

01672 9
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR Y HUMORAL EN OVINOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE CON Haemonchus contortus**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

Presenta:

MARIA EUGENIA LOPEZ ARELLANO

Aseores:

Carlos Ramón Bautista Garfias

Héctor Quiroz Romero

David Herrera Rodríguez



MEXICO, D. F.

Enero de 1990.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
1.1 Presentación del problema	1
1.2 Antecedentes bibliográficos de <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u>	3
1.2.1. Clasificación taxonómica	3
1.2.2. Morfología	4
1.2.3. Ciclo biológico	6
1.2.4. Patología	9
1.2.5. Inmunología de <u>Haemonchus contortus</u> ..	11
1.2.5. Inmunología del hospedero contra <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u>	11
1.3. Justificación.....	16
1.4. Hipótesis.....	16
1.5. Objetivos.....	17
II. MATERIAL Y METODO	18
II.1 Animales.....	18
II.1.1. Ovinos	18
II.1.2. Conejos	18
II.2 COPROCULTIVO PARA LA OBTENCION DE LARVAS IN - FECTANTES (L3) DE <u>Haemonchus contortus</u>	19
II.3 INFECCION DE OVINOS CON LARVAS INFECTANTES (L3) DE <u>Haemonchus contortus</u>	20

	<u>Página</u>
II.4 OBTENCION DE SUEROS DE OVINOS.....	21
II.5 HEMATOLOGIA.....	21
II.5.1. Recuento de eritrocitos	22
II.5.2. Hemoglobina	22
II.5.3. Hematocrito	22
II.5.4. Proteína plasmática	22
II.5.5. Leucocitos	22
II.6 EXAMENES COPROPARASITOSCOPICO Y PARASITOLOGICO 22	
II.6.1. Determinación de huevos por gramo de heces (hpg)	22
II.6.2. Cuantificación de parásitos adultos de <u>Haemonchus contortus</u> colectados a la necropsia	22
II.7 Inoculación de ovinos con el paquete de glóbulos rojos de pollo (GRP).....	22
II.8 PREPARACION DEL ANTIGENO SOMATICO (AS) DE LA LARVA INFECTANTE (L3) DE <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u>	23
II.9 PRUEBAS SEROLOGICAS.....	24
II.9.1. Hemoaglutinación indirecta (HI) para la detección de anticuerpos anti - <u>Haemonchus contortus</u>	24
II.9.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti - <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u>	28

	<u>Página</u>
II.9.3.Hemoaglutinación directa (HD) para la de tección de anticuerpos anti - GRP	30
II.9.4.Prueba intradérmica con Fitohemaglutinina (FHA) en ovinos infectados con <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u>	31
III. RESULTADOS.....	33
III.1 HEMATOLOGIA	33
III.1.1 Eritrocitos	33
III.1.2 Hemoglobina	33
III.1.3 Hematocrito	34
III.1.4 Proteína plasmática	34
III.1.5 Leucocitos	34
III.2 EXAMENES COPROPARASITOSCOPICO y PARASITOLÓGICO	
III.2.1 Huevos por gramo de heces (hpg)	35
III.2.2 Número de parásitos adultos de <u>Haemonchus</u> <u>contortus</u> colectados a la necropsia ...	356
III.3 PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	35
III.3.1 Hemoaglutinación indirecta	35
III.3.2 Inmunoensayo enzimático	36
III.3.3 Hemoaglutinación directa	36
III.4 PRUEBA INTRADERMICA CON FITOHEMAGLUTININA.	37
IV. DISCUSION.....	39
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. LITERATURA CITADA.....	56

LISTA DE GRAFICAS

<u>Gráfica</u>	<u>Página</u>
1. Eritrocitos de ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	69
2. Hemoglobina de ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	70
3. Hematocrito de ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	71
4. Proteína plasmática de ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	72
5. Leucocitos de ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	73
6. Niveles de hpg en ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	74
7. Hemoaglutinación Indirecta con AS en ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	75

<u>Gráfica</u>	<u>Página</u>
8. Inmunoensayo enzimático en ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	76
9. Hemoaglutinación Directa con GRP en ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	77
10. Niveles de FHA en ovinos infectados con <u>Haemonchus contortus</u>	78

I. INTRODUCCION

I.1. Presentacion del problema

Las parasitosis gastroentéricas y pulmonares, son causa de severas pérdidas económicas para los productores de ganado (18,65). En 1983, la American Association of Veterinary Parasitologist, definió a las pérdidas económicas en directas e indirectas, incluyendo en las primeras a :la enfermedad parasitaria en sí, importantes pérdidas económicas en ganancia de peso, una reducción en la producción láctea, decomiso de órganos en rastro, costos de medicación y en casos de parasitosis múltiples la muerte del animal, principalmente en los jóvenes . Dentro de las causas indirectas la Asociación mencionada considera a las siguientes: reducción de la eficiencia (traducida como síndrome de mala absorción), anorexia, retraso del crecimiento, una disminución de la eficiencia reproductiva, además se induce un incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades, siendo éstas últimas menos obvias y más difíciles de estimar su impacto en la producción ganadera (12).

Se ha considerado a las zonas tropicales, por su tipo de clima, como óptimas para la evolución de diversas fases infectantes de endoparásitos (22,23,24,37,43). Aunque también las regiones con clima templado o seco cuentan con un potencial biológico para su desarrollo (14,56,80).

En México se encuentran ambos tipos de regiones; tropicales y subtropicales, dónde se han identificado, principalmente en rumiantes domésticos, diversos géneros de helmintos de los cuales los que afectan el abomaso son considerados altamente patógenos para los pequeños rumiantes; dichos géneros son : Trichostrongylus colubriformis, Ostertagia circumcincta y Haemonchus contortus, todos ellos pertenecientes al orden Strongylida, Familia Trichostrongylidae (28,40,50).

Haemonchus contortus puede pasar en varias ocasiones inadvertido para el ganadero como causa primaria de muerte en los ovinos, no así para el parasitólogo y el anatomopatólogo, los cuales lo han clasificado como un patógeno primario capaz de matar a un ovino vigoroso a diferencia de Trichostrongylus sp. y Ostertagia circumcincta sp. clasificadas como parasitosis secundarias (43,52,74).

Es importante mencionar que la infección por Haemonchus contortus es común en diferentes zonas de México. Por mencionar algunos ejemplos, tenemos que Nuñez (67), encontró una frecuencia del 100% de H. contortus en ovinos en diferentes rastros del Distrito Federal, México. Asimismo, Mejía y Díaz (61), citan una frecuencia del 80% en ovinos de Guerrero; por último Güerena (44), menciona una frecuencia del 80% en ovinos de Veracruz.

Aunada a esta frecuencia, la rapidez con la que se desarrolla la hemocosis, adquiere un impacto económico relevante sobre todo en zonas en donde existe un gran número de rebaños (80). Se ha notificado que

los corderos son el grupo más susceptible a la hemoncosis y si el padecimiento se presenta en adultos, suelen afectarse las hembras , particularmente cuando están criando corderos o cuando los animales son viejos (38, 59).

Algunos borregos adultos, por razones aún no bien definidas, muestran cierto grado de resistencia o una alta susceptibilidad a la infección con larvas infectantes (L3) de H. contortus , dichas variaciones en los animales son atribuidas a un fenómeno considerado como hipersensibilidad adquirida, cuya duración es corta, por lo tanto la protección inmunológica es débil (2).

El presente estudio se realizó con el propósito de conocer, si la respuesta inmune de ovinos de entre 8 meses y 2 años de edad, se observa deprimida por la infección con H. contortus, lo cual pudiera favorecer el establecimiento de infecciones secundarias (por bacterias , virus y otros parásitos), o bien, que la inmunización con productos biológicos como las bacterinas y vacunas, sea poco efectiva en los animales parasitados.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS DE H. contortus

1.2.1 Clasificación taxonómica

Orden	Strongylida	
Superfamilia	Trichostrongyloidea	
Familia	Trichostrongylidae	
Género	<u>Haemonchus</u>	
Especie	<u>contortus</u>	(Soulsby, 1987)

1.2.2 Morfología

Los parásitos adultos de este género son de los más grandes de la familia Trichostrongylidae; las hembras miden de 25 a 34 mm de longitud y los machos de 19 a 22 mm; presentan un cuerpo de forma cilíndrica con un extremo anterior de forma aguda, dónde se localiza una pequeña cápsula oral en la cual se encuentra la lanceta o estilite a través del cual succionan sangre para alimentarse (80). A unos 2 mm de longitud después de la cápsula oral se encuentra el esófago de tipo filariforme presente sólo en al tercera, cuarta y quinta fases larvarias (L3, L4 y L5), al igual que en el adulto (36,56).

Todas estas formas clasificadas como parásitas, presentan a lo largo del cuerpo un tubo sencillo con una pared no muscular denominada intestino, el cual termina en un orificio anal en el extremo posterior del nematodo, cuya función es la de absorber las sustancias nutritivas del hospedero (74,80,87).

El sistema excretor, está formado por dos canales longitudinales que recorren todo el cuerpo del parásito y terminan en un orificio ventral en la porción anterior del cuerpo, regulando el mecanismo osmótico de los líquidos corporales (80).

En lo que respecta al aparato reproductor, existe un marcado dimorfismo sexual en H. contortus, tanto macro como microscópicamente, las hembras son más grandes de tamaño que los machos; éstos presentan una expansión cuticular en el extremo posterior llamada bursa copulatrix, compuesta por tres lóbulos: dos laterales de igual tamaño y

uno medio de tamaño pequeño el cual presenta en su interior un rayo cuticular en forma de "Y" invertida y de color café oscuro, característica morfológica específica de este género, así como también un par de órganos alargados queratinizados denominados espiculas, ubicada en el último tercio del cuerpo y cuya función es la de fijarse a la hembra y probablemente también sea para realizar la expansión cuticular y guiar el flujo espermático (32,80) .

Las principales características del aparato reproductor de las hembras de H. contortus son: el apéndice vulvar de forma alargada, el cual cubre a la vulva aproximadamente a la mitad del cuerpo y la denominada forma de "palo de barbería" por la entrelazación del útero de color blanquecino con la del intestino de color rojizo a través de todo el cuerpo (55,61).

Los huevos son de forma oval y pueden llegar a medir 600 micras de longitud. Presentan una membrana doble de queratina y son eliminados al medio ambiente a través de las heces en forma de mórula , en donde evolucionan dividiéndose en blastómeros hasta llegar a formarse la larva uno (L1), primer estadio de vida libre del nematodo; posteriormente este estadio evoluciona al estadio dos (L2), denominándose a ambos estadios como fases larvarias de vida libre; no parásitas. Estas formas libres presentan un esfago rhabditiforme con una porción anterior de forma mazuda conectada por medio de un estrecho cuello a un bulbo posterior en forma de pera; carecen del aparato digestivo, excretor y reproductor. La alimentación de las larvas de vida libre es a partir de bacterias contenidas en los detritus fecales, además carecen de una vaina que las

proteja de los cambios bruscos del medio ambiente (56,69,80).

La tercera fase larvaria de vida libre, es la considerada como estadio evolutivo infectante (L3), la cual a diferencia de los anteriores estadios evolutivos libres (L1 y L2), que presentan un esfago filariforme, con una cubierta de queratina llamada vaina y un determinado número de células epiteliales que almacenan sustancias energéticas para alimentarse y sobrevivir hasta ser consumida por el hospedero (80).

1.2.3 Ciclo Biológico

H. contortus es un nematodo de ciclo biológico directo y las hembras son capaces de eliminar un promedio de 5,000 huevos al día en forma de mórula (80).

Los pastos con material orgánico, temperatura, humedad y oxígeno en condiciones óptimas, favorecen el desarrollo de los huevos a diferentes estadios evolutivos. Una temperatura de 26 °C y una humedad relativa de 70 a 80%, permiten la evolución del primer estadio evolutivo en 6 horas aproximadamente y el desarrollo de la fase infectante en 48 horas. En cambio las temperaturas bajas inhiben el desarrollo del huevo (31,69).

El desarrollo de huevo a primer estadio evolutivo se inicia por la secreción de enzimas como las quitinazas y las proteasas, las cuales rompen la pared del huevo permitiendo la eclosión de la larva uno y posteriormente a las 24 horas el desarrollo de la larva dos (L2). Ambos cambios ocurren en las heces y las larvas se alimentan de bacterias

contenidas en éstas. El alimento se va almacenando en los gránulos alimenticios contenidos dentro de las larvas, funcionando como almacén de nutrientes para cuando llegue a la larva infectante (L3), puesto que ya no se alimentará de bacterias. Esta larva forma una cubierta protectora de queratina llamada vaina externa que la protege del medio y de cambios bruscos de temperatura a diferencia de la L1 y L2, las cuales son altamente susceptibles a sequías y bajas temperaturas de 4 C durante meses (69,74,80).

La L3 asciende a las hojas del pasto en dos horas, cuando hay gotas de rocío o en el atardecer, para ser ingeridas por el hospedero. La muda de la L3 dentro del hospedero se inicia al detectarse un incremento del pH ruminal, causado por la secreción de leucina-amino-peptidasa a través de las células neurosecretoras, localizadas entre la base del esófago y los orificios excretores de la larva (69,80).

