

R. 9481

T/2.3-I.699 CUQ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310716220

**RESPUESTA HUMORAL EN LA  
HEMONCOSIS OVINA. DINAMICA DE LA  
PRODUCCION DE ANTICUERPOS Y  
CARACTERIZACION ANTIGENICA DE  
*HAEMONCHUS CONTORTUS***

Montserrat Cuquerella Ayensa

Madrid, 1993



La Tesis Doctoral de D. Montserrat Cuquerella Ayensa

.....  
Titulada Respuesta humoral de la hemoncosis ovina. Dinámica de la producción de anticuerpos y caracterización antigénica de Haemonchus contortus

Director Dr. D. .... J.M. Alunda Rodríguez.

fue leída en la Facultad de ..Veterinaria.....

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .14..

de ..Julio..... de 19 92., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE ..Francisco Bolás Fernández.....

VOCAL .....J.M. Tarazona Vilas.....

VOCAL .....F.A. Rojo Vázquez.....

VOCAL .....M. Gordero del Campillo.....

SECRETARIO ..M. Gómez Bautista.....

.....  
habiendo recibido la calificación de ..Anta.....

..... " cum laude " por unanimidad.....

Madrid, a 14 de Julio de 19 92.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE VETERINARIA.

DPTO. PATOLOGIA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL)

RESPUESTA HUMORAL EN LA HEMONCOSIS OVINA. DINAMICA DE LA  
PRODUCCION DE ANTICUERPOS Y CARACTERIZACION ANTIGENICA DE  
HAEMONCHUS CONTORTUS.

AUTOR: D<sup>a</sup> Montserrat Cuquerella Ayensa

DIRECTOR: Prof. Dr. J. M. Alunda Rodríguez



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

RESPUESTA HUMORAL EN LA HEMONCOSIS OVINA.  
DINAMICA DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS Y  
CARACTERIZACION ANTIGENICA DE  
HAEMONCHUS CONTORTUS

D<sup>a</sup>. Montserrat Cuquerella Ayensa  
Licenciada en Veterinaria



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

José María Alunda Rodríguez, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: que la Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria, Dña. Montserrat Cuquerella Ayensa, titulada.

" Respuesta humoral en la hemencosis ovina. Dinámica de la producción de anticuerpos y caracterización antigénica de Haemonchus contortus "

para optar al Grado de Doctor en Veterinaria ha sido realizada bajo mi dirección en las instalaciones de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo presentado contiene información de interés sobre la respuesta del ganado ovino a las infestaciones por este helminto y el diagnóstico inmunológico de esta parasitosis y cumple, a mi entender, los requisitos exigibles para optar a dicho grado.

Lo que firmo en Madrid a cinco de Junio de mil novecientos noventa y dos.

A MIS PADRES

Al finalizar un trabajo siempre se siente la necesidad y el deber de agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible su realización; por ello, quisiera agradecer al Departamento y a todo el personal que lo forma, por permitir que usara sus instalaciones y hacer que en todo momento me sintiera como en casa.

No olvido al Profesor Rojo, uno de los mejores profesores que tuve en la carrera, que me admitió como un miembro más del Departamento.

Al Profesor Rodríguez con quien empecé mi labor investigadora.

A la Profesora Gómez con la que más de una vez he discutido y, sin embargo, sigue siendo agradable seguir haciéndolo.

Agradezco al Profesor Tesouro su ayuda desinteresada, tanto en sus comentarios y técnicas como en la bibliografía que más de una vez me ha proporcionado.

A los laboratorios veterinarios de Merck Sharp and Dohme, España, así como al Doctor J. Uriarte por su gentileza al cedernos material biológico de inestimable valor para nosotros.

Por supuesto a Rafa, no sólo por sus amplios conocimientos científicos sino, y fundamentalmente, por su apoyo incondicional; en este mismo sentido agradezco a Juanma (no sé si ahora debería llamarle Doctor Troncoso) y a Jesús, quienes siempre han estado dispuestos a escucharme.

No olvido a Lucía quien me ha permitido compartir mesa, técnicas, Director e ilusiones.

Me tomo la libertad de dejar para el final a las 3 personas que han hecho posible que hoy pueda entregar mi tesis, el trabajo y lo que ha sido mi ilusión durante los últimos años; me estoy refiriendo al Profesor Alunda, la Doctora de la Fuente y a Teresa.

Al Profesor Alunda, podría darle las gracias por casi todo, sin embargo, simplemente diré que estoy convencida que nunca hubiera podido encontrar un director mejor.

A la Dra. de la Fuente por ser una de las personas que más me ha enseñado, ayudado y aconsejado.

A Teresa, con la que he compartido ovejas, establos y heces; y a la que debo que el trabajo nunca fuese ni solitario ni aburrido.

No quiero olvidar en estas líneas a los 21 corderos que pasaron por mis manos, a los que espero haber hecho sufrir lo menos posible.

Finalmente, agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia por permitirme disfrutar de una beca de FPI durante los años 1988 a 1991, así como a la CICYT (GAN89/324) por la ayuda financiera recibida.

INDICE	Pág.
INTRODUCCION	1
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
1.1. Etiología, ciclo biológico y epizootiología	3
1.2. Acción patógena de <u>Haemonchus contortus</u>	9
1.3. Respuesta del hospedador ante <u>H. contortus</u>	13
1.3.1. Genotipo de los hospedadores	14
1.3.1.a. Factores raciales	15
1.3.1.b. Tipos de hemoglobina	17
1.3.1.c. Factores genéticos	18
1.3.2. Fisiología de los hospedadores	20
1.3.2.a. Sexo	20
1.3.2.b. Niveles hormonales	21
1.3.2.c. Alimentación	23
1.3.2.d. Edad de los hospedadores	24
1.4. Respuesta inmunitaria	26
1.4.1. Autocuración	27
1.4.2. Respuesta celular	28
1.4.3. Respuesta humoral	32
1.4.3.a. Respuesta sérica	32
1.4.3.b. Respuesta en la mucosa gástrica	35
1.4.3.b.1. Coproanticuerpos	38
1.4.4. Vacunación	39
1.4.5. Diagnóstico inmunológico	43
2. MATERIAL Y METODOS	50
2.1. MATERIAL	50
2.1.1. Material biológico	50
2.1.1.a. Corderos	50
2.1.1.a.1. Infestaciones con <u>H. contortus</u>	50

2.1.1.a.2. Donadores	51
2.1.1.b. Conejos	51
2.1.1.c. Parásitos	52
2.1.2. Material de laboratorio	52
2.1.2.a. Material general	52
2.1.2.b. Material para análisis coprológicos	53
2.1.2.c. Material para hematología	53
2.1.2.d. Reactivos generales	54
2.1.2.e. Reactivos para serología	55
2.1.2.f. Equipamiento	56
2.2. METODOS	57
2.2.1. Mantenimiento de los animales	57
2.2.1.a. Alimentación y alojamiento	57
2.2.1.b. Programa higiénico - sanitario	59
2.2.2. Obtención y mantenimiento de L-3 de tricostrongiloides	60
2.2.2.a. Coprocultivos	61
2.2.2.a.1. Cultivos fecales de <u>H. contortus</u> , <u>Te. circumcincta</u> y <u>T. colubriformis</u>	61
2.2.2.a.2. Cultivos de <u>N. battus</u>	62
2.2.2.b. Mantenimiento de las larvas de tercer estadio (L-3)	63
2.2.3. Obtención de adultos de <u>H. contortus</u>	63
2.2.4. Obtención del material antigénico empleado	63
2.2.5. Infestaciones del ganado ovino con <u>H. contortus</u>	64
2.2.6. Análisis coprológicos	67
2.2.7. Obtención de sueros ovinos	68
2.2.8. Determinación de proteínas séricas	68
2.2.9. Análisis inmunológicos	69
2.2.9.a. Obtención de sueros hiperinmunes de conejo	69
2.2.9.b. Obtención del material fecal ovino	69
2.2.9.c. Doble inmunodifusión en agar	70
2.2.9.d. Inmunoadsorción	70

2.2.9.e. Inmunodetección (Western Blotting)	71
2.2.9.f. Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto	73
2.2.10. Electroforesis	78
2.2.10.a. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	78
2.2.10.b. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS - PAGE)	79
2.2.10.c. Electroforesis en dos dimensiones	81
3. RESULTADOS	83
3.1. Resultados parasitológicos	83
3.1.1. Eliminación fecal de huevos de <u>H. contortus</u> en corderos	83
3.1.2. Eliminación fecal de huevos de <u>H. contortus</u> en ovejas	85
3.2. Determinación de las proteínas séricas en corderos y ovejas infestados y reinfestados con <u>H. contortus</u>	88
3.2.1. Niveles de proteínas séricas en corderos	88
3.2.2. Niveles de proteínas séricas en ovejas	89
3.3. Dinámica de la producción de anticuerpos específicos por corderos y ovejas infestados y reinfestados con <u>H. contortus</u>	90
3.3.1. Respuesta IgG sérica anti- <u>Haemonchus</u>	90
3.3.1.a. Respuesta IgG en corderos	90
3.3.1.b. Respuesta IgG en ovejas	95
3.3.2. Respuesta IgM sérica anti- <u>Haemonchus</u>	99
3.3.2.a. Respuesta IgM en corderos	99
3.3.2.b. Respuesta IgM en ovejas	102
3.3.3. Respuesta IgA sérica anti- <u>Haemonchus</u>	105
3.3.3.a. Respuesta IgA en corderos	105
3.3.3.b. Respuesta IgA en ovejas	108
3.3.4. Respuesta IgA fecal anti- <u>Haemonchus</u>	111
3.3.4.a. Respuesta IgA en corderos	111

3.3.4.b. Respuesta IgA en ovejas	115
3.4. Sensibilidad del ELISA IgG anti- <u>Haemonchus</u> en el diagnóstico de la hemoncosis ovina	119
3.5. Análisis proteico de los extractos solubles de L-3 (SLE) y Adultos (ESA) de <u>H. contortus</u>	122
3.5.1. Dinámica de reconocimiento de antígenos a lo largo de las infestaciones	130
3.5.1.a. Reconocimiento de antígenos procedentes de ESL	130
3.5.1.b. Reconocimiento de antígenos procedentes de ESA	137
3.5.2. Identificación de antígenos relevantes para el diagnóstico	145
3.5.3. Antigenicidad cruzada entre <u>H. contortus</u> y otros Trichostrongyloidea	147
3.5.3.a. Infestaciones de corderos con otros Trichostrongyloidea	147
3.5.3.a.1. Especificidad del método ELISA indirecto (IgG anti- <u>Haemonchus</u> )	150
3.5.3.a.2. Pruebas de reactividad cruzada	155
3.5.3.a.2.1. Pruebas de antigenicidad cruzada con ESL	155
3.5.3.a.2.2. Pruebas de antigenicidad cruzada con ESA	163
3.6. Antígenos (ESL y ESA) relacionados con la protección frente a la hemoncosis	172
4. DISCUSION	174
4.1. Respuesta del ganado ovino manchego a las infestaciones por <u>H. contortus</u> . Resultados parasitológicos. Dependencia de la edad de los hospedadores	174
4.2. Dinámica de las inmunoglobulinas séricas y fecales anti- <u>Haemonchus contortus</u> en el ganado	

ovino manchego	178
4.2.1. Inmunoglobulinas IgG anti- <u>Haemonchus</u>	179
4.2.2. Inmunoglobulinas IgA anti- <u>Haemonchus</u>	184
4.3. Valor del ELISA IgG anti- <u>Haemonchus</u> en el diagnóstico de la hemoncosis ovina	189
4.4. Caracterización antigénica de L-3 y Adultos de <u>H. contortus</u> y su potencial valor diagnóstico	191
4.5. Antigenicidad cruzada	197
5. CONCLUSIONES	202
6. BIBLIOGRAFIA	204

## INTRODUCCION

Uno de los grandes retos de la ganadería española es la mejora de las condiciones sanitarias de sus animales, especialmente de aquéllos, como el ganado ovino, que por olvido administrativo, cambios socioeconómicos y otras razones, han sido abandonados. Este tipo de ganado es explotado en nuestro país fundamentalmente en condiciones extensivas o semiextensivas por lo que gran parte de los problemas que afectan a estos animales se hallan ligados a los pastos; tal es el caso de la tricostrongilidosis, entre ellas la hemoncosis. Esta parasitosis ovina puede presentarse - en dependencia del número de vermes presentes en los hospedadores, edad de éstos, factores medioambientales, estado inmunitario - como un proceso agudo o con carácter crónico, constituyendo en ambos casos un apartado de interés en la patología ovina y siendo, con el resto de las nematodosis gastroentéricas, una causa de pérdidas económicas de grandes proporciones.

En condiciones semiáridas tales como las predominantes en la mayoría de las regiones españolas con censos importantes de ganado ovino la norma son las hemoncosis crónicas. No obstante, la introducción de sistemas de explotación más intensivos, en praderas de regadío, conlleva un incremento de la carga ganadera y ciclos de aprovechamiento herbáceo muy cortos. Estas condiciones, junto con la incapacidad aparente de los individuos jóvenes para responder eficazmente a las infestaciones suponen un incremento de los riesgos de procesos de significación clínica.

La prevención de este problema, tanto de las infestaciones crónicas como de las más agudas, pasa por una serie de medidas, entre las que cabría destacar un adecuado manejo de los pastizales - de difícil establecimiento en muchas ocasiones por distintas causas-, utilización de medidas inmunoprofilácticas-

no disponibles en la actualidad - y administración estratégica de fármacos antiparasitarios con una buena relación entre el coste y el beneficio. Desgraciadamente, la medicación con antihelmínticos en el ganado ovino, aunque ha experimentado un gran incremento durante los últimos años merced, entre otras cosas, a las campañas de las administraciones autonómicas, sigue en muchos casos pautas rutinarias sin relación con las características epizootiológicas de las infestaciones.

El diagnóstico laboratorial de la hemoncosis ovina está, en estos momentos, restringido a infestaciones patentes, requiere personal especializado, es laborioso y no siempre permite una adecuada valoración del grado de parasitación de los hospedadores. Por tanto, el desarrollo de un sistema de inmunodiagnóstico de la hemoncosis, entre otras parasitosis, específico y rápido sería de indudable interés tanto en el trabajo clínico, en investigaciones epidemiológicas o, incluso, en la evaluación de la eficacia antihelmíntica de un tratamiento antiparasitario.

Teniendo en cuenta estas circunstancias, el interés generalizado en su estudio durante los últimos años y el desconocimiento de la respuesta del ganado ovino autóctono a las infestaciones por H. contortus nos propusimos estudiar, dentro de un proyecto más amplio, la respuesta humoral del ganado ovino manchego a las infestaciones por el helminto y su dependencia de la edad mediante el desarrollo de un enzimoinmunoensayo (ELISA), caracterización antigénica del parásito mediante inmunoimprontas uni- y bidimensionales, exploración inicial de la antigenicidad cruzada con otros tricostrongiloideos y selección de los antígenos solubles de posible relevancia en el diagnóstico y la inmunoprofilaxis.

## 1. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1.1. Etiología, ciclo biológico y epizootiología

El género Haemonchus Cobb, 1898 perteneciente a la Subfamilia Haemonchinae Skrjabin y Schulz, 1952, Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912 (ver Gibbons y Khalil, 1982) está representado por una docena de especies parásitas de los rumiantes en las regiones tropicales y sólo dos especies en las regiones templadas: H. contortus que parasita fundamentalmente a ganado ovino y caprino y H. placei que infesta al ganado vacuno.

H. contortus (Rudolphi, 1803) es un nematodo cilíndrico que vive en el abomaso de los ovinos, de los caprinos y ocasionalmente de otros rumiantes. La hembra mide de 18 a 30 mm de longitud y de 0,4 a 0,5 mm de diámetro, mientras que el macho mide de 10 a 20 mm de longitud y de 0,1 a 0,15 mm de diámetro. El contenido sanguíneo en el tubo digestivo confiere al verme una coloración rojiza y debido a los cordones sexuales de la hembra que se enrollan en forma de hélice alrededor del intestino, se ha ganado el sobrenombre de "verme contorneado".

La morfología del verme difiere a medida que se va desarrollando su ciclo biológico; las larvas desde el primer hasta tercer estadio son cilíndricas sin ornamentación, con una boca en posición terminal y un ano en posición lateral cerca de la extremidad posterior del cuerpo. Las larvas de 4º y 5º estadio, así como los adultos, presentan en la cavidad bucal una pequeña lanceta transparente; la boca posee seis labios y seis papilas orales; se pueden también distinguir en la región cefálica dos papilas cervicales prominentes con un papel sensorial. A los machos se les reconocen en su bolsa copuladora dos espículas y un gubernáculo, así como dos lóbulos simétricos

laterales y uno dorsal asimétrico. Las hembras poseen una lengüeta supravulvar en el cuarto posterior de su cuerpo (Vray y col., 1988).

Su ciclo biológico se representa en la Fig. 1.1. Las hembras que son muy prolíficas y pueden poner más de 10000 huevos por día. Los huevos son eliminados al exterior con las heces, embrionan y eclosionan en 1 a 30 días según la temperatura y humedad ambientales. Después de la eclosión, la L-1 muda a L-2 y después a L-3, estadio infestante, que abandona el material fecal para alcanzar la hierba, lo que sucede en condiciones adecuadas al cabo de 4 a 6 días.

