

Optimization of an immunoenzymatic (ELISA) assay for detecting ovine antibodies against *Haemonchus contortus*

Optimización de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar anticuerpos de ovinos contra *Haemonchus contortus*

A. Díaz¹, A. Arenal¹, Jessea França², Alda L. Gomes³, Maria A. Machado³, M. Sossanovicz², Úrsula Yoshitani² and M.B. Molento²

¹Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Morfofisiología, Universidad de Camagüey km 5 ½ 74650, Cuba

²Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil, Rua dos Funcionários, 1540. Curitiba, PR, CEP: 80.035-050

³Departamento de Zootecnia, Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil, Rua dos Funcionários, 1540. Curitiba, PR, CEP: 80035-050.

^aEstos autores contribuyeron por igual a la realización del trabajo. * Email: amilcar.arenal@reduc.edu.cu

Diseases originated by gastrointestinal nematodes are one of the most important causes of economic losses in animals, mainly in small ruminants. The objective of this study was to optimize an ELISA immunoenzymatic assay for *Haemonchus contortus*. For that, an extract of total proteins was extracted from a macerate of the adults of this nematode. Blood samples were taken of 48 sheep for obtaining the serum. The parameters of an immunoenzymatic (ELISA) assay were optimized. The best concentration for covering the antigen was 5 µg/mL. The best relationships between the signals of the positive and negative serums for serum dilution, the Anti-IgG and the bovine fetal serum were obtained in 1:300, 1:7000 and 0.25 %, respectively. The optimization of the parameters of this ELISA immunoenzymatic assay allowed the detection of IgG that recognize *Haemonchus contortus* with low unspecific interactions. This is the first study available on the optimization of an ELISA assay for *Haemonchus contortus*.

Key words: optical density, IgG, *Haemonchus contortus*

Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN) are one of the most important causes of economic losses for ruminant exploitations. They generate weight gain reduction, growth delay, decrease of feed intake, reduction of milk yield, wool and low fertility and, in cases of mass infections, animal death (Kui-zheng *et al.* 2007, Liu *et al.* 2009 and Oliveira *et al.* 2012). From the GIN, the most important for small ruminants is *Haemonchus contortus*, which is present in warm climates (Giudici *et al.* 1999, Amarante 2014 and Wilmsen *et al.* 2014) and in temperate regions (Waller *et al.* 2004, Mederos *et al.* 2010 and Felippelli *et al.* 2014).

For *Haemonchus contortus* diagnosis, the most utilized method consists of techniques for determining the presence and/or number of parasite eggs (Ward *et al.* 1997). Within these techniques, McMaster is the most worldwide popular (Bosco 2014) and more recently the Mini-FLOTAC (Rinaldi 2014). Post-mortem examination (necropsy) in slaughter houses allows the confirmation of the diagnosis through the finding of the

Las enfermedades ocasionadas por nemátodos gastrointestinales constituyen una de las más importantes causas de pérdidas económica en los animales, fundamentalmente en los pequeños rumiantes. El objetivo de este estudio fue optimizar un ensayo inmunoenzimático de ELISA para *Haemonchus contortus*. Para ello, se obtuvo un extracto de proteínas totales a partir de un macerado de los adultos de este nemátodo. Se tomaron muestras de sangre de 48 ovinos para obtener el suero. Se optimizaron los indicadores de un ensayo inmunoenzimático (ELISA). La mejor concentración para el recubrimiento del antígeno fue de 5 µg/mL. Las mejores relaciones entre las señales de los sueros positivos y negativos para la dilución de los sueros, el Anti-IgG y el suero fetal bovino se obtuvieron en 1:300, 1:7000 y 0.25 %, respectivamente. La optimización de los parámetros de este ensayo inmunoenzimático de ELISA permitió la detección de IgG que reconocen *Haemonchus contortus*, con bajas interacciones inespecíficas. Este es el primer trabajo que se tiene reporte sobre la optimización de un ensayo de ELISA para *Haemonchus contortus*.

Palabras clave: densidad óptica, IgG, *Haemonchus contortus*

Introducción

Los nemátodos gastrointestinales (NGI) constituyen una de las más importantes causas de pérdidas económicas para las explotaciones de rumiantes. Ocasionan reducción en la ganancia de peso, retraso en el crecimiento, disminución del consumo de alimentos, disminución de la producción de leche, lana, baja fertilidad y, en los casos de infecciones masivas, la muerte de los animales (Kui-zheng *et al.* 2007, Liu *et al.* 2009 y Oliveira *et al.* 2012). De los NGI, el más importante para los pequeños rumiantes es el *Haemonchus contortus*, que está presente en regiones de clima cálido (Giudici *et al.* 1999, Amarante 2014 y Wilmsen *et al.* 2014) y en regiones templadas (Waller *et al.* 2004, Mederos *et al.* 2010 y Felippelli *et al.* 2014).

Para el diagnóstico del *Haemonchus contortus*, el método más utilizado consiste en técnicas para determinar la presencia y/o el número de huevos del parásito (Ward *et al.* 1997). Dentro de estas técnicas, McMaster es la más popular universalmente (Bosco 2014) y más recientemente, el Mini-FLOTAC (Rinaldi 2014). El examen postmortem (necropsia) en los

adult parasites (Sissay *et al.* 2007, Qamar *et al.* 2009 and Khalafalla *et al.* 2011).