Dakkak (30), menciona que la entrada de la fase infectante al orificio omaso-abomasal, ocurre de 10 a 20 minutos, después de haber sido ingerida la L3. Asimismo, este autor observó que a los 30 minutos la forma larvaria predominante en el abomaso es la larva con vaina (L3) en un 66% y en un 27% la larva desvainada (L4). Después de una hora de haber ocurrido la infección, se empieza a observar lo contrario, siendo predominante la L4 en un 7% más que la L3 y en 6 horas predomina en un 25% la L4.

Inicialmente éstas fases evolutivas se van a localizar sobre la mucosa del abomaso, migrando posteriormente hacia dentro del moco de

las glándulas gástricas después de un corto período , durante el cual se alimentan y se inicia el desarrollo de la L4. Posteriormente la L4 inicia su regreso a la superficie de la mucosa en 40 horas después de que el hospedero se infectó con L3, para convertirse en adulto joven (L5) y posteriormente el adulto va adquiriendo su madurez sexual; empezando a eliminar huevos en un lapso de 15 a 21 días posinfección, dependiendo de las condiciones climatológicas (56,69,80).

1.2.4 Patología

H. contortus es un nematodo que parasita a ovinos y caprinos principalmente, aunque accidentalmente puede infestar a bovinos jóvenes que no han adquirido resistencia a la enfermedad pero no les ocasionan dano ni muestran un parasitismo estable en estos hospederos (52). Algunos autores han demostrado que se necesita un número pequeño de larvas desenvainadas (L4) para inducir disturbios en la permeabilidad de la mucosa del abomaso de animales infectados. Este desorden en la mucosa corresponde a un incremento de la hemorragia abomasal observada a los 7 días después de la infección (29). Dicha lesión es causada por la cuarta y quinta fases larvarias (L4 y L5) y por el adulto de H. contortus los cuales succionan sangre tras perforar la mucosa en forma mecánica por su estilete oral (52). Dargie y Allonby (31), observaron que el adulto de H. contortus es capaz de succionar 0.05 ml de sangre diariamente, estimulando la presentación de anemia e hipoproteïnemia en el hospedero. El parásito adulto se alimenta por espacio de 12 min y después se traslada a otro punto de la mucosa abomasal ilesa pero, la lesión que deja sigue sangrando por unos 6 ó 7 min más. Además provoca una gastritis catarral leve al perforar la mucosa con su estilete y puede o no presentarse el signo de diarrea, esto último dependerá del número de parásitos así como de la presencia de otros nematodos (8,79).

El grupo de animales más susceptibles dentro del rebaño a padecer la hemoncosis, son los corderos que fácilmente se infectan por los

adultos, sobre todo cuando apenas han sido destetados, al igual que animales viejos que muestran una deficiencia alimenticia (75).

El cuadro observado a la necropsia en la hemoncosis fatal, es caracterizado por la extrema palidez de las mucosas debido a la anemia. En la mayoría de los casos hay edema o anasarca con un hígado pálido, friable y graso, y con atrofia grasa por múltiples petequias o erosiones fatales así como hemorragia en los lugares en los que los vermes están adheridos. La submucosa aparece edematosa y los pliegues engrosados; asimismo la presencia de úlceras es muy notable. El contenido del abomaso es escaso y acuoso, ligeramente teñido de color pardo y salpicado de coágulos sanguíneos pardos y semidigeridos. El hábito hematófago de éstos vermes favorece su fácil identificación, razón por la cual también son llamados gusanos con forma de palo de "barbería", adaptación que adquiere el intestino de color rojo, entrelazado con el útero blanquesino (60).

Para algunas personas H. contortus pasa muchas veces inadvertido, como causa de muerte en los ovinos, salvo para el parasitólogo y el anatomopatólogo, ya que este verme produce una parasitosis primaria, lo cual significa que es un agente patógeno primario capaz de matar a un ovino vigoroso a diferencia de las parasitosis secundarias, concepto aplicable a la mayoría de los vermes gastrointestinales. Los efectos de algunos vermes pueden no hacerse patentes durante algunas semanas tras la infección, pero cuando aparecen los signos de la hemoncosis ésta se desarrolla con bastante rapidéz y en las infecciones graves la oveja puede morir desangrada sin que antes manifieste síntomas del

padecimiento (31,80).

1.2.5 Inmunología de H. contortus.

1.2.5.2. Inmunología del hospedero contra H. contortus.

El abomaso, habitat definitivo de H. contortus (74,80), presenta una serie de barreras protectoras anatomofisiológicas contra agresiones mecánicas y químicas (63). El moco constituye la primera línea de defensa del abomaso, se halla recubierto de un semifluido semipegasoso de 0.2 - 0.4 mm de espesor formado por un polímero de glucoproteínas unidas entre sí por puentes disulfuros conformando a su vez una red viscosa biodegradable en constante renovación que se opone a la entrada de partículas sólidas, a la acción de una enzima llamada pepsina y a la acción del ácido clorhídrico, éstas dos últimas sustancias producidas por las células principales y marginales, respectivamente de la mucosa (17,46).

La segunda barrera la forma el propio tejido gástrico, al impedir el contacto directo entre las sustancias provenientes del exterior, como alimento o medicamento, con las del medio interno, como son iones y nutrientes. Un tercer mecanismo es el de gradientes de pH el cual se establece entre la mucosa y la cavidad gástrica, formado por iones H^+ y oxidrilos que penetran a través del mucus procedentes de la secreción de ácido clorhídrico y por bicarbonato de sodio, secretado por células del mucus y cuya función es la de regular la permeabilidad y difusión del ión H^+ a través de la aportación de iones oxidrilos que se combinan con los iones H^+ para formar agua. El bicarbonato mantiene así un gradiente de pH entre la mucosa (pH neutro) y el jugo gástrico (pH aproximado de

2) (17).

Por este tipo de barreras se considera al moco como una importante defensa en el hospedero; sin embargo la integridad de la mucosa se ha observado dañada ante la presencia de las larvas y adultos de H. contortus (29).

Las lesiones causadas por estos nematodos en una primoinfección inhiben los mecanismos físicos de la mucosa abomasal ante una segunda dosis de desafío por el rápido ingreso de las larvas infectantes a las glándulas gástricas (10 min), provocando los cambios de permeabilidad y favoreciendo el establecimiento de los nematodos (30).

Algunos autores opinan que los cambios patológicos ocurridos durante la infección con H. contortus, son incapaces de estimular una respuesta inmune de clase protectora y para poder estimular esta respuesta se deberá tomar en consideración la magnitud de la infección y también la exposición del antígeno parásito en el torrente circulatorio (3).

En relación a la magnitud de la infección y el grado de respuesta inmune, Dineen (33) postula que el nivel de respuesta inmunológica dependerá del grado de desigualdad antigénica entre hospedero y parásito y sobre todo de que tan inmunogénico sea el antígeno en circulación. Así, una disminución de la desigualdad antigénica llevaría a una débil respuesta inmune humoral y viceversa, el incremento de la desigualdad propiciaría una respuesta inmune vigorosa por parte del hospedero aunque esto no necesariamente signifique una respuesta de tipo protector .

No sólo se han observado bajos los títulos de anticuerpos séricos anti-H. contortus sino también de IgA local presente en mucosa abomasal en animales sometidos a una primoinfección (86).

Algunos ovinos infectados con larvas de H. contortus, durante 2 meses, han demostrado bajos los niveles de anticuerpos séricos contra H. contortus, por lo que se sugiere que posiblemente los antígenos liberados al torrente circulatorio no son lo bastante inmunogénicos o quizás formen inmediatamente complejos inmunes con los anticuerpos liberados después de la infección (26).

En cambio en animales que han padecido más de una infección con H. contortus, se observó que existe una resistencia adquirida por infecciones continuas y está representado por el fenómeno de autocura, el cual generalmente se manifiesta por eliminación de los nematodos adultos; cese del metabolismo de larvas cuatro (L4) en mucosa abomasal e inhibición de la eliminación de huevos. Lo que corresponde a la dinámica de poblaciones que los mismos parásitos se autoimponen ante la respuesta inmunológica del hospedero (4,9,81).

Al fenómeno de autocuración se le atribuyen características de hipersensibilidad del tipo I y respuesta inmune celular, mucosa superficial y linfocitos sensibilizados. Sin embargo se desconoce actualmente el tipo que dura la memoria inmunológica contra H. contortus en el hospedero (58,76).

Charley *et al.* (27), sugieren que para poder definir el tipo de respuesta inmune presente en ovinos infectados con H. contortus se debería de trabajar con un antígeno específico a probar, pues la

diversidad molecular del parásito completo dificulta el análisis exacto de la reacción antígeno-anticuerpo.

Algunos estudios realizados con antígenos somático del adulto y la larva infectante así como de antígeno de excreción y secreción de la muda de L3 - L4 de H. contortus, han mostrado que el antígeno de muda y el antígeno somático de L3 parecen tener una mayor capacidad inmunogénica al confrontarlos con sueros de animales re infectados, en cambio el antígeno somático del nematodo adulto de H. contortus no favorece el estímulo de anticuerpos (4,10).

Adams (3) menciona que los parásitos adultos de H. contortus no están en contacto directo con el torrente circulatorio el tiempo necesario, como para estimular la respuesta inmune humoral.

Dineen et al. (33), postulan que los nematodos de H. contortus eliminan una mínima cantidad de antígeno al sistema circulatorio, el cual rápidamente forma el complejo antígeno - anticuerpo; favoreciendo el establecimiento del parásito.

Para el establecimiento de la infección también deben de considerarse diversos factores del hospedero como son el estado nutricional, la raza, el sexo y la edad de los animales (1,66).

Abbott et al. (1), observaron que para el establecimiento y patogénesis de H. contortus en corderos de la raza Finn Dorset influye en gran parte el tipo de dieta suministrada, sobre todo si la alimentación es rica en proteínas, porque impide el establecimiento de la infección, sin embargo éstas observaciones no se aplican a otras razas, en donde dietas bajas o altas en su contenido de proteínas no

parecen influir en el establecimiento de los nematodos. También se observó que los animales jóvenes (menores de 6 meses) son más susceptibles a infectarse por la L3 de H. contortus, comparados con los ovinos adultos sometidos a reinfecciones continuas (62,72).

Un factor importante en permitir el establecimiento de la hemoncosis, es el sexo. Diversos han sido los estudios realizados a este respecto y en general se ha observado que las hembras en estado gestante y periparturientas son mucho más susceptibles a padecer la infección que el resto de los adultos (42,77).

I.3. JUSTIFICACION

En la búsqueda de alternativas de protección contra Haemonchus contortus es necesario conocer los posibles mecanismos por medio de los cuales el sistema inmune de ovinos responde ante esta infección. Así como también el comportamiento de este parásito en contra de dicha respuesta inmune. Tomando en cuenta la aplicación práctica de la inmunología en otras áreas se considera de importancia el estudio de la respuesta inmune de nematodos tan patógenos como lo es H. contortus, sobre todo por la poca información que hay sobre este tema en México y por las graves pérdidas económicas que representan anualmente 33 mil millones de pesos en la actualidad (21).

I.4 Hipótesis

La evolución de la respuesta inmune celular y humoral en ovinos infectados experimentalmente con H. contortus, se observa disminuida en diferentes grados medida a través de la aplicación de fitohemaglutinina intradérmica y de glóbulos rojos de pollo por vía intravenosa.

1.5 Objetivos

-Determinar los cambios de la respuesta inmune celular cutánea en ovinos infectados con H. contortus mediante la aplicación intradérmica de fitohemaglutinina y medida través de la reacción cutánea.

-Cuantificar los títulos de anticuerpos de la respuesta inmune humoral en ovinos infectados experimentalmente con H. contortus y estimulada a través de la aplicación intravenosa de glóbulos rojos de pollo utilizando las pruebas serológicas de hemoaglutinación indirecta, hemoaglutinación directa e inmunoensayo enzimático.

-Evaluar la correlación de anticuerpos anti-H. contortus y los títulos de anticuerpos anti-glóbulos rojos de pollo en ovinos.

II. MATERIAL Y METODOS

II.1 Animales

II.1.1. Ovinos

Se emplearon 12 ovinos de la raza Pelibuey, 4 machos y 6 hembras de 8 meses a 2 años de edad libres de nematodos gastroentéricos en el momento de utilizarlos en el experimento, lo cual se confirmó a través de las técnicas copro- parasitológicas de Mc Master y Flotación (85).

Los ovinos se distribuyeron al azar, en dos grupos: A y B, con 6 animales cada uno .

A cada grupo se le asignó un corral para evitar una posible infección cruzada entre ellos; los animales fueron alimentados con forraje y concentrado proporcionado por el "Rancho San Francisco", pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) ubicado en la carretera Chalco-Mixquic, Estado de México, lugar donde se alojaron los animales durante los dos meses de duración del experimento.

II.1.2. Conejos

Se emplearon 4 conejos de 1.5 a 2 Kg de peso de la raza Nueva Zelanda para la obtención de los sueros utilizados en la prueba serológica de hemaglutinación indirecta y directa. Los animales estuvieron confinados en el Bioterio del Departamento de Parasitología

de la F.M.V.Z. durante un mes. Asimismo, el concentrado para su alimentación fue proporcionado por la F.M.V.Z.

