



Identificación de antígenos específicos de Dictyocaulus viviparus en diferentes extractos proteicos

Identification of specific antigens of Dictyocaulus viviparus in different protein extracts

Identificação de antígenos específicos de Dictyocaulus viviparus em diferentes extratos proteicos

Asterio Denis Barbarú-Grajales ^I
asterio.barbaru@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-2862-4558>

Carmita Albina Tenesaca-Mendoza ^{II}
carmita.tenesaca@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-1155-8280>

María Caridad González-Borlet ^{III}
mariacgb@ult.edu.cu
<https://orcid.org/0000-0002-1686-321X>

Correspondencia: asterio.barbaru@esPOCH.edu.ec

Ciencias Técnicas y Aplicadas
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 23 de mayo de 2022 * **Aceptado:** 12 de junio de 2022 * **Publicado:** 31 de julio de 2022

- I. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Sede Orellana, Ecuador.
- II. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Riobamba, Ecuador.
- III. Dpto de Producción Animal Universidad de Las Tunas, Cuba.

Resumen

Con la finalidad de estudiar la composición del mosaico antigénico de *D viviparus* fueron preparados tres extractos proteicos: somático total, somático parcialmente purificado y productos de excreción-secreción, los cuales fueron analizados por SDS-PAGE, observándose un total de 13 polipéptidos, que resultaron ser antigénicos del parásito cuando se realizó el Western BLOT. Tres bandas únicas específicas a *D viviparus* fueron identificadas y su peso molecular fue de 17, 24 y 29 Kd respectivamente, las mismas originaron alta frecuencia de reacción frente al suero homólogo, mientras no originaron frecuencia de reacción alguna cuando fueron enfrentadas con los sueros heterólogos: *Fasciola hepática*, *Trichostrongylus(sp)*, y *Cooperia(sp)*. Estos antígenos forman parte del extracto somático purificado y el estudio de sus características moleculares puede establecer un rol importante de su desempeño en la biología del parásito.

Palabras claves: *D. viviparus*; antígenos; Western Blot.

Abstract

In order to study the composition of the antigenic mosaic of *D viviparus*, three protein extracts were prepared: total somatic, partially purified somatic and excretion-secretion products, which were analyzed by SDS-PAGE, observing a total of 13 polypeptides, which resulted be antigenic to the parasite when Western BLOT was performed. Three unique bands specific to *D viviparus* were identified and their molecular weight was 17, 24 and 29 Kd respectively, they caused a high frequency of reaction against the homologous serum, while they did not cause any frequency of reaction when they were faced with heterologous sera: *Fasciola hepatica*, *Trichostrongylus(sp)*, and *Cooperia(sp)*. These antigens are part of the purified somatic extract and the study of their molecular characteristics can establish an important role of their performance in the biology of the parasite.

Keywords: *D. viviparus*; antigens; Western blot.

Resumo

Para estudar a composição do mosaico antigênico de *D viviparus*, foram preparados três extratos protéicos: somático total, somático parcialmente purificado e produtos de excreção-secreção, os quais foram analisados por SDS-PAGE, observando-se um total de 13 polipeptídeos, que

resultaram ser antigênico ao parasita quando o Western BLOT foi realizado. Foram identificadas três bandas únicas específicas para *D. viviparus* e seus pesos moleculares de 17, 24 e 29 Kd respectivamente, causaram uma alta frequência de reação contra o soro homólogo, enquanto não causaram nenhuma frequência de reação quando confrontados com soros heterólogos : *Fasciola hepatica*, *Trichostrongylus*(sp) e *Cooperia*(sp). Esses antígenos fazem parte do extrato somático purificado e o estudo de suas características moleculares pode estabelecer um importante papel de sua atuação na biologia do parasita.

Palavras-chave: *D. viviparus*; antígenos; Mancha ocidental.