The ELISA immunoenzymatic assay is one of the most used tools for establishing diagnostic methodologies for the most dissimilar parasites both in humans as in animals: *Taenia solium* (Deplazes *et al.* 1991), *Fasciola hepatica* (Howell *et al.* 2015), *Crypto sporidium* (Elgun and Koltas 2011), *Schistosoma mansoni* (El-Badry 2009), *Trichinella spiralis* (Johnson *et al.* 1996) and *Taenia saginata* (Wandra *et al.* 2006). However, for *Haemonchus contortus* there is still no immunoenzymatic method allowing animal diagnosis.

The objective of this study was to optimize the ELISA immunoenzymatic assay for *Haemonchus contortus*.

Materials and Methods

Haemonchus contortus proteins extract. Adult *H. contortus*, collected from the abomasums of slaughtered animals were macerated in 10 g liquid nitrogen and 10 mL of saline solution buffered with phosphates (SSTP) 1 X (KH_2PO_4 1.8 mmol/L; Na_2HPO_4 8.4 mmol/L; KCl 12.6 mmol/L and NaCl 136.8 mmol/L, pH 7.2). Later all this macerated material was deposited in a 50 mL centrifuge test tube and it was adjusted until 20 mL with SSTP IX. The tube was agitated for 30 min at 4 °C. Afterwards it was centrifuged at 10000 rpm for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected and filtered. Protein determination was carried out through the QuantiPro™ High Sensitivity Protein Assay Kit.

Sampling. For establishing ELISA, samples of blood serum were used of 48 female sheep from the Laboratory of Sheep and Goat Research and Production (LAPOC) belonging to the Federal University of Paraná in Brazil. To all animals fecal feces were taken for realizing the modified method of McMaster and coproculture. In this way the infestation or not by the nematode was determined. Blood obtained was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. A mixture with similar volumes of all serums was conformed and stored at -20° C.

Immunoenzymatic (ELISA) assay. Microtitration plates of 96 dishes (PolySorp, Nunc) were recovering the concentration of 5 µg/mL (100 µL/dish) with the *Haemonchus contortus* proteins extract diluted in recovering buffer (carbonate-sodium bicarbonate 0.1 mM, pH 9.6) and incubated at 4° C throughout the night. Dishes were washed three times with SSTP IX solution with Tween 20 at 0.2 % ([vol/vol]). The blocking was made with Bovine Fetal Serum (BFS) at 3 % ([vol/vol]) diluted in SSTP 1X with Tween 20 at 0.2 % for one hour. Dishes were washed three times with SSTP 1X solution with Tween 20 at 0.2 % [vol/vol]. Serum samples of vaccinated animals with

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 49, Number 4, 2015 mataderos permite la confirmación del diagnóstico a través del hallazgo de los parásitos adultos (Sissay *et al.* 2007, Qamar *et al.* 2009 y Khalafalla *et al.* 2011).

El ensayo inmunoenzimático de ELISA es una de las herramientas más utilizadas para establecer metodologías de diagnóstico para los más disímiles parásitos, en humanos como en animales: *Taenia solium* (Deplazes *et al.* 1991), *Fasciola hepatica* (Howell *et al.* 2015), *Crypto sporidium* (Elgun y Koltas 2011), *Schistosoma mansoni* (El-Badry 2009), *Trichinella spiralis* (Johnson *et al.* 1996) and *Taenia saginata* (Wandra *et al.* 2006). Sin embargo, para *Haemonchus contortus*, aún no se describe un método inmunoenzimático que permita el diagnóstico en los animales.

El objetivo de este estudio fue optimizar un ensayo inmunoenzimático de ELISA para *Haemonchus contortus*.

Materiales y Métodos

Obtención del extracto de proteínas de Haemonchus contortus. Los *Haemonchus contortus* adultos, recolectados del abomasum de animales sacrificados, se maceraron en 10 g en nitrógeno líquido y 10 mL de solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) 1X (KH_2PO_4 1.8 mmol/L; Na_2HPO_4 8.4 mmol/L; KCl 12.6 mmol/L y NaCl 136.8 mmol/L, pH 7.2). Después se depositó todo el material macerado en un tubo de centrifuga de 50 mL y se ajustó hasta 20 mL con SSTF 1X. Se agitó el tubo durante 30 min. a 4°C. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. Se colectó y filtró el sobrenadante. La determinación de proteínas se realizó a través de QuantiPro™ High Sensitivity Protein Assay Kit.

Toma de muestras. Para establecer el ELISA, se usaron muestras de suero sanguíneo de 48 hembras ovinas, procedentes del Laboratorio de Producción e Investigación de Ovinos y Caprinos (LAPOC), perteneciente a la Universidad Federal de Paraná en Brasil. A todos los animales se les tomaron muestras de heces fecales para realizar el método modificado de McMaster y coprocultura. Se determinó así la infestación o no por el nemátodo. La sangre obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se conformó una mezcla con volúmenes iguales de todos los sueros y se almacenó a -20 °C.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las placas de microtitulación de 96 pocillos (PolySorp, Nunc) se recubrieron a la concentración de 5 µg/mL (100 µL/pozo) con el extracto de proteínas de *Haemonchus contortus* diluidas en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato de sodio 0.1mM, pH 9.6) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Los pocillos se lavaron tres veces con solución de SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % ([vol/vol]). El bloqueo se realizó con Suero Fetal Bovino (SFB) al 3 % ([vol/vol]) diluido en SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % por espacio de una hora. Los pocillos se lavaron tres veces con solución de SSTF IX con Tween 20 al 0.2 % [vol/vol]. Las muestras de sueros de los animales vacunados con el

the parasite extract and the controls were applied (100 μL /dish) diluted in SSTP IX with Tween 20 at 0.2 % ([vol/vol]) and BFS at 25 % ([vol/vol]). After plate incubation for one hour at environmental temperature, dishes were washed three times with SSTPIX solution with Tween 20 at 0.2 % [vol/vol] and the Anti IgG of sheep was added diluted 1:7000 in SSTPIX with Tween 20 at 0.2 % ([vol/vol]) and BFS at 0.25 % ([vol/vol]) was incubated for one hour. The dishes were washed three times with SSTPIX solution with Tween 20 at 0.2 % ([vol/vol]) and the buffer ABTS (revealing) was added, it was incubated in the darkness for 30 min. The optical density was determined in the Biotek reader EL x 800 at 405 nm.

