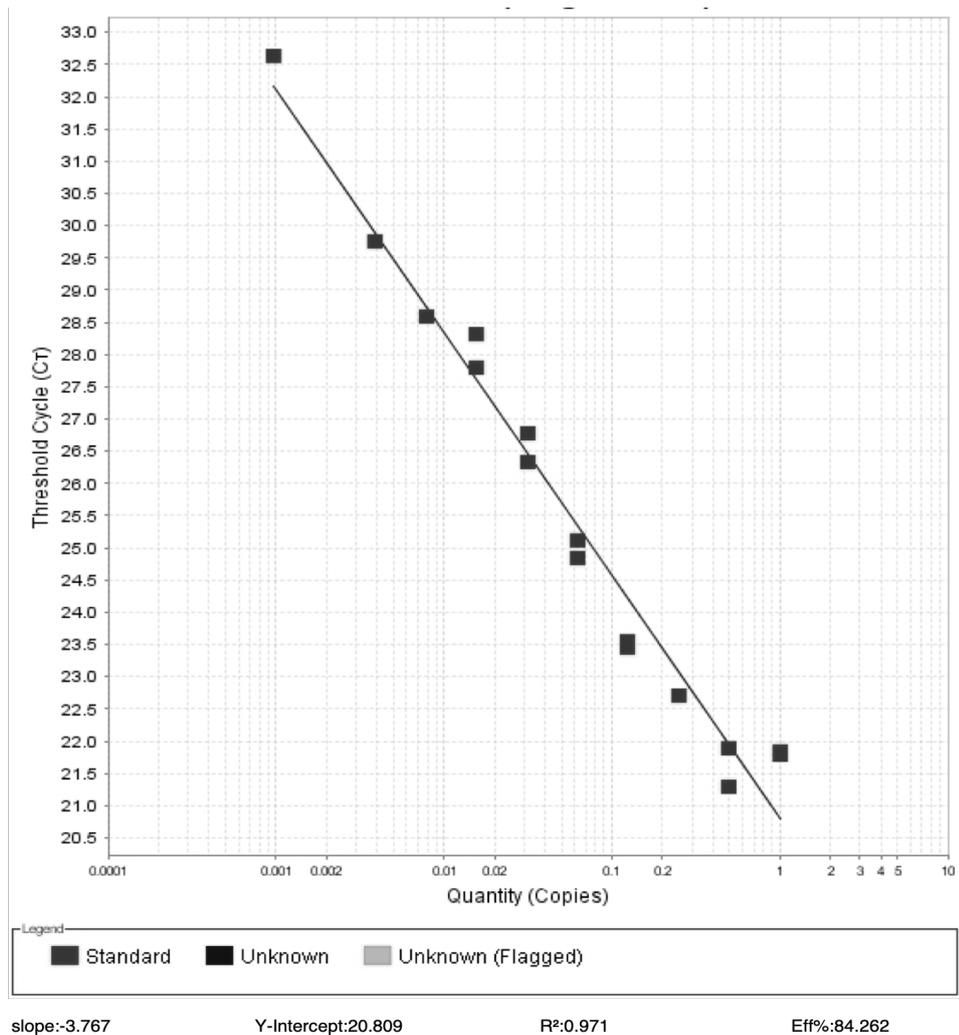


Figura 17. Resultado de la curva estándar realizada para la puesta a punto de determinación de *Haemonchus* sp. mediante PCR en tiempo real. Los valores de la curva de regresión están indicados en la parte inferior de la gráfica, pendiente (slope): -3.77; intercepto (Y-intercept): 20.81; R²: 97%; Eficiencia de la reacción % (Eff): 84.26.

Los resultados de 24 muestras procesadas revelaron valores de Ct entre los ciclos 18 y 35, indicando esto las distintas concentraciones de ADN de huevos de *Haemonchus* sp. presentes en las muestras.

En la Figura 18 se muestran los resultados de las curvas de amplificación de algunas de las muestras.

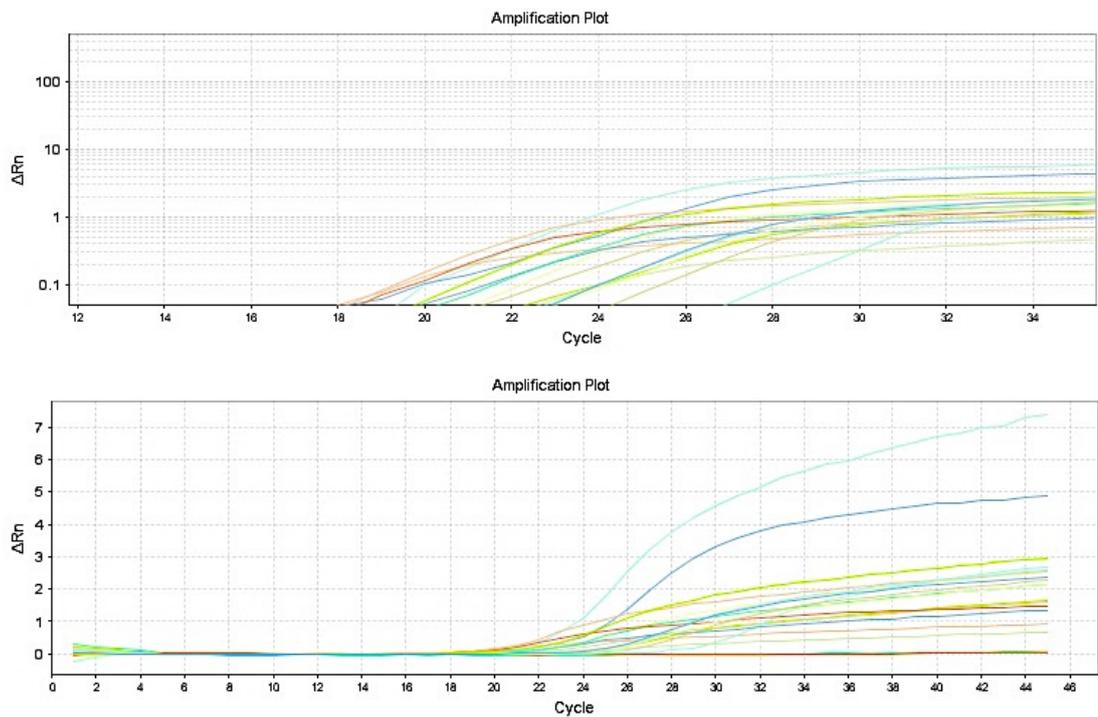


Figura 18. Cinética de amplificación de la PCR en tiempo real para ADN de *Haemonchus* sp. Arriba, su forma logarítmica. Abajo, su forma lineal. Todas las muestras amplificaron a excepción del agua utilizada como control negativo. En ordenadas se refleja la intensidad de fluorescencia normalizada (ΔR_n) de todos los pocillos y en abscisas el número de ciclo de la PCR.

No hubo amplificaciones inespecíficas, a pesar de que la totalidad de las muestras presentaban ADN de al menos dos géneros parasitarios.

Las comparaciones de los resultados de la qPCR (Ct) y Log HPG para el género *Haemonchus*, se muestran en la Figura 19. Se obtuvo una correlación positiva y alta ($r=0,86$) para estas dos variables. La relación de regresión lineal entre los datos de qPCR transformados y LOG₁₀ HPG de Haem+1 mostraron una pendiente de 192.8, un intercepto de 168.2 y un valor R² de 0.75 ($p < 0,05$).