Introducción

El gusano parasito *Dictyocaulus viviparus* causa importantes problemas económicos y de bienestar para la industria ganadera (Springer y col., 2021). El conocimiento sobre las estructuras y funciones de las proteínas del parásito puede contribuir al esclarecimiento de aspectos de su biología (Springer y col.,2022) , lo que puede permitir la generación de nuevas estrategias de prevención y/o tratamiento para esta parasitosis , así como el mejoramiento de los métodos diagnósticos y ensayos de protección (Yuan y col., 2021), sobre todo si se tiene en cuenta que en la actualidad , las terapias disponibles para el tratamiento de son poco eficientes, por la aparición de resistencia de los parásitos a los agentes empleados para combatirlos (Kelleher y col., 2020)

Existen en *D. viviparus* varios componentes antigénicos: de carácter somático, tegumentario y de excreción-secreción (Umair y col.,2017). De los antígenos mencionados anteriormente los somáticos y los de excreción-secreción han sido los más empleados en el diagnóstico de esta parasitosis (Barbaru y col., 2017). Los extractos utilizados pueden ser utilizados además para otros fines, siempre y cuando se le realicen estudios que evidencien la naturaleza molecular y funcional de los mismos (Kim y col., 2019)

El hecho de que los antígenos somáticos totales se encuentren presentes en otros parásitos, tales como: *Fasciola hepática* *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Ascaris suum*, y otros, origina reacciones cruzadas, puesto que son capaces de reaccionar con el suero de terneros infestados con otras parasitosis (De Leeuw y Cornelissen, 1991; Schnieder, 1992; Mccarthy y

col., 2019). Con los antígenos de excreción-secreción, también se presenta, aunque en menor cuantía, este fenómeno (Britton y Murray, 2002).

El presente trabajo tiene como objetivo identificar los componentes antigénicos de *D. viviparus* en diferentes extractos proteicos con el empleo de la técnica de Western Blot.

Materiales y métodos

Preparación de extractos proteicos de *Dictyocaulus viviparus*

Se prepararon tres formulaciones de extractos proteicos a partir de parásitos adultos de *D. viviparus* que fueron lavados con SSTF (Solución salina tamponada con fosfato).

Productos de excreción – secreción (AES)

Se utilizó la técnica de mantenimiento *in vitro* según el procedimiento descrito por Britton y Murray, 2002; con modificaciones (mantenimiento *in vitro* individual a razón de cuatro parásitos por cada dos mililitros de medio de cultivo).

Se emplearon 20 terneros de tres a seis meses de edad, raza Holstein y sus cruces, que resultaron positivos a *D. viviparus* por larvoscopía (Baerman) fueron sacrificados, y se extrajeron parásitos adultos de sus pulmones con pinzas, los cuales se lavaron repetidas veces con SSTF estéril que contenía 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10 mg/mL de gentamicina. El mantenimiento *in vitro* fue estandarizado previamente hasta lograr la supervivencia del 100 % de los parásitos. El procedimiento general es como se describe: lavar los parásitos repetidamente SSTF 0,05 moles/L, pH 7,2; e incubarlos en medio RPMI-1640 con L-glutamina pH 7,2 (RPMI-1640 + 15 mL de HEPES 25 mMoL/ L + 7mL de bicarbonato de sodio 7,5 % + 100 µg/mL penicilina + 100 µg/mL de estreptomicina) a razón de 4 parásitos por cada 2 mL de medio en frascos (4,5 x 1,5 cm) a 37 °C.

La viabilidad y motilidad de los parásitos fue observada en un microscopio invertido Olympus HK. Después de 24 horas de mantenimiento, los medios que contenían los extractos proteicos fueron colectados, y se les añadió inmediatamente una mezcla de inhibidores de proteasas compuestos por Iodoacetamida, Acido etilendiaminotetracético y Fluoruro de fenilsulfonilmetano, a una concentración final de 2 mMoles/L, 5 mMoles/L y 8 mMoles/L respectivamente. Los medios obtenidos fueron centrifugados a 3000 r.p.m. en una centrífuga

refrigerada MCW modelo K70D, a 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron colectados; concentrados por ultrafiltración (PM > 10 kD, AMICON Corp.); y finalmente fueron desalinizados en una columna PD-10 (Sephadex G-25). Al extracto proteico obtenido se le determinó el contenido de proteínas (Smith y col., 1985); y fueron conservados en congelación (–20 °C) en alícuotas de 1mL hasta su uso.