Statistical analysis. For data processing the statistical package Graph Pad Prism 5 was used. An analysis of variance (ANOVA) was carried out and for mean comparison the Post hoc test of Student Newman-Keuls was used.

Results and Discussion

In figure 1 is shown the effect of the recovering at different antigen concentrations. A better performance between 20 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is observed with values of optical density of one for the first and 0.82 for the second. For the rest, the signal decreases until attaining the minimum concentration assessed (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with optical density value close to 0.3.

The best relationship between the optical density of the positive and the negative serums (figure 2) were found in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the covering concentration. Other

extracto del parásito y los controles se aplicaron (100 μL / pozo) diluidos en SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % ([vol/vol]) y SFB al 0.25 % ([vol/vol]). Después de incubar las placas durante una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con solución de SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % [vol/vol] y se añadió el Anti IgG de ovino diluido 1:7000 en SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % ([vol/vol]) y SFB al 0.25 % ([vol/vol]), se incubó una hora. Los pocillos se lavaron tres veces con solución de SSTF 1X con Tween 20 al 0.2 % ([vol/vol]) y se añadió el tampón ABTS (revelado), se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. La densidad óptica se determinó en el lector Biotek ELx 800 a 405 nm.

Análisis estadístico. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Graph Pad Prism 5. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se empleó la prueba Post hoc de Student Newman-Keuls.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra el efecto del recubrimiento a diferentes concentraciones del antígeno. Se observa un mejor comportamiento entre 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con valores de densidad óptica de un para la primera y 0.82 para la segunda. Para las restantes, disminuye la señal hasta llegar a la mínima concentración evaluada (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con valor de densidad óptica cercano a 0.3.

La mejor relación entre la densidad óptica de los sueros positivos y los negativos (figura 2) se encontró en 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la concentración del recubrimiento.

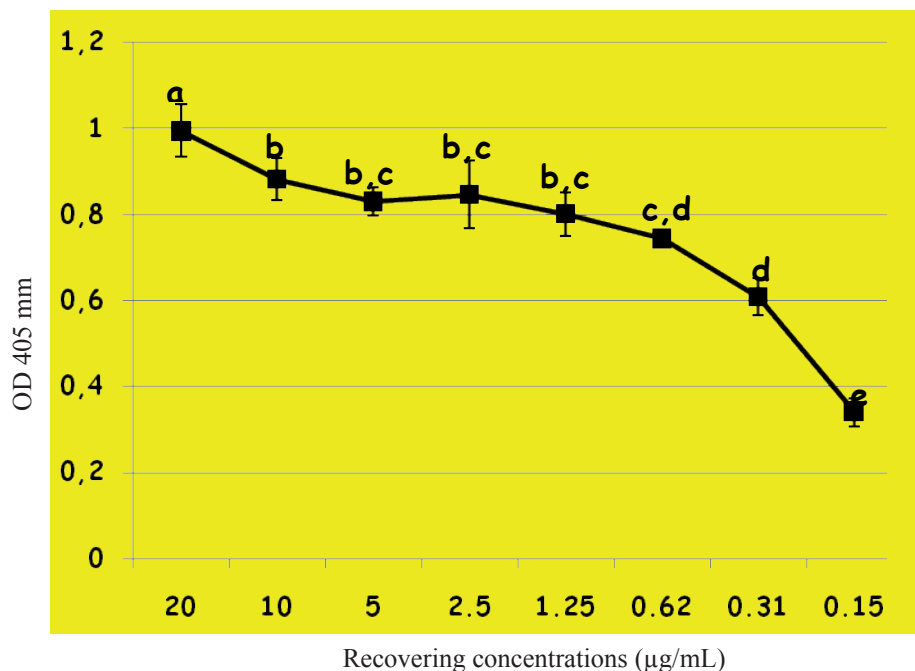


Figure 1. Effect of the covering concentration

OD: optical density

T Bars: Standard deviation from each point

Different letters: significant differences at $P < 0.05$

ANOVA, Mean comparison by Student Newman-Keuls Test

n = 11

reports used the same covering concentration for the detection of titers against *Haemonchus contortus* (Domínguez-Toraño *et al.* 2003, Shakya *et al.* 2011 and Fawzi *et al.* 2014). Nonetheless, coverings of 1 and 2 µg/mL were employed for the determination of antibodies induced by vaccination with this nematode (Bakker 2004, De Vries *et al.* 2009, Bassetto *et al.* 2011 and Molina *et al.* 2012). Meanwhile the covering with 10 µg/mL was also used (van Stijn *et al.* 2010).