Tras la ingestión por el hospedador definitivo, acceden al abomaso y la larva L-3 penetra en la mucosa, evolucionando a L-4, la cual es hematófaga, y muda una última vez para dar el estadio de L-5; ésta se convierte en adulto tras la maduración de sus órganos genitales (Vray y col., 1988). Dash (1985) observó que las larvas infestantes de H. contortus, al igual que las de Trichostrongylus axei y Teladorsagia circumcincta, mudaban en el rumen. Esto sucedía muy rápidamente, normalmente dentro del periodo de 2 h.p.i., de forma que la mayoría de las larvas se encuentran desenvainadas cuando llegan al abomaso. La distribución de las L-4 de H. contortus era muy regular y su frecuencia era mayor en el área fúndica, disminuyendo hacia la región pilórica. Por el contrario, las L-4 de las otras dos especies mostraban una distribución bimodal (un pico en el área fúndica y otro en el área pilórica). El hecho de que la distribución de H. contortus fuera más anterior sugería que las larvas de esta especie eran más rápidas para establecer la infestación que las de otras especies de trichostrongílidos. Por otra parte, la posterior migración de las larvas finales y adultos de H. contortus hacia la región pilórica, podría deberse a la selección de una localización más favorable para alimentarse (hematofagia) o bien al rechazo provocado por una reacción local

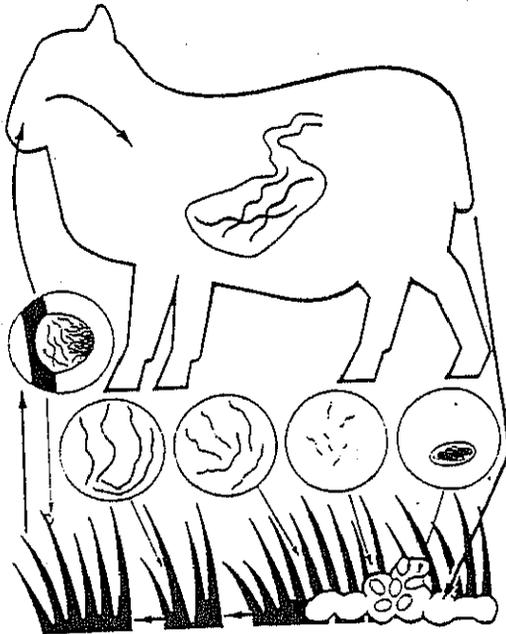


Fig. 1.1. ciclo biológico de Haemonchus contortus

del hospedador en el área que parasitaban las larvas tempranas.

La dosis infestante no parece influir en la proporción del establecimiento de larvas de H. contortus o en su subsiguiente supervivencia, aunque algunos factores sí determinaban tanto el tamaño de los vermes como su fertilidad (Barger y Le Jambre, 1988). Se ha observado además que existe una variación anual del tamaño de los vermes, no relacionada con el sexo del hospedador ni con la duración de la infestación; sin embargo, este cambio cíclico sí estaba relacionado con la inhibición del desarrollo de las L-4 (Coadwell y Ward, 1977). Los mismos autores demostraron que existía una relación lineal entre el incremento del tamaño del verme y su contenido uterino en huevos, y que el número diario de huevos/gramo de heces que salían al exterior estaba relacionado con el peso total de los parásitos y no con el número de individuos. Por otra parte, observaron una relación significativa entre el número de huevos mantenidos en el útero y el número de huevos producidos cada día (Coadwell y Ward, 1982).

El periodo de prepatencia de las infestaciones de H. contortus de 16-22 días en general, varía dependiendo de ciertos factores tales como la raza ovina (Florida: 20,5 días; Rambouillet: 18 días; Radhakrishnan y col., 1972; entre otros), época del año, existencia de inhibición larvaria relacionada con la resistencia del hospedador (Silverman y Paterson, 1960; Adams, 1986, 1988a) o no relacionada (Blitz y Gibbs, 1972a, 1972b) o incluso dependiente del calendario de las infestaciones; de forma que una gran proporción de larvas de H. contortus son inhibidas cuando la infestación se extiende a lo largo de un mes, mientras que la inhibición es menor cuando la dosis infestante se administra en una única ocasión (Michel y col., 1973).

Se han desarrollado numerosos estudios sobre la relación entre los recuentos de huevos de los nematodos gastrointestinales en las heces y el grado de infestación, con la enfermedad, así como con la inmunidad y resistencia del hospedador; sin embargo.

los resultados de estos experimentos no han sido totalmente convergentes. Así, Rubin (1967) no encontró ninguna correlación; sugiriendo, que más que tratar de relacionar los recuentos de huevos con la severidad del parasitismo, se debería aceptar como un hallazgo exclusivamente positivo de parasitismo. Análogos resultados fueron obtenidos por Jordan y Stair (1984), quienes observaron que algunos animales que habían sido diagnosticados antemortem no mostraban resultados comparables en el examen postmortem. Sin embargo, Roberts y Swan (1981) encontraron una gran relación entre los recuentos de huevos y el número de vermes. Dichos autores confirmaron más tarde esta correlación (Roberts y Swan, 1982a), y sugerían que el tamaño de la población, la época del año y la relación de machos y hembras eran fuentes de variaciones menores.

Luffau y col. (1990) encontraron una gran correlación entre el número de larvas ingeridas, el número de huevos eliminados y el grado de anemia observado en el ganado ovino infestado con H. contortus. De igual modo, Kassai y col. (1990) demostraron que los recuentos de huevos (debían ser individuales ya que la producción de huevos dependía parcialmente de factores como el sexo, la raza y regímenes alimenticios del hospedador, aislado del parásito) mostraba una buena correlación con los recuentos de vermes adultos en abomaso, y además servían para discriminar entre animales reactivos y no reactivos.

H. contortus ha sido señalado en la práctica totalidad de las regiones españolas. El Índice Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo y col., 1980) recoge la información con anterioridad a la fecha de su publicación (1980) indicándose su presencia en Córdoba (Martínez Gómez, 1971; Martínez Gómez y Hernández Rodríguez, 1971), en Galicia, Huesca, León (Fernández Díez, 1967), Navarra, Palencia, Sevilla y Granada. En Salamanca había sido señalada por Simón Vicente (1962) y en Badajoz, por Díaz Díaz (1949).

Con posterioridad a la publicación del Índice-Catálogo, su presencia ha sido señalada, entre otros autores, por Díez Baños y col. (1989) en cuajares ovinos de la provincia de León; por Martínez Gómez (1985) en el valle del Guadalquivir; en Cáceres por Reina y col. (1987); en Huesca, por Tarazona Vilas (1985). En la zona centro, su presencia ha sido denunciada, tanto en ganado ovino (p.e. Tarazona Vilas y col., 1985) como en ganado caprino (Tarazona Vilas, 1982, 1984).

La prevalencia e intensidad de las infestaciones por H. contortus han sido, en general, bajas (Fernández Díez, 1967: 16,2%; Martínez Gómez, 1985: 9%; Tarazona Vilas, 1974: 23,2%; Díez Baños y col., 1989: 7,7%, tras el examen de 405 cuajares ovinos). Esta escasa presencia, además de la distribución binomial negativa de esta especie parásita en los rebaños infestados (Roberts y Swan, 1982b), probablemente está relacionada con la estrecha dependencia de H. contortus, para su presentación, de condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Normalmente esta parasitosis se presenta en regiones de clima templado con humedad elevada, siendo relativamente poco frecuente en regiones semiáridas (Blood y Radostits, 1989).

En España, dada la extremadamente variable climatología, ambos factores mayores del clima: humedad y temperatura, pueden actuar como factores limitantes del desarrollo de las fases exógenas del ciclo de H. contortus. Así, en gran parte de España el factor limitante para la presencia de este helminto es el déficit hídrico existente (Tarazona Vilas y col., 1985). En regadíos de Aragón, los meses de mayor riesgo de desarrollo y concentración del parásito en los pastos resultan ser de Mayo a Octubre (Uriarte, 1990) aunque en secanos de la misma región no se ha observado desarrollo alguno (Uriarte y col., 1984) lo que demuestra la baja resistencia de esta especie a las condiciones ambientales adversas. De una forma similar Tarazona Vilas y col.

(1976-1977) indican para la Meseta Meridional los mismos periodos favorables aunque en los estudios sobre la presencia de L-3 en los pastos en la región, los números más elevados de H. contortus fueron hallados en los meses más húmedos del año (Canals Caballero, 1986). Similares resultados (regadío: máximos en julio, septiembre, octubre y noviembre; secano: máximo en noviembre) han sido obtenidos en Madrid por Miró Corrales (1991).

### 1.2. Acción patógena de Haemonchus contortus

Las nematodosis gastrointestinales de los rumiantes son responsables de distintas manifestaciones fisiopatológicas, entre ellas, la inapetencia, alteraciones en la motilidad gastrointestinal, digestión y absorción, metabolismo proteico, energético, mineral y electrolítico (Holmes, 1986). La importancia relativa de cada manifestación está relacionada con la carga parasitaria y composición específica de las helmintosis intestinales (ver rev. Meana Mañes, 1991).

Las hemoncosis cursan con severas anemia e hipoproteinemia, disminución de la ganancia en peso o reducción de éste y agalaxia en hembras lactantes (Thomas y Ali, 1983; Blood y Radostits, 1989; Taylor y col., 1990; Rahman y Collins, 1990, entre otros). Las infestaciones crónicas implican un menor crecimiento y una anemia moderada en los animales infestados, acompañados de una disminución de la ingesta (Abbott y col., 1986). Se han indicado además alteraciones en la fermentación y digestión (Rowe y col., 1988).

La patogenia está, en gran parte, ligada a la actividad hematófaga del parásito. Se estima que una hembra adulta absorbe cada día 0,05 ml de sangre y como el animal puede albergar una gran cantidad de vermes, de cientos a miles, se comprende que

este parásito pueda inducir una anemia importante. A esta actividad habría que sumar la pérdida de proteínas plasmáticas, células y eritrocitos (Rowe y col., 1988).

En los animales infestados la anemia se puede desarrollar en tres fases: la primera fase dura aproximadamente 3 semanas, se corresponde con la transformación de L-3 en adultos y se caracteriza por la disminución progresiva del hematocrito (puede pasar de 40% a 10%), mientras que el hierro sérico permanece normal. Esta rápida caída del volumen celular se debe al período que transcurre entre la pérdida de sangre y la activación del sistema hematopoyético del hospedador. La segunda fase, que dura de 6 a 14 semanas, se caracteriza por un valor estable aunque más bajo del hematocrito, continúa la pérdida sanguínea y como compensación existe una activación del sistema hematopoyético. La tercera y última fase corresponde a la pérdida de proteínas séricas y de la tasa de hierro (Vray y col., 1988).

Hunter y Mackenzie (1982), en corderos menores de 6 meses, estudiaron el desarrollo de la anemia en la hemoncosis. Observaron la presencia de sangre en la luz del abomaso en el día 7 postinfestación, así como reducciones del hematocrito (Ht) y en los niveles de hemoglobina (Hb). La anemia se desarrolló rápidamente desde el día 10, debido a la mayor demanda de la L-5 y el desarrollo al estadio adulto. Para el día 35, tanto los niveles de Hb como el Ht comenzaban a elevarse, lo que indicaba una respuesta del hospedador. Hallazgos comparables han sido realizados por numerosos autores tanto en ganado ovino (Thomas y Ali, 1983; Taylor y col., 1990, entre otros) como en ganado caprino (Rahman y Collins, 1990).

Los estudios histológicos del abomaso de animales infestados han mostrado una buena correlación con las variaciones fisiopatológicas señaladas (Hunter y Mackenzie, 1982). Así, las lesiones superficiales de la mucosa fueron aparentes por primera

vez en el día 12 p.i., coincidiendo con la formación de la lanceta bucal. El incremento de las lesiones desde el día 18 a 35 reflejaban el establecimiento y maduración de los parásitos adultos. Los eosinófilos, derivados de la circulación, comenzaron a estar presentes en la mucosa a partir del 4º día, mostrando un incremento ca. los 12 primeros días, empezando a disminuir rápidamente para alcanzar los niveles hallados antes de la infestación en el día 35 p.i. Esta eosinofilia se iniciaba con el desarrollo de L-3 a L-4, alcanzando un máximo en las mudas de L-4 y L-5, por lo que la actividad de los eosinófilos parece estar más dirigida contra el desarrollo y establecimiento de las fases larvarias que con la expulsión de los vermes.

En el día 22, correspondiendo al establecimiento de adultos, aparecen agregados de células linfoides, comenzando la respuesta inmune directamente contra el material antigénico adulto; los mastocitos sólo aparecieron a partir de este día. La hipertrofia de la mucosa se hizo patente hacia el día 12, relacionada con el incremento de las células que invadían la mucosa; la congestión y hemorragia aparecieron en las últimas fases. Análogos resultados fueron obtenidos por Salman y Duncan (1984), tanto en ovejas como en corderos, observando que el número de eosinófilos se encontraba más incrementado en la mucosa del abomaso después de la infestación y reinfestación de las ovejas, respecto a lo hallado en corderos; del mismo modo hubo un marcado incremento de las células IgA plasmáticas en las ovejas adultas respecto a los corderos. Finalmente indicaban que los mastocitos, así como la respuesta de eosinófilos después de la infestación y reinfestación, podían estar asociados con la mayor resistencia del ganado ovino adulto.

En los estudios sobre las alteraciones histológicas, tras una dosis de prueba de corderos y ovejas inmunizadas (con larvas irradiadas) y sin inmunizar, se ha observado que el incremento de eosinófilos y de mastocitos era evidente en los 5 primeros días

de la reinfestación de las ovejas inmunizadas, mientras que cambios similares aparecieron más tarde en los corderos inmunizados; la presencia de agregados linfoides sólo fue detectada en ovejas inmunizadas y los incrementos de los números de células plasmáticas (IgA) después de la reinfestación, sólo fueron evidentes en ambos grupos de ovejas, pero no en corderos (Salman y Duncan, 1985).

De un modo similar a lo ocurrido en las infestaciones ovinas por Te.circumcincta, las infestaciones por H.contortus provocan un incremento en los niveles de pepsinógeno sérico (Holmes, 1986; Fox y col., 1991) relacionados con la elevación del pH gástrico. Mostofa y col. (1990), observaron que la concentración de pepsinógeno en el plasma de las ovejas se veía incrementada durante las infestaciones por H.contortus (en el día 7 después de una infestación simple), un poco antes que en las infestaciones por Te.circumcincta (en el día 15), y que estaba asociada a diferentes mecanismos fisiopatológicos dentro del abomaso.

Honde y col. (1985), comparando los cambios hormonales inducidos tanto por una infestación por H.contortus en corderos, como por administración intravenosa de extractos antigénicos de larvas o de adultos, observaron que el polipéptido pancreático durante la infestación no experimentó ninguna modificación significativa, mientras que con la inyección intravenosa se produjo una elevación al cabo de 5-6 horas; la gastrina plasmática se elevó al cabo de 1 hora de la infestación y entre 3-4 horas de la administración intravenosa del extracto de adultos (no se elevó con extracto de larvas). La somatostatina plasmática se elevó en los corderos infestados a los 180 minutos y administrando cualquiera de los dos extractos se incrementó entre los primeros 60-120 minutos. Finalmente, los autores sugieren que la hipergastrinemia no era la consecuencia de una respuesta inmunitaria general, estando probablemente ligada a la liberación de sustancias por las larvas o a una inflamación local de la

mucosa; por el contrario, el aumento tardío de la somatostatina en sangre podría resultar de la respuesta inmunitaria. Más recientemente, en la hemoncosis caprina también se han hallado elevaciones muy notables en los niveles de gastrina, sugiriéndose su empleo en el diagnóstico de la hemoncosis (Fox y col., 1991).

Finalmente, se han observado cambios en el mucus y en la mucosa del abomaso de los animales con infestaciones por H. contortus. Newlands y col. (1990) observaron que en los animales inmunes a esta parasitosis, existían muy pocos cambios aparentes en la mucina en contraste con los animales no inmunes, en los que se observó una drástica disminución de ésta, particularmente de la zona superficial de la mucosa. Estas reducciones se limitaban a las áreas invadidas por las larvas, indicando que la respuesta al parásito era localizada, con algunas partes de la mucosa todavía resistentes, o alternativamente, los parásitos podrían simplemente no haber alcanzado aquellas zonas, con lo cual todavía mostraban un contenido normal de mucina.

### 1.3. Respuesta del hospedador ante H. contortus

La capacidad de respuesta de un hospedador frente a una primoinfestación por un nematodo gastrointestinal no es una constante puesto que depende de la edad de los hospedadores, de su estado fisiológico (fundamentalmente estado nutricional y reproductivo), de su genotipo, así como de la propia capacidad del agente parasitario para evadir, suprimir o modificar la respuesta del hospedador (Miller, 1986). Estas variaciones pueden ser estudiadas a distintos niveles, tras las primeras exposiciones al parásito y considerando tanto los parámetros parasitológicos (porcentaje de implantación, fertilidad, duración del periodo de prepatencia, patencia, eliminación fecal de huevos

- "resistance") como a los parámetros patológicos y productivos (variaciones del hematocrito, recuentos eritrocitarios, incremento de peso de los hospedadores - "resilience" sensu Albers y col., 1987).

La existencia de variaciones en la capacidad antigénica, poder inmunógeno y otras características en nematodos gastrointestinales y específicamente en Haemonchus contortus está ampliamente referenciada y parece ser un fenómeno frecuente en helmintos (Simpson, 1986). Estas variaciones podrían ser las responsables de los fenómenos de resistencia a antihelmínticos (Le Jambre, 1982; Van Wyk y Malan, 1988). En nuestra revisión, sin embargo, nos ceñiremos a los factores dependientes del hospedador.

### 1.3.1. Genotipo de los hospedadores

La evolución biológica ha dado lugar a una diversidad genética de las poblaciones, que en virtud de la acción de la selección natural ha determinado la preponderancia de poblaciones particulares. En la génesis de tales variaciones un elemento importante ha sido la posesión de diferentes capacidades en los hospedadores para responder a las enfermedades parasitarias (Wakelin, 1985), aspecto éste reconocido por los parasitólogos mucho más tarde que en virología, bacteriología o fitopatología. Como marcadores genéticos de la adecuación-resistencia de las relaciones parásito-hospedador en las hemoncosis ovinas se han considerado habitualmente la raza ovina, tipos de hemoglobina y más recientemente, el sistema de histocompatibilidad. En la actualidad se dispone de una buena información acerca de esta base genética, tanto mediante estudios comparados interraciales como dentro de una misma raza ovina (Barger, 1989).

### 1.3.1.a. Factores raciales

La existencia de variaciones raciales en el ganado ovino en su resistencia a las infestaciones por H. contortus y otros Trichostrongyloidea ha sido reconocida muy tempranamente (Whitlock y Madsen, 1958) y, de hecho, la manipulación genética- mediante selección racial- ofrece una nueva posibilidad para el control de la hemoncosis frente a la lucha quimioterápica tradicional (Winton, 1990). No se han obtenido, sin embargo, modelos claros, probablemente relacionado con los distintos aislados de H. contortus empleados y los diferentes diseños experimentales.

Parece sin embargo, relativamente claro, que los corderos Florida Native son más resistentes de forma natural a las hemoncosis, como se evidenciado tanto en las infestaciones primarias (Radhakrishnan y col., 1972; Courtney y col., 1985a y b; Zajac y col., 1990) como en las infestaciones y reinfestaciones (Neilson y Van de Walle, 1987). En efecto, comparando distintas razas ovinas se ha observado que, tras las primoexposiciones a H. contortus, los corderos Florida muestran periodos de prepatencia más alargados, menores recuentos de huevos fecales, disminuciones menos notables del Ht, y menor implantación en cuajar e inferior tamaño de los nematodos, tras la necropsia.