Productos somáticos

Después de finalizado el mantenimiento *in vitro* para la obtención de los productos somáticos totales los parásitos fueron desintegrados, según el procedimiento descrito por Pyziel y col. (2018).

Se lavaron repetidas veces con SSTF estéril y, posteriormente fueron triturados y homogenizados en frío empleando un homogenizador Medigen EL226 y se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas en la misma proporción en que se utilizó en el mantenimiento *in vitro*, luego se colocaron en agitación constante a 4 °C durante 16 horas; al cabo de las cuales se procedió a realizar una centrifugación a 12 000 en una centrífuga refrigerada MCW modelo K70D, a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado y colectado con el empleo de filtros milipore de 0.2 micrómetros.

Productos somáticos totales

Una parte del preparado proteico fue concentrado por ultrafiltración AMICON (PM > 10 kD, AMICON Corp.). La concentración de proteínas fue determinada y fueron posteriormente conservados en congelación (–20 °C) en alícuotas de 1 mL hasta su uso.

Productos somáticos purificados por ultrafiltración AMICON

La otra porción del extracto fue colocada en un vaso AMICON y ultrafiltrada (PM > 30 kD AMICON Corp.). El filtrado obtenido se colectó y concentró por ultrafiltración (PM > 10 kD, AMICON Corp.). La concentración de proteínas fue determinada (Smith y col., 1985) y fueron posteriormente conservados en congelación (–20 °C) en alícuotas de 1mL hasta su uso.

Sueros para el desarrollo del Western blot

Suero homólogo: Para obtener dicho suero se empleó un ternero que fue destetado a los 7 días de nacido, y se mantuvo en cría artificial hasta los 30 días, periodo en el que se le provocó una

infestación experimental (May y col., 2018), administrándole por vía oral una dosis de 50 larvas III de *D. viviparus* por Kg de peso. Pasada la sexta semana postinfestación, se le realizó una toma de muestra de heces, la cual fue procesada por el ensayo de Baerman. Una vez detectada la positividad a tres cruces por este ensayo, indicativo de que el animal poseía una alta infestación, el mismo fue sacrificado, y tanto las muestras de suero, como las de heces fueron colectadas y guardadas en congelación (-20 °C) hasta su posterior uso.

Sueros heterólogos: Fueron seleccionadas dos muestras de animales, las cuales fueron analizadas por sedimentación y flotación, una cuyo resultado parasitológico fue positivo a *Fasciola hepática*, y *Oesophagostomum radiatum.*, y la otra con resultado positivo a *Trichostrongylus* (sp), *Cooperia* (sp) y *Haemonchus* (sp).

SDS PAGE-Western Blot

La transferencia de las proteínas separadas por la técnica de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (Laemmli, 1970) a la membrana de nitrocelulosa se realizó según el procedimiento de Towbin y col. (1979).

Los extractos proteicos fueron diluidos en proporción 2:1 en el tampón de aplicación compuesto por: 0,01 M TRIS-HCL, pH 6,8; 2,5 % Duodecil sulfato de sodio, 0,1 % de Bromofenol azul y 10 % de glicerol y posteriormente fueron desnaturalizados por calor durante 3 minutos a 100°C. Más tarde fueron aplicados junto con un patrón de mediano peso molecular constituido por: Lisozima (14 kD), Inhibidor de Tripsina (21 kD), Anhidrasa Carbónica (31 kD; Ovoalbúmina (45 kD); Albúmina Bovina (66 kD), y Fosforilasa b (97 kD, sobre el minigel (concentrador al 5 %, 5 mm de altura; separador al 12 % con un tamaño de 80 x 55 x 0,75 mm) y fueron sometidos a corriente constante (25 mA-75 mm de gel) durante aproximadamente 45 minutos en un equipo de Electroforesis Vertical (mini protean II, Bio RAD). Al finalizar la corrida las bandas de proteínas de una parte del minigel fueron reveladas por tinción con azul Coomassie 0,1 % disuelto en solución metanol-acético-agua.