II.2. COPRO CULTIVO PARA LA OBTENCION DE LARVAS INFECTANTES (L3) DE Haemonchus. contortus.

Para la realización del coprocultivo se tomaron muestras de heces de ovinos positivas a H. contortus de un ovino donador del Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (C.E.N.I.D.), en Jiutepec, Mor.

Se emplearon palanganas de plástico limpias con serrín estéril y agua hervida para preparar el cultivo de heces. Se colocó una cubierta de aluminio con un cuadro de gasa en el centro para favorecer la circulación de aire y evitar la contaminación por moscas, se dejó tapada durante 21 días y sólo se destapo para humedecerla y oxigenarla (6,82). Al término de este tiempo se colectaron las larvas por medio de la técnica de Migración Larvaria (85).

Las muestras colectadas se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos en tubos de ensayo de 15 ml con fondo "V" graduados, posteriormente la muestra se dejó sedimentar a 4 C durante 60 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvieron las larvas del sedimento para volver a agregarles 15 ml de agua destilada y proseguir con la centrifugación y la refrigeración. Este procedimiento se repitió hasta observar el sobrenadante claro (86). En un portaobjetos se colocaron 4 gotas de 20 cada una del sedimento para efectuar el conteo hasta completar 1 ml, posteriormente se realizó una regla de tres en base al

volumen total que se tenía así como también para identificar la presencia de la L3 de H. contortus.

El sedimento de las larvas colectadas se concentró en un tubo de centrifuga de 10 ml con una cantidad de 5×10^6 larvas.

El siguiente cambio del gradiente de densidad de éstas larvas fué con una solución de sacarosa a una concentración del 37% (proporción 1:5), se centrifugó a 350 xg durante 10 minutos; posteriormente las larvas se observaron resuspendidas en la parte media y superior de la solución de sacarosa quedando en el sedimento el detritus de heces.

Las larvas se colectaron con ayuda de una pipeta pasteur de 5 ml y se resuspendieron en solución salina amortiguadora de fosfatos 0.15 M, pH 7.2 (SSAF), para eliminar el exceso de sacarosa. Los lavados se continuaron haciendohasta observar claro el sobrenadante para esto fue necesario centrifugar a 350 xg durante 5 minutos, dejando sedimentar a 4 C / 60 min. en una probeta de 100 ml (86).

La concentración final de las larvas fue de 1×10^6 larvas / ml, se conservaron a 4 C para la inoculación experimental de los borregos y en congelación (-20 C) para la preparación del antígeno.

11.3. INFECCION DE OVINOS CON LARVAS INFECTANTES (L3) DE H. contortus.

Se prepararon 12 frascos de 5 ml con 10,000 L3 de H. contortus cada uno, resuspendidas en 3 ml de la solución salina fisiologica (SSF) estéril. Los animales se dividieron en dos grupos al azar por sorteo, el primer grupo fué designado como A al cual no se le inocularon larvas y

al segundo, como grupo B, y se le administró a cada ovino 10,000 L3 de H. contortus por vía oral. El día de la inoculación con larvas infectantes se le denominó día cero.

11.4. OBTENCION DE SUEROS DE OVINOS

La colecta del suero control positivo fué realizada por venopunción de la yugular de un ovino positivo, el cual había sido infectado experimentalmente en el C.E.N.I.D.- Microbiología con 10,000 larvas infectantes (L3) de H. contortus.

El suero control negativo se obtuvo de un ovinos neonatal por vía intracardiaca del rastro de Ferrería, ubicado en el Distrito Federal, Mex.

Los sueros de los animales experimentales se obtuvieron por venopunción de la yugular, colectando la muestra 7 días antes de la inoculación y posteriormente cada 7 días, durante dos meses, en ambos lotes.

El procedimiento a seguir para la obtencion de todos los sueros colectados fué el mismo: la sangre obtenida se dejo coagular 8 horas ó hasta observar la formacion del coagulo; posteriormente se centrifugó a 200 xg durante 5 minutos. El suero obtenido se colectó en condiciones estériles y se conservo a menos 20 C hasta su uso (64).

11.5. HEMATOLOGIA

Se tomaron aproximadamente 5 ml de sangre por punción de la vena yugular de todos los animales empleando como anticoagulante citrato de sodio al 3.8%. A las muestras obtenidas se les realizaron las siguientes pruebas de laboratorio:

II.5.1. Recuento de eritrocitos

II.5.2. Hemoglobina

II.5.3. Hematocrito

II.5.4. Proteína Plasmática

II.5.5. Leucocitos

El procedimiento a seguir para cada técnica fue el descrito por Benjamin (16).

II.6. EXAMENES COPROPARASITOSCOPICO Y PARASITOLÓGICO

II.6.1. Determinación de huevos por gramo de heces (hpg).

Las muestras fueron tomadas directamente del recto de ambos grupos cada 7 días durante 2 meses. Se realizaron las pruebas de diagnóstico parasitológico en heces, Flotación y Mc Master descritas por Thiepont et al. (85).

II.6.2. Cuantificación de parásitos adultos de Haemonchus contortus colectados a la necropsia.

A los 45 días posinfección, los animales de ambos grupos fueron sacrificados y sometidos a una necropsia de donde se obtuvo el abomaso. Colectándose el total del contenido abomasal yaforando con agua a 1,2,3,4 ó 5 litros, dependiendo del volumen total de cada abomaso. Se tomó una alícuota del 20% del volumen aforado y se le agregó 10 ml de formal al 10% como preservativo (88).

Posteriormente se realizó el conteo e identificación de los parásitos adultos en base a la morfología citada por Mejía y Díaz (61).

II.7. INOCULACION DE OVINDOS CON EL PAQUETE DE GLOBULOS ROJOS DE POLLO (GRP).

Se emplearon jeringas de 20 ml con solución Alsevers como anticoagulante. Se colectó la sangre de pollos domésticos por punción intracardiaca la proporción fué de 1 de sangre : 1 de Alsevers, se colectó un total de 30 ml de sangre y se dejaron madurar los eritrocitos de pollo durante 3 días a 4 C. Posteriormente se lavaron con SSAF 0.15 M, pH 7.2, para eliminar el anticoagulante. El paquete de eritrocitos que se preparó para la inoculación de cada ovino fué de 2×10^6 eritrocitos, resuspendidos en SSAF estéril (66,70).

11.8 PREPARACION DEL ANTIGENO SOMATICO (AS) DE LA LARVA INFECTANTE (L3) DE H. contortus.

Las larvas obtenidas del coprocultivo, se lavaron con SSAF, pH 7.2 más 400 U.I. de penicilina y 400 mg de estreptomycin para eliminar una posible contaminación bacteriana.

La proporción de las larvas empleadas para la preparación del antígeno fué de 1×10^6 larvas / 10 ml de SSAF pH 7.2, con antibiótico y EDTA como inhibidor de proteasas a una concentración de 10 mM (86).

La preparación del AS se realizó en un homogenizador Brawn y las larvas se colocaron en un frasco de vidrio conteniendo 10 ml de SSAF pH 7.2 y se dejó en el homogenizador 1 hora / 4 C.

Posteriormente se colocó el macerado de larvas en un matraz de 50 ml sobre una platina magnética y se dejó agitando durante 12 horas / 4 C para centrifugarlas posteriormente a 700 xg durante 60 minutos a 4 C obteniendo el sobrenadante .

El contenido de proteínas se determinó por medio del método de Biuret (64).Obteniéndose una concentración de 2.9 mg/ml de proteína.

El AS se conservo a menos 20 C hasta su uso en frascos de 2 ml.

II.9. PRUEBAS SEROLOGICAS

II.9.1. Hemoaglutinacion Indirecta (HI) para los titulos de anticuerpos anti- H. contortus.

Para el procedimiento de la prueba de HI, se siguió la metodología citada por Morilla y Bautista (64), a la cual se le realizaron algunas modificaciones para su estandarización con el AS de H. contortus.

Todos los sueros empleados en esta prueba se trabajaron el mismo día para evitar cualquier tipo de variable que pudiera alterar los resultados. Previo a la realización de la prueba experimental, se realizaron una serie de pruebas de hemoaglutinación, para determinar la concentración óptima de antígeno así como la dilución positiva de suero.

Las concentraciones de proteína del antígeno de extracto crudo de H. contortus para seleccionar la dilucion donde se observaba una reacción positiva y a su vez emplear la menor cantidad de antígeno, fueron las siguientes: 1:45, 1:90, 1:180, 1:260 . Seleccionándose la dilución de 1:90 de antígeno.

Se realizaron diluciones dobles de sueros positivos y negativos, iniciando con diluciones de 1:16 y finalizando con la dilución de 1:4098. Para tomar el patrón de dilución de suero positivo, se descartaron las diluciones anteriores a la de 1:64, por considerar que dan reacciones positivas falsas.

El procedimiento para la realización de la prueba de Hemoaglutinación Indirecta fue el siguiente:

Suero Normal de Conejo (SNC)

-Obtener el SNC (no lisado) en condiciones estériles y congelarlo.

-Descomplementar el SNC a 56 C durante 30 minutos

-Adsorberlos: 0.1 ml de Glóbulos Rojos de Barrego (GRB) + 0.9 ml de SNC.

-Incubar a 37 C durante 10 minutos

-Centrifugar a 350 xg durante 5 minutos y obtener el sobrenadante.

-Congelarlo a menos 20 C y descomplementar a 56 C durante 10 minutos cada vez que se use.

Diluyente de SNC al 1%

-1 ml de SNC adsorbido + 99 ml de SSAF pH 7.2

Dilución de Ácido Tánico.

-Prepararlo al momento de usarlo

-Preparar una solución madre : 20 mg de ác. tánico + 20 ml de SSAF pH 7.2

-Agregarlo a los GRB y observar de que no aglutinen. Si se observara que aglutina probar con otras diluciones de ácido tánico (1:10,000, 1:15,000 y 1: 20,000).

Tanizado de GRB (GRBt)

-Lavar tres veces los GRB, los dos primeros lavados realizarlos a 300 xg durante 5 minutos y el tercer lavado a 300 xg durante 10 minutos.

-Realizar una suspensión al 2.5% con el paquete de GRB y SSAF pH 7.2

Ej: 2.5 ---- 100

3.0 ---- X = 120 ml donde: 117 ml SSAF pH 7.2

3 ml paquete de GRB

-Adicionar un volumen igual de la dilución seleccionada de ác. tánico, la cual en el presente estudio fué de 1:10,000

Ej: siguiendo con el ejemplo anterior, se deberá de adicionar 120 ml de la dilución 1:10,000 de ác. tánico.

$$\text{Vol. final} = \frac{120 \text{ ml} \times 1,000 (\text{dil. madre})}{10,000} = 12 \text{ ml}$$

Por lo tanto se deberá adicionar 12 ml de la dilución de ác. tánico + 108 ml de SSAF pH 7.2 para tener un vol. final de 120 ml.

-Incubar a 37 C durante 10 minutos y centrifugar a 300 xg durante 5 minutos.

-Hacer un lavado con SSAF pH 7.2 a 300 xg durante 10 minutos, tirar el sobrenadante y resuspender con SSAF pero a un pH 6.4

Determinación de la concentración óptima de antígeno

-Preparar 4 diluciones de antígeno en SSAF pero a pH de 6.4

Sensibilización de Glóbulos Rojos de Borrego (GRBs)

-Los GRB tanizados (GRBt) se sensibilizan agregando un volumen igual de una dilución óptima de antígeno

-Incubar e baño maría a 37 C durante 15 minutos y centrifugar a 300 xg durante 5 minutos.

-Lavar el paquete de GRB dos veces con SMC al 1%, el primer lavado se realizará a 300 xg durante 5 minutos. y el segundo durante 10 min.

Ajustar los GRB ya sensibilizados (GRBs) a una suspensión de 1.5%. Ej:

1.5 ---- 100

0.5 ---- 33.3 SNC 1%

Procedimiento:

1. Inactivar los sueros sospechosos (Sx), durante 30 min. en baño maría. y adsorberlos con 0.1 ml de GRBt + 0.9 ml del Sx.

2. Incubar a 37 C en baño maría durante 30 min y centrifugar a 300 xg durante 5 min.. Obtener el sobrenadante, cuidando de no mover los eritocitos sedimentados.

3. En placas de microtitulación de 200 microlitros (mcl) con fondo de "U", transferir 50 mcl de SNC al 1% a cada pozo.

4. Transferir 50 mcl del Sx al primer pozo

5. Mezclar y hacer 12 diluciones del Sx pasando 50 mcl a cada pozo

6. Mezclar y adicionar 25 mcl de GRBs al 1.5% a cada pozo

7. Mezclar y dejar reposar a 4 C durante 12 horas ó 2 horas a temperatura ambiente.

Control de SNC al 1%

1. Transferir 50 mcl del SNC al 1% a 16 pozos

2. Adicionar 25 mcl de GRBs al 1.5%

3. Dejar reposar 12 horas a 4 C o 2 horas a temperatura ambiente.

4. El resultado deberá de ser negativo, en caso contrario se deberá de emplear otro suero de conejo.

Control de sueros sospechosos

1. Transferir 50 mcl del SNC al 1% en los pozos dónde se realicen

las diluciones de cada suero.