Otros informes usaron la misma concentración del recubrimiento para la detección de títulos contra *Haemonchus contortus* (Domínguez-Toraño *et al.* 2003, Shakya *et al.* 2011 y Fawzi *et al.* 2014). Sin embargo, recubrimientos de 1 y 2 µg/mL se emplearon para la determinación de anticuerpos inducidos por la vacunación con este nemátodo (Bakker 2004, De Vries *et al.* 2009, Bassetto *et al.* 2011 y Molina *et al.* 2012). Mientras que recubrimiento con 10 µg/mL también fue empleado (van Stijn *et al.* 2010).

Figure 3 shows the effect of the dilution of the

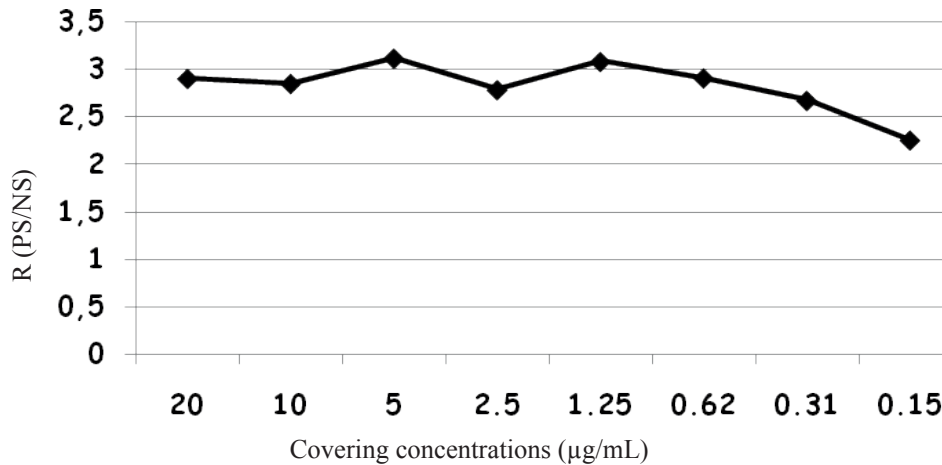


Figure 2. Relationship between the optical density of positive and negative serums for the covering concentration

PS: positive serum NS: negative serum n = 11

animal serum. The 1:200 dilution was of the highest optical density (1.1). The remaining dilutions behaved very similar but with a tendency to the decrease of the signal.

La figura 3 muestra el efecto de la dilución del suero de los animales. La dilución 1:200 resultó la de mayor densidad óptica (1.1). Las restantes diluciones se comportaron muy similares pero con una tendencia a la disminución de la señal.

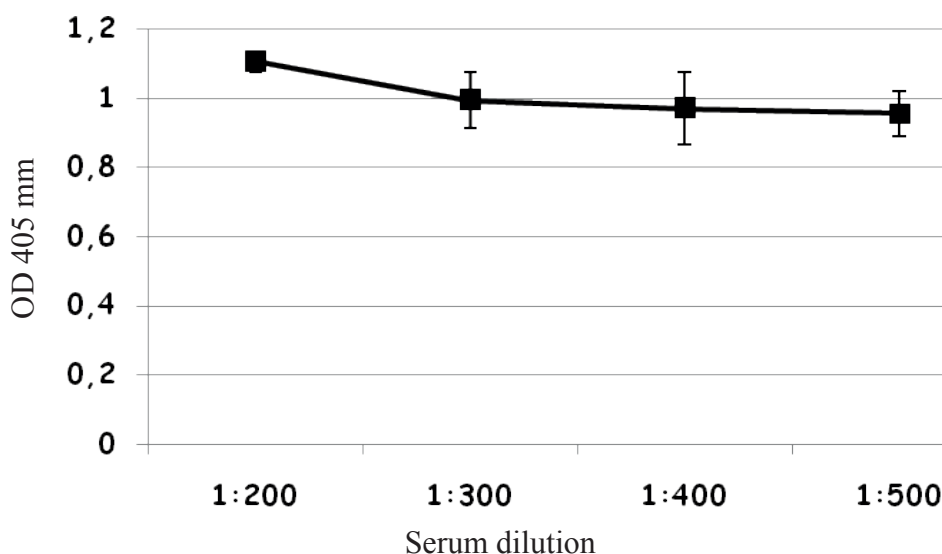


Figure 3. Effect of serum dilution

OD: optical density

T bars: standard deviation from each point

Different letters: significant differences P < 0.05

ANOVA, mean comparison by the Student Newman-Keuls Test

n = 11

The relationship between the optical density of the positive and negative serums is shown in figure 4. In the 1:300 dilution 2.7 relationship was obtained which is much higher to that of 1:200 that was of 2.2. Reports indicate the utilization of serums for detecting antibodies against *Haemonchus contortus* at the most different concentrations, 1:100 (De Vries *et al.* 2009); 1:200 (Ruiz *et al.* 2004, Bassetto *et al.* 2011 and Molina *et al.* 2012); 1:1000 (Sun *et al.* 2011, Han *et al.* 2012 and Yan *et al.* 2013) and 1:4000 (Smith *et al.* 2003).

La relación entre la densidad óptica de los sueros positivos y los negativos se muestra en la figura 4. En la dilución 1:300 se obtuvo relación de 2.7, muy superior a la de 1:200 que fue de 2.2. Reportes señalan la utilización de los sueros para detectar anticuerpos contra el *Haemonchus contortus* a las más diferentes concentraciones, 1:100 (De Vries *et al.* 2009); 1:200 (Ruiz *et al.* 2004, Bassetto *et al.* 2011 y Molina *et al.* 2012); 1:1000 (Sun *et al.* 2011, Han *et al.* 2012 y Yan *et al.* 2013) y 1:4000 (Smith *et al.* 2003).