Para realizar el Western Blot la otra parte del gel fue sumergida durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y agitación constante en el tampón de transferencia (25 mM de TRIS, 192 mM de Glicina, 20 % de metanol, pH 8,6); luego se realizó la transferencia del patrón electroforético hacia una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm, para ello se empleó un equipo de transferencia semiseco (mini proteam Transfer Unit, BioRAD) a 15 volt., durante 2 horas. Al transcurrir este

tiempo la nitrocelulosa fue bloqueada con gelatina al 2,5 % disuelta en una solución de salina tamponada con fosfato (SSTF) que contenía un 0,5 % de Tween-20 (SSTF-T), durante 1 hora a TA. Posteriormente fue cortada en tiras de 5 mm de ancho las cuales fueron sumergidas en el suero homólogo y los heterólogos, diluidos 1/100 en SSTF-T e incubadas toda la noche a 4 °C.

Después se realizaron 3 lavados con SSTF-T de 5 minutos cada uno, más tarde las tiras fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con la solución de conjugado (anti-IgG de bovino peroxidasa de rábano, SIGMA), diluida 1:1000 en SSTF-T. Luego de tres lavados con SSTF-T las tiras fueron incubadas con la solución de sustrato (10 mg de 3,3'diaminobencidine tetrahydrochloride, SIGMA; 10 µl de H₂O₂ 30 % w/v; 10 mL de SSTF). Una vez visualizadas las bandas fueron sumergidas las tiras en agua destilada.

El peso molecular de cada una de las bandas observadas fue estimado a través del cálculo de su movilidad relativa, mediante una curva de calibración previamente confeccionada a partir de un patrón de proteínas de mediano peso molecular que fue corrido en la electroforesis en iguales condiciones que los extractos proteicos y cuyos pesos moleculares fueron transformados en logaritmos y graficados contra sus correspondientes movilidades relativas mediante un tratamiento de correlación lineal simple ($r = 0,98$).

Resultados y discusión

La Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (Figura 1), mostró que existe una gran variedad de componentes polipeptídicos en un amplio rango, que abarca desde los 17 hasta 114 kD, de los cuales tres están presentes en todos los extractos proteicos analizados. La composición proteica del extracto somático de parásitos adultos es la más compleja con 13 polipéptidos (17, 24, 29, 34, 37, 45, 52, 66, 69, 98, 103, 108 y 114 kD, respectivamente) observables, en la composición de los productos de excreción-secreción se observan cinco polipéptidos, y es más sencilla, la del extracto somático purificado donde son observables solamente tres polipéptidos, todos por debajo de los 30 kD.

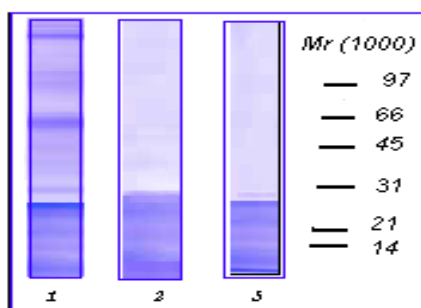


Figura 1: Electroforesis en gels de poliacrilamida de diferentes extractos proteicos. 1- Extracto proteico somático total. 2- Productos de excreción-secreción. 3- Extracto proteico somático purificado.

En el ensayo de Western Blot (figura 2) los polipéptidos identificados por SDS-PAGE, resultaron ser antígenos de *D. viviparus*, coexisten en todos los casos un total de tres antígenos por debajo de los 30 kD. El peso molecular estimado para los antígenos del extracto somático purificado es de 17, 24, y 29 kD respectivamente, y coincide con los resultados obtenidos por otros autores (daSilva y col., 2018); quienes, en un extracto somático total, identificaron conjuntamente con otras moléculas estos polipéptidos de bajo peso molecular.