2. Adicionar 25 mcl de GRBT al 1.5%

3. Dejar reposar 12 horas a 4 C o 2 horas a temperatura ambiente

4. El resultado deberá ser negativo, en caso contrario se recomienda descomplementar el suero nuevamente.

11.9.2. Inmunoensayo enzimático (E.L.I.S.A.) para los títulos de anticuerpos anti- H. contortus.

La metodología empleada para la prueba de E.L.I.S.A. fué la descrita por Morilla y Bautista (64).

Previo a la realización del experimento correspondiente al presente estudio, se evaluaron la concentración de la proteína antigénica, la dilución del conjugado y de los sueros testigo.

Se trabajó con diluciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 de los sueros testigo positivos y negativos, observándose una reacción óptima en la dilución de 1:100 para ambos sueros. Todas las diluciones se realizaron en SSAF pH 7.2 y Tween 20 al 0.05%.

Para la concentración óptima de proteína del extracto crudo de la L3 de H. contortus, se probaron diferentes concentraciones de 5, 10, 15 y 20 microgramos (mcg) por ml. En el presente estudio se optó por emplear la concentración de 10 mcg por considerar que dió la reacción óptima para sensibilizar la placa. El diluyente empleado fué la solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5.

En el conjugado se probaron también diferentes diluciones seleccionadas en base a trabajos anteriores realizados en la estandarización de la prueba de ELISA para Fasciola hepatica. Las

diluciones empleadas fueron las siguientes: 1:500, 1:1,000, 1:2000 y 1:4000, tanto para el suero negativo como para el positivo. La dilución considerada como óptima fué la de 1:2000.

Asimismo, durante el tiempo de estandarización de la técnica se colocaron testigo de suero (+ y -), de antígeno, de conjugado y del substrato empleado (Orthophenilendiamo) .

Procedimiento:

-Obtener antígeno de extracto crudo de la larva infectante (L3) de H. contortus y estandarizar su concentración.

-Obtener sueros testigo positivos y negativos para estandarizar la dilución con la que se va a trabajar.

-Estandarizar la concentración óptima del conjugado que se va a emplear.

1. 10 mcg/ml del antígeno de extracto crudo de la L3 de H. contortus diluido en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5

2. Colocar 100 mcl en cada pozo de la sol. de antígeno. Homogenizar la placa y dejarla sensibilizar a 4 C durante 12 horas.

3. Posteriormente lavar la placa tres veces con SSAF 0.15 M, pH 7.2 + Tween 20

4. Adicionar 100 mcl a cada placa de solución bloqueadora (Leche descremada al 5%).

5. Incubar 15 min. y realizar tres lavados con SSAF-Tween 20

6. Hacer una dilución de 1:100 para los Sx y colocar 100 mcl en cada pozo de la placa. Homogenizar.

7. Incubar 15 minutos a 37 C

8. Posteriormente hacer tres lavados con SSAF-Tween 20.

9. Adicionar 100 mcl de conjugado a una dilución 1:2000 con SSAF-Tween 20. Incubar a 37 C durante 15 minutos.

10. Lavar tres veces y adicionar 100 mcl del substrato en cada pozo

11. Realizar la lectura a 405 nanómetros (nm).

II.9.3. Hemoaglutinación Directa (HD) para los títulos de anticuerpos anti-globulos rojos de pollo (GRP).

El procedimiento para la realización de la prueba de HD fué la citado por Orozco (70) y Nguyen (66).

Todos los sueros empleados en esta prueba se trabajaron el mismo día para evitar cualquier tipo de variable, que pudiera alterar los resultados. A partir de la dilución 1:32, se considero como suero positivo.

Hemoaglutinación directa:

-Obtener los GRP mediante punción cardiaca en solución de Alsevers. Dejarlos en refrigeración tres días.

-Después de este tiempo, lavarlos tres veces con SSAF pH 7.2 a 300 xg durante 5 min. dos veces y una vez durante 10 min.

-Resuspender el paquete de GRP en SSAF 0.15 M, pH7.2, ajustándolo al 1.5%

-Inactivar los sueros sospechosos (Sx) a 56 C durante 30 minutos en baño maría.

-Adsorberlos : 0.1 ml de GRP + 0.9 ml de Sx

-Incubar a 37 C durante 30 minutos en baño maría y centrifugar a 300 xg durante 5 min. Obtener el sobrenadante, si no se usa al momento,

dejarlo en congelación.

Procedimiento:

1. Transferir 50 mcl de SNC 1% en cada pozo de la microplacas con fondo "U".
2. Transferir 50 mcl del Sx al primer pozo de la placa .
3. Mezclar y realizar 12 diluciones de 50 mcl
4. Mezclar y adicionar 25 mcl de los GRP al 1.5% en cada pozo.
5. Mezclar y dejar reposar 12 horas a 4 C 6 2 horas a temperatura ambiente.

Testigo del suero

El procedimiento tanto para los testigo del SNC como del Sx se realizará de igual forma que la utilizada para hemaglutinación indirecta.

II.9.4. Prueba intradérmica con Fitoemaglutinina (FHA) en ovinos infectados experimentalmente con Haemonchus contortus.

Se empleo FHA* a una concentración de 100 mcg de FHA / ml. Previamente los animales de ambos grupos fueron rasurados en la tabia del cuello formando un rectangulo de 10 cm de longitud aproximadamente; dónde se trazaron dos círculos, uno en la parte superior y otra en la inferior para realizar la inoculación en el centro de cada círculo con 0.1 ml de FHA por vía intradérmica y con 0.1 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril (84,86).

Previo a la realización del experimento, se realizaron una serie de pruebas piloto con objeto de conocer cual es el periodo de tiempo posinoculación con FHA y SSF, con una mayor reacción cutánea. Este

periodo se determinó después de haber realizado varias veces la lectura, una vez antes de la inoculación y a los 15 min., 30 min., 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 72 horas posinoculación. La medida del grosor de la piel se realizó levantando los extremos de la piel del círculo trazado en la tabla del cuello, dejando el centu cutáneo libre para poderse medir con un vernier, dejando que tuviera un ligero juego al contacto con el pliegue y cuidando de no presionar, con el fin de evitar resultados falsos.

El tamaño del grosor cutáneo tomado antes de la inoculación se tomó como referencia de grosor normal, el cual al compararlo con el tamaño del grosor cutáneo sin haberlo inocularla, permitió determinar el tiempo y rango. Los cuales fueron de 0.2 mm a 1.0 cm tomados en ips diferentes tiempos, observándose el mayor incremento a las 24 horas. Por lo tanto las posteriores lecturas se tomaron a esta hora. (66).

III. RESULTADOS

III.1. HEMATOLOGIA

Los parámetros hematológicos obtenidos de ambos grupos en el presente estudio se compararon con los valores normales para ovinos Pelibuey citados por Larios y cols. (54) y por Benjamín (16). Asimismo los resultados obtenidos del presente trabajo fueron evaluados a través de la prueba de regresión binaria (45,82).

III.1.1. Eritrocitos

El análisis indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), durante las últimas tres semanas del experimento, sobre todo durante la 5a. semana posinfección donde se observó una media y desviación estándar de 10.9 ± 2.5 y 7.2 ± 1.2 (millones de eritrocitos por mm^3) para el grupo A y B respectivamente. Gráfica 1.

Esta gráfica muestra como se inicia la disminución de eritrocitos a partir de la segunda semana posinfección, así como la tendencia a seguir bajando en las restantes semanas.

III.1.2. Hemoglobina

El análisis señala una diferencia significativa ($P < 0.05$) únicamente en la 4a. semana posinfección con una media y desviación estándar de 11.2 ± 1.1 de g/100 ml de hemoglobina para el grupo A y de 9.2 ± 1.5 para el B.

Durante el resto de las semanas se observó normal la concentración de hemoglobina.

La gráfica 2 muestra la disminución de hemoglobina durante la 4a semana posinfección así como también como se comportaron ambos grupos de forma casi igual aunque el grupo B siempre mantuvo sus niveles más bajos que el testigo, observándose cierta tendencia a disminuir.

III.1.3. Hematocrito

La diferencia entre ambos grupos se señala a partir de la 3a. semana posinfección en la cual se observó la mayor diferencia estadística ($P < 0.05$), con una media y desviación estándar de 36.5 ± 2.6 del porcentaje de hematocrito para el grupo A y 28.2 ± 4.7 para el grupo B.

Asimismo, se observó diferencia estadística durante la 4a. y 5a. semanas posinfección. Gráfica 3

III.1.4. Proteína plasmática

La diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), entre el grupo testigo y el infectado se señalan durante la 3a., 4a. y 6a. semanas posinfección. La mayor diferencia entre grupos se observó durante la 3a. semana, con una media y desviación estándar de 6.96 ± 0.34 para el grupo testigo y 6.2 ± 0.2 para el grupo infectado.

La gráfica 4 muestra estas diferencias entre grupos, así como el comportamiento normal de proteína en las anteriores semanas.

III.1.5. Leucocitos

La gráfica 5 indica las medias y desviaciones estándar de los grupos A y B. Asimismo, se indica que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre grupos, en ninguna semana durante el experimento. También se observó como se comportaron

prácticamente iguales ambos grupos durante las 8 semanas del experimento.

III.2 EXAMENES COPROPARASITOSCOPICO Y PARASITOLÓGICO

III.2.1 Huevos por gramo de heces (hpg).

El inicio de la eliminación de huevos en el grupo infectado fué durante la 3a. semana posinfección con una media y desviación estándar de 1688 ± 1009 . Asimismo la eliminación de huevos persistió durante las dos semanas restantes (5a. y 6a.) alcanzando el máximo pico de eliminación de hpg en la 6a. semana posinfección con una media y desviación estándar de 7125 ± 6918 . Gráfica 6.

III.2.2 Número de parásitos adultos de Haemonchus contortus colectados a la necropsia.

Se sacrificaron 8 ovinos al término de la sexta semana posinfección, 6 de los animales sacrificados corresponden al grupo A y 2 al grupo B. Dos de los animales infectados, no fueron sacrificados por estar en estado de gestación.

El número total de parásitos hallados a la necropsia fué 1400 con una media y desviación estándar de 1200 ± 11 de parásitos adultos encontrados a la necropsia para el grupo B y 0 ± 0 para el A.

III.3 PRUEBAS SEROLÓGICAS

III.3.1. Hemoaglutinación indirecta (HI)

El análisis estadístico señala una diferencia significativa ($P < 0.05$), para los títulos de anticuerpos anti- H. contortus, partir de la 3a. semana posinfección con 10,000 L3 de H. contortus, con una media y

desviación estándar de 4.3 ± 0.5 para el grupo A y 9.7 ± 0.5 para el B, las diferencias significativas, entre ambos grupos continuaron durante la 5a. y 6a. semana posinfección. Gráfica 7

La gráfica muestra una marcada diferencia entre grupos a partir de la segunda semana posinfección, persistiendo la diferencia durante las restantes semanas. Asimismo se observó que existe una alta respuesta humoral principalmente durante la 3a. y 5a. semanas posinfección.

III.3.2 Inmunoensayo enzimático (E.L.I.S.A.).

El análisis estadístico indica diferencia significativa ($P < 0.05$) para los títulos de anticuerpos anti- H. contortus correspondiente a la 3a. semana posinfección observando una media y desviación estándar de 0.5 ± 0.3 para A y de 0.9 ± 0.2 para el grupo B. Durante las siguientes semanas no hubo diferencia entre grupos. Gráfica 8

En esta gráfica se aprecia el ligero incremento de anticuerpos anti-H. contortus durante la 3a. semana, así como el bajo títulos de anticuerpos anti-H. contortus en las semanas restantes.

III.3.3 Hemoaglutinación directa (HD).

El análisis señala una diferencia significativa ($P < 0.05$), para los títulos de anticuerpos anti- GRP durante la 2a. y 3a. semanas posinoculación del paquete de GRP.

De acuerdo a la prueba estadística consultada la diferencia significativa para los títulos de anticuerpos anti- H. contortus entre ambos grupos se inició a partir de la 2a. semana posinfección con el

paquete de GRP con una media y desviación estándar de 6.3 ± 1.0 para el grupo A y 4.7 ± 0.6 para el B. Gráfica 9

La gráfica muestra la disminución de anticuerpos anti-GRP durante la segunda y la tercera. semanas posinoculación con GRP, principalmente.

Se observó cierta tendencia a disminuir el nivel de anticuerpos anti-GRP en los animales infectados con L3 de H. contortus en las semanas restantes sin ser estadísticamente significativa esta disminución ($P < 0.05$).

III.4 PRUEBA INTRADERMICA CON FITOHEMAGLUTININA (FHA).

El análisis estadístico señala una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el grosor del pliegue cutáneo entre ambos grupos durante la 3a y 6a semanas posinfección con 10,000 L3 de H. contortus, la mayor diferencia se observó durante la 3a. y 6a. semanas posinfección con una media y desviación estándar de 3.93 ± 0.15 para el grupo A y 2.05 ± 0.06 para el B. Gráfica 10

También se muestra la cinética que tuvo la respuesta intradérmica observándose la diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) durante la 3a. y 6a. semana, así como la tendencia a disminuir la reacción cutánea en los animales del grupo infectado.

IV DISCUSION

Diversos estudios realizados en ovinos infectados experimentalmente con larvas infectantes de Haemonchus contortus, Ostertagia circumcincta y Trichostrongylus axei, al mismo tiempo han demostrado que las lesiones patológicas son menos severas al compararlas con las lesiones de los ovinos inoculados únicamente con larvas infectantes de H. contortus (15,19,20).