En otras razas ovinas los resultados han sido menos concluyentes y claramente dependientes de las dosis infestantes empleadas. Con dosis altas de L-3, no se han observado diferencias en las cargas parasitarias en abomaso entre Finn-Dorset y Scottish Blackface, aunque con dosis infestantes moderadas, esta última raza se mostró más resistente (Altaif y Dargie, 1978a y b).



Aparentemente la raza Barbados Blackbelly es más resistente a H. contortus que las razas Kathadin y Suffolk (Presson, 1986), aunque esta raza ovina parece mostrar una menor resistencia que otras estudiadas (Finn-Dorset, St. Croix y otras). Así, comparando la resistencia de los corderos (14-18 semanas de edad) en razas ovinas (St. Croix, 3/4 St. Croix, de Florida, Barbados - Blackbelly) frente a un cruce de Finn - Dorset con Rambouillet, Courtney y col. (1985a) observaron que la resistencia durante las primoinfestaciones fue variable, resultando menos resistente la raza Barbados, al menos cuando se consideró la eliminación fecal de huevos de H. contortus y la implantación de vermes en abomaso; sin embargo, la disminución del valor hematocrito (Ht) en estos experimentos no siguió el mismo patrón.

Cuando se estudió la resistencia diferencial, en condiciones de campo, mediante pastoreo de praderas infestadas, la raza Florida Native mostró una menor reducción en los valores de Ht, así como inferiores recuentos de huevos fecales (Courtney y col., 1985b). No obstante, no se observaron diferencias en las cargas parasitarias tras la necropsia de St. Croix, Barbados Blackbelly y un cruce de Finn-Dorset X Rambouillet.

Los resultados obtenidos cuando se analizaron conjuntamente la respuesta inmunitaria (particularmente inmunoglobulinas de isotipo IgA) y la resistencia diferencial racial, tampoco han mostrado un modelo claro. Mientras Preston y Allonby (1978) observaron que la raza Merina mostraba una buena resistencia al establecimiento de las larvas de H. contortus frente a los Red Masai, que se relacionaba claramente con los mayores niveles de IgA de los primeros, Zajac y Col. (1990) no hallaron correlación entre las diferencias raciales (Dorset X Rambouillet; St. Croix y Florida Native) y el número total de vermes, así como tampoco con la respuesta linfocitaria, niveles de anticuerpos, número de mastocitos, leucocitos y niveles de histamina aunque sí

se observó correlación con los recuentos fecales de huevos, los niveles de proteínas plasmáticas y los valores de Ht.

#### 1.3.1.b. Tipos de Hemoglobina

Los primeros estudios sobre la influencia de los tipos de hemoglobina sobre la resistencia a las infestaciones por H. contortus apoyaban que las ovejas cuyo tipo de hemoglobina era AA tenían menores recuentos de huevos fecales que aquellos cuyos tipos de Hb eran AB y BB (Evans y col., 1963).

Esta sugerencia fue confirmada, en un experimento de autocuración, por Allonby y Urquhart (1976), quienes hallaron menores alteraciones en los parámetros hemáticos y mayor ganancia de peso vivo de los individuos homocigóticos (AA). Radhakrishnan y col. (1972) también observaron menores niveles de infestación en corderos Florida Native con tipo HbAA y resultados similares fueron obtenidos por Luffau y col. (1981a), con una mayor resistencia de las ovejas AA. A su vez, tras una primoinfestación con H. contortus, también parecía existir una resistencia relacionada con el tipo de hemoglobina, de forma que los heterocigóticos (HbAB) eran más resistentes que los homocigóticos BB, al menos cuando se consideraba el valor Ht y los recuentos fecales de huevos; no parecía existir respecto a la implantación de vermes en el abomaso (Courtney y col., 1985a y b).

Estas inconsistencias (independencia del efecto patológico, implantación parasitaria, eliminación de huevos), junto con las sospechas de Radhakrishnan y col. (1972) motivaron que se reevaluase la influencia del tipo de hemoglobina en el ganado ovino en la resistencia a la hemoncosis. Trabajos más recientes, sin embargo, no han logrado comprobar esta relación entre

resistencia a H. contortus y el tipo de hemoglobina en ganado ovino (Luffau y col., 1990; Kassai y col., 1990) y parece que tanto la resistencia natural a la infestación como la producción de anticuerpos anti-Haemonchus específicos podrían depender de uno o varios genes sin relación íntima con los determinantes del genotipo de hemoglobina.

#### 1.3.1.c. Factores genéticos

El incremento de los costes de producción de nuevos antiparasitarios y la aparición de resistencias a un buen número de antihelmínticos ha motivado la investigación sobre la base genética de la receptividad a helmintos gastrointestinales de pequeños rumiantes (ver Gruner y Cabaret, 1988; Windon, 1990 y 1991; Gruner, 1991).

La existencia de alguna relación, al menos parcial, entre los genotipos de Hb y la resistencia a las hemoncosis, y entre las características raciales del ganado ovino empleado en las infestaciones y algunos parámetros estimativos del grado de adecuación parásito-hospedador en el binomio H. contortus - Ovis aries (supervivencia de vermes, implantación, grado de desarrollo en sus hospedadores, fertilidad de las hembras instaladas, etc.) apuntaban a la existencia de una base genética de la receptividad del ganado ovino al nematodo gástrico, así como quizás a la propia distribución de las poblaciones parasitarias en sus hospedadores en condiciones naturales.

Estos estudios se han llevado a cabo tanto en infestaciones, pruebas vacunales, inmunosupresión e inmunopatología de la hemoncosis, sin que sea fácil señalar los mecanismos finales implicados. En efecto, los resultados obtenidos mediante infestaciones y reinfestaciones de corderos con H. contortus

tratados con dexametasona han mostrado que el glucocorticosteroide es capaz de suprimir la respuesta secundaria a las reinfestaciones (Adams, 1982; Adams y Davies, 1982) y convertir en sensibles a *Merinos* resistentes (Presson y col., 1988). Estos resultados parecen sugerir que existe una base inmunológica en la mayor o menor resistencia a las hemoncosis en los genotipos resistentes de los hospedadores (Gill, 1991). Además, a pesar de existir una gran heterogeneidad en las poblaciones parasitarias de helmintos (Simpson, 1986; Beh y col., 1989), de interés en la respuesta parásito-hospedador (Kennedy, 1989), los resultados obtenidos, experimentalmente, en las infestaciones por *H. contortus* no han mostrado ningún tipo de selección parasitaria (Adams, 1988b; Albers y Burgess, 1988).

Una atención considerable, han recibido, en el genotipo de los hospedadores, los genes ligados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) como reguladores de la función de las Células-T, para controlar la respuesta a las infestaciones (Grey y col., 1990; Kennedy, 1989), pudiendo determinar, desde una falta de reconocimiento antigénico hasta la inmunosupresión o tolerancia a los complejos antígeno parasitario- CMH.

Recientemente, el CMH del ganado ovino (OLA) y vacuno (BoLA) han sido el centro de atención de una caracterización molecular, al entender que el aislamiento e identificación de los marcadores de ADN vinculados con los genes que codifican caracteres de importancia económica y la resistencia a las enfermedades podrían ofrecer pruebas objetivas para identificar los animales portadores de los genes deseados, a su nacimiento o incluso antes (Gogolin-Ewens y col., 1990), dada la heredabilidad de la resistencia a algunas helmintosis intestinales de interés (p.e. *Trichostrongylus colubriformis*, según observaron Dineen y Windon, 1980) y la asociación existente entre los alotipos de antígenos de superficie de linfocitos ovinos clase I, codificados por genes íntimamente relacionados con el CMH, y la resistencia

frente a T.colubriformis (Outteridge y col., 1985, 1986).

Los resultados obtenidos por Luffau y col. (1990) mostraron efectos estadísticamente significativos de varios haplotipos OLA, en la respuesta humoral, así como en los recuentos de huevos en las heces y el grado de anemia debido a las hemoncosis ovinas, lo que quizás mostrase la existencia, dentro o ligado al sistema OLA, de genes que puedan afectar estos fenómenos. Sin embargo, Cooper y col. (1989) trabajando con merinos australianos, con gran polimorfismo en su sistema OLA, no obtuvieron evidencias entre la asociación de los tipos OLA y la sensibilidad a la infestación por H.contortus.

### 1.3.2. Fisiología de los hospedadores

#### 1.3.2.a. Sexo

En general, existe una relación entre el sexo de los hospedadores y las infestaciones por H.contortus, sólo tras la pubertad. Mientras que las ovejas incrementan drásticamente su resistencia a las infestaciones después de la pubertad, el desarrollo de esta resistencia en los machos es gradual, hasta alcanzar el estado adulto (Thorson, 1970 *in* Courtney y col., 1985a). Resultados similares, tras una primoinfestación han sido obtenidos por Luffau y col. (1981b), con una mayor producción de huevos por parte de los machos respecto a hembras de la misma edad, raza y tipo de hemoglobina. Además, la autocuración con dosis infestantes elevadas fue más consistente en hembras, probablemente ligado a una mayor producción de histamina local en abomaso o a una mayor sensibilidad al choque histamínico en este sexo.

No obstante, Albers y col. (1987) con un elevado número de animales (>1000) sometidos a una primoinfestación con 11000 L-3 de H. contortus y posterior análisis multivariante no hallaron esta clara diferencia, puesto que los recuentos de huevos fecales (hpg) al cabo de 4 semanas p.i. no fueron diferentes entre moruecos, hembras y machos castrados.

Contrastan estos resultados, con la mayor facilidad para obtener una respuesta inmunitaria protectora tras una primoinfestación y reinfestación en machos (Luffau y col., 1981b; Courtney y col., 1985a) y los mejores índices de protección observados en hembras, índices a su vez relacionados con los recuentos de vermes en abomaso (Adams, 1989).

#### 1.3.2.b. Niveles hormonales

La reproducción puede alterar el curso de las nematodosis ovinas. Está ampliamente demostrado que la preñez y la lactación provocan una marcada elevación en los recuentos de vermes gastrointestinales así como una mayor receptividad de estos hospedadores a las infestaciones. De una forma general, estas elevaciones en los recuentos fecales de huevos de nematodos gastrointestinales han recibido el nombre de elevación periparto, posparto o primavera (ver rev. Michel, 1976) y se han relacionado (Connan, 1968), con:

- maduración de larvas inhibidas en la mucosa gastroentérica
- incremento de las tasas de establecimiento de larvas infestantes ingresadas
- aumento de la fecundidad de los vermes adquiridos y establecidos
- y suspensión durante la última parte de la preñez y lactación de los mecanismos efectores de expulsión,

permitiendo que los nematodos alcancen su madurez.

Aunque la elevación está claramente establecida tanto en ganado vacuno infestado con Ostertagia ostertagi (Kloosterman y col., 1984/1985) como en ganado ovino con infestaciones pluriespecíficas o monoespecíficas con H. contortus (Thomas y Ali, 1983; Gibbs, 1986; Taylor y col., 1990a; entre otros), dependiente de la raza ovina implicada (Courtney y col., 1984), y se han relacionado estas elevaciones tanto con la maduración de larvas del nematodo gástrico como con el fallo del ganado ovino para expulsar a los adultos existentes (Gibbs, 1986) -que suponen un incremento de los efectos patológicos de las infestaciones en estos momentos (Thomas y Ali, 1983)- no están del todo claros los mecanismos implicados en su aparición.

La estrecha correlación existente entre las elevaciones periparto y los niveles de algunas hormonas (p.e. prolactina, progesterona) apuntaban a que los elevados niveles de prolactina eran los responsables de esta elevación en los recuentos fecales -como medida de la estimación de la relajación inmunitaria de las ovejas-. No obstante, Coop y col. (1990), mediante infestaciones experimentales con Te. circumcincta en ovejas preñadas y paridas observaron que ni la prolactina ni la progesterona parecían ser las únicas responsables de la elevación periparto. Similares resultados fueron obtenidos cuando se emplearon antagonistas de la prolactina, como la bromocriptina; en estos experimentos, a pesar de que la bromocriptina disminuyó los niveles plasmáticos de prolactina no redujo las eliminaciones fecales de huevos de Te. circumcincta.

La posible inmunosupresión provocada por la progesterona y el cortisol ha sido invocada como agente de la elevación periparto (Lloyd y col., 1983). Sin embargo, Coop y col. (1990) no observaron ningún efecto notable tras la administración de dexametasona. El estudio del efecto de la administración exógena

de hormonas y corticosteroides ha producido resultados inconsistentes. Fleming y Conrad (1989) aparentemente reprodujeron una elevación periparto en ovejas ovariectomizadas mediante la administración de progesterona y/o prolactina, aunque más recientemente, Coop y col. (1990) no consiguieron reproducir los efectos mediante administración exógena de hormonas. Parece probable, por tanto, que la elevación sea un proceso multifactorial en el que estén implicados tanto el mucus gastrointestinal (Miller, 1984), proteinasas, mediadores inflamatorios e inmunoglobulinas, pudiendo desempeñar un papel notable los glucocorticoides en la modulación de la respuesta antiparasitaria (Miller, 1987) y no siendo la prolactina probablemente el único factor responsable (Jeffcoate y col., 1990).

En favor de este carácter probablemente multifactorial de las elevaciones periparto se puede señalar que, al menos en lo que respecta a las concentraciones de inmunoglobulinas séricas de las hembras preñadas, no se observa ninguna inmunodepresión salvo en los últimos días previos al parto (10-15 días antes) explicables por el trasvase activo de IgG1 hacia la mama (Pellerin y col., 1990).

#### 1.3.2.c. Alimentación

En general una buena alimentación influye en el estado inmunitario y en la capacidad de reacción frente a las infestaciones (Holmes, 1986). En las hemoncosis que pueden cursar como una parasitosis primaria - por una ingestión muy elevada de L-3 - o como una parasitosis secundaria, con debilitamiento de los animales infestados, este factor es crítico.

Una dieta hipoproteica de animales agrava los efectos patogénicos de H. contortus, como ha sido demostrado por Roberts y Adams (1990), quienes observaron que administrando 600 g/animal/día de granulado, los corderos desarrollaban una fuerte resistencia a las reinfestaciones, no observable en los corderos mantenidos con 400 g /día. De forma análoga, el estado nutricional de los corderos (Scottish Blackface) influye de forma notable en la capacidad de resistencia tras una inmunización, posiblemente como resultado de alteraciones en el establecimiento de la competencia inmunitaria, alteraciones no observables en animales mayores de ocho meses (Abbot y Holmes, 1990).

#### 1.3.2.d. Edad de los hospedadores

La resistencia ligada a edad en las infestaciones ovinas por H. contortus constituye uno de los aspectos más interesantes de la hemoncosis. El ganado ovino es capaz de desarrollar una respuesta protectora tras una primoinfestación con otras especies de nematodos intestinales (p.e. corderos de 2 meses de edad frente a Nematodirus battus, Taylor y Thomas, 1986) aunque también existe en algunos casos una dependencia de la edad en la magnitud de la respuesta; así, los corderos de 4 meses y medio de edad son más sensibles a las reinfestaciones con Te. circumcincta, que los animales de 10 meses (Smith y col., 1985).

Sin embargo, la situación en las hemoncosis está más ampliamente referenciada (ver Knight y Rodgers, 1974) existiendo una clara evidencia de una mayor resistencia ligada estrechamente a la edad del ganado ovino y dependiente, a su vez, de la raza ovina (Courtney y col., 1985a, 1985b). La mayoría de las razas ovinas (Merino, Blackface, Préalpes du Sud) parecen alcanzar su madurez inmunitaria frente a H. contortus en algún momento entre

los seis y doce meses de edad o incluso más tarde (Manton y col., 1962; Charley-Poulain y col., 1984; entre otros).

En experimentos con vacunaciones mediante L-3 irradiadas, Urquhart y col. (1966) hallaron que la inmunización no era capaz de conferir ninguna resistencia a las reinfestaciones en corderos de 3 meses de edad, sólo una resistencia parcial a los cinco meses de edad y una buena respuesta a los 8 meses de edad. Al año siguiente, López y Urquhart (1967) no consiguieron inmunizar merinos de 7 meses, con 2 dosis vacunales de L-3 irradiadas de H. contortus, mientras que la vacunación estimuló una fuerte respuesta protectora en animales de 2 años.

Otras razas ovinas, por el contrario, son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria frente a H. contortus a más temprana edad, como Romanov (Berezhko y col., 1987) o Florida Native (Neilson y Van de Walle, 1987; Zajac y col., 1990).

Es difícil entender esta incapacidad, teniendo en cuenta que los corderos son capaces de responder adecuadamente a otros estímulos antigénicos (víricos, bacterianos e incluso parasitarios). Urquhart y col. (1966) entendían que o bien el desarrollo ontogenético de los mecanismos efectores frente a H. contortus era más lento, por su complejidad antigénica, o bien que H. contortus era antigénicamente muy pobre. Se ha aducido además la posibilidad de transferencia de sustancias inmunosupresoras, desde las ovejas infestadas, a los corderos (Soulsby, 1979). Contrasta esta aparente escasa antigenicidad de H. contortus con el hecho de que el nematodo gástrico está en contacto permanente con el torrente circulatorio del hospedador, y por ello existe la posibilidad de un estrecho contacto parásito-hospedador (Munn y col., 1987).

#### 1.4. Respuesta inmunitaria

La inmunidad supone generalmente una resistencia y prácticamente siempre existe un proceso destructivo; el éxito del proceso inmune se basa en la capacidad de los organismos vivos para reconocer, por diferentes medios, las moléculas complejas extrañas que carecen de relación con su propia estructura normal. La inmunidad puede adquirirse como consecuencia de una experiencia previa con la estructura química de la sustancia extraña y conlleva la adquisición de memoria inmunológica, la síntesis de anticuerpos y la proliferación de linfocitos; sin embargo, también puede ser innata, en cuyo caso viene determinada genéticamente (Wesley Alexander y Good, 1980).

Es difícil generalizar sobre los mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria de los animales expuestos a una helmintosis; sin embargo, la mayoría de los autores sugieren que la lesión y expulsión de los vermes en un animal inmune, resulta de la interacción secuencial entre anticuerpos y la respuesta inmune mediada por células junto con cambios inflamatorios no específicos, debido a aminas biógenas y prostaglandinas (Castro, 1989).