Estos componentes fueron identificados también por Holzhausen y col.,(2018), quienes detectaron en un ensayo similar, reacción de estas bandas del extracto total frente al suero homólogo, y reportaron además en los productos de excreción-secreción, reactividad para estas mismas bandas, y otras cuatro que reaccionaron con sueros heterólogos, resultado que coincide en alguna medida con los antígenos de excreción- secreción que obtuvimos, aunque en nuestro caso solo encontramos dos bandas, es por eso, que independientemente que los antígenos de excreción-secreción se les atribuye una reactividad cruzada importante con *F hepatica* (Becker y col., 2017), en nuestro análisis, estos componentes de reacción cruzada parecen encontrarse en proporciones mínimas pues solo se observaron dos bandas que reaccionaron frente a los sueros heterólogos , lo cual puede deberse a que el mantenimiento *in vitro* que realizamos difiere notablemente del de otros autores (Britton y Murray., 2002) porque los productos metabólicos fueron colectados en un menor tiempo (24 horas) y además, lo realizamos de forma individual, mientras que los restantes investigadores que han desarrollado este tipo de ensayo, prolongan el tiempo de mantenimiento a más de tres días en un recipiente con un gran número de parásitos,

por lo que es probable que se introduzcan al medio sustancias propias del desprendimiento tegumentario, productos de degradación u otros de naturaleza no metabólicas, los cuales pudieran ser los causantes de las reacciones inespecíficas. (Figura 2)

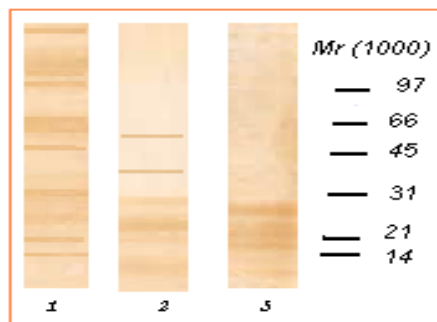


Figura 2: Identificación de antígenos con el Western Blot. 1- Antígenos somáticos totales. 2- Antígenos de excreción secreción. 3- Antígenos somáticos purificados.

Al evaluar la reactividad cruzada con el empleo del Western Blot (Figura 3); para el caso de los antígenos del extracto somático total evidenció que muchos de estos reaccionan con los sueros heterólogos positivos a diferentes parasitosis (*Fasciola hepática*, y los géneros *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Haemonchus*); puesto que se observaron diferentes bandas en el rango de 31-114 kD, por lo que existen anticuerpos en estos sueros que reaccionan con los antígenos *D. viviparus*. Esto demuestra que los antígenos de este parásito en nuestras condiciones también poseen reactividad cruzada con los de estas parasitosis. Es por eso que cuando existe el mosaico antigénico completo en un extracto, en su evaluación diagnóstica se tiene en cuenta que la presencia de las reacciones cruzadas disminuye la especificidad de cualquier ensayo inmunológico (Barbaru y col., 2015). Otros autores (Britton y col., 2002), reportan reacciones cruzadas de extractos somáticos totales fundamentalmente con *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Ascaris suum*, resultados que en algunos casos coinciden con los nuestros y demuestran que las reacciones cruzadas suelen ser más o menos acentuadas en dependencia del extracto proteico elaborado.

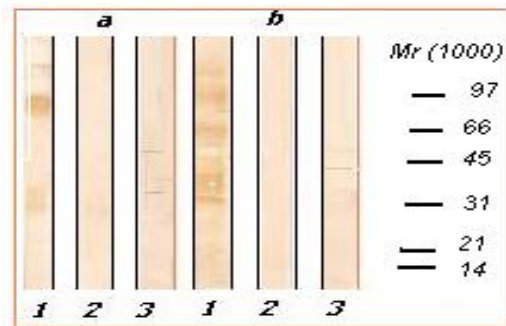


Figura 3: Evaluación de la reactividad cruzada con el Western Blot. Sueros heterólogos, a – suero positivo a *Fasciola hepática*, y el género *Oesophagostomum*, b- suero positivo a los géneros *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Haemonchus*. 1 -Antígenos somáticos totales. 2- Antígenos somáticos purificados. 3- Antígenos de excreción-secreción.