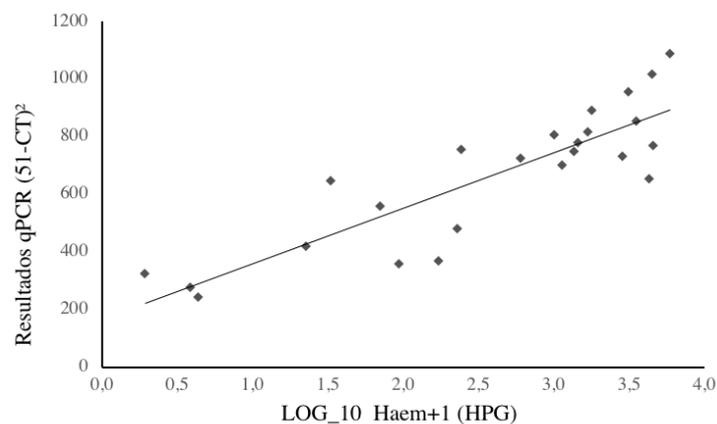


Figura 19. Resultados de la correlación entre valores de qPCR y valores de recuento de huevos por gramo en materia fecal. En el eje de las Y se muestran los valores promedios

de dos réplicas de qPCR (Ct) transformados usando la ecuación $(51-Ct)^2$. En el eje de las X se observa el LOG₁₀ del recuento de huevos por gramo (HPG) para *Haemonchus* sp.

Por otra parte, también se logró la amplificación de todos los pooles (n=24) para el género *Trichostrongylus* mediante qPCR utilizando ADN de huevos. En la Figura 20 se muestran los resultados de las curvas de amplificación de algunas de las muestras. Sin embargo, para todas las muestras (n=24) los Ct obtenidos fueron mayores a 32, y un tercio de estas tuvieron Ct entre 40 y 44. Cabe recordar que no se realizó la curva estándar para este género, por lo que no se hizo la cuantificación y correlación con los valores de HPG.

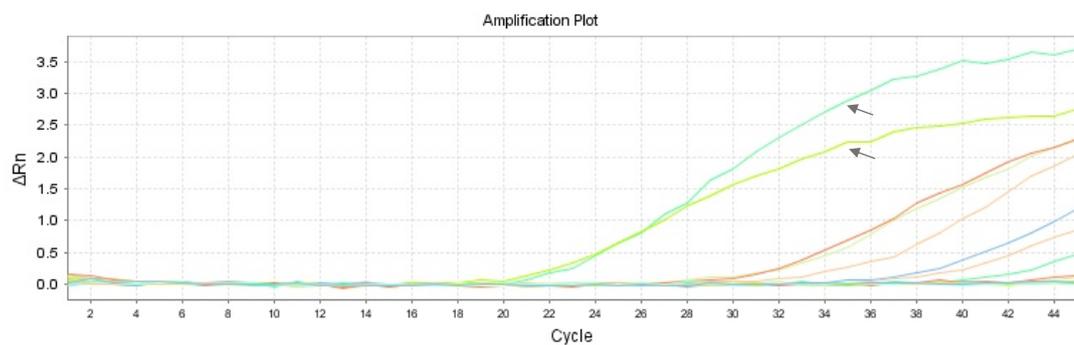


Figura 20. Cinética de amplificación de la PCR en tiempo real para ADN de *Trichostrongylus* spp., su forma lineal. Todas las muestras amplificaron a excepción del agua utilizada como control negativo. En ordenadas se refleja la intensidad de fluorescencia normalizada (ΔRn) de todos los pocillos y en abscisas el número de ciclo de la PCR. Las flechas indican los controles positivos.

DISCUSIÓN

Durante el transcurso de este trabajo se evaluaron métodos moleculares para el diagnóstico y tipificación de NGI en ovinos. A pesar de que desde hace algunos años se dispone en la literatura una importante cantidad de trabajos referentes a esta temática, estas metodologías aún siguen en la órbita de la investigación y están siendo poco utilizadas en el diagnóstico parasitológico en ovinos en Uruguay. En líneas generales, en este trabajo se logró poner a punto y validar los protocolos de las técnicas moleculares tanto de PCR convencional como qPCR disponibles en la literatura (Demeler et al. 2013; McNally et al. 2013) para la identificación de los principales NGI que afectan a los ovinos en nuestro país. El alto porcentaje de acuerdo entre las técnicas tradicionales utilizadas de rutina para la identificación de NGI, sobre todo para los géneros *Haemonchus* y *Trichostrongylus* nos permite concluir que se pueden realizar diagnósticos más rápidos sin esperar la evolución de huevos a L3, para ello se requieren mayores estudios.

La cuantificación de la abundancia del género *Haemonchus* mediante qPCR utilizando ADN de huevos, puede ser una herramienta diagnóstica prometedora (por ej. vinculándola incluso con técnicas subjetivas como es el método FAMACHA®). Sin embargo, se debería realizar mayores estudios sobre todo para mejorar la extracción de ADN tratando de eliminar potenciales inhibidores al trabajar con una matriz compleja como es la materia fecal.

La variabilidad obtenida con los recuentos de HPG de cada pool fue importante al momento de realizar la técnica de PCR ya que determinó también la variabilidad en la cantidad de ADN obtenido. Ueno & Gonçalves (1998) clasifican como una infección leve recuentos de HPG menores a 1000, valores entre 1000-2000 como moderados y valores mayores a 2000 como altos. En este caso se obtuvieron recuentos de HPG que aplicaron a estas tres categorías (rango: 3-6000 HPG) y son comparables a los rangos de HPG que pueden encontrarse normalmente a nivel de campo.

Los géneros *Haemonchus* y *Trichostrongylus* fueron los que se hallaron en mayor proporción en la muestra de ovinos utilizados en este estudio, por consiguiente, esto concuerda con los géneros más prevalentes en Uruguay tal como fue observado por Castells et al. (2011).

Por otro lado, en la mayoría de los pooles de MF analizados, las infestaciones fueron mixtas, salvo en un pool dónde el único género hallado fue *Haemonchus* sp., de acuerdo con los resultados de los coprocultivos. Como es bien conocido y algo demostrado en los estudios epidemiológicos reportados en la literatura, las infestaciones parasitarias de los ovinos en condiciones de pastoreo, son mixtas. En concordancia con esto, los resultados de la PCR detectaron en todos los pooles (n=24) al menos dos géneros parasitarios, indicando una posible falla en la determinación de los géneros presentes al utilizar la técnica de coprocultivo. Berrie et al. (1988) señalan que el coprocultivo y la posterior diferenciación larval no son adecuados para una estimación precisa de las proporciones de especies individuales en infecciones mixtas.

Los resultados obtenidos tanto en la PCR convencional como en la qPCR mostraron que cuando las reacciones fueron realizadas en forma única, no se detectaron reacciones cruzadas con otros géneros de NGI presentes en la muestra. Este resultado es muy alentador para realizar trabajos utilizando cepas de campo provenientes de infestaciones naturales, sin necesidad de realizar infestaciones artificiales que comprometen muchas veces el bienestar de los animales.

En lo que refiere a la puesta a punto de la PCR convencional se obtuvieron buenos resultados sin tener que modificar las condiciones de la PCR descritas por Demeler et al. (2013), al utilizar tanto ADN de NGI adultos, L3 o de huevos. Esto reafirma lo expresados por Demeler et al. (2013) que asegura que este método de PCR convencional tiene el potencial de permitir un diagnóstico molecular altamente sensible de los NGI con importancia en medicina veterinaria.

En el caso de *H. contortus* todas las muestras de ADN obtenido de L3 que mostraron una banda de amplificación también fueron positivas en su correlativo de ADN obtenido de huevos, lo que demuestra un buen nivel de congruencia (Wimmer et al. 2004). Esto puede deberse a la alta tasa de ovipostura de este parásito que permitió obtener altas cantidades de ADN tanto de larvas como de huevos. Sin embargo, debido al hecho de que las larvas tienen más células y, por lo tanto, un mayor contenido de ADN, uno podría obtener resultados positivos a partir de ADN de L3 sin una amplificación en la muestra de ADN de huevos de la misma muestra fecal. Esto es algo que puede jugar un papel importante cuando el recuento de huevos es bajo como es el caso de *Teladorsagia circumcincta*. von Samson-Himmelstjerna et al. (2002) han señalado que las L3 podrían dar un resultado más confiable en la PCR, sin embargo algunos estudios indican que no todas las especies pueden desarrollarse en el coprocultivo igualmente bien (Berrie et al. 1988). El género *Haemonchus* es más

susceptible al frío que otros géneros parasitarios, por lo que la tasa recuperación de L3 podría verse afectada por el almacenamiento prolongado en frío (McKenna, 1998). Sin embargo, *Haemonchus* sp. en este trabajo estuvo en mayor proporción en la mayoría de los grupos y los coprocultivos se realizaron inmediatamente después de realizado el HPG, por lo que, aún con recuentos bajos de HPG fue posible recuperar L3 en todos los grupos.