La respuesta inmune se desencadena cuando una molécula receptora de la superficie de una célula B o T encuentra al antígeno contra el que la célula está programada para responder y lo reconoce como extraño al unirse a alguna pequeña parte del mismo. Con la ayuda de otros elementos del sistema inmunitario, la célula se multiplica y ejerce su función de célula B secretora de anticuerpos, de célula T citotóxica o de célula T coadyuvante, que segrega sustancias que movilizan a otras células (Grey y col., 1990).

#### 1.4.1. Autocuración

La expulsión rápida o autocuración, consistente en la eliminación de la población parásita de helmintos en un hospedador tras una reinfestación es un fenómeno relativamente frecuente y se ha indicado, entre otras, en las infestaciones por Trichinella spiralis, Nippostrongylus brasiliensis, T.colubriformis y H.contortus (Soulsby, 1957 In rev. Miller, 1984).

En la hemoncosis ovina, este fenómeno se presenta en ovejas infestadas, tras la ingestión de larvas infestantes frescas; al cabo de unos pocos días existe una caída drástica de los recuentos fecales de huevos del parásito y la población adulta es eliminada del abomaso. Generalmente la autocuración ha sido considerada como una expresión de la inmunidad protectora. Sin embargo, Michel y col. (1973) entendían que el hecho de que una infestación terminara con la expulsión de los adultos (autocuración) y por otra parte, que el hospedador fuera refractario al establecimiento de una infestación nueva (protección), eran fenómenos aislados; ya que podía ocurrir la una sin la otra, y la protección podía desarrollarse antes o más tarde de que sucediera la autocuración.

Parecidas consideraciones han sido expresadas por Luffau y col. (1981a), quienes además encontraron una relación inversa entre el pico de recuentos de huevos en las heces y la intensidad de la autocuración y Berezhko y col. (1987), en corderos de raza Romanov. Estos últimos autores observaron que la resistencia a la invasión con H.contortus estaba correlacionada con el incremento de las reacciones inmunoalérgicas, a la vez que con la edad de los animales. En corderos de 2 meses de edad no encontraban anticuerpos en sangre, ni en la infestación primaria ni en la superinvasión; sin embargo disminuyó el número de vermes

y de huevos después de la sobreinfestación. Estos resultados sugieren que, independientemente de los mecanismos implicados en la autocuración en la hemoncosis ovina, este fenómeno y la resistencia a las reinfestaciones pueden actuar como entidades separadas (Adams, 1981). Por ello la resistencia a la reinfestación constituye una mejor medida de la respuesta inmune que la autocuración, lo que podría ser debido a que el fenómeno de autocuración mide un "todo o nada", mientras que la resistencia a la reinfestación está cuantitativamente más relacionada con el nivel inmunitario del hospedador (Luffau y col., 1981a).

#### 1.4.2. Respuesta celular

El estudio de la inmunidad frente a helmintos parásitos se ha encontrado con numerosas dificultades tanto de orden metodológico como conceptual. En efecto, los helmintos presentan algunas características estructurales que les convierten en casi únicos, entre las que habría que destacar:

- Variaciones antigénicas debido a su desarrollo (distintas fases de desarrollo) dentro del hospedador. Además, en numerosas ocasiones estas fases diferentes se localizan en distintos órganos del hospedador.
- Posesión de una superficie externa no fagocitable. La mayoría de las especies de helmintos parásitos presentan a su hospedador una superficie muy amplia que no es fagocitable (p.e. nematodos gastrointestinales).

En buena medida estas dos características van a determinar el tipo de respuesta frente a los helmintos y además van a suponer una enorme restricción a los mecanismos efectores de los

que dispone el hospedador para hacer frente a una infestación parasitaria. Obviamente se podría predecir que algunos tipos celulares de los hospedadores deberían desempeñar un papel más relevante en la respuesta inmune, tales como linfocitos citotóxicos (LTC), y además también podría suponerse que los hospedadores habrían dado lugar al desarrollo de sistemas específicos de defensa antiparasitaria. Sin embargo, aunque sí es relativamente cierto que algunos tipos de células efectoras son más adecuadas en general en las parasitosis, hasta donde se conoce, los mecanismos finales (dependientes de anticuerpos o de complemento, células inflamatorias) son relativamente constantes y en muchos casos similares a los relacionados con otro tipo de agentes patógenos tanto parasitarios como infecciosos (Mackenzie y col., 1978).

Se han realizado algunas revisiones sobre la respuesta inmunitaria en el tracto gastrointestinal, tanto de carácter general (Befus, 1986; Miller, 1987; Zajac, 1987; Urban y col., 1989; Castro, 1989; McGhee y col., 1992) como sobre el papel de algunos componentes de la respuesta inmunitaria (IgA, Goldblum, 1990, p.e.; Butterworth, 1984). A pesar del trabajo intenso realizado, la forma precisa de actuación de los mecanismos inmunitarios que provocan la expulsión intestinal de los helmintos es muy poco conocida. Es claro que la respuesta inmunitaria provocada por las infestaciones parasitarias involucran tanto componentes específicos como inespecíficos. La respuesta celular y la humoral son determinadas por el reconocimiento antigénico y por tanto es específica, mientras que las respuestas inflamatorias, una vez activadas, son inespecíficas. Ya que la información existente sobre la respuesta humoral es considerablemente más abundante, se ofrecerá en la sección 1.4.3., mientras que la respuesta celular y sus componentes (linfoide, mieloide) se mostrarán a continuación.

En la hemoncosis ovina y procesos relacionados, se han



efectuado numerosos ensayos para conferir resistencia mediante la transferencia de células linfoides de individuos inmunes a receptores sensibles. Smith y col. (1984) encontraron que la resistencia a H. contortus era adquirida por la transferencia de linfocitos derivados de linfa gástrica entre gemelos monocigóticos de ovejas, observando que gran número de mastocitos habían sido transferidos para los receptores y que estos fueron más resistentes a la reinfestación. Del mismo modo Smith y col. (1986) consiguieron proteger frente a Te. circumcincta mediante transferencia celular entre ovejas genéticamente idénticas; así, todas las ovejas donadoras fueron tan resistentes a la reinfestación como las ovejas de los experimentos iniciales. Adams y Rothwell (1977) transfirieron inmunidad en cobayos, frente a T. colubriformis, mediante células de ganglios linfáticos mesentéricos, comprobando que la edad de los donadores era más importante que la de los receptores en este sistema de transferencia celular. Sin embargo, Adams y col. (1980), no consiguieron transferir de forma pasiva inmunidad, mediante canulación del conducto torácico en corderos de 8 a 10 meses de edad, frente a esta misma especie. Es posible que esta falta de respuesta protectora se deba al propio desarrollo ontogenético del sistema inmunitario ovino, ya que Riffkin y Dobson (1979) demostraron que tanto la capacidad de respuesta linfocitaria a la fitohemoaglutinina como a los antígenos de H. contortus no estaban presentes en el nacimiento de los corderos, desarrollándose en los 5 primeros meses de vida, en ausencia de infestación.

Otro modo de abordar el problema sobre la transferencia de inmunidad fueron las investigaciones realizadas sobre un factor de transferencia, preparado con un lisado de leucocitos. Ross y Halliday (1979a, 1979b) transfirieron inmunidad a corderos receptivos a la reinfestación por T. colubriformis y por Te. circumcincta y consideraron que la resistencia transferida estaba operando independientemente de la competencia inmune, ya que los corderos donador y receptor eran genéticamente

disimilares. El tratamiento con factor de transferencia en infestaciones por H. contortus no determinó ninguna protección del ganado ovino (Hunter y col., 1983), aunque Ross y col. (1978) lograron una ligera la protección de corderos mediante un tratamiento combinado con L-3 irradiadas y "factor de transferencia". Por su parte, Hunter y col. (1983) lograron una reducción significativa en el establecimiento de los vermes en corderos menores de 6 meses de edad utilizando un tratamiento con antígenos parasitarios de adultos de H. contortus, factor de transferencia e inmunoglobulinas precipitadas, aunque ninguno de los componentes individuales provocó ninguna protección.

Más recientemente se ha estudiado el papel desempeñado, en la resistencia ovina a la hemoncosis, por una proteinasa secretada por mastocitos, habiéndose demostrado que los niveles de esta enzima se elevaban en las ovejas inmunizadas respecto a los abomasos de animales no infestados (Huntley y col., 1987).

El papel de otros tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos) no ha sido claramente establecido. Adams (1981) observó una disminución de leucocitos, una linfopenia media y disminución de neutrófilos en ovejas infestadas con H. contortus; las ovejas mostraban eosinopenia en el día 105 de la infestación, característica encontrada en animales expuestos a una amplia variedad de fenómenos estresantes. Por su parte, Berezhko y col. (1987) estudiando el fenómeno de la autocuración en una hemoncosis experimental, hallaron una fuerte reacción eosinofílica local, en la submucosa del abomaso, (acompañada de linfocitos y plasmocitos), dependiente de la edad de los animales, de forma que la respuesta fue más notable a partir de los 4 meses de edad, respecto a la hallada en corderos de 2-3 meses. Más recientemente, Rahman y Collins (1990) observaron en hemoncosis caprinas, además de una fuerte anemia y reducción del Ht, una importante disminución de linfocitos y aumento de neutrófilos, mientras que ni eosinófilos ni monocitos presentaron

alteraciones.

El conocimiento sobre otras células derivadas de la médula ósea como macrófagos, células dendríticas y células de Langerhan's, es escaso; sin embargo todos ellos, presumiblemente, son de importancia considerable en la generación de la respuesta inmune contra los nematodos parásitos del digestivo. La cuestión sobre si la inmunopatología asociada a la protección es una parte integral del mecanismo de la resistencia, continúa sin ser aclarada, así como si los componentes diferentes de la respuesta son estimulados por separado. No obstante, es posible que en el futuro se pueda determinar, si la resistencia es una consecuencia del incremento de la reactividad inmune específica, o de otros mecanismos protectores, efectivos, no específicos, con el fin de preparar vacunas más sencillas a partir de antígenos de vermes (Miller, 1984).

#### 1.4.3. Respuesta humoral

##### 1.4.3.a. Respuesta sérica

La importancia del papel de los anticuerpos en la respuesta inmune frente a *H. contortus* y otros nematodos gastrointestinales ha sido muy discutida a lo largo de los años. Numerosos autores, han concluido que mayores títulos de anticuerpos reflejan una inmunidad incrementada frente a la reinfestación, ya sea mediante infestaciones previas o mediante inyecciones administradas de sustancias antigénicas de los parásitos o los propios parásitos irradiados.

Además, recientemente ha vuelto a plantearse la necesidad de un ataque de anticuerpos a los organismos diana previo a la

expulsión de vermes del tubo digestivo (Winton, 1991).

De una forma general, y al igual que ocurre con otros nematodos gastrointestinales de rumiantes (ver Klesius y col., 1986, en ostertagiosis de terneros por Ostertagia ostertagi), la respuesta ha sido relativamente baja y lenta.

En corderos de 6 meses de edad, Smith (1977b) observó una respuesta IgG sérica anti-L3, de desarrollo lento, que apareció a partir de las 4 semanas después de una dosificación diaria de L-3 y dependiente del estímulo antigénico constante, mostrando un declive inmediatamente después de terminar la dosificación. Resultados similares fueron obtenidos por el mismo autor, tras la inoculación de antígenos de L-3 y L-4 en cruces de Scottish Blackface (Smith, 1977a).

Esta correlación positiva entre el grado de protección y la producción de inmunoglobulinas fue confirmada en las vacunaciones con L-3 irradiadas de H. contortus por Smith y Christie (1978), quienes observaron una elevación en los niveles de IgG e IgA séricos. Del mismo modo, Duncan y col. (1978) hallaron una buena correlación entre los títulos séricos de IgG y la protección (en ovejas) pero no en corderos de 2 meses de edad. Sin embargo, Smith y Angus (1980) no observaron esta clara correlación, a pesar de unas menores elevaciones en los corderos, puesto que los animales de 60 días (cruce de Suffolk-Greyface) lograron producir unos elevados niveles de IgG sérica anti-Haemonchus tras la inoculación parenteral de antígeno larvario en coadyuvante. Los niveles, no obstante, de IgG sérica en cuatro animales resistentes no fueron estadísticamente superiores a los hallados en el resto de los individuos sensibles.

La aparente irrelevancia en la protección de las inmunoglobulinas séricas también fue observada por Adams y Beh (1981), mediante estimación de los niveles de anticuerpos por

hemaglutinación. La primoinfestación determinó una elevación en los niveles, pero no las sucesivas reinfestaciones y además los títulos hemaglutinantes no estuvieron correlacionados con la respuesta de los animales a la reinfestación.

Los resultados obtenidos en los ensayos de autocuración por Charley-Poulain y col. (1984) fueron similares; no mostraron ninguna elevación notable en los niveles séricos de IgA, IgG e IgM anti-Haemonchus en animales de 7 meses de edad (Préalpes du Sud) a pesar de la drástica disminución observada en los recuentos de huevos fecales del parásito. Parecidos resultados han sido obtenidos en una raza de respuesta precoz (Florida) por Neilson y Van de Walle (1987), con mayores títulos IgG anti-Haemonchus cuando se vacunaban los corderos de 6 meses con fracciones de alto y bajo peso molecular del parásito (una mezcla de productos de excreción y secreción, con extracto soluble de larvas más adyuvantes, con una mezcla de productos de excreción y secreción sin fraccionar con adyuvante) que cuando se procedía a la primoinfestación, tratamiento y reinfestación de los corderos; a pesar de lo cual, el porcentaje de protección fue superior y menor el número de vermes hallados en abomaso en este último caso. Por tanto los títulos IgG séricos más elevados no estaban relacionados con la resistencia a la infestación.

Más recientemente, Boisvenue y col. (1987, 1991) no hallaron diferencias en pruebas vacunales y Gamble y Zajac (1992) observaron que a pesar de las importantes diferencias observadas en St. Croix y Dorset, tras las primoinfestaciones experimentales y las infestaciones naturales por H. contortus adquiridas en pastoreo, estimando las cargas parasitarias y las eliminaciones de huevos del nematodo, las diferencias en los títulos séricos estimados mediante ELISA no fueron significativas. Quizás esta falta de correlación hallada mediante las estimaciones de IgG anti-Haemonchus sean debidas a los diferentes papeles desempeñados por los isotipos IgG1 e IgG2,

normalmente no diferenciados en los estudios sobre la cinética de la respuesta humoral en ganado ovino, y que han mostrado sus claras diferencias en otros sistemas parásito-hospedador. Así, por ejemplo, las IgG1 anti-Nematospiroides dubius parecen ser responsables de la protección en ratón (Pritchard y col., 1983); las IgG2 parecen correlacionarse con la protección en terneros frente a Oesophagostomum radiatum (Gasbarre y Canals, 1989) y otros ejemplos.

Sin embargo, Kassai y col. (1990) observaron que el desarrollo de la inmunidad en ganado ovino no estaba asociado con un incremento de los niveles de IgG1 sérica, ni con las IgA; no encontraron ninguna diferencia en los niveles medios de anticuerpos de los animales reactivos y no reactivos de forma natural, por los que ni los niveles de IgG1 ni los de IgA, servían en la identificación de los corderos que fueran genéticamente resistentes a las infestaciones por H. contortus.

#### 1.4.3.b. Respuesta en la mucosa gástrica

El estudio de la respuesta inmunitaria local se ha incrementado al observarse que en algunas infecciones e infestaciones, particularmente las que afectaban al tracto digestivo y respiratorio, la inmunidad estaba correlacionada con anticuerpos encontrados en secreciones locales (de forma especial con las inmunoglobulinas de tipo IgA y una porción de las IgG1 - Newby y Bourne, 1976 -) y no con los anticuerpos circulantes (Murray, 1973).

De una forma similar a lo observado (vide supra) en la respuesta sérica, los resultados obtenidos en las estimaciones de la respuesta local, en abomaso, tras las infestaciones ovinas por H. contortus han sido notablemente inconsistentes y relacionados

con la edad de los hospedadores, estado inmunitario, estímulo antigénico empleado y otros factores.

Smith (1977b), en infestaciones repetidas de corderos con H. contortus, observó que, independientemente de la protección, las infestaciones iban acompañadas de niveles elevados de inmunoglobulinas en la mucosa del abomaso, siendo las IgG posiblemente de procedencia sérica y las IgA, de producción local. Sin embargo, el mismo autor, en corderos inoculados con antígeno de L-4 del parásito no halló ninguna elevación de las IgA gástricas, aunque sí de las IgG (Smith, 1977a). Al año siguiente, Smith y Christie (1978), en inmunizaciones ovinas con larvas irradiadas de H. contortus observaron que la resistencia de los animales a las reinfestaciones estuvo asociada con niveles elevados de IgA e IgG en la mucosa gástrica. Este papel de las IgA en la protección fue comprobado asimismo por Duncan y col. (1978) al hallarse niveles elevados en individuos reactivos, tras una inmunización, y no observar estas elevaciones en corderos de 2 meses de edad, no reactivos.

Sin embargo, Smith y Angus (1980) con un diseño experimental similar, en corderos y ovejas, hallaron elevaciones notables de IgA en la mucosa del cuajar, significativamente mayores que los obtenidos en animales no inmunizados, aunque existieron grandes variaciones individuales, sin que se obtuviese una evidencia directa de que sus elevaciones y las de la IgG de la mucosa gástrica estuviesen asociadas con la protección, al menos según se estimó mediante recuento de vermes en abomaso, tras el sacrificio. De hecho, los niveles más elevados de IgG e IgA en mucus fueron observados en los individuos que fueron sometidos a una inyección intramuscular de 1 mg de antígeno larvario en adyuvante completo de Freund. Resultados similares han sido obtenidos por Wedrychowicz y col. (1984a) en inmunizaciones de ganado ovino frente a H. contortus y parecen descartar el papel de este isotipo (IgA) en la protección frente

a Haemonchus en las reinfestaciones o en los fenómenos de "exclusión inmunitaria" en ovejas hiperinmunizadas, tal y como había sido propuesto, entre otros factores (hiperplasia de la mucosa, hipersecreción de mucus) por Miller y col. (1983).