Con vistas a obtener antígenos específicos se han purificado los somáticos (Kim y col., 2019). Se reporta por ellos fundamentalmente en los trabajos previos realizados el aislamiento por cromatografía de afinidad de fracciones antigénicas con masas moleculares pequeñas 17-18 kD, que han mostrado su utilidad en ensayos de detección de anticuerpos (McCarthy y col., 2019). En el análisis de nuestro resultados existen bandas para todos los extractos analizados con masa molar 17-29 kD, donde los antígenos no reaccionan con los sueros heterólogos empleados, estos resultados coinciden en parte con otros autores (Springer y col., 2021), porque ellos realizan una purificación dirigida a una proteína (17-18 kd) en específico incluyendo una mayor cantidad de procedimientos, por lo que no tienen en cuenta los dos restantes polipéptidos (24 y 29 kD) que identificamos y que también identifican en sus estudios otros autores (Umair y col., 2021)

Conclusiones

En todos los extractos proteicos preparados, se identificaron proteínas antigénicas de *D.viviparus*. Los componentes antigénicos del extracto somático total (AST) y de los productos de excreción-secreción, originaron reacciones cruzadas con los sueros de animales parasitados con *Fasciola hepatica*, los géneros *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Haemonchus*.

Los componentes antigénicos del extracto somático purificado (AYM-30) de peso molecular (17, 24, 29 kD) resultaron ser específicos de *D. viviparus*, por lo que son los responsables de la especificidad que muestra el ELISA de captura de antígenos desarrollado utilizando un anticuerpo policlonal contra estos antígenos.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración y apoyo brindado por instituciones científicas: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Sede Orellana, Universidad Autónoma de México, y la Universidad de Las Tunas. A los colegas de las Direcciones de Instituto de Medicina Veterinaria, por su colaboración a través de los Laboratorios Diagnóstico de Parasitología y Empresas Pecuarias.

Referencias

1. Barbarú, A.D; Miranda, G; Artigas, R; Rodríguez, Diego, J G Validación de un ELISA de captura de antígenos en terneros infestados con *Dictyocaulus viviparus* REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 18, núm. 10, octubre, 2017, pp. 1-8 Veterinaria Organización Málaga, España
2. Barbarú, A.D; Miranda, G; Rodríguez Diego, J G. Cinética de la detección de antígenos por ELISA en heces de terneros infestados de forma natural con *Dictyocaulus viviparus* REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 15, núm. 11, noviembre, 2014, pp. 1-8 Veterinaria Organización Málaga, España
3. Becker AC, Willenberg I, Springer A, Schebb NH, Steinberg P, Strube C Fatty acid composition of free-living and parasitic stages of the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. Mol Biochem Parasitol. 2017 Sep; 216:39-44. doi: 10.1016/j.molbiopara.2017.06.008. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651962
4. Britton C, Canto G, Urquhart G, Kennedy M. Characterization of excretory-secretory products of adult *Dictyocaulus viviparus* and the antibody response to them in infection and vaccination. Parasite Immunol. 1993. Mar; 15 (3): 163-74.
5. Britton C, Murray L. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. Mol Biochem Parasitol. 2002 Jun; 122 (1): 21-33.
6. da Silva AS, Baldissera MD, Bottari NB, Doleski PH, Carmo GM, Schwertz CI, Lucca NJ, Henker LC, Piva MM, Giacomini P, Stefani LM, Leal DBR, Machado G, Mendes RE Ectonucleotidase and adenosine deaminase as inflammatory marker in dairy cows