El género *Trichostrongylus* también estuvo presente en todas las muestras de acuerdo con los resultados de la PCR convencional, aunque no fue el género más abundante. Según los resultados de los coprocultivos estuvo en menor proporción en relación a *Haemonchus* sp., por lo que se concluye que la cantidad de ADN obtenida de este NGI también fue inferior a la obtenida para *Haemonchus* sp., sin embargo aun así se logró la amplificación en todas las muestras de ADN tanto de L3 como de huevos de NGI.

Se encontraron dificultades al momento de realizar la PCR con ADN extraído de huevos de NGI y en muchas muestras fue necesario repetir la PCR, ya que en los coprocultivos se contaba con un resultado positivo para el NGI buscado. Esto pudo deberse en parte a la presencia de inhibidores presentes en la MF (por ej. polisacáridos complejos), ADN competitivo (ADN de otros trichostrongilídeos) y ADN no competitivo (bacterias, células de huésped y de plantas que están en la muestra). Muchos estudios indican que estos factores son capaces de impedir la amplificación del ADN en estudio y por lo tanto afectar la sensibilidad del ensayo (Monteiro et al. 1997; Al-Soud & Rådström, 1998; Thornton & Passen, 2004; Harmon et al. 2007). La menor cantidad de ADN de *Trichostrongylus* spp. en relación con el género *Haemonchus* en combinación con los inhibidores de la MF, nos hace pensar que fue lo que dificultó la amplificación.

En este estudio, *Teladorsagia circumncincta* fue la especie menos abundante, por lo que la cantidad de ADN en relación con los demás géneros fue inferior. Esta especie se identificó en cinco de las muestras estudiadas mediante PCR convencional utilizando ADN de L3, pero solamente en dos muestras utilizando ADN de huevos y estas no coincidieron entre sí. Esto podría ser explicado en parte (al igual que lo observado para *Trichostrongylus* spp.) a la presencia de los inhibidores provenientes de la MF que permanecen en la muestra cuando se hace el lavado huevos y pudieron impactar negativamente en la amplificación o a que el ADN blanco está presente en pequeñas cantidades (Harmon et al. 2007). Por lo que podríamos decir que para géneros que están en baja proporción en la muestra, la utilización de ADN de huevos

podría resultar en falsos negativos, esto mejoraría al utilizar ADN proveniente de L3 ya que la muestra es más limpia y además la cantidad de ADN en la L3 es mayor. En segundo lugar, las muestras que fueron positivas para *T. circumcincta* utilizando ADN de huevos, pero no lo fueron utilizando su correspondiente de ADN de L3, podrían indicar una falla en el procedimiento de coprocultivo, lo que impidió el desarrollo adecuado de este género. Whitlock (1956) observó que las condiciones de cultivo utilizadas rutinariamente son adecuadas para la mayoría de las especies, pero que las L3 de *T. circumcincta* se desarrollan mejor a temperaturas algo más bajas que las utilizadas. Esta afirmación fue respaldada por los hallazgos de Dobson et al. (1992) que demostraron que el éxito de desarrollo de las L3 en coprocultivos fue menor para *T. circumcincta* en relación con *T. colubriformis*.

Se hallaron varios géneros parasitarios en los coprocultivos (ADN competitivo), no obstante, no se observó amplificación no específica, sugiriendo que el ensayo de PCR convencional mantuvo su especificidad en esas condiciones, respaldando lo encontrado por Demeler et al. (2013). Si bien los enfoques morfológicos seguirán siendo una herramienta fundamental en el diagnóstico, la identificación de L3 requiere de experiencia y tiene limitaciones intrínsecas, tales como identificar inequívocamente algunos géneros y diferenciar a nivel de especies (Bisset et al. 2014; Milhes et al. 2017). Por lo dicho anteriormente, la utilización de la tecnología molecular al momento de determinar las especies parasitarias presentes en los coprocultivos podría representar una ventaja sobre los métodos rutinarios (Zarlenga et al. 2016).

En este trabajo los resultados de la comparación entre la prueba fenotípica (coprocultivo) y molecular (PCR convencional utilizando ADN de L3) para los géneros *Haemonchus* y *Trichostrongylus* indican que la PCR podría ser utilizada como complemento de la técnica de coprocultivo para brindar soporte al diagnóstico microscópico. Esto concuerda con la revisión realizada por Gasser et al. (2008), donde queda evidente la utilidad de los enfoques moleculares y como estos podrían ser usados para superar las limitaciones de las técnicas de diagnóstico tradicionales. Por su lado, Roeber et al. (2011) compararon la sensibilidad y especificidad de un ensayo de PCR con un método coprológico convencional y afirmaron que los métodos moleculares pueden ofrecer ventajas importantes en relación con los tradicionales, sobre todo en lo que refiere al tiempo requerido para llevar a cabo el ensayo. Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad y especificidad de la PCR, aseguraron que es necesario probarla en un contexto “de campo” y realizar mejoras en la extracción de

ADN de huevos (eliminar los inhibidores) para que las técnicas moleculares puedan ganar confianza y así llegar a reemplazar los métodos tradicionales de diagnóstico coprológico.

Por otro lado, los resultados de la comparación de la prueba fenotípica y molecular para *Teladorsagia circumncincta* no fueron del todo concluyentes (acuerdo moderado), es decir, del total de los pooles donde se detectó *T. circumncincta* (ya sea con PCR o mediante coprocultivo) solamente en la mitad coincidieron ambas pruebas (fenotípicas y moleculares). Para los pooles donde se detectó *T. circumncincta* mediante coprocultivo y no mediante PCR convencional (utilizando ADN L3) es posible que haya existido un error durante la identificación microscópica. Se debe tener en cuenta que la identificación de esta especie al microscopio es compleja y su diferenciación con *Trichostrongylus* spp. (ambos géneros de cola corta) basándonos solamente en atributos morfológicos resulta engorrosa. Para una correcta diferenciación entre estos dos géneros es necesario tener en cuenta varias características morfológicas como largo de cola, largo de la vaina de la cola, longitud total de la L3, inflexión en extremidad craneal, etc. (Lancaster & Hong, 1987; Gordon, 1933). Para aquellos pooles donde se identificó *T. circumncincta* mediante PCR y no mediante coprocultivo, es posible que haya ocurrido algo similar y que ésta se haya confundido con *Trichostrongylus* spp. Por otra parte, al estar en baja proporción, es posible también que *T. circumncincta* no haya quedado incluida en la alícuota utilizada para la identificación y recuento al microscopio. Por lo mencionado anteriormente sería de gran utilidad una metodología basada en ADN como la PCR convencional o qPCR como herramientas de apoyo al diagnóstico de *T. circumncincta* que se realiza mediante coprocultivo (Learmount et al. 2009).

La alta correlación qPCR y el HPG sugiere que estas herramientas moleculares podrían predecir adecuadamente el número de huevos en el rango evaluado. En correspondencia con esto, McNally et al. (2013) reportan que existe una fuerte relación entre HPG y Ct a pesar de la posible presencia de inhibidores que contaminan la muestra de ADN proveniente de la MF. En el mismo sentido, Bott et al. (2009) afirman que el desarrollo de ensayos de qPCR genera la oportunidad de mejorar el diagnóstico incorporando la cuantificación del ADN en una muestra dada, es decir, indicando la proporción de cada género o especie en cada muestra de MF. Teniendo en cuenta esto, algo que se debe considerar, es el grado de desarrollo de los huevos en las muestras de MF ya que si no se conservan adecuadamente, los huevos continúan su desarrollo y la multiplicación celular dará como resultado un aumento

del contenido de ADN, pudiendo influir en el resultado de una PCR cuantitativa (Schnieder et al. 1999; Andersen et al. 2012). Se considera que el transporte en anaerobiosis de las muestras de MF es clave para detener el desarrollo celular de los huevos. Basado en ello Høglund et al. (2013) decidieron realizar la qPCR con ADN de L3 en lugar de utilizar ADN de huevos, ya que teóricamente tienen un número de copia de ADN_r más uniforme. Pero los resultados no fueron los esperados, entre las explicaciones encontradas está el hecho de que las L3 individuales difieren en su tamaño a pesar de que están en igual etapa de desarrollo y sean de la misma especie.