A pesar de esta falta de correlación entre la protección y la presencia de inmunoglobulinas en la mucosa, particularmente IgA, también observada más recientemente por Charley-Poulain y col. (1984); Zajac y col. (1990); Kassai y col. (1990) en infestaciones experimentales con el nematodo gástrico, las inmunoglobulinas de la mucosa gástrica están, en general, asociadas a la presencia de infestaciones parasitarias. Además de las indicadas en las líneas precedentes, existen evidencias de que en otros sistemas parásito-hospedador, la presencia de helmintos gastrointestinales provoca respuestas de inmunoglobulinas. Así, en las ostertagiosis experimentales ovinas (por Te. circumcincta), los niveles de IgA y de células productoras de IgA estaban estrechamente correlacionados con la exposición constante al estímulo antigénico (L-3), cesando su producción al finalizar la administración de L-3 (Smith y col., 1987). Resultados similares han sido obtenidos en infestaciones con Nippostrongylus brasiliensis por Sinski y Holmes (1977) y Wedrychowicz y col. (1984b), en infestaciones ovinas con Oesophagostomum columbianum (Dobson, 1966) y sugerido por Gasbarre y Canals (1989), en ganado vacuno, con O. radiatum.

Un aspecto notable ha sido la aparente falta de correlación entre los niveles séricos y de la mucosa (vide supra y Byszewska - Szpocinska y Stankiewicz, 1985). Además de inducir a pensar en su posible papel protector, sugiere la existencia de un transporte selectivo de IgA, o bien su producción local. Existen evidencias de la existencia de transporte en dependencia de componentes secretores de las moléculas de IgA (Scicchitano y col., 1984; Sheldrake y col., 1984) en algunas circunstancias, aunque probablemente las IgA son, fundamentalmente de producción

local (Husband y col., 1979) y ello podría explicar la falta de correlación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y de la mucosa, tanto en las hemoncosis (Charley-Poulain y col., 1984; Byszewska - Szpocinska y Stankiewicz, 1985) como en otros sistemas parásito-hospedador (Sinski y Holmes, 1977; Williams y Burden, 1987).

#### 1.4.3.b.1. Coproanticuerpos

Dado el elevado precio de los animales de experimentación, así como otras razones, se ha intentado la estimación de anticuerpos en las heces ("coproanticuerpos") como una medida indirecta de la respuesta local en el tracto gastrointestinal. Dichas estimaciones se han llevado a cabo tanto en algunas protozoosis (Williams y Burden, 1987), infestaciones por N.brasiliensis en rata (Wedrychowicz y col., 1983, 1985), infestaciones por T.colubriformis (Maclean y col., 1986) como en hemoncosis ovina (Wedrychowicz y col., 1984a).

Mediante un estudio comparativo de los niveles de anticuerpos hemaglutinantes en distintos compartimentos orgánicos (suero, mucosa intestinal y heces), Wedrychowicz y col. (1983) observaron que en ratas infestadas con N.brasiliensis, la estimación de coproanticuerpos constituía una buena medida de la respuesta local en la mucosa entérica, con un modelo diferente del hallado en suero. Aparentemente estas diferencias, además de por el posible transporte desde el suero a la mucosa, por la estimulación patotópica de ésta, quizás estuviera relacionado con los diferentes mecanismos efectores sistémicos y locales. En pruebas vacunales con larvas irradiadas y no irradiadas de T.colubriformis, Maclean y col. (1986) mostraron que los niveles de anticuerpos específicos en heces reflejaban los valores de anticuerpos en el contenido intestinal y por ello podrían ser

empleados en dichas infestaciones como un índice sensible.

Los únicos resultados obtenidos en la hemoncosis, con estudios comparativos de anticuerpos en la mucosa y en las deyecciones han sido obtenidos por Wedrychowicz y col. (1984a). Desgraciadamente sus resultados no fueron concluyentes. Ni los niveles de IgG e IgM totales en heces fueron superiores a los hallados en los testigos no infestados. No existieron diferencias en los niveles de anticuerpos hemaglutinantes en las vacunadas y testigos y los niveles de IgA fecales anti-Haemonchus fueron dependientes de los planos de alimentación. Por ello constituye un campo abierto a la investigación.

#### 1.4.4. Vacunación

Se han llevado a cabo numerosos estudios con el objeto de provocar respuestas inmunitarias protectoras en el ganado ovino frente a las infestaciones por H. contortus e implicando tanto infestaciones con L-3 viables, L-3 atenuadas, extractos antigénicos y antígenos individuales (ver Emery y Wagland, 1991).

Entre las pruebas de infestaciones con larvas infestantes y reinfestaciones ("challenges"), además de las pruebas tendentes a estudiar la dependencia de la resistencia de la edad del ganado ovino (vide supra) podríamos citar a Smith (1977b), quien mediante dosis repetidas de H. contortus en corderos de 6 meses de edad no logró ninguna protección. De una forma general, es posible conseguir inmunizaciones tras primoinfestaciones con el parásito en individuos ovinos adultos, pero no en corderos (Manton y col., 1962; Urquhart y col., 1966; Knight y Rodgers, 1974; Charley-Poulain y col., 1984 ; Kassai y col., 1990; Abbot y Holmes, 1990 ) salvo en el caso de corderos precoces (Romanov, Florida) (Berezhko y col., 1987; Neilson y Van de Walle, 1987;

Zajac y col., 1990).

De una forma similar, los niveles de protección logrados mediante el empleo de L-3 irradiadas de H. contortus ha dependido dramáticamente de la edad de los hospedadores, dosis inmunizantes y el sistema de irradiación de las L-3.

En efecto, al menos son necesarias 2 dosis de L-3 irradiadas (40 Krad) para lograr un grado consistente de inmunidad protectora frente a las reinfestaciones, siendo las dosis de radiación más elevadas (p.e. 60 Krad) incapaces al haber perdido las L-3 su poder inmunógeno (Sivanathan y col., 1984).

Smith y Christie (1978) lograron, tras dos dosificaciones de L-3, una adecuada protección en ovejas de más de 7 meses y Duncan y colaboradores, en el mismo año, consiguieron una buena inmunización con larvas tratadas similarmente en ovejas de 1 año de edad y no pudieron lograrlo en corderos de 60 días de vida (Duncan y col., 1978). Hallazgos comparables fueron obtenidos por Smith y Angus (1980), tras la vacunación de ovejas adultas con 2 dosis de L-3 irradiadas. El mismo tratamiento, sin embargo, en corderos de 2 meses de edad, no provocó protección alguna, ni siquiera cuando simultáneamente se administraba -parenteralmente- a los corderos una mezcla antigénica y adyuvante.

Los intentos de inmunización con extractos antigénicos de H. contortus han dado lugar a resultados similares a los obtenidos en las pruebas de vacunación anteriores. Han dependido de la edad de los corderos (Smith, 1977a versus Neilson y Van de Walle, 1987; Adams, 1989), de la procedencia de los extractos antigénicos empleados (L-3, L-4, adultos) y del tipo de antígenos administrados (extractos totales, antígenos somáticos, metabólicos, de secreción/excreción, purificados), vía de administración y presencia o ausencia de coadyuvantes.

Aunque, en general, las L-3 son consideradas habitualmente más antigénicas (p.e. Charley-Poulain y col., 1984), Smith (1977a) no fue capaz de provocar una respuesta protectora en corderos de 6 meses de edad con un extracto soluble de L-3 y L-4 más adyuvante de Freund. Más recientemente, Adams (1989) logró una buena protección empleando como inmunizante un sonicado completo de adultos de H. contortus, protección no lograda cuando se empleó una cantidad equivalente del sonicado total de larvas del parásito.

Una posible razón para explicar algunos de los fallos vacunales podría ser el empleo de algunos adyuvantes. Adams (1989) obtuvo sus mejores resultados sin coadyuvante y, de hecho, los ensayos realizados con coadyuvante mostraron un incremento de la receptividad a las infestaciones por el nematodo gástrico. Habría que señalar que resultados similares fueron obtenidos en infestaciones en cobayas con T. colubriformis. La adición, en este modelo, de adyuvante de Freund (completo o incompleto) a una inyección subcutánea no incrementó la capacidad inmunizante de los homogeneizados de vermes, lo que podría indicar que los materiales somáticos de los helmintos poseen, al menos, sustancias funcionalmente equivalentes a los coadyuvantes (Rothwell y Love, 1974).

A pesar de estos resultados de protección, superiores al 80% en corderos de más de 6 meses de edad, mediante irradiación, en las reinfestaciones homólogas (H. contortus) y entre un 30-40% en las heterólogas (T. colubriformis) (Smith y Angus, 1980; Adams y col., 1989), las elevadas dosis necesarias (> 20000 L-3 de H. contortus / animal) hicieron poco práctica esta aproximación. Por otra parte, los problemas surgidos con los coadyuvantes y la posibilidad de interferencia entre los antígenos inmunógenos y los no inmunógenos en los extractos totales, señalaron la necesidad de emplear en los ensayos vacunales mezclas antigénicas más definidas: fraccionamiento de mezclas antigénicas complejas,

identificación de inmunógenos in vitro, aislamiento de antígenos específicos y/o aislamiento de enzimas específicos (Emery y Wagland, 1991).

Entre los experimentos iniciales, dado el importante papel desempeñado por los antígenos de secreción/excreción (Capron y Dessaint, 1988), debe reseñarse el estudio llevado a cabo por Neilson (1975) con antígenos metabólicos producidos in vitro, durante la transformación de L-3 a L-4, aunque sin valor protector alguno, probablemente por la existencia simultánea de antígenos funcionales y no funcionales que podrían bloquear o interferir con la inducción de la respuesta protectora en el ganado ovino, posibilidad ésta señalada por Lightowlers y Rickard (1988) cuando se empleaban cultivos de larvas in vitro como fuente de antígenos metabólicos. En un ensayo experimental en corderos de Florida Native (reactivos), se han logrado, sin embargo, niveles parciales de protección frente a H. contortus empleando algunas fracciones antigénicas de alto y bajo peso molecular (Neilson y Van de Walle, 1987) así como utilizando una fracción de adultos de H. contortus enriquecida en "contortina" (Munn y col., 1987) y una cierta reducción en la fertilidad de los vermes en abomaso mediante una mezcla de fluido de desvainamiento de L-3 (Boisvenue y col., 1987). Jasmer y McGuire (1991) lograron una protección del 65% (cabritos) al 80% (cabras) con un extracto de antígenos del tubo digestivo de adultos de H. contortus.

Aunque los ensayos de vacunación de ganado ovino con colágeno parasitario no provocaron ninguna protección (Boisvenue y col., 1991), se han obtenido resultados espectaculares más recientemente con los antígenos H110D y H45D de adultos de H. contortus, con porcentajes de protección para H110D del 90% respecto a la implantación de vermes y disminuciones del 94% en la eliminación fecal de huevos (Smith y Munn, 1990; ver Emery y Wagland, 1991).

#### 1.4.5. Diagnóstico inmunológico

La caracterización antigénica de las especies parásitas de interés y, en particular, de nematodos tiene gran importancia por sus implicaciones diagnósticas, inmunoproliféricas e inmunomoduladoras (Parkhouse y col., 1987), de modo especial después del establecimiento de nuevas tecnologías que podrían poner a nuestra disposición sistemas sencillos para obtener péptidos antigénicos de valor similar a los obtenidos a partir de los propios vermes parásitos (Miller, 1986; Simpson, 1986, entre otros).

Dichas investigaciones, llevadas a cabo mediante diferentes tecnologías y aproximaciones, se han realizado tanto con antígenos somáticos, de superficie y de secreción/excreción (ver Lightowlers y Rickard, 1988; Capron y Dessaint, 1988). En el caso de H. contortus se han llevado a cabo caracterizaciones de una forma similar desde hace algún tiempo (Neilson, 1969; Ozerol y Silverman, 1969, 1970; Neilson, 1975) y más recientemente se ha procedido a una caracterización más exhaustiva mediante tecnologías más sensibles (Cox y col., 1989; Shamansky y col., 1989; entre otros). Además del estudio de los antígenos de H. contortus utilizables, se ha intentado la determinación de constituyentes parasitarios circulantes en sus hospedadores, pero hasta donde se conoce tales antígenos o no existen (Petit y col., 1981) o se hallan en concentraciones tan bajas que hasta ahora no han sido señalados.

La caracterización de H. contortus se ha llevado a cabo, teniendo en cuenta los variables resultados obtenidos en pruebas de protección (vide supra y Smith y Christie, 1978; Charley-Poulain y col., 1984; Adams, 1989), con L-3, L-4, adultos y antígenos de secreción / excreción.



Los primeros estudios fueron llevados a cabo por Neilson (1969) mediante fraccionamientos (Sephadex G-50, G-100 y G-200), del extracto somático de larvas y productos de excreción y secreción de H. contortus y posterior disco electroforesis con las fracciones obtenidas. Mediante estos procedimientos de separación, halló diferencias cuantitativas y cualitativas entre ambas fuentes proteicas, por lo que sería esperable que también existiesen diferencias antigénicas.

Las caracterizaciones llevadas a cabo por Ozerol y Silverman (1969, 1970) mediante cromatografía (G-200), electroforesis en acrilamida y espectros de infrarrojo de líquidos de muda de las fases larvarias histotropas, mostraron la existencia de dos picos en cada fuente proteica (L-3, L-4), estando restringida la actividad serológica al primer componente metabólico y parecía estar relacionado con la protección. Por fraccionamiento en Bio-Gel (A-1.5 m), la mayoría de los productos metabólicos de L-3 y L-4 mostraron modelos idénticos de separación, con peso molecular (PM) de 650, 240 y 35 kilodaltons (KDa). La electroforesis posterior señaló que cada una de las fracciones contenía entre 2 y 6 bandas, siendo la glicina el aminoácido más abundante. Los estudios de Neilson (1975) abundaron en el estudio de los antígenos de muda (L-3 a L-4) aunque localizaron tanto componentes funcionales, como no funcionales, que podrían bloquear o interferir con la respuesta.

Tras estos primeros estudios, y al contrario que con otros Trichostrongyloidea (ver p.e. Wedrychowicz y Bezubik, 1981; Wedrychowicz, 1986; Wedrychowicz y col., 1986: en Te. circumcincta; O'Donnell y col., 1985; Milner y Mack, 1988: en T. colubriformis; Keith y col., 1990: en O. ostertagi y Te. circumcincta), los estudios sobre los componentes proteicos de H. contortus, independientemente de su poder antigénico fueron relativamente escasos y sólo a partir de finales de los ochenta se han iniciado dichos trabajos. Cabe señalar, sin embargo, la

contribución de Clarke y Slocombe (1984) sobre el líquido de muda y extractos somáticos de L-3 y hembras del parásito.

Se han seguido, en general, dos líneas de estudio: proteínas cuticulares y componentes relacionados con las mudas. Sólo recientemente se han llevado a cabo otros estudios, como la caracterización molecular de la tubulina, diana de los benzimidazoles frente a H. contortus, y que parece tener un PM algo superior a 42 kDa (Lubega y Prichard, 1990).

Gamble y col. (1989) obtuvieron una proteasa de 44 KDa (p44) relacionada según dichos autores con la muda de la larva infestante de H. contortus, que regulaba o era la llave del desarrollo del ciclo de los Trichostrongylidae de rumiantes. Esta proteasa sería una zinc-metaloproteasa de PM 44 kDa que permitiría la digestión de la porción anterior de la 2ª cutícula de la L-3 del helminto y los sustratos parecían ser 3 moléculas proteicas de PM estimados en 160, 120 y 105 kDa, de solubilidades decrecientes. Por el contrario, los demás componentes de la cutícula no se solubilizaban y requerían, para su extracción, la presencia de agentes reductores y detergentes. Los productos de degradación oscilaron entre los 30 y 60 kDa (Gamble y col., 1990). Además de esta metaloproteasa (p44), mediante técnicas histoquímicas, se ha demostrado la existencia de glucoproteínas ya presentes en las L-3 antes de desenvainarse, de función presumiblemente lubricante, de PM diferente a la p44 (Bird, 1990).

A pesar del interés básico de estos estudios de caracterización proteica de H. contortus, su poder inmunizante en ganado ovino no ha sido estudiado. Además, aunque este punto podría constituir una diana potencial en trichostrongílidos, probablemente la respuesta inmune del hospedador no fuese efectiva, ya que el lugar de secreción y acción de estas enzimas (espacio intracuticular) era inaccesible para los anticuerpos

del hospedador o para las células inmunes efectoras, era de vida media corta y el proceso se completaba antes de que el verme llegase al abomaso (Gamble y col., 1989).

Un aspecto interesante serían las posibles diferencias en la expresión de proteínas y, consiguientemente, las diferencias antigénicas presentes en los distintos estadios de desarrollo del nematodo (Parkhouse y col., 1987), especialmente teniendo en cuenta las distintas antigenicidades señaladas en H. contortus por los diferentes autores (ver Smith y Christie, 1978 versus Adams, 1989).

Se han hallado en H. contortus diferencias en las proteínas marcadas con yodo radiactivo en L-3 desenvainadas, L-4 y las cutículas de adultos, evidenciadas por las incubaciones frente a antisuero obtenido en conejo, responsabilizando a esta variación antigénica de estadio del curso de las infestaciones primarias y la resistencia tras las reinfestaciones en individuos reactivos. De todas las proteínas de superficie observadas, las de 24 y 36 KDa de la L-3 fueron las que estaban más débilmente asociadas a la cutícula (Cox y col., 1989; 1990b). El tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS), mercaptoetanol, colagenasa, provocaba la aparición de patrones muy complejos de proteínas solubilizadas.

Sin embargo, existen evidencias de la similitud de las cutículas de nematodos (Fetterer y Urban, 1988; Fetterer, 1989) y se ha sugerido que las proteínas cuticulares analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de H. contortus eran similares, tanto en fases larvarias como parásitas, al menos cualitativamente a otras especies de nematodos (Ascaris suum, ~~Caenorhabditis elegans~~ y Meloidogyne incognita) y que las diferencias de las proteínas, tanto cuantitativas como cualitativas, específicas de los estadios de H. contortus, podían constituir un suceso común en el desarrollo de los nematodos. Aunque esta similitud podría constituir una

buena aproximación (teórica) con fines inmunoproliféricos, supone una seria limitación en el estudio de la respuesta específica.