Dentro de los factores patológicos más relevantes durante la hemoncosis está la disminución de los parámetros hematológicos, sobre todo la disminución de eritrocitos (80). Lo cual se confirmó en el presente estudio, aunado a la disminución de hematocrito, hemoglobina y proteína plasmática a partir de la tercera y cuarta semana posinfección, probablemente esto sea debido a la pérdida de sangre provocada por el hábito hematófago del nematodo adulto (31).

Asimismo se observó que la disminución de estos cuatro parámetros hematológicos no persistieron durante el mismo tiempo para todos: el porcentaje de hematocrito correspondiente al grupo infectado, fué el único parámetro hematológico que mantuvo sus valores por abajo del normal, durante las cuatro últimas semanas; a éstele siguió por orden de duración el nivel de eritrocitos y la cantidad de proteína plasmática, cuya duración fué de tres semanas posinfección. Por último

el nivel de hemoglobina mostró únicamente su nivel por abajo del considerado normal durante la cuarta semana.

Sin embargo, se debe de considerar que los resultados observados en el presente estudio no están indicando incongruencia entre ellos, sino que antes de sacar alguna conclusión se deberán de tomar en conjunto tres puntos. En el primer punto se debe hacer mención de que estos parámetros son factores biológicos, por lo tanto están sujetos a diversos cambios entre individuos. Para alguno de ellos el volumen de hemoglobina contenido en los eritrocitos maduros fué mayor en cambio para otros probablemente el volumen de hemoglobina fué menor porque existían más eritrocitos inmaduros que el de los maduros, por lo tanto la cantidad de hemoglobina contenida fué menor.

Segundo, en las gráficas correspondientes a los 5 parámetros hematológicos (1-5), se puede observar que existe relación entre ellos; por ejemplo: durante las tres (3a., 4a. y 5a.) últimas semanas del experimento, se observó una tendencia a disminuir sus valores hematológico normales durante la infección, incluyendo el valor de hemoglobina la que al parecer no observó una diferencia significativa entre grupo infectado y grupo testigo, aunque este resultado se esperaba puesto que la cantidad de hemoglobina fue mínima en el torrente circulatorio, comparada con el volumen de otros componentes sanguíneos. Asimismo, ante situaciones de estrés el bazo produce más eritrocitos, para compensar a los perdidos, aportando hemoglobina en forma inmediata (16). A excepción de los valores hematológicos anteriormente citados. Los

resultados de leucocitos, observados en el presente estudio, parecen indicar un incremento a partir de la primera semana posinfección sin que ésto sea estadísticamente significativo.

Tercero, la mayoría de los valores hematológicos para estas variables, cayeron en un rango de semanas posinfección en las cuales la larva infectante ya había evolucionado a nematodo adulto, por lo tanto el hábito hematófago se observó, al disminuir el nivel de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y proteína plasmática. Indicando un estado anémico del animal, el cual se agudizó durante la cuarta y quinta semanas posinfección .

Puesto que la mayoría de los nematodos hallados eran adultos. Por esto mismo es importante el apoyo de estudios como el de la biometría hemática en animales infectados con H. contortus. Asimismo se recomienda que en futuros estudios profundizar aún más en el empleo de técnicas histológicas que nos apoyen en el estudio sobre la hemoncosis y el tipo de células leucocitarias, que intervienen así como también utilizar las fórmulas citadas por Wintrobe (16) para relacionar los resultados obtenidos de hemoglobina , hematocrito y eritrocitos.

Se sugiere que en futuros experimentos con H. contortus, se alargue un poco más el tiempo de experimentación , para observar la disminución de leucocitos, como lo cita Adams (2,3), quien observó leucopenia en ovinos infectados con este parásito a los 105 días posinfección. También es importante considerar otros factores como edad, estado nutricional y sexo en el animal, así como la clase de antígeno (de adulto, de larva o de huevo) que estimulen la disminución o incremento de los leucocitos

para estudios posteriores. Probablemente esto represente un punto importante para iniciar una vacuna contra este nematodo (1,29,66)

El establecimiento del nematodo adulto en el presente estudio, se observó durante las tres últimas semanas posinfección en el grupo infectado; a través de la técnica coproparasitológica de Mc Master, incrementándose el número de huevos parásitos de 1000 a 7000, por lo cual se piensa que la infección padecida por los animales fué de tipo semilagudo. El inicio de la eliminación de los huevos de parásitos fué a partir de la tercera semana posinfección, persistiendo la eliminación durante el resto de las semanas, con más huevos eliminados a través de heces. Al sumarse el promedio de nematodos adultos encontrados a la necropsia de cada animal (1400) comprenderemos la pérdida sanguínea, básicamente de eritrocitos y de hematocrito; sobre todo por la capacidad de volumen sanguíneo (0.05 ml/ día) que es capaz de succionar un nematodo adulto de H. contortus (31).

Consideramos de importancia mencionar que el hecho de haber descartado dos animales del grupo infectado en el presente estudio no alteró significativamente ningún experimento, puesto que los resultados obtenidos de los restantes animales así lo muestran, sin que en alguno se observara incongruencia en relación al resto de los animales, aunado a esto, se les mantuvo en condiciones de habitat y de alimentación en forma adecuada.

En todos los casos se demostró la presencia del nematodo, sobre todo en los resultados obtenidos mediante la prueba coproparasitológica

de Mc Master y por la necropsia. En el grupo testigo no se encontraron nematodos adultos, ni huevos parásitos eliminados a través de heces; esto sugiere que el grupo no estuvo infectado, aunque no se puede descartar que lo hayan estado anteriormente a pesar de tomar las precauciones necesarias para trabajar con animales totalmente libres de cualquier nematodo y por las condiciones en que se realizó el diseño experimental, no fué posible comprobar si verdaderamente los animales no estuvieron parasitados anteriormente.

Los títulos de anticuerpos anti- H. contortus, en la prueba de hemoaglutinación indirecta, durante las últimas cuatro semanas del diseño experimental en el grupo infectado, indica que el hospedero reaccionó contra la infección en el momento de realizar la inoculación, incrementándose el título de anticuerpos anti - H. contortus a partir de la tercera semana posinfección durante la cual el nematodo ya estaba maduro sexualmente e inició la eliminación de huevos; sin embargo, los anticuerpos anti- H. contortus fueron incapaces de eliminar al adulto e inhibir la eliminación de huevos como se observó en el presente estudio, puesto que la eliminación de huevos persistió y se incrementó aun más. Por este motivo se sugiere que no hubo un mecanismo inmunológico capaz de eliminar la carga parasitaria, los anticuerpos estimulados no son protectores .

Diversos estudios serológicos, empleando extracto crudo de la larva infectante, del adulto y del huevo, de H. contortus a través de la prueba de inmunoensayo enzimático, han observado incrementados los títulos de anticuerpos en ovinos infectados con este nematodo, pero

también han observado que la infección estuvo latente hasta el término del experimento, sin observar mejoría por parte del animal (26,27).

Algunos autores sugieren que la respuesta inmunológica no estimula la expulsión del nematodo porque no detecta antígenos lo suficientemente protectores, asimismo, sugieren que esto se debe a que la larva cuatro, al salir de la mucosa abomasal puede o no estimular la respuesta inmune, puesto que al realizarse la muda de la larva infectante (L3) a larva cuatro (L4), posiblemente estimule la respuesta inmunológica pero posteriormente por algún mecanismo desconocido aún, al momento de salir de la mucosa se pierde parte del estímulo inmunológico. Parece que los nematodos adultos de H. contortus son relativamente incapaces a estimular la respuesta inmunológica, faltando aún por demostrarse esto último (34,35,78,81).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, se apoyan en lo anteriormente citado para su interpretación; ya que la presencia de anticuerpos homólogos anti-H. contortus, detectados en los hospederos infectados, no inhibieron o eliminaron al parásito; probablemente sea consecuencia de los frecuentes cambios de muda de las larvas de H. contortus lo cual sugiere una forma de evasión de la respuesta protectora. Basándose también en que existe un amplio mosaico antigénico de H. contortus del cual saca provecho para sobrevivir en el hospedador (11,71). Las técnicas para la detección de antígenos han sido muy variadas, sin que hasta la fecha se tenga certeza del número de ellos, así como también para conocer cuales son las propiedades funcionales en el parásito o en contra del hospedador. (10,78,79).

Sin embargo, a pesar de que se desconoce la actividad funcional de los antígenos parásitos, se ha podido observar que los antígenos de excreción y secreción obtenido del cultivo in vitro de la muda de la L3 - L4 son más inmunogénicos, comparado con los antígenos de extracto crudo de la L3 y del adulto de H. contortus (11,79).

Probablemente la respuesta inmune humoral observada en el presente estudio, fué estimulada por la muda de la L3- L4 perdurando por algún tiempo. Al parecer este tipo de reacción no tuvo una acción efectiva sobre los subsecuentes estadios evolutivos, después de haberse realizado la muda.

En 1950, Stewart (81), quién fuera uno de los pioneros sobre el estudio de la respuesta inmune de H. contortus, observó un incremento de los títulos de anticuerpos anti- H. contortus en ovinos infectados con larvas infectantes, observando a su vez que no hubo una disminución de la infección padecida, por lo que este autor sugiere la probabilidad de que el nematodo adulto de H. contortus estimula ligeramente la respuesta inmunológica. Sin embargo, es claro que el incremento de títulos de anticuerpos estimulados por el antígeno de la larva infectante, no fué lo suficientemente protectores como para que los animales pudieran resistir la infección.

Actualmente es difícil determinar con certeza la causa de la presencia de anticuerpos observados en la prueba de hemaglutinación indirecta; parte de ella es lo citado anteriormente en relación al estímulo inmunogénico provocado por la L3 y por otra parte, son diversos los factores por parte del hospedero que pudieran estimular la respuesta

inmunológica observada, como es la tensión nerviosa provocada por la infección parasitaria, así como también la resistencia natural del animal, la cual se manifiesta en casos como por ejemplo la influencia de una alimentación a base de proteínas, las diferentes características genéticas que varían de una raza animal a otra (P.ej: La raza Finn Dorset es más susceptible que la Scottis Blackface), características diferentes dentro de la misma especie (P. ej: el tipo sanguíneo) y por último la edad de los animales (1,5,11,58). El cual es uno de los más representativos para el desarrollo de la respuesta inmunológica contra este parásito. En los jóvenes es común observar que la respuesta inmune tarde más en presentarse que en los adultos, sobre todo porque éstos últimos pudieron haber estado infectados con H. contortus ó con otro nemátodo, el cual pudiera dar una reacción cruzada con H. contortus, como se observó en animales infectados con H. contortus y Nippostrongylus brasiliensis (26). Así como se observó reacción cruzada entre éstos dos géneros, es de pensar que también se podría dar con otros géneros trichostrongylidos encontrados como son Trichostrongylus spp. y Cooperia spp, principalmente porque es frecuente encontrar borregos infectados con éstos dos últimos géneros y H. contortus en diferentes regiones de México (67).

En lo que respecta a los resultados obtenidos en la prueba de inmunoensayo enzimático en el presente estudio, probablemente la prueba no se estandarizó bien, puesto que el incremento de los títulos de anticuerpos homólogos anti H. contortus durante las semanas cero y -1, así lo indican. En relación a esto se sugiere que probablemente los

animales empleados para el presente experimento, estuvieron en un tiempo parasitados con algún otro nematodo que pudiera dar una reacción cruzada con H. contortus y que reconociera algún determinante antigénico del extracto crudo de la L3 empleado o quizás éste antígeno (extracto crudo de la L3), pudo haber actuado como un antígeno común reconocido como propio por parte del hospedero (11,33). Por lo cual se sugiere emplear antígeno obtenido de la muda de L3 - L4 de H. contortus para la prueba de inmunoensayo enzimático, pues al parecer éste antígeno tiene una mayor capacidad inmunogénica comparado con el antígeno de extracto crudo de la L3 y del adulto de H. contortus (10,11).

Como podrá observarse en la gráfica 8, hay un ligero incremento en los títulos de anticuerpos homólogos anti- H. contortus durante las tres primeras semanas (1-3), aunque dos de ellas (1 y 2) no fueron estadísticamente significativas; sin embargo se considera que por la tendencia a incrementarse, probablemente hubo un corto estímulo inmunogénico probablemente estimulado por el antígeno de muda de L3 -L4 y por el cambio evolutivo de éstas larvas a su estadio adulto, lo cual no fué muy marcado como en el anterior estímulo.

Otros factores que debieron de tomarse en consideración fueron las diluciones de todos los sueros empleados (dilución 1:100). Probablemente se debió haber hecho una dilución o diluciones mayores (1:1000 o 1:2000).

Para estandarizar la prueba también se requiere utilizar sueros de animales parasitados por otros nematodos, con objeto de establecer el menor límite de absorbancia que permita diferenciar animales infectados

con H. contortus.

Por último, se descarta la posibilidad de que el suero de neonato pudiera haber afectado la prueba, puesto que se pretendió eliminar sueros que nos dieran reacciones positivas, por lo tanto el suero de neonato de ovinos se seleccionó puesto que está libres de inmunoglobulinas por no pasar éstas a través de placenta (89).