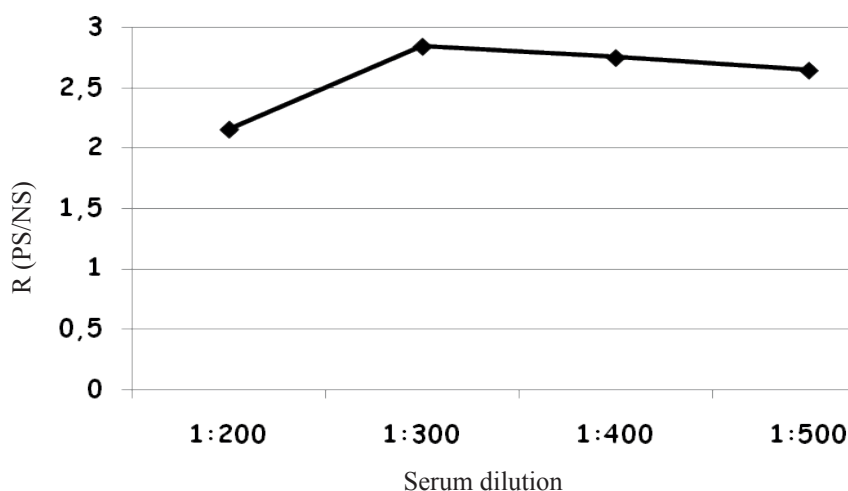
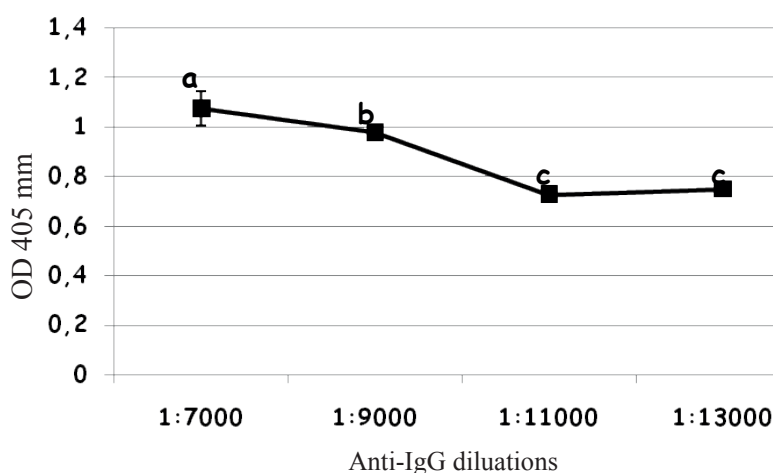


Figure 4. Relationship between the optical density of the positive and negative serums for serum concentration

PS: positive serum NS: negative serum n = 11

The effect of the conjugate (Anti-IgG of sheep) dilution is shown in figure 5. The conjugate dilution recommended by the producer (Invitrogen®, USA) was of 1:7000. Nonetheless, conjugate dilutions from 1:7000 to 1:13000 were evaluated. The dilutions 1:7000 and 1:9000 exhibited values of optical densities higher to one. On diluting more the conjugate the tendency was to decrease the signal with minimum in 1:11000 and 1:13000.

El efecto de la dilución del conjugado (Anti-IgG de ovino) se muestra en la figura 5. La dilución del conjugado recomendada por el fabricante (Invitrogen®, EE.UU.) fue de 1:7000. No obstante, se evaluaron diluciones del conjugado desde 1:7000 hasta 1:13000. Las diluciones 1:7000 y 1:9000 mostraron valores de densidad óptica superiores a uno. Al diluir más el conjugado, la tendencia fue a disminuir la señal, con mínimos en 1:11000 y 1:13000.



OD: optical density
 T bars: standard deviation from each point
 Different letters: Significant differences P < 0.05
 ANOVA, mean comparison by Student Newman-Keuls Test
 n = 11

Figure 5. Effect of the conjugate dilution

Figure 6 presents the relationship between the optical density of the positive and negative serums. The conjugate dilution 1:7000 was that of highest relationship. Some authors report the utilization of the conjugate at a dilution of 1:8000 (Fawzi *et al.* 2014) which is similar to ours. On the contrary, in other reports conjugate dilutions ranging from 1:3000 (Bakker 2004), 1:4000 (Ruiz *et al.* 2004 and Molina *et al.* 2012), 1:5000 (Santos *et al.* 2014), 1:10000 (Bassetto *et al.* 2011), 1:20000 (Muleke *et al.* 2007) up to 1:25000 (Shakya *et al.* 2011).

La figura 6 muestra la relación entre la densidad óptica de los sueros positivos y los negativos. La dilución del conjugado 1:7000 resultó la de mayor relación. Algunos autores informan la utilización del conjugado a una dilución de 1:8000. similar a la nuestra (Fawzi *et al.* 2014). Por el contrario, en otros informes se utilizan diluciones del conjugado que van desde 1:3000 (Bakker 2004), 1:4000 (Ruiz *et al.* 2004 y Molina *et al.* 2012), 1:5000 (Santos *et al.* 2014), 1:10000 (Bassetto *et al.* 2011), 1:20000 (Muleke *et al.* 2007) hasta 1:25000 (Shakya *et al.* 2011).