Como mencionamos anteriormente, la MF contiene una serie de componentes que inhiben las polimerasas en la PCR, la preparación de la muestra de MF y los métodos de recuperación de huevos son críticos (Schnieder et al. 1999). Si bien para alrededor de un 10% de las reacciones fue necesaria una segunda ejecución para lograr la identificación positiva (explicado principalmente por la presencia de inhibidores), en la mayoría de las reacciones iniciales se logró la amplificación. Al igual que en el ensayo de PCR convencional, en el ensayo de qPCR no se produjo amplificación no específica, a pesar de la presencia de ADN de otros géneros de nematodos. En ese mismo sentido, el ADN bacteriano derivado de la inmensa flora de bacterias presente en la MF no pareció tener un impacto negativo en la amplificación. A diferencia de lo anterior, Harmon et al. (2007) encontraron que el ADN no competitivo derivado de fuentes ambientales no parece afectar la amplificación, pero sí lo hace el ADN competitivo de otras especies de trichostrongilídeos. Una explicación podría ser que en 88% de las muestras obtenidas en este estudio el porcentaje *Haemonchus* sp. fue superior en relación con los demás géneros identificados.

Los resultados de la qPCR mostraron que el ensayo desarrollado fue lo suficientemente sensible como para diferenciar entre muestras que contienen huevos en rangos de HPG que se hallarían a nivel de campo. Se obtuvieron diferentes valores de Ct para muestras que contenían huevos de *H. contortus* a concentraciones de HPG que variaron de 3 a 6000, esto contradice los resultados de Harmon et al. (2007) para *H. contortus*, donde los valores de Ct obtenidos para rangos de 75 y 1000 HPG no difirieron significativamente.

Existió una alta correlación entre el número de huevos recuperados de la MF y su correspondiente de HPG, lo que estaría indicando una correcta implementación de la técnica de recuperación de huevos descrita por Demeler et al. (2013) a pesar de todos los pasos implicados. Se debe tener en cuenta la técnica fue realizada bajo las mismas condiciones, es decir, el mismo procedimiento, por el mismo operador, en

intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental y en el mismo lugar, lo que elimina muchos factores de error. A pesar de ello, es probable que los potenciales errores se encuentren en estas etapas y durante la extracción de ADN de huevos y no en la técnica molecular en sí, pero estas afirmaciones son especulativas y demandan mayor estudio. Teniendo en cuenta eso, algo a considerar para pruebas futuras es la posibilidad de extraer ADN directamente de muestras fecales. Sería importante, si se desean usar las pruebas moleculares de forma rutinaria, desarrollar un método reproducible para recolectar huevos de la MF y mejorar la extracción de ADN de huevos.

Los resultados de la qPCR para el género *Trichostrongylus* mostraron que el protocolo utilizado (McNally et al. 2013) es válido y no son necesarias modificaciones en las condiciones de la qPCR. Al igual que para la qPCR de *Haemonchus* sp. no existieron amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, para un tercio de las muestras (n=8) se obtuvieron Ct entre 40-44, es decir, en una instancia de diagnóstico estas muestras podrían ser consideradas como negativas. Se podría pensar que esto se debe a la menor cantidad de ADN de este género (menor proporción en relación a *Haemonchus* sp.), ya que según los resultados de los coprocultivos, en un 62% de las muestras *Trichostrongylus* spp. representa menos de un 10% del total de los géneros de NGI encontrados. Además, Harmon et al. 2007 señalan que el ADN competitivo de otras especies de trichostrongilídeos parece afectar la amplificación. No obstante, la mayoría de las muestras que obtuvieron los mayores Ct (40-44), no coinciden con las que tienen menor proporción de *Trichostrongylus* spp. (recordar, a mayor Ct menor cantidad de ADN). Al mismo tiempo, se sabe que la presencia de inhibidores en las muestras provenientes de MF causa fallas en la amplificación (Monteiro et al. 1997; Al-Soud & Rådström, 1998; Thornton & Passen, 2004; Harmon et al. 2007). Eso no lleva a pensar que la conjunción de ambos factores (menor proporción de ADN en relación con *Haemonchus* sp. y presencia de inhibidores) podría haber causado los altos Ct (40-44), pero esto es a modo de hipótesis y requiere mayor investigación.

Con todo, es probable que los métodos moleculares basados en PCR proporcionen herramientas alternativas poderosas a los enfoques tradicionales, para sustentar la investigación fundamental sobre la epidemiología de los parásitos, resistencia antihelmíntica y mejorar el control de la enfermedad parasitaria (Gasser, 2006; Bisset et al. 2014), sin embargo es necesario realizar nuevos estudios para evaluar costos y su aplicación práctica en el diagnóstico parasitológico en ovinos en Uruguay.

CONCLUSIONES

Se ha logrado la puesta punto y validación de los protocolos de PCR convencional para *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumncincta* y *Trichostrongylus* spp. Asimismo, se observó que los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza ADN de larvas infectantes provenientes de coprocultivos.

El estudio actual ha señalado también que es posible un diagnóstico rápido y confiable mediante qPCR de *Haemonchus* sp. en ovinos, utilizando ADN extraído directamente de huevos recolectados de materia fecal. Por otra parte ha demostrado que la cuantificación de este género mediante la utilización de qPCR parece ser prometedora, sin embargo son necesarios más estudios y mejoras en la extracción de ADN de huevos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott K, Taylor M, Stubbings L. (2012). Sustainable worm control strategies for sheep. A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers. Ed. Sustainable Control of Parasites in Sheep (SCOPS), Context Publications 4^a ed. Worcestershire, Reino Unido.

Aguilera P, Ruiz M, Rocha M, Pineda B, Chánez, M. (2014). PCR en tiempo real. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón A, Rocha M. (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Ed. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT) 1^a ed. México (DF), Cap. 8, pp.175-202.

Ahmed M, Singh M, Bera A, Bandyopadhyay S, Bhattacharya D. (2011). Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites. *Asian Pac J Trop Med*4:589-593.

Al-Soud W & Radstrom A. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ Microbiol* 64:3748-3753.

Amarante A. (2000). Relationship between faecal egg counts and total worm counts in sheep infected with gastrointestinal nematodes. *Brazil J Vet Parasitol* 9:45-50.