Gran parte de estos estudios se han realizado asumiendo que las respuestas obtenidas en modelos experimentales eran comparables a las halladas en los hospedadores naturales. Así, O'Donnell y col. (1985), en ganado ovino (primoinfectados, vacunados, reinfestados) y en infestaciones en cobayas (resistentes y parcialmente resistentes), no hallaron diferentes patrones de reconocimiento antigénico, mediante Western blots (inmunodetección). Estos autores fueron incapaces de reconocer a los posibles antígenos implicados en la respuesta inmunitaria protectora, quizás por un mayor papel de la inmunidad celular, papel más relevante de las inmunoglobulinas de isotipo no IgG (IgM, IgA) o escaso poder inmunógeno de los antígenos protectores y por ello difícilmente reconocibles. En esta línea, Dopheide y col. (1991), mediante el uso de antisueros de cobayos, aislaron y caracterizaron molecularmente una proteína de 11 KDa, cuya expresión estaba regulada por mRNA en L-4 y adultos, de extracto soluble de T.colubriformis, la cual mostraba una fuerte acción protectora.

No obstante, en las infestaciones por H.contortus, Adams (1990) en ratones inmunodeprimidos (dexametazona, ciclosporina o con cimetidina) infestados con el nematodo, aunque obtuvo desarrollos similares a los hallados en ganado ovino, las pruebas de doble inmunodifusión mostraron líneas de precipitación distintas con los sueros de las ovejas y de los ratones, frente a extracto soluble de adultos de H.contortus; lo que sugería que el sistema inmune del ratón y de la oveja reconocían diferentes antígenos del parásito.

A pesar de las ventajas de los inmunodiagnósticos en las tricostrogilidosis y el valor de los sistemas de detección de

anticuerpos, por la gran variedad de antígenos utilizables y su fácil metódica, no han sido muy abundantes los estudios llevados a cabo y además, han producido resultados dispares. En las ostertagiosis de terneros (O.ostertagi), los títulos seriados (ELISA) de IgG, IgA e IgM, han sido demasiado bajos para ser utilizables en el diagnóstico (Klesius y col., 1986). Entre las posibles razones para esta falta de sensibilidad, ya observada en otros modelos (Charley-Poulain y col., 1984), se ha señalado la complejidad antigénica de los extractos empleados. Sin embargo, el estudio mediante inmunodetección de los antígenos de L-3 y adultos de Te.circumcincta permitió observar que el ganado ovino resistente reconocía a partir del día 32 p.i., un único antígeno soluble de 31 kDa (McGillivery y col., 1989).

La exploración de antígenos de valor diagnóstico en el suero de ganado infestado con H.contortus no ha permitido observar su existencia (Petit y col., 1981), por lo que los escasos estudios de caracterización antigénica se han dedicado a la determinación de estos antígenos por el reconocimiento de los sueros de individuos infestados. Hasta donde sabemos la información ha sido obtenida en animales reactivos (Haig y col., 1989) y en animales inmunizados (Hendrikx, 1990).

Mediante inmunodetección, Haig y col. (1989) identificaron algunos antígenos inmunodominantes de la larva infestante de H.contortus, cuyos PM eran 15-18, 25-29, 70-80 y >100 KDa. Por su parte, Hendrikx (1990), además de una elevada antigenicidad cruzada con otros helmintos en las regiones de PM elevado, observó que la mayor reactividad en las mezclas séricas se hallaba entre 20 y 40 kDa, en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Desgraciadamente, la mayoría de las infestaciones por tricostrongílidos, en condiciones naturales, son pluriespecíficas. Existen evidencias de inmunidad cruzada entre H.contortus y ~~otros nematodos gastrointestinales ovinos (vide~~

supra y Blanchard y Wescott, 1985; Adams y col., 1989); antigenicidad cruzada (Charley y col., 1981; Anderson y col., 1989; Shamansky y col., 1989; Gamble y col., 1990); los estudios analíticos (SDS-PAGE, 2DE) de T.colubriformis y Te.circumcincta han demostrado una elevada homología proteica (Milner y col., 1987); y la caracterización antigénica ha permitido incluso, en ocasiones, el hallazgo de antígenos compartidos entre O.ostertagi y Fascioloides magna (Cross y col., 1988).

En el caso de H.contortus, Anderson y col. (1989), utilizando un heterohibridoma (clase IgG2, frente a Te.circumcincta en ovejas), observaron que tanto con los antígenos solubles de L-3 del parásito, como con los de L-3 y adultos de H.contortus, el heterohibridoma reconocía mediante Western blot, una banda proteica de PM estimado de 40 KDa.

Cox y col. (1990a) mediante un antisuero de conejo (frente a un péptido de 18 aa de longitud de secuencia, carbono terminal de la proteína de colágeno de H.contortus que era sintetizada y acoplada a una proteína portadora) y mediante Western blots, demostraron el reconocimiento de una banda > 68 KDa ampliamente distribuida dentro del Phylum Nematoda. Estas similitudes antigénicas, también observadas por Hendrikx (1990) podrían relacionarse con el estrecho parentesco de algunos nematodos gastrointestinales (Beh y col., 1989) así como con la existencia de componentes muy conservados (Shamansky y col., 1989).

En efecto, los estudios mediante endonucleasas de restricción con Eco RI del ADN de H.contortus, T.colubriformis y Te.circumcincta mostraron fuertes homologías - además de las diferencias- con bandas de 2,7 y 1,4 kpb tanto en L-3 como en adultos de los nematodos (Beh y col., 1989) e incluso se ha observado una gran homología entre los genes que codifican el colágeno de Caenorhabditis elegans y H.contortus (Shamansky y col., 1989; Cox y col., 1990a).

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Material biológico

##### 2.1.1.a. Corderos

##### 2.1.1.a.1. Infestaciones con H. contortus

En el estudio de la respuesta inmunitaria del ganado ovino a las infestaciones por H. contortus se emplearon corderos de raza manchega, suministrados por Industrias Agropecuarias VISAN, Madrid. A la llegada a nuestras instalaciones la edad de los animales era de cuatro a seis semanas y sus pesos oscilaban entre 11 y 14 kg. Cuando los animales fueron instalados en los establos del Departamento de Patología Animal I, se efectuaron análisis coprológicos individuales a fin de conocer las posibles infecciones/infestaciones parasitarias presentes en ellos.

Los análisis coprológicos mostraron una infección por Eimeria spp. con valores entre 450 y 240.000 ooquistes/gr de heces y la presencia de una infestación, en algunos animales, por Strongyloides con una eliminación fecal máxima, en un individuo, de 400 huevos/gr. En ningún caso se observaron huevos de tricostrongiloideos. Los corderos fueron tratados con Amprolium (100 mg/Kg) y Tiabendazol (88 mg/Kg p.v.).

### 2.1.1.a.2. Donadores

Como donadores se utilizaron 9 animales, 8 de ellos de raza manchega:

El animal número 1 (Cuernos) se encontraba infestado experimentalmente con H. contortus. Dicho animal había sido infestado con 7000 L-3 de esta especie a los 5 meses de edad y permaneció en nuestras instalaciones 10 meses más.

Cuatro corderos manchegos (animales nº 70, 77, 69 y 80) fueron adquiridos en una explotación de Noez (Toledo) cuando tenían alrededor de 4 semanas. Los análisis coprológicos efectuados revelaron la presencia de una infección por coccidios que se controló con Amprolio (100 mg/Kg). Los animales se mantuvieron en nuestras instalaciones hasta los tres meses de edad en condiciones que excluían las infestaciones por *Trichostrongyloidea*.

El otro grupo de donadores, de raza manchega (animales O, G, C y B) nacieron en nuestras instalaciones. Los animales se mantuvieron con alimentación materna y fueron tratados, al igual que el lote anterior, con Amprolio a la dosis indicada.

### 2.1.1.b. Conejos

Los conejos (H y B) (New Zealand X California gigante blanco) de dos meses de edad, procedían de la Escuela de Ingenieros Agrónomos (Universidad Politécnica de Madrid). Mientras permanecieron en nuestras instalaciones fueron alimentados con pienso comercial y agua ad libitum.

### 2.1.1.C. Parásitos

Se han empleado en nuestra experimentación L-3 y Adultos de Haemonchus contortus, así como L-3 de Teladorsagia circumcincta, Trichostrongylus colubriformis y Nematodirus battus.

Las larvas infestantes, fueron, en principio, cedidas por el Departamento de Patología Animal I, que habían sido obtenidas originalmente de Merck Sharp and Dohme, España, con el fin de poder infestar nuestros propios donadores; sin embargo debido al excesivo almacenamiento de las larvas de Ta.circumcincta, éstas perdieron su capacidad infestante, por lo que solicitamos al Laboratorio Agropecuario de Zaragoza (ITEA) un nuevo aislado de dicha especie, que fue cedido por el Dr. J. Uriarte.

Los adultos de H.contortus fueron obtenidos a partir de infestaciones experimentales realizadas en las instalaciones de Merck Sharp and Dohme, España.

### 2.1.2. Material de laboratorio

#### 2.1.2.a. Material general

- Recipientes plásticos de polietileno
- Cristalizadores de vidrio de 14 cm de diámetro
- Copas de sedimentación de 1000 ml
- Cubetas para tinción
- Chupetes de látex
- Duquesas de plástico de 1000 ml
- Espátulas
- Esponjas (Trans-Blot)

- Gradillas metálicas en "z" para tubos y eppendorf
- Guantes de plástico y de látex de un solo uso
- Homogeneizador de vidrio de 7 ml (Pobel)
- Morteros de porcelana
- Papel de filtro
- Pipetas de 1,5 y 10 ml
- Pipetas Pasteur de 150 y 230 mm de longitud
- Placas de Petri de 9 cm de diámetro
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Probetas de 50, 100 y 1000 ml de capacidad
- Punzones
- Sacabocados
- Tijeras y pinzas
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Tubos de vidrio y de poliestireno de 10 ml para centrifuga

#### 2.1.2.b. Material para análisis coprológicos

- Aparato Baermann
- Bolsas de recogida de heces
- Cámaras de McMaster
- Jaulas metabólicas
- Mallas metálicas de 500, 150 y 50  $\mu$ m de luz

#### 2.1.2.c. Material para hematología

- Agujas cono Luer (7 X 30 mm) y (9 X 25 mm) (Becton Dickinson)
- Capilares de vidrio de 70 X 1 mm
- Jeringas de un solo uso de 10 ml (Becton Dickinson)
- Membrana de transferencia Immobilon -P (Millipore)

- Pipetas automáticas, P20, P200 y P1000 (Gilson)
- Pipetas multicanal de 50 y de 250  $\mu$ l (Gilson)
- Placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Nunc)

#### 2.1.2.d. Reactivos generales

- Ac. Acético glacial (Probus)
- Ac. Cítrico (Panreac)
- Ac. Clorhídrico (Probus)
- Ac. Etilenodiaminotetraacético (Sigma)
- Ac. Fosfórico (Merck)
- Acrilamida 99 % de pureza (Merck, Sigma) y 95 % de pureza (TDI)
- Agarosa (Sigma)
- Agua oxigenada (Foret)
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
- Azida sódica (Scharlau)
- Azul de Coomassie G 250 (Merck)
- Azul de Coomassie R 250 (Merck)
- Bicarbonato sódico (Probus)
- Carbonato sódico anhidro (Probus)
- Cloruro potásico (Merck)
- Cloruro sódico (Probus)
- Deoxicolato sódico (Sigma)
- Dietil Barbiturato sódico
- Dioxano (Analar)
- Dodecil sulfato sódico (Merck, Sigma)
- Etanol (Probus, Merck)
- Fenil metasulfonil fluoruro (Merck)
- Fosfato disódico (Panreac)
- Fosfato potásico (Panreac)
- Glicerina (Probus, Merck)

- Glicina (Panreac, Boehringer)
- Hidróxido sódico (Panreac)
- Ioduro potásico (Probus)
- Lache en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé)
- Marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia)
- 2 - Mercaptoetanol (Merck)
- Metanol (Panreac, Merck)
- N - Metil bis(acrilamida) (Merck)
- Negro amido (Merck)
- Persulfato amónico (Probus, Merck)
- Sacarosa (Panreac)
- Sulfato cúprico
- Sulfato sódico
- Tartrato sódico potásico (Probus)
- 3',3'',5',5''Tetrabromofenol sulfonftaleína (Sigma)
- N,N,N',N' - Tetrametiletileno diamina (Merck)
- Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck)
- Tween 20 (Merck)

#### 2.1.2.a. Reactivos para serología

- Acido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolinsulfónico)  
(Boehringer)
- 4-Cloro-1-Naftol (Bio-Rad)
- 1,4 P- Nitrofenil fosfato
- Anti-IgG de Oveja obtenida en conejo marcada con  
fosfatasa alcalina (lot. M3932 Bio-Rad)
- Anti-IgG de oveja obtenida en conejo marcada con  
peroxidasa de rábano picante (lot. M5395 Bio-Rad)
- Anti-IgG de oveja obtenida en conejo marcada con  
peroxidasa de rábano picante (lot. M4501 Bio-Rad)
- Anti-IgG de oveja obtenida en asno marcada con  
peroxidasa de rábano picante (lot.18F-8860 y lot. 40H-8826)

Sigma)

- Anti-IgG de conejo obtenida en cabra marcada con peroxidasa de rábano picante (70516 Bio-Rad)
- Anti- IgA de oveja obtenida en cerdo (lot.249I Moredun Research Institute, Edinburgh)
- Anti-IgM de oveja obtenida en conejo (Nordic)
- Anti-IgG de cerdo obtenida en conejo marcada con peroxidasa de rábano picante (lot. 20H8920 Sigma)

#### 2.1.2.f. Equipamiento

- Agitadores orbitales (SBS y Heidolph Reax 2000)
- Agitadores magnéticos (A-05-SBS y Agimatic Selecta)
- Balanza analítica monoplato (PE2000 Mettler)
- Balanza de precisión (H43 Mettler)
- Baño termostataado (Mod. Unitronic 320 OR, Selecta)
- Bomba de vacío
- Centrifuga preparativa refrigerada (Beckman J21) con rotor JA20
- Centrifugas de mesa (Heraeus Mod. Combifuge; Selecta Mod. Centronic y Orto Mod. Tornax)
- Centrifuga para microhematocrito (Gricel Mod.61)
- Colorímetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb)
- Cubetas de electroforesis verticales de 12,5- 12,5 y de 20-20 cm; así como separadores de 1 mm (Lagoplast)
- Cubeta Trans-Blot Cell, con cartucho de transferencia y serpiente n° 170 3911 (Bio-Rad)
- Escala para la lectura de microhematocrito (Gricel)
- Espectrofotómetro Hitachi 4-1100 (Vis-UV)
- Estufa de cultivos (Selecta Mod. 210)
- Fuente de alimentación de electroforesis (EC-Apparatus Corporation, Mod. EC-105)
- Fuente para transferencia Trans-blot de voltaje constante

(Mod. 200/2.0 BioRad)

- Lector de ELISA (EAR 400)
- Lector de tiras de acetato de celulosa (Atom)
- Microscopio (Leitz Wetzlar mod. HM-LUX 3)

## 2.2. METODOS.

### 2.2.1. Mantenimiento de los animales

#### 2.2.1.a. Alimentación y alojamiento

a) El animal nº 1 (cuernos) fue cedido para nuestro experimento siendo un animal adulto y su alimentación consistió en pienso para oveja, heno de alfalfa y agua ad libitum. En el establo la paja era cambiada dos veces por semana, impidiéndose las posibles reinfestaciones. Sus heces eran recogidas mediante una bolsa que se sujetaba a la parte posterior del animal, por medio de arneses.

b) Todos los corderos utilizados en nuestro trabajo, cuando llegaron a nuestras instalaciones ya habían sido destetados; se les permitió su adaptación a los establos así como a la nueva alimentación. Se mantuvieron en observación realizándoles los análisis coprológicos pertinentes para determinar la carga parasitaria existente, al mismo tiempo que se comprobó la validez de dichos animales para nuestros experimentos, al no aparecer en sus heces huevos de tricostrongiloides.

Los establos fueron desinfectados con Zotal (R), tanto suelos como paredes. Durante el invierno se introdujeron en los establos, radiadores, que permitían alcanzar una temperatura no

inferior a los 18 °C. Los animales dispusieron de yacijas de paja en el suelo, para su mejor aislamiento. Dispusieron de agua ad libitum. La cantidad inicial de pienso fue 100 g de pienso de destete por animal/día; en tres días aumentamos la cantidad a 250 g/animal y una semana después ya disponían de 300 g/animal. Un mes después de la llegada de los animales se cambió el tipo de pienso (pienso de hasta 3 meses de edad), 500 g/animal; posteriormente recibieron pienso de cebo, el cual fue suprimido durante el verano. Aproximadamente al año de edad, se les administró pienso de ovejas. Los animales dispusieron de heno de alfalfa libremente. Una semana antes de cada infestación los animales eran separados, en dos lotes, situados en establos distintos y alimentados y mantenidos de igual forma.

Los donadores # 69, 70, 77 y 80 fueron mantenidos en observación a su llegada, al igual que se realizó con los corderos anteriores; la alimentación fue similar. Dispusieron de agua y alfalfa ad libitum y una vez infestados los animales con las distintas especies de tricostrongiloides fueron instalados en jaulas metabólicas metálicas, lo que permitía su desinfección; poseían comedero de amplias dimensiones donde era colocada la alfalfa, una bandeja con la cantidad de pienso administrado y bebedero. En la parte inferior de las jaulas se dispuso una malla cuyo tamaño de poro permitía el paso de la orina, pero impedía el paso de las heces, con lo cual cada día podíamos recoger las heces necesarias para la obtención de los huevos de cada especie.

c) Los donadores O, G, C y B fueron alimentados por sus madres, un mínimo de dos meses. Una vez destetados los corderos, pasaron a tomar los distintos tipos de pienso citados anteriormente en las cantidades establecidas dependiendo de las distintas edades. Después de infestados, fueron instalados en jaulas metabólicas.

## 2.2.1.b. Programa higiénico - sanitario

Con independencia de los tratamientos antiparasitarios que los animales recibieron a su llegada a nuestras instalaciones (vide supra) y los tratamientos antihelmínticos utilizados en nuestro diseño experimental, que serán pormenorizados en la sección correspondiente, los animales recibieron algunos tratamientos durante su estancia en los establos.

A los 14 meses de edad, dos animales (nº 67 y 89), accidentalmente consumieron más cantidad del pienso establecido, apareciendo diarrea y postración, que desaparecieron tras la administración de 250 ml de Meteoral [parafina líquida (medicina refinada) 830 mg], 0,3 ml de Neoskin [Neostigmina (metilsulfato) 0,12 mg] y, en el agua de bebida, manzanilla amarga; al día siguiente, recibieron nuevamente Meteoral y se les inyectó un protector hepático (0,6 ml de Bykahepar intramuscular, Clanobutina 200 mg).