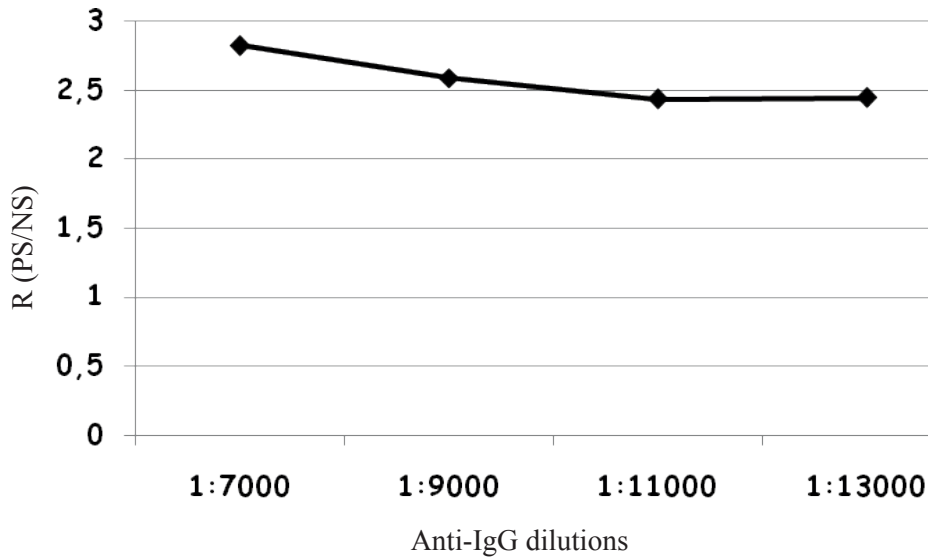
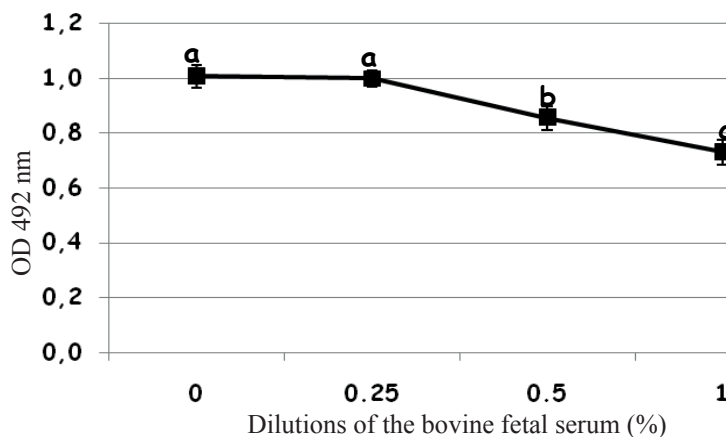


Figure 6. Relationship between the optical density of the positive and negative serums for the conjugate dilutions

PS: positive serum NS: negative serum n = 11

For serum incubation and the conjugate (Anti-IgG), BFS was used for decreasing the unspecific interactions of the assay. For this, dilutions were assessed from 0 until 1 % (figure 7). In the dilutions where no BFA was utilized and in that of 0.25 %, the values of optical density were approximately one. As BFS concentration increased, the tendency was to decrease the values of optical density.

Para la incubación de los sueros y del conjugado (Anti-IgG) se empleó SFB con el objetivo de disminuir las interacciones inespecíficas del ensayo. Para esto se evaluaron diluciones desde 0 hasta 1 % (figura 7). En las diluciones donde no se usó el SFB y en la de 0.25 %, los valores de densidad óptica fueron aproximadamente uno. En la medida que aumentó la concentración del SFB, la tendencia fue a disminuir los valores de densidad óptica.



DO: optical density
 T Bars: standard deviation from each point.
 Different letters: significant differences P < 0.05
 ANOVA, mean comparison by Student Newman-Keuls Test
 n = 11

Figure 7. Effect of the bovine fetal serum dilution

Figure 8 shows the relationship between the positive and negative serums for determining BFS concentration. The highest relationship was attained with the dilution at 0.25 %. When BFS concentration was increased, the signal decreased. BFS dilutions at 1 % (Rodríguez Sánchez *et al.* 2005) and at 2 % (Pupo-Antúnez *et al.* 2011) were employed with the purpose of eliminating the unspecific interactions in ELISA assays. Bashir *et al.* (2011) and Wu *et al.* (2015) reported the use of albumin from bovine serum for this objective. The first do not declare the concentration utilized while the second made it at 1 %.

La figura 8 muestra la relación entre los sueros positivos y negativos para determinar la concentración del SFB. La más alta relación se logró con la dilución al 0.25 %. Cuando se aumentó la concentración del SFB, la señal disminuyó. Diluciones del SFB al 1 % (Rodríguez Sánchez *et al.* 2005) y al 2 % (Pupo-Antúnez *et al.* 2011) se emplearon con el propósito de eliminar las interacciones inespecíficas en ensayos de ELISA. Bashir *et al.* (2011) y Wu *et al.* (2015) informan el uso de albúmina del suero bovino con este propósito. Los primeros no declaran la concentración utilizada mientras que los segundos lo hacen al 1 %.