Con objeto de observar si los animales infectados con H. contortus responden inmunológicamente ante un antígeno heterólogo como son los glóbulos rojos de pollo (GRP), se inocularon a los ovinos de ambos grupos con un paquete de GRP en el tiempo considerado como periodo prepatente de la hemoncosis, del cual se deduce que existe un estado de desarrollo en particular del parásito que contribuye significativamente a la inmunosupresión durante éste crítico periodo.

Encontrándose en el presente estudio la disminución de los títulos de anticuerpos heterólogos anti-GRP en la prueba de hemoaglutinación directa en animales que padecieron hemoncosis durante la cuarta y quinta semanas posinfección con L3 de H. contortus. Por el tipo de diseño experimental realizado en el presente estudio, no se pudo definir con certeza la causa del mecanismo inmunosupresor observado, sobre todo porque H. contortus es un nematodo con amplio mosaico antigénico el cual es tan diverso por presentar diferentes estadios evolutivos, que excretan varios tipos de antígenos, pero se desconoce aún que parte de ellos es inmunogénico o quizás alguno (s) es capaz de producir factores inmunomoduladores in vivo., los cuales supriman el sistema inmune del hospedero.

Es evidente que la depresión del estímulo inmune hacia los GRP, está asociado con el periodo prepatente de la hemoncosis, correspondiente al día 15 posinoculación, durante el cual se observó tendencia a disminuir el nivel de anticuerpos anti - GRP.

La importancia que se le ha dado al momento de la inoculación de antígenos heterólogos in vivo, también se ha reportado en ovinos infectados con otros helmintos como son: Fasciola hepatica y Nematospiroides dubius, a los cuales se les administró GRP y globulos rojos de borrego (GRB) respectivamente, manifestando depresión humoral durante el periodo prepatente en la infección (7,70,73).

Sin embargo, a pesar de haberse observado la inmunodepresión en estos helmintos, tampoco se definió con certeza el mecanismo de esta disminución, sumandose así a la inmunodepresión no especifica observada en hospederos infectados con otros helmintos como Trichinella spp. y Ascaris suum (13,39,47,72). El significado preciso de este suceso se desconoce, pero se sugiere que este mecanismo facilita la sobrevivencia del parásito (68).

Pritchard et al. (73), observaron que la sobrevivencia de N. dubius, está relacionada con infecciones crónicas en animales inmunodeprimidos. Estos autores sugieren la eliminación de sustancias inmunodepresoras por parte del nematodo, pero posiblemente esta sustancia esté regulando de alguna forma el mecanismo inmunodepresor, puesto que previene la muerte del hospedero por agentes oportunistas. Posiblemente algún mecanismo semejante esté ocurriendo con H. contortus

porque reúne el requisito de ser una infección crónica y porque inmunodeprime al hospedero infectado.

H. contortus es un nematodo que además de causar un tipo de hemoncosis crónica en los hospederos por infecciones continuas, también puede presentar resistencia hacia el sistema inmune del hospedero ante una primoinfección y favorecer de ésta forma la inmunosupresión, como se observó en el presente estudio. Aunque no es la única parasitosis que muestra resistencia e inmunosupresión cuando infectan por primera vez, sino también otros nematodos como Ascaris suum, Trichinella spiralis y Nippostrongylus brasiliensis (25,39,47).

Probablemente el mecanismo de inmunosupresión observado en los hospederos infectados por H. contortus, sea una de las formas para evadir la respuesta inmune del hospedero y a la vez regular la sobrevivencia de éste dítimo. En la actualidad se desconoce los posibles mecanismos por parte de éste nematodo que modulen la respuesta inmune.

En algunos nematodos como es el caso de Oesophagostomum radiatum, Gasbarre et al. (41), mostraron que existe una sustancia, de la cual se desconoce sus componentes bioquímicos, pero que es producida por la muda de L3-L4 de éste nematodo, capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T in vitro., y Loose, et al. (57) sugiere que la inhibición de la proliferación de linfocitos T supresores es porque el procesamiento normal del antígeno por los macrófagos puede verse afectado durante infecciones crónicas.

En los últimos años, el tema de inmunodepresión en hospederos

parasitados, se considera como un importante punto para su estudio por varios investigadores, por lo tanto son diversas las formas aplicadas en su estudio. Por ejemplo, el empleo de antígenos y de sustancias mitogénicas que estimulen la respuesta celular por vía intradérmica en el hospedero parasitado o su uso para pruebas de laboratorio *in vitro* se está trabajando como un apoyo más en la inmunoparasitología (48,51,53).

La reacción intradérmica a la inoculación de Fitohemaglutinina (FHA) en los animales infectados con Demodex canis e Eimeria tenella, se observó marcadamente disminuida en ambas infecciones y en algunos casos se observó el establecimiento de infecciones secundarias que posteriormente provocaron la muerte en sus hospedadores (49,83,84).

En el presente estudio la reacción de la respuesta intradérmica empleando FHA en ovinos infectados con H. contortus también indica que existe un periodo de inmunosupresión durante la 3a., 4a. y 6a. semanas posinfección. Al correlacionar los títulos de anticuerpos homólogos anti- H. contortus con los obtenidos de la prueba de hemoaglutinación directa empleando GRP, se observó que existe una tendencia a disminuir la respuesta inmunológica del organismo animal, ante un antígeno heterólogo, sobre todo durante el periodo prepatente de este nematodo.

V. CONCLUSIONES

1) Por los resultados obtenidos en el presente estudio sobre los parámetros hematológicos y por la cantidad de huevos parásitos encontrados en el presente estudio, se determinó el establecimiento del nematodo H. contortus en la infección experimental así como también el daño causado por éste nematodo en el hospedero, por la disminución de eritrocitos y hematocrito.

2) De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de inmunoensayo enzimático, se sugiere que el antígeno de extracto crudo de la L3 de H. contortus, presenta reacción cruzada con anticuerpos estimulados por alguna otra infección antes de la hemoncosis ó por algún anticuerpo propio del hospedero y se recomienda estandarizar nuevamente la técnica de ELISA empleando antígeno de muda de la L3 y L4, así como establecer diluciones de todos los sueros mayores de la de 1:100.

3) La técnica de Hemoaglutinación indirecta, mostró ser una técnica sensible y barata para continuar con estudios inmunológicos de H. contortus. En lo que respecta a lo relacionado con los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere que el incremento del título de anticuerpos anti-H. contortus corresponden principalmente al estímulo provocado por la muda de L3 y L4 y por el adulto. Sin embargo esto no representa que éstos antígenos sean inmunodominantes e inmunoprotectores, por lo tanto se recomienda continuar realizando estudios sobre la inmunología de H. contortus.

4)De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de Hemoaglutinación directa e intradérmica con FHA, se sugiere que la infección por H. contortus en ovinos induce una inmunosupresión hacia antígenos heterólogos como son los GRP, lo cual facilitaría la sobrevivencia del nematodo en el hospedero, además de favorecer las infecciones secundarias por agentes oportunistas.

5)Debido al tipo de diseño experimental realizado en el presente estudio, no se logró definir el mecanismo por el cual H. contortus inhibe la producción de anticuerpos y la respuesta inmune heteróloga.

LITERATURA CITADA

1. Abbott, E.M., Parkins, J.J., Holmes, P.H. : Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottis Blackface lambs given a single moderate infection of H. contortus. Res. Vet. Sci., 38: 6 - 13 (1985).
2. Adams, D.B. and Beh, K.J.: Immunity acquired for sheep from experimental infection with Haemonchus contortus. Int. J. Parasit., 1: 381-386 (1981).
3. Adams, D.B.: Changes in blood leukocytes, bone marrow and lymphoid organs in sheep infected with Haemonchus contortus. Int. J. Parasit., 1: 309-317 (1981).
4. Adams, D.B. : Time of onset and target of immune reactions in sheep with acquired immunity against Haemonchus contortus. Int. J. Parasit., 12: 439-442 (1982).
5. Adams, D.B.: Observations on the self-cure reactions and other forms of immunological responsiveness against Haemonchus contortus in sheep. Int. J. Parasitol., 13: 571-578 (1988).
6. Ahluwalia, J.S. : Technique for the recovery of infective larvae of Cooperia curticei from small sample units of herbage and soil. Indian Vet. J., 52: 610-613 (1975).
7. Ali, N.H. and Behnke, J.: Nematospiroides dubius : factors

- affecting the primary response to SRBC in infected mice. J. Helimthol., 57:343-353 (1983).
8. Al-Zubaidy, A.J., Altaif, K.I., Al-Qaisy, H.H.K. and Makkawi, : Gross pathology and histopatology of haemonchosis in sheep and goats in Iraq. Vet. Parasitol., 23:249-256 (1987).
 9. Allonby, E.W. and Urquhart, G.M. : Self-cure of Haemonchus contortus infections under field conditions. Parasitol., 66: 43- 53 (1973).
 10. Ambrosio, H.J., Bautista, G.C.R.: Determinación de antígenos comunes entre el nematodo abomasal Haemonchus contortus y ovinos Pelibuey (Ovis aries). VII Congreso Nac. de Parasitología, Puebla, Pue. Sociedad Mexicana de parasitología, Puebla, Puebla, 1986.
 11. Ambrosio, H.J.R.: Inmunología de la hemoncosis ovina. VII Congreso Nacional de Parasitología, Puebla, Pue., Sociedad Mexicana de Parasitología, Puebla, Pue. 1986. 143, Soc. Mexicana de Parasitología, (1986).
 12. American Association of Veterinary Parasitologist : Research needs and priorities for ruminant internal parasites in the United States. Am. J. Vet. Res., 44: 1836-1847 (1983).
 13. Araujo, F.G., Coelho, P.M.Z., Pereira, L.H. and Pellegrino, J.: Schistosoma mansoni: Impairment of the cell-mediated immune response in mice. Clinical and Exp. Immunol., 28:289

-291 (1977).

14. Barger, I.A., Lewis, R.J. and Brown, G.F.: Survival of infective larvae of nematode parasites of cattle during drought. Vet. Parasitol., 14:143-152 (1984).
15. Barger, I.A. and Le Jambre, L.F.: Regulation of Haemonchus contortus populations in sheep: mortality of established worms. Int. J. Parasitol., 18: 269-273 (1988).
16. Benjamín, M.H.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria. LIMUSA, D.F., México, 1984.
17. Bernier, J. y Florent, Ch.: Las defensas del estómago. Mundo Científico, 60:756-765 (1986).
18. Bianchin, I. and Honer, M.R.: Endoparasites of Cattle in the tropical Savannah of South America: Epidemiology, Control and Economics. Proceedings of the MSD AGVET Symposium. Montreal, Canadá, 1987, 49-51, Veterinary Learning Systems, Montreal, Canadá (1987).
19. Blanchard, J.L. and Wescott, R.B.: Enhancement of resistance of lambs to Haemonchus contortus by previous infection with Ostertagia circumcincta. Am. J. Vet. Res., 46: 2136-2140 (1980).
20. Blanchard, J.L., Gallina, A.M. and Wescott, R.B.: Pathological changes in lambs with Ostertagia circumcincta infections associated with decreased infectivity of Haemonchus contortus. Am. J. Vet. Res., 47:309-314 (1986).

21. Bulletin Office International Epizooties: Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull. Off. Int. Epiz., 93:903 (1981).
22. Calderon, T.J.: Fisiología III. Primera edición. Ed. Diana. México, D.F. 1985.
23. Campos, R.R., Escutia, S.I. y Herrera, R.D.: Estudio epizootiobiológico de algunas parasitosis internas de ovinos en en Istmo de Tehuantepec. Resúmenes de la XV Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México, D.F., 1981, 540-542. Inst. Nac. de Invest. Pecs. - S.A.R.H., México, D.F. (1981)
24. Carretón, P.G. : Edad y Parasitismo gastroentérico de bovinos en trópico húmedo. Tesis Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1979.
25. Crandall, C.A. and Crandall, R.B.: Ascaris suum: Immunosuppression in mice during acute infection. Exp. Parasitol., 40:363- 372 (1976).
26. Charley, J., Bourdieu, C., Luffau, G. and Pery, P.: Immune response of sheep to Haemonchus contortus: serum antibodies against cross reacting antigens between parasites. Ann. Rech. Vét., 12:123-128 (1981).
27. Charley, P.J., Luffau, G. and Pery, P. : Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with Haemonchus

- contortus. Vet. Parasitol., 14:129- 141 (1984).
28. Chavarria, Ch.M., González, R.A. y Lara, H.F.: Parasitos internos (Metazoarios) determinados en ovinos de México. Rev. de Med. Vet. Méx., 3:30-32 (1964).
 29. Christie, M.G., Hart, R., Angus, R., Angus, K.W., Devoy, J. and Petterson, J.E.: Resistance to Haemonchus contortus in sheep given repeat daily doses of 10,000 infective larvae. J. Comp. Path., 88:157-165 (1978).
 30. Dakkak, A., Fioramonti, J. y Bueno, L.: Haemonchus contortus third stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformations during rumino-omasal transit. Res. Vet. Sci., 31: 384-385 (1981)1.
 31. Dargie, J.D. and Allonby, E.M.: Pathophysiology of single and challenge infections of Haemonchus contortus in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. Int. J. Parasit., 5:147-157 (1975)
 32. Daskalov, P.B.: Haemonchus contortus: Factors determining the polymorphism of linguliform females. Exper. Parasitol., 32:364-368 (1972).
 33. Dineen, J.K.: Antigenic relationship between host and parasites. Nature, 197: 471-472 (1963).
 34. Dineen, J.K., Donald, A.D., Wagland, B.M. and Offener, J. : The response of sheep to primary infections with Haemonchus contortus. Parasitol., 55: 514- 525 (1965).
 35. Dineen, J.K., Wagland, B.M. : The dynamic of the host -

- parasite relationship. IV. The response of sheep to graded and repeated infections with Haemonchus contortus. Parasitol. 56: 639- 650 (1966).
36. Dunn, A.M.: Helmintología Veterinaria. 3a. ed. El Manual Moderno, 1983.
37. Fabiyi, J.P.: Production losses and control of helminths in ruminants of tropical regions. Proceedings of the sixth International Congress of Parasitology. Brisbane, Australia, 1988, 435-442, Int. J. Parasit., 17: 435 -442 (1986).
38. Farias, S.F., Vázquez, P.V. y Campos, R.V.: Determinación del incremento en la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos postparto en ovejas. Tesis Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
39. Faubert, G.M. and Tanner, C.E.: Trichinella spiralis: inhibition of sheep hemagglutinins in mice. Exp. Parasitol. 30: 120- 123 (1971).
40. García, N.E., Ortega, L. y Mejía, G.R.A.: Especies parasitarias localizadas en el tracto gastroentérico y pulmonar de bovinos del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco y su área de influencia. Memorias de la Reunión Anual Pecuaria en México. México, D.F., 1984, 255. Sria. de Agric. y Recs. Híd.- Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1984).