- naturally infected by *Dictyocaulus viviparus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017 Apr;51:9-13. doi: 10.1016/j.cimid.2017.01.001. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28504100
7. De Leeuw W, Cornelissen J. Identification, and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*. *Vet. Parasitol* 1991 Jul; 39 (1-2): 137-47.
 8. Holzhausen J, Haake C, Schicht S, Hinse P, Jordan D, Kremmer E, Strube C Biological function of *Dictyocaulus viviparus* asparaginyl peptidase legumain-1 and its suitability as a vaccine target. *Parasitology*. 2018 Mar;145(3):378-392. doi: 10.1017/S0031182017001573. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28942744
 9. Kelleher AC, Good B, de Waal T, Keane OM. Anthelmintic resistance among gastrointestinal nematodes of cattle on dairy calf to beef farms in Ireland. *Vet J*. 2020 Jul 1; 73:12. doi: 10.1186/s13620-020-00167-x. eCollection 2020. PMID: 32637072.
 10. Kim YS, Kim EK, Dong X, Shin WB, Park JS, Kim SJ, Go EA, Byun HG, Park PJ Antioxidant Activities of *viviparus* Contectus Extract Against Tert-utylhydroperoxide-Induced Oxidative Stress. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1155:611-626. doi: 10.1007/978-981-13-8023-5_55. PMID: 31468435
 11. Laemmli U. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage. *Nature*; 194. 227: 680-5.
 12. May K, Brügemann K, König S, Strube C The effect of patent *Dictyocaulus viviparus* (re)infections on individual milk yield and milk quality in pastured dairy cows and correlation with clinical signs. *Parasit Vectors*. 2018 Jan 8;11(1):24. doi: 10.1186/s13071-017-2602-x. PMID: 29310709
 13. McCarthy C, Höglund J, Christley R, Juremalm M, Kozlova I, Smith R, van Dijk J.A novel pooled milk test strategy for the herd level diagnosis of *Dictyocaulus viviparus*. *Vet Parasitol*. 2019;276S:100008. doi: 10.1016/j.vpoa.2019.100008. Epub 2019 Apr 7. PMID: 34311940
 14. Pyziel AM, Laskowski Z, Höglund J. *Parasitol* An assessment of the use of cox1 and cox3 mitochondrial genetic markers for the identification of *Dictyocaulus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) in wild ruminants. *Res*. 2018 Jul;117(7):2341-2345. doi: 10.1007/s00436-018-5904-9. Epub 2018 May 7. PMID: 29736729

15. Schnieder T. *Dictyocaulus viviparus*: Isolation and characterization of a recombinant antigen with potential for immunodiagnosis. *Int J Parasitol.* 1992. Nov; 22 (7): 933-8.
16. Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150:7 6-85.
17. Springer A, Jordan D, Kirse A, Schneider B, Campe A, Knubben-Schweizer G, Müller KE, Hoedemaker M, Strube C Seroprevalence of Major Pasture-Borne Parasitoses (Gastrointestinal Nematodes, Liver Flukes and Lungworms) in German Dairy Cattle Herds, Association with Management Factors and Impact on Production Parameters. *Animals (Basel).* 2021 Jul 12;11(7):2078. doi: 10.3390/ani11072078.PMID: 34359205
18. Springer A, von Holtum C, von Samson-Himmelstjerna G, Strube C Immunization Trials with Recombinant Major Sperm Protein of the Bovine Lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Pathogens.* 2022 Jan 2;11(1):55. doi: 10.3390/pathogens11010055.PMID: 35056003
19. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76: 4350-4.
20. Umair S, Bouchet CLG, Knight JS, Pernthaner A, Simpson HV Molecular and biochemical characterisation and recognition by the immune host of the glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) of the abomasal nematode parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Exp Parasitol.* 2017 Oct; 181:40-46. doi: 10.1016/j.exppara.2017.07.006. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28757123
21. Wolf MJ, Yin T, Neumann GB, Korcuć P, Brockmann GA, König S, May K. Genome-Wide Association Study Using Whole-Genome Sequence Data for Fertility, Health Indicator, and Endoparasite Infection Traits in German Black Pied Cattle. *Genes (Basel).* 2021 Jul 28;12(8):1163. doi: 10.3390/genes12081163.PMID: 34440337
22. Yuan D, Li S, Shang Z, Wan M, Lin Y, Zhang Y, Feng Y, Xu L, Xiao L. BMC Genus-level evolutionary relationships of FAR proteins reflect the diversity of lifestyles of free-living and parasitic nematodes. *Biol.* 2021 Aug 30;19(1):178. doi: 10.1186/s12915-021-01111-3.PMID: 34461887

© 2022 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).