Andersen U, Haakansson I, Roust T, Rhod M, Baptiste K, Nielsen M. (2012). Developmental stage of strongyle eggs affects the outcome variations of real-time PCR analysis. *Vet Parasitol* 191: 191-196

- Anderson N, Hansky J, Titchen D. (1985). Effects on plasma pepsinogen, gastrin and pancreatic polypeptide of *Ostertagia* spp. transferred directly into the abomasum of sheep. *Int J Parasitol* 15:159-165.
- Anziani O & Fiel A. (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la argentina. *Rev Invest Agropecu* 41:34-46.
- Ayalew L & Gibbs H. (1973). Seasonal fluctuations of nematode populations in breeding ewes and lambs. *Can J Comp Med* 37:79-89.
- Azzarini M & Ponzoni R. (1971). Aspectos modernos de la producción ovina: primera contribución. Ed. Montevideo, Uruguay: EEMAC.
- Baker N, Cook E, Douglas J, Cornelius C. (1959). The pathogenesis of trichostrongyloid parasites. III. Some physiological observations in lambs suffering from acute parasitic gastroenteritis. *J Parasitol* 45: 643-651.
- Barker I. (1975). Location and distribution of *Trichostrongylus colubriformis* in the small intestine of sheep during the prepatent period, and the development of villus atrophy. *J Comp Path* 85: 417-426.
- Barrán J. (2011) El Fracaso de la Fusión y el renacimiento de los partidos políticos 1860-1868. En: Barrán, J. Historia Uruguaya. Apogeo y crisis del Uruguay pastoril y caudillesco 1839-1875. Tomo VI. Ediciones de la Banda Oriental S.R.L. Montevideo, Cap.3, pp. 78-119.
- Bendixsen T, Windon R, Huntley J, MacKellar A, Davey R, McClure S, Emery D. (2004). Development of a new monoclonal antibody to ovine chimeric IgE and its detection of systemic and local IgE antibody responses to the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol* 97:11-24.
- Berghen P, Hilderson H, Vercruyse J, Dorny P. (1993). Evaluation of pepsinogen, gastrin and antibody response in diagnosing ostertagiasis. *Vet Parasitol* 46:175-95.
- Berrie D, East I, Bourne A, Bremner K. (1988). Differential recoveries from faecal cultures of larvae of some gastrointestinal nematodes of cattle. *J Helminthol* 62:110-114.
- Besier R, Kahn L, Sargison N, van Wyk J. (2016). The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv Parasitol* 93:95-143.
- Beveridge I, Pullman A, Phillips P, Martin R, Barelds A, Grimson R. (1989). Comparison of the effects of infection with *Trichostrongylus colubriformis*, *T. vitrinus* and *T. rugatus* in Merino lambs. *Vet Parasitol* 32:229-245.
- Bishop S & Stear M. (2001). Inheritance of faecal egg counts during early lactation in Scottish Blackface ewes facing mixed, natural nematode infections. *Animal Sci* 73: 389-395

- Bisset S, Knight J, Bouchet C. (2014). A multiplex PCR-based method to identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture samples. *Vet Parasitol* 200:117-127.
- Blouin M, Yowell C, Courtney C, Dame J. (1998). Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol Biol Evol* 15:1719-1727.
- Blouin M. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 32:527-31.
- Boletín de Exportaciones del Rubro Ovino. [En línea]. Secretariado Uruguayo de la Lana, noviembre 2018. Disponible en:<[https://www.sul.org.uy/descargas/be/Bolet%C3%ADn_Exportaciones_del_Rubro_Ovino_\(noviembre_2018\).pdf](https://www.sul.org.uy/descargas/be/Bolet%C3%ADn_Exportaciones_del_Rubro_Ovino_(noviembre_2018).pdf)>. Consultado: 8 de enero de 2019.
- Bonino J, Casaretto A, Castells D, Martínez E. (1990). Enfoque de la sanidad en sistemas de producción. III Seminario Técnico de Producción Ovina. SUL. Paysandú.
- Bosco A, Rinaldi L, Maurelli M, Musella V, Coles G, Cringoli G. (2014). The comparison of FLOTAC, FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. *Acta Parasitol* 59: 625-628.
- Bott, N, Campbell B, Beveridge I, Chilton N, Rees D, Hunt P, Gasser R. (2009). A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. *Int J Parasitol* 39:1277-1287.
- Bowman D. (2003). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Ed. Elsevier Health Science Division 8^a ed. Missouri, USA.
- Castells D, Nari A, Rizzo E, Marmol E, Acosta D. (1995). Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos del ovino en la etapa de recría. *Producción ovina* 8:17-31.
- Castells D. (2004). Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. En: *Nematodos gastrointestinales de los ovinos y saguaypé en ovinos y bovinos* (2004). Ed. INIA Tacuarembó, Uruguay. INIA Serie Actividades de Difusión 359, pp. 3-11.
- Castells D & Gimeno D. (2010). Corriedale resistente a los nematodos gastrointestinales. *Anuario Corriedale 2010*, Uruguay, pp.76-77.
- Castells D, Gayo V, Mederos A, Martínez D, Risso E, Rodríguez A, Scremini P, Olivera J, Bancharo G, Lima A, Larrosa F, Casaretto A, Bonino J, Rosadilla D, Franchi M, Quintana S, Quintans G. (2011). Epidemiological study of gastrointestinal nematodes of sheep in Uruguay Prevalence and seasonal dynamics.

23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, (Buenos Aires, Argentina, 21-25 August 2011) pp 126–132.

Castells D, Nari A, Gayo V, Mederos A, Pereira D. (2013) Epidemiología e impacto productivo de nematodos gastrointestinales en Uruguay. En: Fiel C & Nari A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap. 7, pp. 149-174.

Coles C, Jackson F, Pomroy W, Prichard R, Von Samson-Himmelstjerna, G, Silvestre A, Taylor M, Vercruysse J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136:167-185.

Craig T. (2009). Helminth Parasites of the Ruminant Gastrointestinal Tract. En: Anderson D, Rings M. (2009) Food Animal Practice. Ed. Anderson D, Rings M 5^a ed. W.B. Saunders, Cap. 22, pp.78-91.

Craig T. (2018). Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control, Veterinary Clinics of North America. *Vet Clin Food Anim*34:185-199.

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli M, Utzinger J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc* 5:503–515.

Cringoli G, Rinaldi L, Albonico M, Bergquist R, Utzinger J. (2103). Geospatial(s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospat Health* 7:399-404.

De Ley P & Blaxter M. (2002) Systematic Position and Phylogeny. En: Donald L. (2002) The Biology of Nematodes. Ed. CRC Press. Cap. 1, pp. 1-58.

Demeler J, Schein E, von Samson-Himmelstjerna G. (2012). Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. *Vet Parasitol* 189:52-64.

Demeler J, Ramünke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu J, Cringoli G, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J. (2013). Discrimination of Gastrointestinal Nematode Eggs from Crude Fecal Egg Preparations by Inhibitor-Resistant Conventional and Real-Time PCR. *PLOS ONE* 8(4): e61285.

Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). (2018). Anuario Estadístico 2018. Montevideo-Uruguay. Disponible en: <<http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politica-agropecuaria/estadisticas-y-documentos/29-08>>. Consultado: 30 de enero de 2019.

Dobson R, Barnes E, Birclijin S, Gill J. (1992). The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. *Int J Parasitol* 22:1005-1008.

Dohoo I, Martin W, Stryhn H. (2009). Veterinary Epidemiologic Research. VER Inc. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.

Durette-Desset M, Hugot J, Darlu P, Chabaud A. (1999). A cladistics analysis of the Trichostrongyloidea (Nematoda). *Int J Parasitol* 29:1065-1086.

Emery D, Hunt P, LeJambre L. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int J Parasitol* 46: 755-769.

Eysker M & Ploeger H. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology* 120:109-119.

Fernández Abella D, Castells D, Piaggio L, De León N. (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. I Efecto de las distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. *Producción ovina* 18: 25-31.

Fernández A, Larsen P, Henningsen E, Grønvold J, Henriksen S, Bjorn H. (1999). The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. *J Helminthol* 73:115-122.

Fierro F. (2014). Electroforesis de ADN. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón A, Rocha M. (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Ed. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT) 1ª ed. México (DF), Cap. 2, pp.27-51.

Fox M. (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet Parasitol* 72: 285-308.

Gasser R, Chilton N, Hoste H, Beveridge I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res* 21:2525-2526.

Gasser R. (1999). PCR-based technology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 84:229-258.

Gasser R. (2006). Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Vet Parasitol* 136:69-89.

Gasser R, Bott N, Chilton N, Hunt P, Beveridge I. (2008). Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock- Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnol Adv* 26:325-334.

Gibbons L. (2002). General Organization. En: Donald L. (2002) *The Biology of Nematodes*. Ed. CRC Press. Cap. 2, pp. 59-139.

Giudici C, Entrocasso C, Steffan P. (2013). Biología, fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel C & Nari A. (2013)

Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap. 1, pp. 1-28.