41. Gasbarre, L.C., Romanowski, R.O. and Douvres, F.W.:
Suppression of antigen- and Mitogen- Induced Proliferation of
Bovine Lymphocytes by excretory-secretory products of
Oesophagostomum radiatum. Infection and Immunity,
48:540-545 (1985).
42. Gibbs, H.C. and Barger, I.A.: Haemonchus contortus and
others Trichostrongylid infection in parturient, lactating
and dry ewes. Vet. Parasitol. 22: 57- 66 (1986).
43. Granados, A.P.: Prevalencia de parásitos gastroentéricos de
bovinos en trópico húmedo. Tesis Licenciatura. Fac. de
Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México.
México, D.F., 1980
44. Guereña, R.R.: Estudio sobre la incidencia, epizootiología
e importancia de los nematodos gastroentéricos de los
bovinos de San Andrés Tuxtla, Ver. Tesis Licenciatura. Fac.
de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de
Mexico. México, 1984.
45. Gujarati, D. : Use of dummy variables in testing two linear
regressions. The American Statistician, 24(1):50-52 (1970).
46. Guyton, A.: Fisiología Médica. Quinta edición.
Interamericana, D.F., México, 1977.
47. Haig, D.M., Lima, G.C. and Mota, I.: Antibody suppression in
mice infected with Nippostrongylus brasiliensis. Parasite.
Immunol., 2: 175- 187 (1980).
48. Hanrahan, L.A., Benz, G.W. and Schultz, R.D.: Experimentally

- induced Cooperia oncophora infection in calves: lymphocyte blastogenic and delayed hipersensitivity response. Am. J. Vet. Res., 45: 855-862 (1984).
49. Healey, M.C. and Gaafar, S.M.: Immunodeficiency in canine demodectic mange. II Skin reactions to phytohemagglutinning and concavalin A. Vet. Parasitol., 3:133-140 (1977).
50. Hernández, T.G.F.: Determinación de especies de nematodos gastroentéricos en ovinos de México. Tesis Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1979.
51. Jacobs, R.M., Valli, V.E.O. and Wilkie, B.N.: Response of cow with lymphoma to the intradermal injection of tumor cell antigens and phytohemagglutining. Can. J. Comp. Med., 45: 43-50 (1981).
52. Jubb, K.V.F. y Kennedy, P.C.: Patología de los animales domésticos. 3a. ed. Labor. Barcelona, España, 1974.
53. Kelly, K.W., Greenfield, R.E., Evermann, J.F., Parish, S.M. and Perryman, L.E.: Delayed type hipersensitivity, contact sensitivity, and phytohemagglutining skin-test response of heat and cold-stressed calves-. Am. J. Vet. R., 43: 775-779 (1982).
54. Larios, G.F., Lora, M.P.P., Trigo, T.F. y Rodríguez, R.E.: Fisiología del ovino Tabasco o Pellibuey en clima subtropical A(f)c: Hematología y niveles séricos de calcio, fósforo y magnesio. Tec. Pec. en Méx. (30):84-90 (1976).

55. Le Jambre, L.F., Whitlock, J.H.: Seasonal fluctuations in linguiform morphs of Haemonchus contortus cayugensis. J. Parasitol. 54:827-830 (1968).
56. Levine, N.D. : Nematode parasites of domestic animals and man. Second ed. Burgess Publishing Co., Minnesota, U.S.A., 1980.
57. Loose, L.D., Cook, J.A. and Di Luzio, N.R. : In: Basic Research in Malaria, 484- 491. Procc. Helminthol. Soc. Washinton, D.C., 39. Special Issue Reed Army Institute, Washinton, D.C., 1971.
58. Luffau, G., Pery, P. and Petit, A.: Self-cure and immunity following infection and reinfection in ovine haemonchosis. Vet. Parasitol., 9:57-67 (1981)
59. Manton, V.J.A., Peacock, R., Poynter, D., Silverman, P.H. and Terry, R.J.: The influence of age on naturally acquired resistance to Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci., 3: 303-308 (1962).
60. Medway, W., Prier, J.E. y Wilkinson, J.S.: Patología Clínica Veterinaria. UTEHA, México, D.F., 1980.
61. Mejía, G.R.A. y Díaz, B.A.: Variación morfológica del apéndice vulvar de Haemonchus contortus y Haemonchus similis en bovinos y caprinos. Rev. Ibér. Parasitol., 47:365-375 (1987).
62. Miller, H.R.P., Jackson, F., Newlands, G. and Appleyard, W.T.: Immune exclusion a mechanism of protection against the

- ovine nematode Haemonchus contortus. Res.Vet. Sci., 35: 357-363 (1983).
63. Miller, H.R.P.: The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. Vet. Immunol. Immunopathol., 6: 167-259 (1984)
64. Morilla, G.A. y Bautista, G.C.R.: Manual de inmunología. Primera edición. Diana, México, D.F., 1986.
65. Nansen, P.: Production losses and control of helminths in ruminants of temperate regions. Proceedings of the sixth International Congress of Parasitology. Brisbane, Australia, 1986, 425-433. Int. J. Parasitol., 17: 425-433 (1986).
66. Nguyen, T.C.: The immune response in sheep: Analysis of age, sex and genetic effects on the quantitative antibody response to chick in red blood cell. Vet. Immunol. Immunopathol., 5: 237-245 (1983-1984).
67. Nuñez, M.E.: Frecuencia y determinación de las especies del género Haemonchus (Nematoda: Trichostrongylidae) en bovinos, ovinos y caprinos. Tesis Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México, 1984.
68. Ogilvie, B.M. and Wilson, R.J.M.: Evasion of the immune response by parasite. Br. Med. Bull., 32: 177 (1976).
69. Olsen, W.G.: Animal parasites : Their life cycles and ecology. Third ed. University Park Press., Baltimore.

U.S.A., 1974.

70. Orozco, A.M.: Efecto de la infección experimental por Fasciola hepática en ovinos sobre la respuesta inmune humoral a antígenos timo-dependientes. Tesis Licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México, 1986.
71. Petit, A., Pery, P. and Luffau, G.: Circulating antigens in ovine haemonchosis. Ann. Rech. Vét., 12: 1 - 9 (1981).
72. Portaro, J.K., Britton, S. and Ash, L.R. : Brugia pahangi: depressed mitogen reactivity in filarial infections in the jird, Meriones unguiculatus. Exp. Parasitol., 40: 438- 446 (1976).
73. Pritchard, N.M., Ali, N.M.H. and Behnke, J.M.: Analysis of the mechanism of immunodepression following heterologous antigenic stimulation during concurrent infection with Nematospiroides dubius. Immunol. 51: 633-642 (1984).
74. Quiroz, R.H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Primera edición . LIMUSA, México, D.F., 1984.
75. Runnells, R.A., Monlux, W.S., Monlux, A.: Principios de Patología Veterinaria. Primera edición. Cia. Editorial Continental. S.A., D.F. México, 1980.
76. Smith, W.D. : Antilarval antibodies in the serum and abomasal mucus of sheep hyperinfected with Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci., 22: 334-338 (1977).

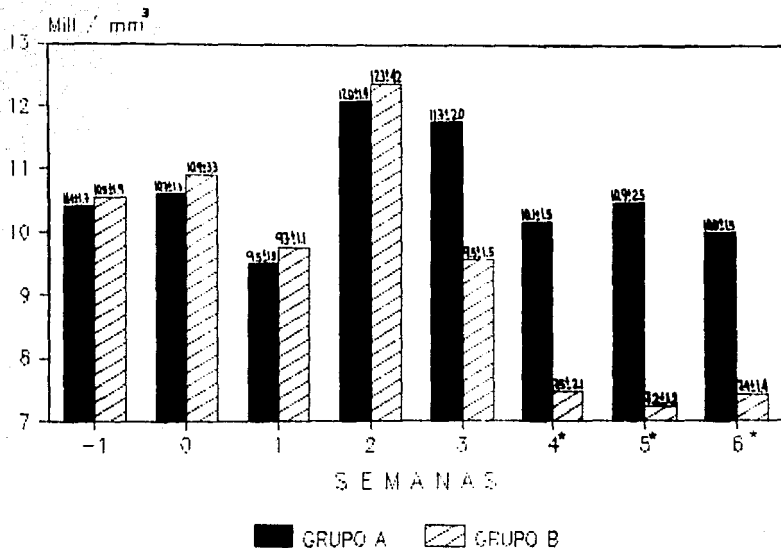
77. Schillhorn, van Veen, T.W. and Ogunsusi, R.A.A.: Periparturient and seasonal rise in the trichostrongylid egg output of infected ewes during the season in Northern Nigeria. Vet. Parasitol., 4: 377- 383 (1978).
78. Soulsby, E.J.L.: Biology of parasites. First ed. Ed. Academic Press, 1966.
79. Soulsby, E.J.: Immunity to animal parasites. Academic Press. New York, U.S.A., 1972.
80. Soulsby, E.J.L.: Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Séptima edición. Interamericana, D.F., México, D.F., 1987.
81. Stewart, D.F.: Studies on resistance of sheep to infestation with Haemonchus contortus and Trichostrongylus spp. and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. Aust. J. Agric. Res., 1: 301- 321 (1950).
82. Swinscow, T.D.V.: Statistics at square one. Second ed. British Medical Association, London, England, 1978.
83. Taylor, R.R., Strout, G.S., Clare, R.A. and Aeed, P.A.: Delayed wattle reactions in Elmeria tenella, infected chickens. Developmental and Comp. Immunol., 10: 387-394 (1986).
84. Taylor, R.L., Cotter, P.F., Wing, T.L. and Briles, P.: Mayor histocompatibility (B) complex and effect sex on the phytohemagglutinin response. Animal Genetics, 18: 343-500 (1987).
85. Thiepont, D., Rochette, F. and Vanpariis, O.F.J.: Diagnosing

helminthiasis through coprological examination. First ed.
Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium, 1979.

86. Wedrychowicz, H. and Bezubik, B.: Studies on the antigens of Ostertagia circumcincta. I Somatic antigens of infective larvae. Acta Parasitol. Pol., XXVIII:233-245 (1981).
87. Wedrychowicz, H., Abbott, E.M. and Holmes, P.H. : Use of coproantibody measurement to assess the influence of diet on local immune response of sheep vaccinated against Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci., 36: 240-246 (1984).
88. Young, R.R. and Trajstman, A.C.: A rapid technique for the recovery of strongyloid infective larvae from pasture and soil sample. Parasitol., 80:425-431 (1980).