Debido a la inoculación con 14000 larvas de tercer estadio, la oveja (nº 65) mostró una ligera anemia. Tras la determinación del valor hematocrito (Ht) por el método de microhematocrito se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla.

Ovejas	Valor hematocrito ( % )
nº 52	32
nº 65	20
nº 66	27
nº 67	28,5
nº 89	27
nº 91	27
nº 92	26
nº 96	26,5
nº 97	26,5

Ya que los valores normales en el ganado ovino oscilan entre 24-50 %, salvo la oveja nº 52, los animales presentaron valores bajos, pero únicamente la oveja nº 65 fue tratada con Cromatonbic 5000 Ferro hasta el final del experimento. Cuando utilizamos al cordero "O" como donador de H. contortus, el número de huevos por gramo de heces fue muy elevado y también presentó anemia, por lo cual se le trató del mismo modo. A los seis corderos nacidos del lote experimental se les inyectó 1 ml de Reavit selenio intramuscular (Selenito sódico 0,50 mg.  $\alpha$ - Tocoferol acetato 80 mg), con el fin de evitar la enfermedad del músculo blanco.

### 2.2.2. Obtención y mantenimiento de L-3 de trichostrongiloides

Los corderos y las dosis infestantes empleadas se muestran a continuación.

#### LOTE 1

Cordero	nº de L-3	Especie Parásita
nº 70	7000	<u>Haemonchus contortus</u>
nº 69	10000	<u>Trichostrongylus colubriformis</u>
nº 77	1400	<u>Nematodirus battus</u>
nº 80	4200	<u>Teladorsagia circumcincta</u>

#### LOTE 2

Cordero	nº de L-3	Especie parásita
O	8000	<u>Haemonchus contortus</u>
B	10000	<u>Trichostrongylus colubriformis</u>
C	1675	<u>Nematodirus battus</u>
G	8000	<u>Teladorsagia circumcincta</u>

### 2.2.2.a. Coprocultivos

Las heces obtenidas de los animales donadores fueron homogeneizadas con espátula desechable y disgregadas con agua. Las incubaciones del material fecal se realizaron en duquesas de plástico de 1000 ml de capacidad a 22-26°C durante 2 semanas. En el fondo de los recipientes se colocó gasa para eliminar el exceso de agua y en los cultivos se introdujo un tubo de ensayo con agua para garantizar un grado de humedad elevado. Los cultivos fueron removidos y aireados diariamente.

#### 2.2.2.a.1. Cultivos fecales de Haemonchus contortus Teladorsagia circumcincta y Trichostrongylus colubriformis

Pasado el periodo de incubación se procedió a separar las larvas de las heces, para lo cual empleamos el método de Baermann. Las heces envueltas en doble gasa y sumergidas en el agua del embudo, con detergente líquido, se mantuvieron durante 12 horas; las larvas, concentradas en el fondo del tubo de goma, fueron recuperadas.

Se emplearon 2 métodos para la limpieza de las larvas obtenidas (MAFF, 1971):

a) Filtrar el líquido que contenía las larvas mediante papel de filtro, permitir que se seque el papel, invertirlo y colocarlo en el aparato de Baermann que previamente dispuso de una gasa doble. Las larvas vivas migraron por el agua al fondo del tubo, mientras que las larvas muertas quedaron retenidas en el papel de filtro. Este método fue muy eficaz para eliminar los nematodos de vida libre así como las larvas no viables pero existió un porcentaje elevado de pérdidas debido a la desecación.

b) Utilización de gradiente de sacarosa: a un tubo de ensayo de 4 ml de la disolución de sacarosa (20 g de sacarosa en 50 ml de agua destilada) se añadieron, gota a gota, 6 ml de la solución con las larvas; a continuación se centrifugó a 2000 rpm durante 3-4 minutos; en el fondo del tubo quedaron los residuos fecales, por encima la sacarosa, seguida de una interfase con las larvas y la última capa superior estuvo formada por el líquido que contuvo inicialmente las larvas. Se tomó esa interfase y se realizaron numerosos lavados con agua con el fin de eliminar los residuos de sacarosa. La ventaja de este método fue la mayor limpieza de las larvas obtenidas aunque el rendimiento fue menor que con la técnica anterior. Ambos métodos se emplearon al inicio de los experimentos pero la mayor recuperación de L-3 con la desecación sobre papel de filtro nos indujo a emplear de forma rutinaria tal técnica.

#### 2.2.2.a.2. Cultivos de Nematodirus battus

Ya que la formación de las distintas fases larvarias hasta el estadio de L-3 tiene lugar dentro del huevo, en esta especie, nos interesó su obtención preliminar. Para ello se disgregaron las heces hasta conseguir que quedasen líquidas. Se filtraron por una malla de 0,5 mm, una de 0,160 mm, quedando los huevos retenidos en una última malla con tamaño de poro de 50  $\mu$ m. Se lavaron con agua y se concentraron por medio de flotación en solución salina saturada; al cabo de 20 minutos se recogió la capa superficial de esta solución salina, y este proceso se repitió varias veces con el fin de obtener la mayor cantidad de huevos. Posteriormente, se realizaron lavados con agua para eliminar la solución salina. A continuación se incubaron dichos huevos a 22 °C en placas de vidrio de gran diámetro para permitir una buena oxigenación de los huevos. Después de 21 días se provocó la salida de las L-3. Para ello se introdujeron perlas

de vidrio y un imán en la placa y por medio de un agitador magnético se provocó la ruptura de los huevos. La limpieza de las larvas se realizó empleando los métodos antes citados (gradiente de sacarosa; desecación sobre papel de filtro) (MAFF, 1971).

#### 2.2.2.b. Mantenimiento de las larvas de tercer estadio (L-3)

Las larvas limpias se mantuvieron hasta su uso, en agua para infestar corderos y para obtener extracto antigénico, en una disolución de tampón fosfato salino (PBS) (0,01 M, pH 7,2) en refrigeración (4-10°C), en ambos casos.

#### 2.2.3. Obtención de adultos de H. contortus

Las formas parásitas adultas de H. contortus (hembras en una gran proporción) se obtuvieron a partir de abomasos de corderos infestados experimentalmente. Tras el sacrificio de los corderos, los cuajares fueron abiertos y sus contenidos se depositaron en recipientes plásticos. Los vermes unidos a la mucosa fueron liberados y se efectuaron lavados sucesivos de los contenidos de los abomasos en PBS frío (0,01 M, pH 7,2; 4°C) para eliminar detritus y facilitar la recolección de los vermes. Los nematodos fueron lavados repetidamente en el mismo tampón, depositados en criotubos y almacenados a -80°C hasta su empleo.

#### 2.2.4. Obtención del material antigénico empleado

Se empleó material antigénico procedente de larvas de tercer estadio de H. contortus así como de adultos de la misma especie.

Las L-3 limpias fueron sometidas a tres ciclos de congelación (- 20 °C) y descongelación (temperatura ambiente), mientras que a los adultos se les sometió a ocho ciclos de congelación y descongelación. A continuación se les trituró mediante un homogeneizador de vidrio, tipo Potter-Elvehjem, en refrigeración (4°C) para reducir, en lo posible, la actividad de las proteasas y la posible multiplicación bacteriana residual. Posteriormente el triturado proteico de ambas fuentes fue centrifugado a 30000 x g, durante 30 minutos a 4°C (Klesius y col., 1986). En los tubos de centrifugación se observaron tres capas; la del fondo formada por membranas, la superior, lipídica y en el centro se halló la fracción proteica; ésta fue recogida cuidadosamente con el fin de no afectar a las otras capas y finalmente se dividieron en alícuotas, en viales, para proceder a su congelación a -80 °C. Una muestra de 100 µl fue empleada para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) consistente en la reacción de las proteínas con el reactivo de Bradford (Azul de Coomassie-G250, etanol y ácido fosfórico). La densidad óptica de dicha coloración se determinó en colorímetro a una longitud de onda de 595 nm. Los valores obtenidos se compararon con los valores que presentó una recta patrón con distintas concentraciones de albúmina sérica y se estimó el rendimiento proteico.

#### 2.2.5. Infestaciones del ganado ovino con H. contortus

##### Experimento 1:

Cuando los corderos alcanzaron los 4 - 4,5 meses de edad fueron divididos en 2 grupos:



### Experimento 2:

Para estudiar la respuesta del ganado ovino manchego mayor de 1 año de edad y evitar el desconocimiento de la historia de los animales, decidimos emplear los mismos individuos. Por ello, al final de la infestación con 5000 L-3 de los corderos, éstos fueron medicados con Tiabendazol (88 mg/ Kg p.v.) chequeados y mantenidos juntos hasta alcanzar los 12 - 12,5 meses de edad. En dicho momento se dividieron nuevamente en 2 grupos:

#### El grupo A':

Hembras	Machos
nº52	nº67
nº66	nº89
nº91	

#### El grupo B':

Hembras	Machos
nº97	nº96
nº65	
nº92	

El grupo A' fue infestado con 7000 L-3 de H. contortus de la misma procedencia; el grupo B' fue mantenido como testigo. La infestación se extendió durante 59 días al cabo de los cuales todos los animales recibieron un tratamiento antihelmíntico, (Rafoxanida, 7,5 mg/ Kg). Doce días más tarde ambos grupos (A' y B') fueron enfrentados a una dosis única de 14000 L-3 del parásito. Dicha infestación se mantuvo durante 45 días, hasta que se observó una importante elevación periparto en un individuo (nº

91) y finalmente fueron medicados con Rafoxanida a la misma dosis. En la Fig. se muestra el diseño experimental.

Ovino >1año

Grupo A':	7000 L3	-----	14000 L3	-----
	Tto.		Tto.	
Grupo B':	-----14000 L3-----			

A lo largo de los experimentos, se realizaron tomas de muestras de sangre una vez antes de cada infestación y 2 veces/semana durante cada experimento. Las muestras fecales para la determinación de inmunoglobulinas, dos veces por semana en el experimento 1, y una vez por semana en el experimento 2. Se determinaron los niveles puntuales de proteínas séricas totales en la prepatencia y patencia de cada infestación.

Se realizaron análisis coprológicos individuales y diariamente durante la patencia de la primoinfestación del Grupo A, cada dos días durante la reinfestación del Grupo A y primoinfestación del Grupo B en el experimento 1. En el segundo experimento se realizaron tres veces por semana en la patencia de la primoinfestación del Grupo A' y, diariamente, durante cuarenta y cinco días tras la dosis de prueba con 14000 L-3 de H. contortus.

#### 2.2.6. Análisis coprológicos

La eliminación fecal de huevos de tricostrongiloides y de oocistas de coccidios se estimó mediante una modificación del método de McMaster (MAFF, 1971). Brevemente, se emplearon 3 g de heces tomadas directamente de recto que fueron homogeneizadas en

42 ml de agua. Tras el filtrado de la emulsión fecal a través de mallas (0,5 mm y 0,150 mm) se recogieron 10 ml y se centrifugaron a 1500 rpm, 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadió una solución saturada de NaCl, se homogeneizó y los recuentos se llevaron a cabo en cámara de McMaster (retícula o toda la cámara, en dependencia de la carga parasitaria). La eliminación se determinó por transformación numérica y se expresó como nº de ooquistes y/o huevos/ gramo de heces (HPG).

#### 2.2.7. Obtención de sueros ovinos

Los sueros se obtuvieron a partir de sangre de la vena yugular de los animales por medio de Vacutainer (R); tras su coagulación durante dos horas a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos, los sueros se distribuyeron en alícuotas (1 ml) y se conservaron en congelación a -20 °C hasta su uso.

#### 2.2.8. Determinación de proteínas séricas

Los niveles de proteínas séricas fueron determinados por el método de Biuret. El principio de este método consiste en la reacción de las proteínas séricas con una solución alcalina de sulfato de cobre, produciéndose un color violeta cuya densidad óptica es leída (usando un blanco como referencia) en un colorímetro, con un filtro OGR1, a 545 nm de longitud de onda.

$$\text{Concentración de proteínas (g/l)} = \frac{\text{D.O. Muestra}}{\text{D.O. Estándar}} (6 \text{ g/100 ml}) \times 10$$

## 2.2.9. Análisis inmunológicos

### 2.2.9.a. Obtención de sueros Hiperinmunes de conejo

Los sueros hiperinmunes de conejo frente a la fracción soluble de L-3 de H. contortus se consiguieron inoculando a dichos animales una emulsión de la fracción citada con adyuvante completo de Freund (FCA). El protocolo de inmunización se realizó según Hudson y Hay (1979). La dosis inmunizante inicial estuvo formada por una disolución 1:1 (1 ml de FCA fue mezclado cuidadosamente con 1 ml de inmunógeno conteniendo alrededor de 1 mg de proteína). Esta emulsión fue inoculada por vía intramuscular en 6-8 lugares de las extremidades de los animales. Este proceso fue repetido cada quince días (recuerdo), para terminar con una inoculación de 1 ml del inmunógeno sin adyuvante. Por último, se obtuvo sangre de la vena marginal de los conejos (H y B) y se comprobó la positividad de los sueros por medio de un ELISA. Cuando el resultado fue satisfactorio se procedió a la obtención de 30 ml de sangre de la oreja de los animales por medio de una bomba aspirante. Se alicuotó el suero (1 ml) y se mantuvo en congelación a -20 °C.

### 2.2.9.b. Obtención del material fecal ovino

Para la obtención de las emulsiones fecales se siguió el protocolo de Williams y Burden (1987). En esencia, se tomaron 2 g de heces de cada animal directamente de recto; se homogeneizaron en 10 ml de tampón fosfato sódico salino que contenía 0,05 % de Tween 20; se centrifugó a 2500 x g durante 30 minutos. A continuación el sobrenadante se centrifugó a 150000 x g en refrigeración (4 °C) durante una hora y el sobrenadante se

alícuotó y se mantuvo en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 2.2.9.c. Doble inmunodifusión en agar

La finalidad de todas las técnicas de inmunodifusión es identificar las reacciones antígeno-anticuerpo por la aparición de una precipitación. Aunque la formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como el agar, depende de electrolitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo. Se siguió la técnica descrita por Ouchterlony (1953).

Para la preparación, la agarosa se disolvió en tampón fosfato salino hasta la concentración final (1,4%, p.v.) en caliente (al baño María o en un plato caliente a  $100-110^{\circ}\text{C}$ ) en ambos casos en agitación. Se dejó enfriar hasta  $56^{\circ}\text{C}$  con agitación, se añadió 0,01 % de azida sódica. El agar fundido se vertió en placas de Petri. Tras la solidificación se realizaron pequeños orificios; las muestras (antígenos y anticuerpos) se situaron en los pocillos y se permitió la difusión durante 18-24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las líneas de precipitación resultantes (Ag-Ac) se observaron en estereomicroscopio en luz indirecta.

#### 2.2.9.d. Inmunoadsorción

Esta técnica consiste en la utilización de un inmunoadsorbente (antígeno) que, previamente fijado a un soporte (placa de microtitulación) forma un complejo con los anticuerpos. Hemos empleado una modificación de la cromatografía

de afinidad descrita por Hudson y Hay (1979). La disociación del complejo mediante tampón glicina 0,1 M, pH 2,8; posterior estabilización de los anticuerpos ya eluidos con Tris pH 8,8; diálisis a 4 °C frente a PBS pH 7,4 y la concentración con Centricon 30 (Amicon) permite la obtención de anticuerpos específicos purificados.

#### 2.2.9.e. Inmunodetección (Western Blotting)

Mediante la técnica de Western Blotting se determinaron las bandas proteicas reconocidas por las inmunoglobulinas existentes en los sueros ovinos y de conejo. La inmunodetección se realizó mediante modificaciones de métodos descritos previamente (Jenkins y Dame, 1987; Shepherd y McManus, 1987; Cross y col., 1988).

##### a) Preparación de las membranas de transferencia

En las pruebas iniciales se emplearon dos tipos de membrana: Nitrocelulosa (45 µm) (BioRad) e Immobilon P (Millipore). La escasa respuesta del ganado ovino y la superior resolución del Immobilon nos aconsejaron usar esta membrana de forma rutinaria. El Immobilon se cortó de forma que sobresaliera 1 cm por cada lado del gel y se sumergió en metanol absoluto durante 1 - 2 segundos, empapándose perfectamente; a continuación se lavó con agua destilada, evitando su flotación, durante 5 minutos para eliminar el exceso de metanol y finalmente se mantuvo en solución de transferencia [(25 mM Tris, 192 mM Glicina; pH ca. 8,3) (TBS) y metanol (20 %, V/V)].

##### b) Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis de proteínas (ver 2.2.10.b.) el gel se situó en la solución de transferencia.

Mientras, se preparó un cartucho de transferencia (esponja, ocho capas de papel de filtro, el gel, membrana de Immobilon, ocho capas de papel de filtro, otra esponja) y se colocó en cámara Trans Blot (BioRad) y solución de transferencia. Se aplicó una corriente de 0,1 A y 30 V durante toda la noche; al día siguiente, se elevó la corriente a 0,56 A (1  $\frac{1}{2}$  h) en refrigeración mediante serpentín. Una vez finalizada la transferencia se procedió a la visualización de la misma, cortando un trozo de la membrana y tiñendo con Negro Amido (0,5 g de Negro Amido, 45 ml de metanol absoluto, 10 ml de ácido acético glacial y 45 ml de agua destilada) durante 5 minutos. Para la observación se decoloró con 47,5 ml de metanol + 5 ml de ácido acético glacial + 47,5 ml de agua destilada. Si la transferencia fue adecuada se procedió con el resto del Immobilon, lavándolo con TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,3 + 0,15 M NaCl) con 0,05 % de Tween 20, en tres ciclos de lavado de 10, 5 y 5 minutos respectivamente, en agitación.

### c) Bloqueo de la membrana, incubación y revelado

Para impedir que las inmunoglobulinas inespecíficas se uniesen al Immobilon, se bloqueó con una solución de 5 % leche en polvo desnatada (Molico, Nestlé) en TBS durante 30 min con agitación; se eliminó el exceso de la solución bloqueadora lavando del mismo modo; se incubó la membrana con el suero a estudiar a la dilución 1/10 en solución bloqueadora a una temperatura de 37 °C, en agitación durante 3 horas; tres ciclos de lavados e incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de oveja obtenido en conejo marcado con peroxidasa (para los sueros de las ovejas). Cuando se determinaron las inmunoglobulinas existentes en los sueros hiperinmunes de los conejos, el segundo anticuerpo fue anti-IgG de conejo obtenido en cabra marcado con peroxidasa; en ambos casos se incubó a 37 °C con agitación durante una hora. Los lavados fueron de 10 y 5 minutos con solución de lavado y 5 + 5 minutos con TBS sin Tween 20.