Gómez-Muñoz M, Domínguez I, Gómez-Iglesias L, Fernández-Pérez F, Méndez S, de la Fuente C, Alunda J, Cuquerella M. (2000). Serodiagnosis of haemonchosis with a somatic antigen (Hc26) in several breeds of sheep. *J Vet Diagn Invest* 12: 354-60.

Gordon H. (1933). Differential diagnosis of the larvae of *Ostertagia* spp. and *Trichostrongylus* spp. of sheep. *Aust Vet J* 9:223-227.

Hansen J & Perry B. (1994). *The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants*. Ed. Published by the International Laboratory for Research on Animal Diseases Nairobi, Kenya.

Harmon A, Williams Z, Zarlenga D, Hildreth M. (2007). Real-time PCR for quantifying *Haemonchu scontortus* eggs and potential limiting factors. *Parasitol Res* 101:71-76.

Harris D & Crandall K. (2000). Intragenomic Variation Within ITS1 and ITS2 of Freshwater Crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for Phylogenetic and Microsatellite Studies. *Mol Biol Evol* 17: 284-291.

Hawkins J. (1993). Economic benefits of parasite control in cattle. *Vet Parasitol* 46:159-173.

Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994.

Henriksen S, Korsholm M. (1983). A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Nord Vet Med* 35: 429-430.

Höglund J, Engström A, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Tydén E. (2013). Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. *Vet Parasitol* 197:251-7.

Hu M, Chilton N, Gasser R. (2004). The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics. *Adv Parasitol* 56:133-212.

Hung G, Gasser R, Beveridge I, Chilton N. (1999). Species-specific amplification of ribosomal DNA from some equine strongyles. *Parasitol* 119:69-80.

Huntley J, Redmond J, Welfare W, Brennan G, Jackson F, Kooyman F, Vervelde L. (2001). Studies on the immunoglobulin E responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep: purification of a major high molecular weight allergen. *Parasite Immunol* 23:227-235.

Jas R, Ghosh J, Das K. (2010). Polyclonal antibody based coproantigen detection immunoassay for diagnosis of *Oesophagostomum columbianum* infection in goats. *Vet Parasitol* 170:262-267.

- Kandil O, Hendawy S, El Namaky A, Gabrashanska M, Nanev V. (2017). Evaluation of different *Haemonchus contortus* antigens for diagnosis of sheep haemonchosis by ELISA and their cross reactivity with other helminthes. J Parasit Dis 41: 678-683.
- Kaplan M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol 20:477-481.
- Kaplan M & Vidyashankar A. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Vet Parasitol 186:70-79.
- Kenyon F, Greer A, Coles G, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, van Wyk J, Thomas E, Vercruyse J, Jackson F. (2009). The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. Vet Parasitol 164:3-11.
- Kooyman F, Van Kooten P, Huntley J, MacKellar A, Cornelissen A, Schallig H. (1997). Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. Parasitology 114: 395-406.
- Lancaster M & Hong C. (1987). Differentiation of third stage larvae of 'ovine *Ostertagia*' type and *Trichostrongylus* species. Vet Rec 120: 503.
- Larsen J, Anderson N, Vizard A, Anderson G, Hoste H. (1994). Diarrhoea in Merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. Aust Vet J 71:365-72.
- Le Jambre L, Dominik S, Eady S, Henshall J, Colditz I. (2007). Adjusting worm egg counts for faecal moisture in sheep. Vet Parasitol 145:108-115.
- Learmount J, Conyers C, Hird H, Morgan C, Craig H, von Samson-Himmelstjerna G, Taylor M. (2009). Development and validation of real-time PCR methods for diagnosis of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* in sheep. Vet Parasitol 166: 268-274.
- Lichtenfels J, Hoberg E, Zarlenga D. (1997). Systematics of gastrointestinal nematodes of domestic ruminants: advances between 1992 and 1995 and proposals for future research. Vet Parasitol 72:225-245.
- MAFF. (1986). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. 3rd edn. Ministry of Agriculture and Food, London.
- Martin P, Anderson N, Jarrett R. (1985). Resistance to benzimidazole anthelmintic in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. Aust Vet J 62:38-43.
- McKenna P. (1987). The estimation of gastrointestinal strongyle worm burdens in young sheep flocks: a new approach to the interpretation of faecal egg counts. NZ Vet J 35:94-97.
- McKenna P & Simpson B. (1987) The estimation of gastrointestinal strongyle worm burdens in young sheep flocks: A new approach to the interpretation of faecal egg counts II. N Z Vet J 35:98-100.

- McKenna P. (1998). The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Vet Parasitol* 80:167-172.
- McLeod R. (1995). Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *Int J Parasitol* 25:1363-1367.
- McManus D & Bowles J. (1996). Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int J Parasitol* 26:687-704.
- McNally J, Callan D, Andronicos N, Bott N, Hunt P. (2013). DNA-based methodology for the quantification of gastrointestinal nematode eggs in sheep faeces. *Vet Parasitol* 198:325-335.
- Medina P, Guevara F, La O M, Ojeda N, Reyes E. (2014). Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes* 37:257-263.
- Milhes M, Guillerme M, Robin M, Eichstadt M, Roy C, Grisez C, Prévot F, Liénard E, Bouhsira E, Franc M, Jacquet P, (2017). A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. *Parasitol Res* 116: 909-920.
- Miller C, Waghorn T, Leathwick D, Candy P, Oliver A, Watson T. (2012). The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet Parasitol* 186:376-381.
- Molina J, Hernández Y, Ruiz A, González J, Argüello A, Ferrer O, Forbes A. (2009). Preliminary study on the use of a *Teladorsagia circumcincta* bulk milk ELISA test in dairy goats under experimental conditions. *Vet Parasitol* 166:228-234.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry K, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35:995-998.
- Muchiut S, Fernández A, Steffan P, Riva E, Fiel A. (2018). Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Vet Parasitol* 254:43-48.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263-73.
- Nari A, Cardozo H, Berdie J. (1977). Alza de lactación (Spring rise) para nematodos gastrointestinales en ovinos. Primera comprobación en el Uruguay. *Veterinaria* 12:147-156.
- Niec, R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. INTA. 37p.

Nielsen M, Vidyashankar A, Andersen U, DeLisi K, Pilegaard K, Kaplan R. (2010). Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Vet Parasitol* 167: 55-61.

Nierhaus K. (2004). Ribosome Assembly. En: Nierhaus K & Wilson D (2004). Protein synthesis and ribosome structure. Translating the genome. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Berlín, Germany. Cap. 3, pp. 85-136.

Nieto L, Martins E, Macedo F, Sakagutti E, Santos A. (2002). Genetic resistance to gastrointestinal endoparasites in different genetic groups of sheep. Proc. 7th W.C.G.A.L.P., Montpellier, France, Communication N° 13-39.

Olaechea F. (2013). Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la región patagónica Argentina. En: Fiel C & Nari (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap. 6, pp.131-147.

Pereira D, Castells D, Deschenaux H. (2006). Infectividad de campo natural contaminado con huevos de *Haemonchus contortus* en las cuatro estaciones del año. *Producción ovina* 18:57-65

Perry B & Randolph T. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Vet Parasitol* 84:145-168.

Perry B, Randolph T, McDermott J, Sones K, Thornton P. (2002). Investing in animal health research to alleviate poverty. International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya.

Pestana E, Belak S, Diallo A, Crowther J, Viljoen G. (2010). Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications. Ed. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Presson B, Gray G, Burgess S. (1988). The effect of immunosuppression with dexamethasone on *Haemonchus contortus* infections in genetically resistant Merino sheep. *Parasite Immunol* 10: 675-680.

Prichard R. (1997). Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 71:155-175.

Rinaldi L, Coles G, Maurelli M, Musella V, Cringoli G. (2011). Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet Parasitol* 177: 345-352.

Roberts J & Swan R. (1981). Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. *Vet Parasitol* 8:165-171.