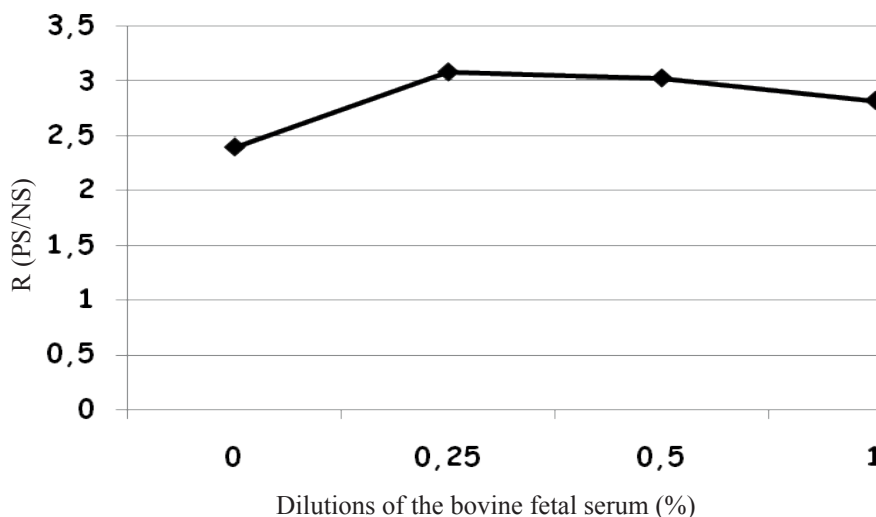


Figure 8. Relationship between the optical density of the positive and negative serums for the concentration of bovine fetal serum

PS: positive serum NS: negative serum n = 11

The optimization of the parameters of this ELISA immunoenzymatic assay allowed achieving high optical density values with low unspecific interactions. With this procedure the effect of *Haemonchus contortus* can be assessed on meat and wool production without the need of animal slaughtering. For this, it is necessary the identification of the gray zone of this assay.

Acknowledgements

The authors are indebted to CAPES and BIOLAC for financing pre-doctoral scholarships that allowed the development of this research. To the Federal University of Paraná (UFPR), to all its technicians, staff members, students and professors for their inestimable help.

La optimización de los indicadores de este ensayo inmuno enzimático de ELISA permitió lograr altos valores de densidad óptica con bajas interacciones inespecíficas. Con este procedimiento se puede evaluar el efecto del *Haemonchus contortus* en la producción de carne y lana, sin la necesidad del sacrificio de los animales. Para ello, es necesario identificar la zona gris de este ensayo.

Agradecimientos

A CAPES y BIOLAC por el financiamiento a becas predoctorales que permitieron el desarrollo de esta investigación. A la Universidad Federal de Paraná (UFPR), a todos sus técnicos, funcionarios, estudiantes y profesores por la ayuda inestimable.

References

- Amarante, A.F. 2014. Sustainable worm control practices in South America. *Small Ruminant Res.* 118:56
- Bakker, N., Vervelde, L., Kanobana, K., Knox, D.P., Cornelissen, A.W.C.A., de Vries, E. & Yatsuda, A.P., 2004. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine* 22:619
- Bashir, S., Singh, R., Sharma, B. & Yadav, S.K. 2011. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. *Asian Pacific J. Tropical Medicine* 4:363
- Bassetto, C., Silva, B., Newlands, G., Smith, W. & Amarante, A. 2011. Protection of calves against *Haemonchus placei* and

- Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*. Parasite Immunology 33:377
- Bosco, A. 2014. The coprological diagnosis of gastrointestinal nematode infections in small ruminants. PhD Thesis. Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia
- De Vries, E., Bakker, N., Krijgsveld, J., Knox, D.P., Heck, A.J. & Yatsuda, A.P. 2009. An AC-5 cathepsin B-like protease purified from *Haemonchus contortus* excretory secretory products shows protective antigen potential for lambs. Veterinary Res. 40:1
- Deplazes, P., Eckert, J., Pawlowski, Z., Machowska, L. & Gottstein, B. 1991. An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* copro-antigens in humans. Transactions of the Royal Soc. Tropical Medicine and Hygiene 85:391
- Domínguez-Torano, I.A., Fernández-Pérez, F.J., Gómez-Muñoz, M.T., Alunda, J.M. & Cuquerella, M. 2003. Humoral and cellular response in lambs vaccinated against *Haemonchus contortus* with p26/23. Small Ruminant Res. 50:29
- El-Badry, A. 2009. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. J. Egyptian Soc. Parasitology 39:757
- Elgun, G. & Koltas, I.S. 2011. Investigation of *Crypto sporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. Parasitology Res. 108:395
- Fawzi, E.M., González-Sánchez, M.E., Corral, M.J., Cuquerella, M. & Alunda, J.M. 2014. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. International J. Parasitology 44:429
- Felippelli, G., Lopes, W.D.Z., Cruz, B.C., Teixeira, W.F.P., Maciel, W.G., Fávero, F.C., Buzzulini, C., Sakamoto, C., Soares, V.E. & Gomes, L.V.C., 2014. Nematode resistance to ivermectin (630 and 700µg/kg) in cattle from the Southeast and South of Brazil. Parasitology International 63:835
- Giudici, C., Aumont, G., Mahieu, M., Saulai, M. & Cabaret, J. 1999. Changes in gastro-intestinal helminth species diversity in lambs under mixed grazing on irrigated pastures in the tropics (French West Indies). Veterinary Res. 30:573
- Han, K., Xu, L., Yan, R., Song, X. & Li, X. 2012. Vaccination of goats with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus*. Veterinary Immunology and Immunopathology 149:177
- Howell, A., Baylis, M., Smith, R., Pinchbeck, G. & Williams, D. 2015. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. Preventive Veterinary Medicine.
- Johnson, M., Behnke, J. & Coles, G. 1996. Detection of gastrointestinal nematodes by a coproantigen capture ELISA. Research in Vet. Sci. 60:7
- Khalafalla, R.E., Elseify, M.A. & Elbahy, N.M. 2011. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in Northern region of Nile Delta, Egypt. Parasitology Res. 108:337
- Kui-zheng, C., Xiao-ye, Y., Xiao-liang, W., Cheng, H., Gui-hua, M., Feng-bao, Y., Yan-bin, F., Xu-bin, Z., De-xin, R. & Zhen-lian, L. 2007. Investigation on resistance of gastrointestinal nematodes in sheep and goats to anthelmintics in Ningxia, China. Vet. Sci. China 6:9
- Liu, Y., Li, F., Liu, W., Dai, R., Tan, Y., He, D., Lin, R. & Zhu, X. 2009. Prevalence of helminths in water buffaloes in Hunan Province, China. Tropical Animal Health and Production 41:543
- Mederos, A., Fernández, S., VanLeeuwen, J., Peregrine, A., Kelton, D., Menzies, P., Le Boeuf, A. & Martin, R. 2010. Prevalence and distribution of gastrointestinal nematodes on 32 organic and conventional commercial sheep farms in Ontario and Quebec. Canada (2006–2008). Veterinary Parasitology 170:244
- Molina, J.M., Martín, S., Hernández, Y.I., González, J.F., Ferrer, O. & Ruiz, A. 2012. Immunoprotective effect of cysteine proteinase fractions from two *Haemonchus contortus* strains adapted to sheep and goats. Veterinary Parasitology 188:53
- Muleke, C.I., Yan, R., Sun, Y., Zhao, G., Xu, L. & Li, X. 2007. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with a recombinant cysteine protease. Small Ruminant Res. 73:95
- Oliveira, A.C., Nunes, A.P., Bern, M.E.N., Borba, M.F.S., Echevarria, F., Vaz, C.M. & Carvalho, F.I.F. 2012. Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça corriedale com marcadores RAPD. Current Agricultural Sci. Technol. 13
- Pupo-Antúnez, M., Cabrera Rodríguez, V., Vázquez Mojena, Y., Drebot, M., Andonova, M., Dickinson Meneses, F., Fuentes Gonzalez, O., Pérez Rodríguez, A. & Santos Montero, P. 2011. Estudio serológico en localidades cubanas con infecciones confirmadas al virus del Nilo Occidental. Rev. Cubana de Medicina Tropical 63:227
- Qamar, M.F., Maqbool, A., Khan, M.S., Ahmad, N. & Muneer, M.A. 2009. Epidemiology of Haemonchosis in sheep and goats under different managemental conditions. Veterinary World 2:413
- Rinaldi, L. 2014. The coprological diagnosis of gastrointestinal nematode infections in small ruminants. PhD Thesis. Ghent University, Ghent, Bélgica
- Rodríguez Sánchez, H., Pupo Antúnez, M., Ilhait, M.T., Otero, A. & Martínez Machín, G. 2005. Anticuerpos monoclonales que reconocen al polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*. Revista Cubana de Medicina Tropical 57:162
- Ruiz, A., Molina, J.M., González, J.F., Conde, M.M., Martín, S. & Hernández, Y.I. 2004. Immunoprotection in goats against *Haemonchus contortus* after immunization with cysteine protease enriched protein fractions. Vet. Res. 35:565
- Santos, M.C., Xavier, J.K., Amarante, M.R.V., Bassetto, C.C. & Amarante, A.F.T. 2014. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. Vet. Parasitology 203:127
- Shakya, K., Miller, J., Lomax, L. & Burnett, D. 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. Veterinary Parasitology 181:239
- Sissay, M., Uggla, A. & Waller, P. 2007. Prevalence and seasonal incidence of nematode parasites and fluke infections of sheep

- and goats in eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 39:521
- Smith, W., Skuce, P., Newlands, G., Smith, S. & Pettit, D. 2003. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunology* 25:521
- Sun, W., Song, X., Yan, R., Xu, L. & Li, X. 2011. Vaccination of goats with a glutathione peroxidase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology* 182:239
- van Stijn, C.M.W., van den Broek, M., Vervelde, L., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Tefsen, B. & Die, I.V. 2010. Vaccination-induced IgG response to Gal α 1–3GalNAc glycan epitopes in lambs protected against *Haemonchus contortus* challenge infection. *International J. Parasitology* 40:215
- Waller, P., Rudby-Martin, L., Ljungström, B. & Rydzik, A. 2004. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Veterinary Parasitology* 122:207
- Wandra, T., Sutisna, P., Dharmawan, N., Margono, S., Sudewi, R., Suroso, T., Craig, P. & Ito, A. 2006. High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002–2004. *Transactions of the Royal Soc. Tropical Medicine and Hygiene* 100:346
- Ward, M., Lyndal-Murphy, M. & Baldock, F. 1997. Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces. *Veterinary Parasitology* 73:181
- Wilmsen, M.O., Silva, B.F., Bassetto, C.C. & Amarante, A.F.T.D. 2014. Gastrointestinal nematode infections in sheep raised in Botucatu, state of São Paulo, Brazil. *Rev. Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23:348
- Wu, M., Li, H., Zhang, Y., Chen, D. 2015. Development of a C3c-based ELISA method for the determination of anti-complementary potency of Bupleurum polysaccharides. *Acta Pharmaceutica Sinica B*
- Yan, R., Sun, W., Song, X., Xu, L. & Li, X. 2013. Vaccination of goats with DNA vaccine encoding Dim-1 induced partial protection against *Haemonchus contortus*: A preliminary experimental study. *Res. Veterinary Sci.* 95:189

Received: July 10, 2015