GRAFICA 1

ERITROCITOS DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON Haemonchus contortus



Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

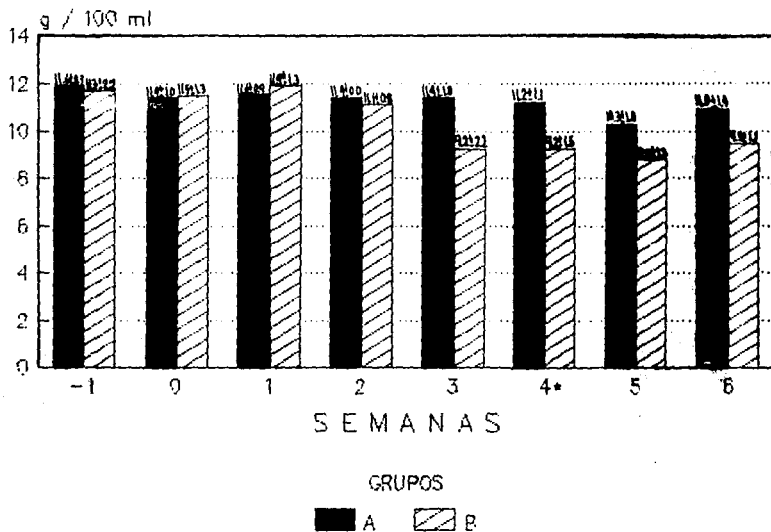
Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas P 0.05

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRAFICA 2

HEMOGLOBINA DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON Haemonchus contortus



Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

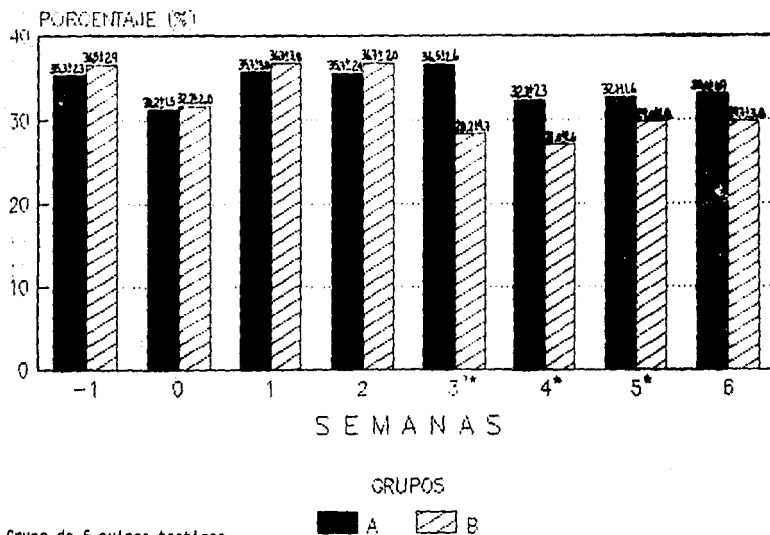
Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

GRAFICA 3

HEMATOCRITO DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

CON Haemonchus contortus



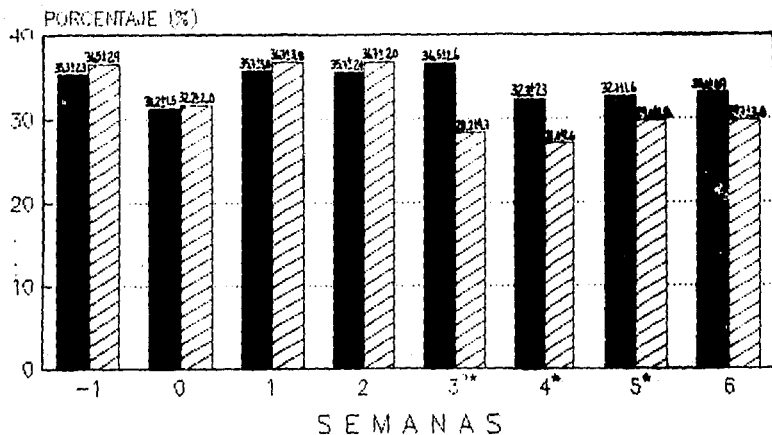
Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigos

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas $\zeta(P < 0.05)$

GRAFICA 3

HEMATOCRITO DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON Haemonchus contortus



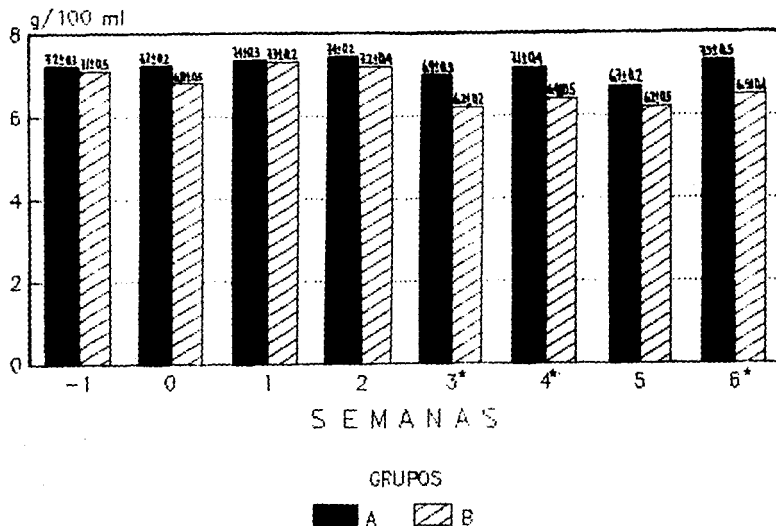
Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigos

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas $(P < 0.05)$

GRAFICA 4

PROTEINA PLASMÁTICA DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTAL-
 MENTE CON Haemonchus contortus



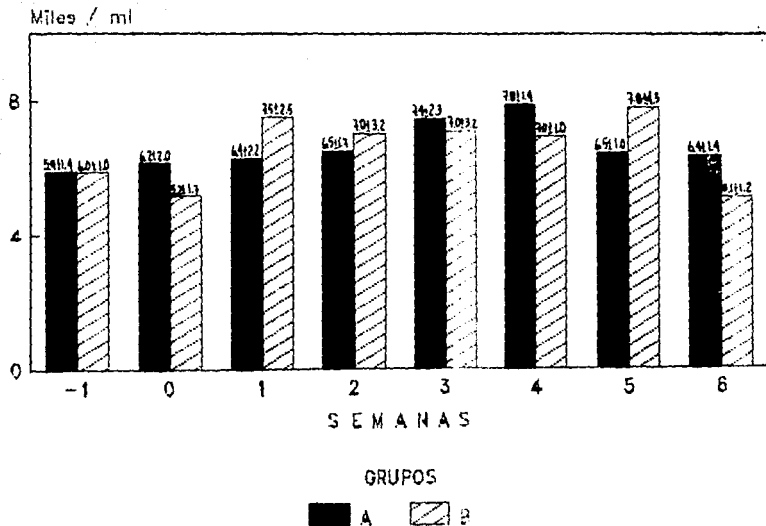
Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

GRAFICA 5

LEUCOCITOS DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON Haemonthus contortus



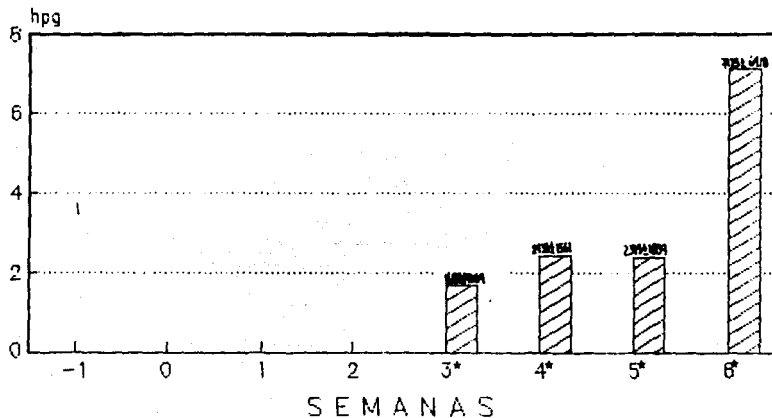
Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

No hubo diferencia significativa (P 0.05) en ninguna semana de duración del experimento.

GRAFICA 6

NIVELES DE hpg EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON Haemonchus contortus



GRUPOS



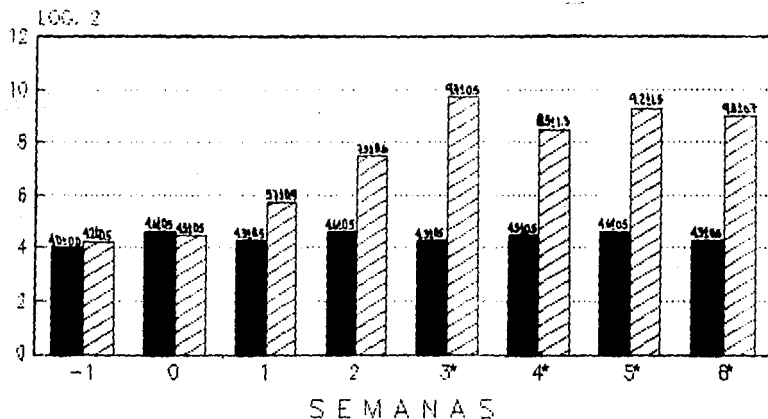
Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

GRAFICA 7

HEMOAGLUTINACION INDIRECTA CON ANTIGENO SOMATICO (AS)
 EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON Haemonchus
contortus



GRUPOS



Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

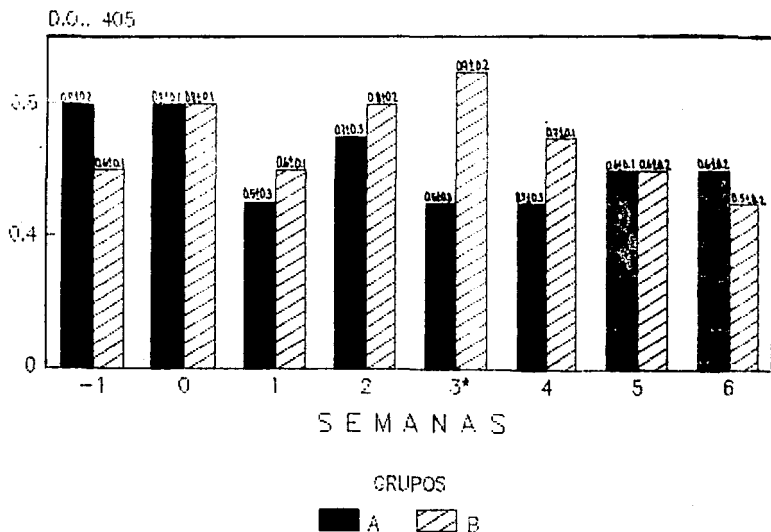
Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

AS = Antígeno Somático de la L3 de H. contortus (2.9mg/ml sw de proteína).

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

GRAFICA 8

INMUNOENSAYO ENZIMATICO CON ANTIGENO SOMATICO (AS) EN
OVINOS INFECTADOS CON Haemonchus contortus



76

Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

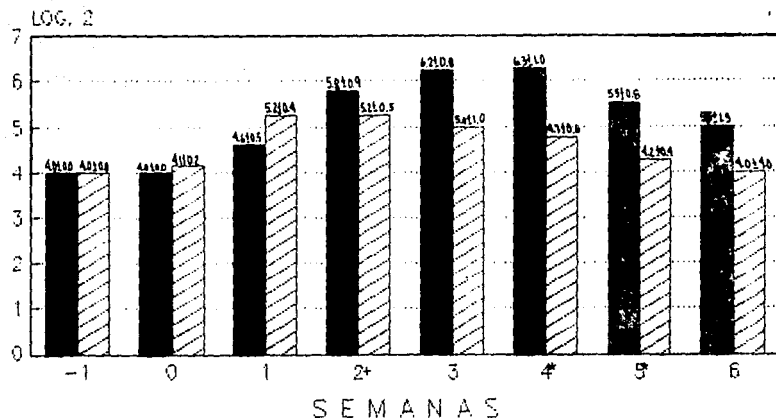
AS = Antígeno Somático de la L3 de H. contortus (2.9 mg/ml de proteína).

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

G R A F I I C A 9

HEMAGLUTINACION DIRECTA CON GRP EN OVINOS INFECTADOS

EXPERIMENTALMENTE CON Haemonchus contortus



GRUPOS

■ A ▨ B

Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo

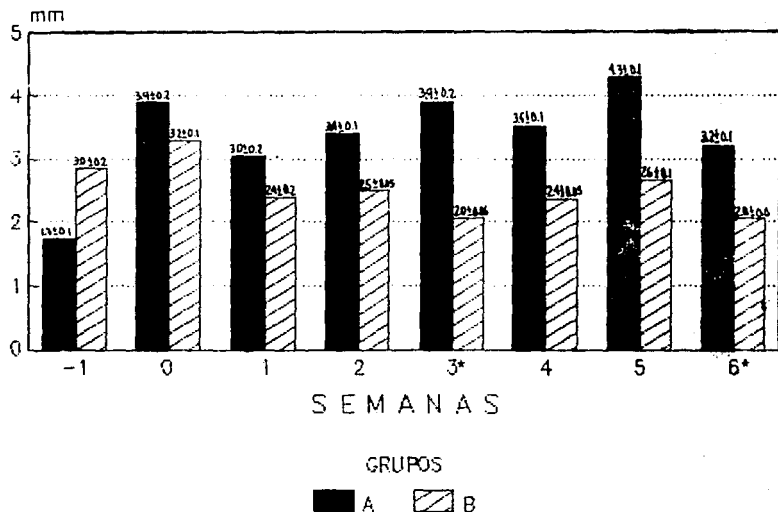
Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.

+ = Semana correspondiente a la inoculación del paquete de globulos rojos de pollo (GRP) de 2×10^8 células.

* = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).

GRAFICA 10
 NIVELES DE FHA EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
 CON Hæmonchus contortus

78



Grupo A = Grupo de 6 ovinos testigo
 Grupo B = Grupo de 4 ovinos infectados por vía oral con 10,000 L3 de H. contortus durante la semana 0.
 FHA = Fitohemaglutinina inoculada en ambos grupos por vía intradérmica cada 7 días a partir de la semana -1 hasta la 6a. semana
 * = Indicación correspondiente a las semanas estadísticamente significativas (P 0.05).