Roeber F, Jex A, Campbell A, Campbell B, Anderson G, Gasser R. (2011). Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of

- strongyloid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. *Infect Genet Evol* 11:849-854.
- Roeber F, Larsen J, Anderson N, Campbell A, Anderson G, Gasser R, Jex A, (2012a). A molecular diagnostic tool to replace larval culture in conventional faecal egg count reduction testing in sheep. *PLoS One* 7: e37327.
- Roeber F, Jex A, Campbell A, Nielsen R, Anderson G, Stanley K, Gasser R. (2012b). Establishment of a robotic, high-throughput platform for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep. *Int J Parasitol* 42:1151-1158.
- Roeber F, Jex A, Gasser R. (2013). Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point? *Adv Parasitol* 83:267-333
- Ross G, Purcell D, Dow C, Todd J. (1967). Experimental infections of calves with *Trichostrongylus axei*: The courses and development of infection and lesions in low level infections. *Res Vet Sci* 8:201-206.
- Rossanigo C & Gruner L. (1994). Relative effect of temperature and moisture on the development of strongyle eggs to infective larvae in bovine pats in Argentina. *Vet Parasitol* 55:317-325.
- Russel A, Doney J, Gunn R. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72:451-454.
- Rowe A, McMaster K, Emery D, Sangster N. (2008). *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet Parasitol* 153: 285-293.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Schallig H, Hornok S, Cornelissen J. (1995). Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep, *Vet Parasitol* 57: 329-338.
- Sangster N, Whitlock H, Kelly J, Gunawan M, Hall C. (1979). The effect of single and divided dose administration on the efficacy of fenbendazole against adult stages of benzimidazole resistant sheep trichostrongylids. *Res Vet Sci* 26:85-89.
- Sangster N. (1999). Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol* 29:115-124.
- Schnieder T, Heise M, Epe C. (1999). Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasitol Res* 85:895-898.
- Seesao Y, Gay M, Merlin S, Viscogliosi E, Aliouat-Denis C, Audebert C. (2017). A review of methods for nematode identification. *J Microbiol Methods* 138:37-49.

- Serrato A, Flores L, Aportela J, Sierra E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón A, Rocha M. (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Ed. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-SEMARNAT) 1ª ed. México (DF), Cap. 3, pp.53-73.
- Shaw R, Gatehouse T, McNeill M. (1998). Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 28: 293-302.
- Shoo M & Wiseman A. (1986). Changes in serum pepsinogen and haemoglobin concentrations in calves infected with *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci* 4:124-125.
- Sinclair R, Melville L, Sargison F, Kenyon F, Nussey D, Watt K, Sargison N. (2016). Gastrointestinal nematode species diversity in Soay sheep kept in a natural environment without active parasite control. *Vet Parasitol* 227:1-7.
- Suarez V, Olaechea F, Rossanigo C, Romero J. (2007). Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Ed. INTA Anguil.
- Suarez V, Cristel S, Buseti M. (2009). Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes. *Parasite* 16:141-147.
- Sutherland I & Scott I. (2010) Epidemiology of gastrointestinal nematodes in grazing ruminants. En: Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. Wiley-Blackwell, Sussex, UK. Cap. 3, pp. 61-75.
- Sutherland I, Shaw J, Shaw R. (2010). The production costs of anthelmintic resistance in sheep managed within a monthly preventive drench program. *Vet Parasitol* 171:300-304.
- Sweeny J, Robertson I, Ryan U, Jacobson C, Woodgate R. (2011). Comparison of molecular and McMaster microscopy techniques to confirm the presence of naturally acquired strongylid nematode infections in sheep. *Mol Biochem Parasitol* 180:62e67.
- Tarazona J. (1986). A method for the interpretation of parasite egg counts in faeces of sheep. *Vet Parasitol* 22:113-119.
- Taylor M, Coop R, Wall R. (2007). *Veterinary Parasitology*. Ed. Blackwell Publishing 3ª ed. Oxford, UK.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50:S1-S5.
- Thornton C & Passen S. (2004). Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J Microbiol Methods* 59:43-52.

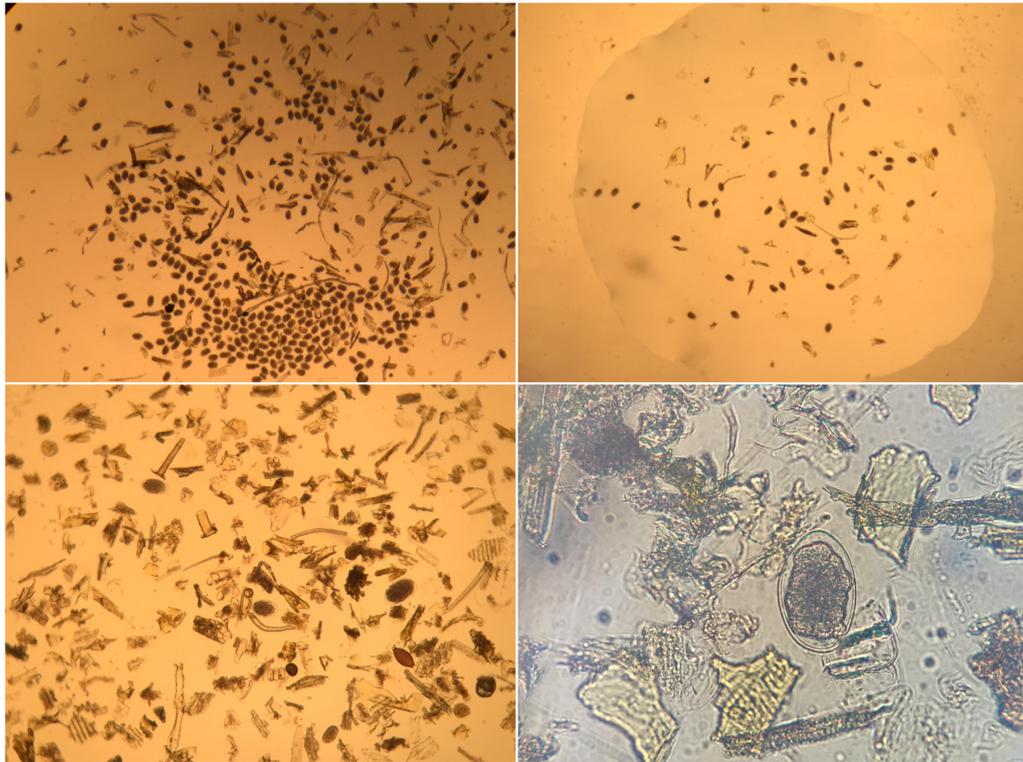
- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl M. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31:e122.
- Ueno H & Gonçalves P. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4ta edición. Japan International Cooperation Agency, Tokyo, Japan, 143p.
- Urquhart G, Armour J, Duncan J, Dunn A, Jennings F. (1996). *Veterinary Helminthology*. En: Urquhart G, Armour J, Duncan J, Dunn A, Jennings F. (1996). *Veterinary Parasitology*. 2ªed. Blackwell Science Ltd. pp. 3-42.
- van Wyk J & Bath G. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *VetRes* 33:509–529.
- van Wyk J & Mayhew E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res* 80:1-14.
- von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Schnieder T. (2002). Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *Int J Parasitol* 32: 1529-1535.
- Waller P, Donald A, Dobson R, Lacey E, Hennessy D, Allerton G, Prichard R. (1989). Changes in anthelmintic resistance status of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* exposed to different anthelmintic selection pressures in grazing sheep. *Int J Parasitol* 19:99-110.
- Wimmer B, Craig B, Pilkington J, Pemberton J. (2004). Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int J Parasitol* 34:625-631.
- Winter P. (2005). Polymerase Chain Reaction (PCR). *CurrSci* 199:1-5.
- Wong M & Medrano J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39:75-85.
- Whitlock H. (1956). An improved method for the culture of nematode larvae in sheep faeces. *Aust Vet J* 32: 141-143.
- Young C, McKeand J, Knox D. (1995). Proteinases released *in vitro* by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, an ovine abomasal nematode. *Parasitology* 110:465-471.
- Zajac A. (2006). Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Vet ClinFoodAnim* 22:529-541.
- Zarlenga D, Hoberg E, Tuo E. (2016). The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. *Adv Parasitol* 93:145-180.

ANEXOS

a) Anexo 1

i) Imágenes de la recuperación de huevos de NGI

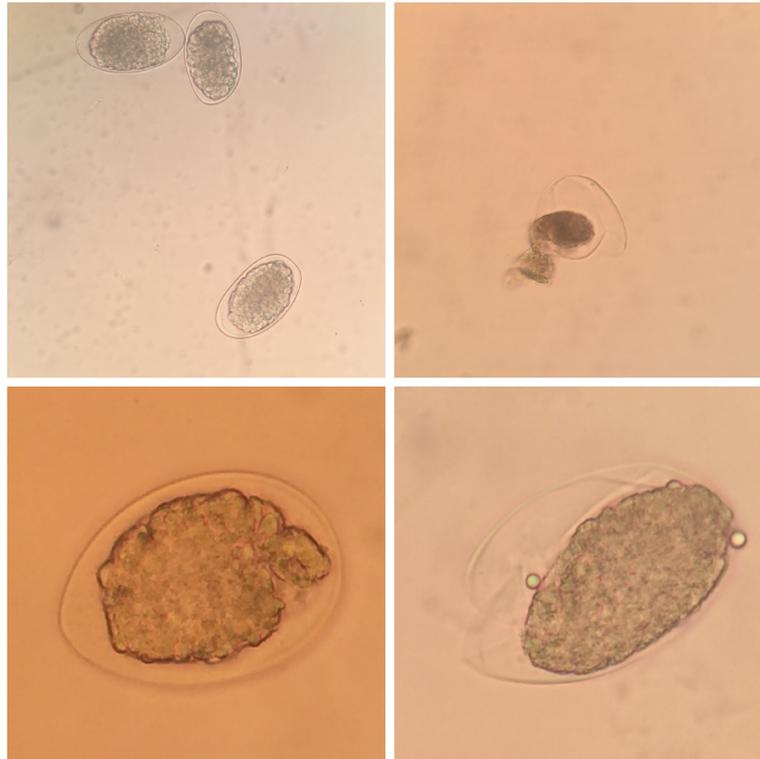
Luego de aplicado el procedimiento de recuperación de huevos descrito por Demeler et al. (2013), algunas muestras contenían importante cantidad de restos de materia vegetal.



Huevos de nematodos gastrointestinales luego de aplicado procedimiento de recuperación de huevos descrito por Demeler et al. (2013). Arriba, huevos recuperados con muy poco contenido de materia vegetal. Abajo, huevos recuperados con gran contenido de materia vegetal.

ii) Imágenes de la extracción de ADN de huevos de NGI

Con la finalidad de lograr un método simple, rápido y barato para lisar los huevos de nematodos Demeler et al. (2013) se centraron en la congelación/ebullición para agrietar los huevos y liberar cantidades suficientes de ADN genómico para su posterior utilización. El procedimiento consiste en 5 ciclos rápidos de congelación de los huevos a -80°C seguidos de la incubación en un bloque de calentamiento a 105°C con agitación a 800 rpm por 10 minutos.



Arriba izquierda, huevos de nematodos gastrointestinales antes de la extracción ADN. Arriba derecha, abajo izquierda y derecha, huevos de nematodos gastrointestinales luego de realizado procedimiento de lisis mediante congelación/ebullición para extracción de ADN descrito por Demeler et al. (2013).

b) Anexo 2

i) Protocolo de PCR convencional *Haemonchus contortus*

LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL-INIA TACUAREMBÓ

Protocolo # Titulo: *Haemonchus contortus*
 PCR Convencional Uniplex *H. contortus* ITS 2

Fecha: / /

Demeler et al. (2013)

H. contortus (ITS2): 226 pb

Reactivos	Cf	Vol. (µl)	X Tubos
Buffer 5 x	1X	4	
dNTPs (10 mM)	200µM	0.4	
Hc-SH-for2 (20µM)	0.5 µM	0.5	
Hc-SH-rev (20µM)	0.5 µM	0.5	
Fusion Hot Start II High Fidelity DNAPol	0,4 U	0.2	
H2O		12,4	
ADN	~100ng	2	
		20	

Muestra	Ficha	Muestra	Ficha	Muestra	Ficha
1		7		13	
2		8		14	
3		9		15	
4		10		16	
5		11		17	
6		12		18	

Ciclado:

Desnaturalización inicial 98 °C 30 seg

Desnaturalización 98 °C 10 seg	} X 40 ciclos
Hibridación 62 °C 30 seg	
Extensión 72 °C 30 seg	

Resultado:

ii) Protocolo de PCR convencional *Trichostrongylus* spp.

LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL-INIA TACUAREMBÓ

Protocolo # Título: *Trichostrongylus* spp.
PCR Convencional Uniplex *Trichostrongylus* spp.

Fecha: / /

Reactivos	Cf	Vol. (µl)	X Tubos
Buffer 5 x	1X	4	
dNTPs (10 mM)	200µM	0.4	
Tricho-2-Multi-83F (20µM)	0.5 µM	0.5	
Tricho-2-Multi-187R (20µM)	0.5 µM	0.5	
Fusion Hot Start II High Fidelity DNAPol	0,4 U	0.2	
H2O		12,4	
ADN	~100ng	2	
		20	

Demeler et al. (2013)
Trichostrongylus spp.: 106 pb

Muestra	Ficha	Muestra	Ficha	Muestra	Ficha
1		7		13	
2		8		14	
3		9		15	
4		10		16	
5		11		17	
6		12		18	

Ciclado:

Desnaturalización inicial 98 °C 30 seg

Desnaturalización 98 °C	10 seg	} X 40 ciclos
Hibridación 53 °C	30 seg	
Extensión 72 °C	30 seg	

Extensión 72 °C 10 min

Resultado:iii) Protocolo de PCR convencional *Teladorsagia circumcincta***LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL-INIA TACUAREMBÓ****Protocolo # Titulo:**PCR Convencional Uniplex *Teladorsagia circumcincta*

Fecha: / /

Reactivos	Cf	Vol. (µl)	X Tubos
Buffer 5 x	1X	4	
dNTPs 10 mM (1*10 ⁴ µM)	200µM	0.4	
Telc-SH-F (20µM)	0.5 µM	0.5	
Telc-SH-R (20µM)	0.5 µM	0.5	
Fusion Hot Start II High Fidelity DNAPol	0,4 U	0.2	
H2O		12,4	
ADN	~100ng	2	
		20	

Demeler et al. (2013).

Teladorsagia circumcincta: 147pb

Muestra	Ficha	Muestra	Ficha	Muestra	Ficha
1		7		13	
2		8		14	
3		9		15	
4		10		16	
5		11		17	
6		12		18	

Ciclado:

Desnaturalización inicial 98 °C 30 seg

Desnaturalización 98 °C	10 seg	} X 40 ciclos
Hibridación 53 °C	30 seg	
Extensión 72 °C	30 seg	

Extensión 72 °C 10 min

Resultado:

c) Anexo 3

i) Protocolo de PCR en tiempo real *Haemonchus* spp.

LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL-INIA TACUAREMBÓ
Protocolo # Titulo: PCR Tiempo Real *Haemonchus* spp.

Fecha: / /

Reactivos	Cf	Vol. (µl)	X Tubos
iQ™ Multiplex Powermix	1X	10	
Sonda Haem- P (4 µM)	0,1 µM	0,5	
Haem-F (4 µM)	0,25 µM	1,25	
NC2-R (4 µM)	0,25 µM	1,25	
H2O		5	
ADN 1/10		2	
		20 µl	

McNally et al. (2013).

Fluróforo: **FAM**
Quencher: **BHQ1**

Ciclado:

Desnaturalización inicial 95 °C 2 min

Desnaturalización 95 °C 30 seg
Hibridación 56 °C 60 seg } X 45 ciclos

Resultado:

Muestra	Ct	Muestra	Ct	Muestra	Ct
1		7		13	
2		8		14	
3		9		15	
4		10		16	
5		11		17	
6		12		18	

ii) Protocolo de PCR en tiempo real *Trichostrongylus* spp.