Posteriormente se procedió a la visualización, empleando un sustrato precipitable (0,5 mg/ml de 4-cloro-1-naftol, disuelto en TBS, metanol con agua oxigenada), en las siguientes proporciones:

- 84 ml de TBS en agitación (sol. A)
- 0,0504 g de 4-cloro-1-naftol disuelto en 16,8 ml de metanol (se añade a sol. A)
- 50,4  $\mu$ l de agua oxigenada (30 volúmenes) (se añaden al final)

La incubación se realizó en agitación y oscuridad, y la reacción se detuvo mediante lavado en agua corriente.

#### 2.2.9.f. Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto

La detección de anticuerpos se realizó mediante un enzimoimmunoensayo "Enzyme - Linked Immunosorbent Assay" (ELISA). Las fracciones antigénicas son adsorbidas a un soporte sólido. Si la muestra biológica contiene anticuerpos contra un cierto agente, los anticuerpos presentes reaccionarán con el antígeno homólogo, previamente adsorbido a la fase sólida, formando así un complejo antigénico - anticuerpo. Este complejo puede ser reconocido por anti-inmunoglobulinas conjugadas a una enzima específica. Se añade un apropiado sustrato y el color desarrollado constituirá una estimación indirecta del nivel de anticuerpos de la muestra. Para la determinación de las condiciones del ensayo se siguió el protocolo de Catty y Raykundalia (1989).

##### a) Determinación de condiciones óptimas de ensayo

Se valoró la potencia de cada lote de los conjugados

comerciales adquiridos. Para ello se realizó un ELISA directo, tapizando las placas de microtitulación con IgG ovina. En la Fig. 2.1. se muestran dos ejemplos representativos.

Para la obtención de las IgG ovinas se recogió sangre de corderos y se obtuvo el suero. Se añadió sulfato sódico al 18 ‰ (p/v), se agitó hasta su disolución y se incubó a 25 °C durante 30 minutos. Tras la centrifugación a 3000 xg durante 30 min., se eliminó el sobrenadante y la proteína precipitada se resuspendió en 25 ml de agua destilada. La disolución fue calentada a 25 °C y se añadió sulfato sódico hasta conseguir una disolución al 14 ‰ (p/v); se agitó e incubó a 25 °C durante 30 min. Se centrifugó de nuevo de forma similar y se eliminó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 15 ml de agua destilada y se dializó frente a PBS (0,07 M) a 4 °C. Finalmente se estimó la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

Las IgG ovinas obtenidas se ajustaron a una concentración de 1 µg/ml y se emplearon en el tapizado de las placas de microtitulación durante 16 h, a 4 °C; como control se utilizó albúmina sérica bovina (100 µg/ml). Tras los 3 ciclos de lavados (PBS + 0,05 ‰ Tween 20) se añadió la anti-IgG ovina conjugada (peroxidasa o fosfatasa). Se realizaron diluciones del conjugado desde 1/100 a 1/204800 incubándose a 37 °C durante 3 h. Tras los lavados se añadieron los sustratos respectivos y se incubación a 37°C durante 30 min. La densidad óptica (D.O.) se estimó a 405 nm. Se comprobó que la potencia de los conjugados comerciales fue la adecuada y como diluciones de trabajo se emplearon 1/600 para la anti-IgG marcada con peroxidasa y 1/800 para la marcada con fosfatasa alcalina. En los ELISA se emplearon conjugados con fosfatasa.

El siguiente paso fue determinar la concentración óptima de los antígenos parasitarios. Se realizó un barrido desde 0,15 µg/ml hasta 20 µg/ml y a la vez se determinó la dilución de

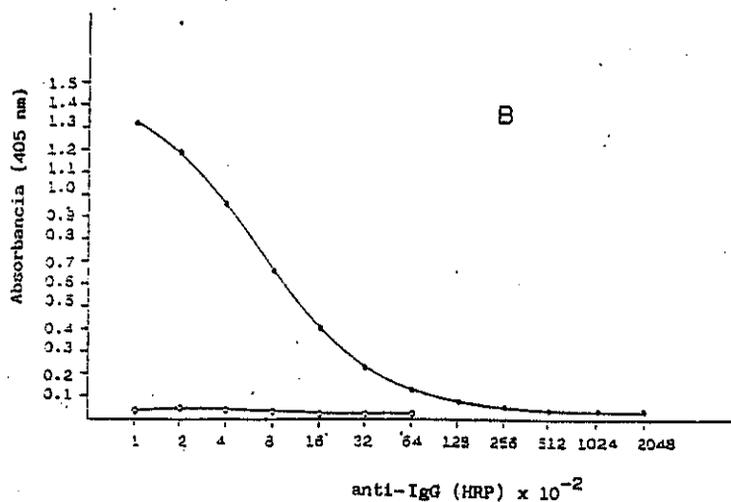
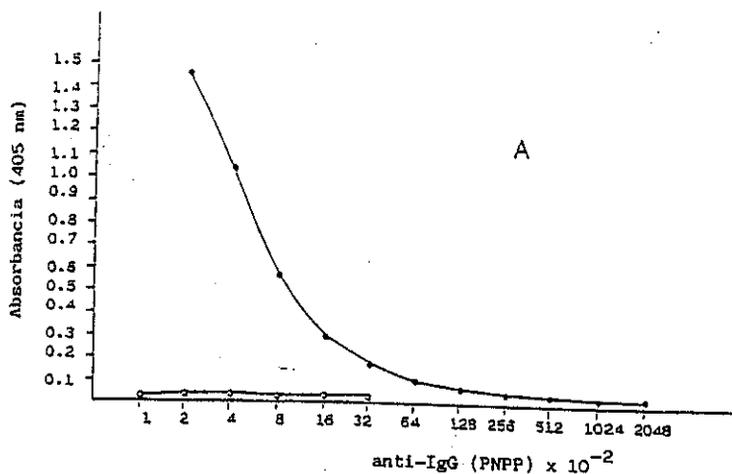


Fig. 2.1. Valoración de la potencia de la anti-IgG de oveja marcada con Fosfatasa alcalina (A) y Peroxidasa (B). 1  $\mu\text{g}$  /ml de IgG (●) y 100  $\mu\text{g}$  /ml de Albúmina sérica bovina (○). Muestra representativa.

trabajo de los sueros: 1/50, 1/100 y 1/200. Los ensayos se realizaron con ambas fuentes antigénicas.

Para la valoración de las IgM e IgA ya que los segundos anticuerpos no estaban marcados enzimáticamente, se realizaron barridos de los segundos y terceros anticuerpos, así como de la concentración antigénica óptima. La dilución de los sueros fue constante (1/50).

En todas las valoraciones se utilizaron varios controles de fondo (sin antígeno, sin suero, sin segundo anticuerpo, sin tercer anticuerpo).

b) Adsorción del antígeno a la fase sólida

El antígeno preparado (extracto soluble de L-3 o extracto de adultos de H. contortus) fue diluido en un tampón de tapizado (tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6) a la concentración óptima de 5  $\mu\text{g/ml}$  para el extracto soluble de las larvas de tercer estadio y de 10  $\mu\text{g/ml}$  para el de adultos. Este preparado antigénico se situó en los pocillos de las placas de microtitulación de fondo plano (Nunc) en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  por pocillo. La adsorción del antígeno a la superficie de poliestireno se realizó en refrigeración (4 °C), durante 16 horas.

c) Bloqueo de uniones inespecíficas

Es necesario dispensar una solución bloqueadora, cuyas proteínas interfieran esta posible unión. Se realizó con un 5 % de albúmina sérica bovina (BSA) disuelta en tampón fosfato salino; el volumen por pocillo fue de 200  $\mu\text{l}$  (con el objetivo de tapizar completamente cualquier espacio que pudiera haber quedado sin antigenar en el pocillo ) y se incubó una hora a 37 °C.

d) Incubación con el suero / heces

Los sueros ovinos fueron diluidos (1/50) en PBS con 0,05 % de Tween 20 y dispensados a las placas de microtitulación en un volumen final de 100  $\mu$ l e incubadas durante 1 h a 37  $^{\circ}$ C.

e) Adición del segundo anticuerpo

La dilución del conjugado dependió del tipo de inmunoglobulinas empleadas y tras el estudio para determinar la dilución óptima de uso, se utilizaron según se muestra en la tabla:

2º anticuerpo	Especie	Enzima	Dilución
Anti-IgG de ovino	Conejo	Fosfatasa alcalina	1/800
Anti-IgG de conejo	Conejo	Peroxidasa	1/3000
Anti-IgA de ovino	Cerdo	no marcada	1/320
Anti-IgG de cerdo	Cabra	Peroxidasa	1/1000
Anti-IgM de oveja	Conejo	no marcada	1/3200
Anti-IgG de conejo	Cabra	Peroxidasa	1/3000

Las incubaciones se realizaron a 37  $^{\circ}$ C durante una hora. Cuando los segundos anticuerpos no estaban conjugados se incubó posteriormente con un tercer anticuerpo, (p.e. Anti-IgM de ovino obtenida en conejo, otra incubación con un Anti-conejo marcado). En todos los casos el volumen final por pocillo fue de 100  $\mu$ l.

f) Adición del sustrato

Dependiendo del tipo de enzima unida al 2º/ 3 er anticuerpo se emplearon como sustratos:

- Para la enzima fosfatasa alcalina se usaron 100  $\mu$ l de p-Nitrofenilfosfato (1 mg/ml) en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C siendo necesario detener la reacción enzimática con 50  $\mu$ l de NaOH 3 N.

- Cuando se empleó peroxidasa, el sustrato estuvo formado por 100  $\mu$ l de 40 mM ácido 2,2'-Azinobis (3 etilbenzotiazolin-sulfónico) (ABTS) en tampón citrato 0,1 M, pH 4 añadiéndole agua oxigenada al 2 %; la incubación fue similar a la anterior, pero no se precisa detener la reacción.

#### g) Niveles de inmunoglobulinas

Se empleó como medida, la densidad óptica (D.O.) de las soluciones obtenidas a 405 nm, en un lector de ELISA semiautomático EAR 400, restando el fondo existente en cada pocillo.

### 2.2.10. Electroforesis

#### 2.2.10.a. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Los reactivos utilizados para la formación de geles y tampones fueron los mismos que para una electroforesis SDS-PAGE, sin emplear sodio dodecil sulfato ni 2- mercaptoetanol. Tanto las concentraciones de los reactivos como el protocolo empleados serán descritos en la siguiente sección.

### 2.2.10.b. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se realizaron entre dos placas de vidrio (12 cm x 12 cm) separadas por espaciadores de plástico, añadiéndose una solución de 28 % de acrilamida-bisacrilamida para formar el gel, así como N,N,N',N'-tetrametiltilen diamina (TEMED) empleado para catalizar la polimerización; persulfato amónico como iniciador y dodecil sulfato sódico (SDS) como desnaturalizador de proteínas. Los tampones utilizados fueron uno de alta molaridad para los geles (Tris-HCl 1 M, pH 8,8); y otro en los compartimentos de los electrodos (Tris-glicina pH 8,3). La resolución se incrementó considerablemente polimerizando un gel de empaquetamiento (de baja porosidad) sobre el gel de separación, el cual contenía un tampón Tris-HCl 1 M, pH 6,8. Se siguió la técnica descrita por Laemmli (1970).

Se emplearon 3 concentraciones de acrilamida, en dependencia de los PM estudiados. Los componentes del gel de separación fueron los siguientes:

Reactivos (Vol/ml)	Acrilamida final		
	10 %	12,5 %	15 %
Tris-HCl 1 M, pH 8;8	5,62	5,62	5,62
Acrilamida 28 %	5,36	6,7	8,03
Agua destilada	4,02	2,67	1,35
SDS 10 %	0,15	0,15	0,15
Persulfato amónico 10 %	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,05	0,05	0,05

Se mezclaron rápidamente y la solución se vertió en el interior de los dos vidrios que previamente habíamos sellado, dejando un espacio de 1,5 cm sin rellenar para el gel de empaquetamiento; una vez polimerizado el gel separador se añadió el gel de empaquetamiento.

Los componentes del gel de empaquetamiento fueron:

Reactivos (Vol/ml)	Acrilamida final	
	3 %	5 %
Tris-HCl, 1 M pH 6,8	0,63	0,63
Acrilamida 28 %	0,53	0,89
Agua destilada	3,84	3,84
SDS 10 %	0,05	0,05
Persulfato amónico 10 %	0,05	0,05
TEMED	0,025	0,025

Se rellenaron los compartimentos de los electrodos de la cubeta con 0,025 M Tris y 0,192 M Glicina pH 8,3 y se le añadió 0,1 % de SDS.

A los extractos proteicos a estudiar, cuya concentración fue de ca. 1 mg/ml, se les añadió un tampón de muestra que constó de:

Tris-HCl 10 mM, pH 7	_____	
EDTA 3 mM	_____	30
SDS 2 %	_____	
Glicerina 50 % en agua + 0,005 % de azul de bromofenol	—	10
Mercaptoetanol	_____	2,5
		<u>42,5</u> µl

La muestra (10  $\mu$ l de extracto cuya concentración fue de 1 mg/ml) se añadió a los 42,5  $\mu$ l. A continuación se mantuvo en ebullición en baño maría durante 10 min. La muestra, así procesada, estaba dispuesta para ser aplicada en los pocillos correspondientes del gel. Se empleó un voltaje de 60 V hasta que el frente de proteínas (Azul de Bromofenol) atravesó el gel de empaquetamiento y después se elevó a 200 V hasta que se completó la resolución en el gel separador.

La tinción de los geles se llevó a cabo mediante Azul de Coomassie o tinción de Nitrato de Plata. Las tinciones con Nitrato de Plata se realizaron con un Kit comercial (Silver Stain Kit, Bio-Rad). La mayoría de las tinciones fueron realizadas con Azul de Coomassie cuya composición es la siguiente:

- 0,25 g (P/V) de azul de Coomassie R.250
- 50 % de Metanol
- 5 % de Ac. Acético glacial

Para la observación de las bandas proteicas existentes se utilizó una solución decolorante formada por:

- 25 % de Metanol
- 5% de Ac. Acético glacial

Las tinciones y decoloraciones se realizaron en agitación.

#### 2.2.10.c. Electroforesis en dos dimensiones (2DE)

Por medio de esta técnica, las proteínas fueron separadas por sus cargas eléctricas (PAGE) y posteriormente por sus pesos moleculares (SDS - PAGE).

El primer gel se realizó sin SDS para evitar la desnaturalización de las proteínas. El 2-Mercaptoetanol no se incluyó en el tampón de muestra ya que reduciría los grupos SH<sub>2</sub> de proteínas. El resto de los reactivos, tanto para la formación del gel como para los tampones, fueron similares a los citados en la sección anterior. El segundo gel y los tampones se realizaron según lo indicado para las SDS - PAGE.

Una vez completada la 1ª electroforesis (60 V en el gel de empaquetamiento y 200 V en el de separación) se eliminó el gel de empaquetamiento (3 % acrilamida) y se cortó una tira de 1,5 cm del gel de separación en la misma dirección en que migran las proteínas (acrilamida 5 %). Esta tira se colocó cuidadosamente sobre el gel de empaquetamiento del segundo gel (3 % acrilamida), y posteriormente se recubrió con más gel de empaquetamiento. Para la migración proteica se utilizaron las mismas condiciones de voltaje. El gel de separación se formó con un 10 % de acrilamida.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Resultados parasitológicos

##### 3.1.1. Eliminación fecal de huevos de H. contortus en corderos

La figura 3.1 muestra los resultados obtenidos cuando se estudió la eliminación de huevos de H. contortus en las heces de los corderos a lo largo de la infestación con 2500 L-3 (Grupo A) y la dosis de prueba con 5000 L-3 del parásito (Grupos A y B).

El periodo de prepatencia en la primoinfestación del Grupo A (animales de 4 - 4,5 meses de edad) fue de 16 días. Después de iniciada la patencia se observó una clara elevación de los recuentos de huevos por gramo de heces (HPG) hasta el día 24 p.i. seguida de una fase estacionaria. La administración a los animales de un tratamiento antihelmíntico (88 mg /Kg p.v., Tiabendazol) redujo y posteriormente eliminó la presencia de huevos de H. contortus en las deyecciones de los corderos infestados.

La reinfestación del Grupo A y primoinfestación del Grupo B (corderos de 6 - 6,5 meses de edad) con 5000 L-3 de H. contortus de la misma procedencia provocó una elevación de recuentos fecales en ambos grupos de animales sin diferencias significativas entre ellos. De hecho, el grupo de corderos con primoinfestación mostró en la dosis de prueba un acortamiento ligero del periodo de prepatencia, respecto al periodo prepatente del Grupo B (17 días).

No existió una clara relación lineal entre los recuentos de huevos fecales y las dosis infestantes usadas en los corderos del

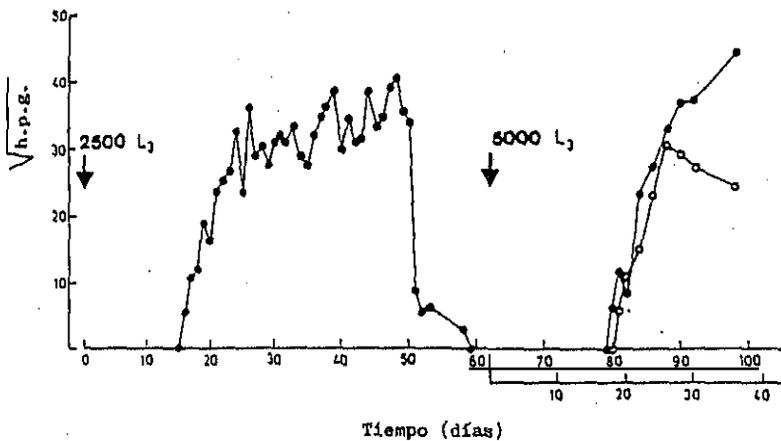


Fig. 3.1. Eliminación fecal media de huevos de *H. contortus* en corderos Manchegos reinfestados con 5000 L-3 después de una infestación con 2500 L-3 (●) y animales testigo sin la primoinfestación (○).

Grupo A (2500 L-3) y las administradas posteriormente para los dos grupos (5000 L-3). En efecto, se obtuvieron recuentos de HPG muy similares, a pesar de las dosis infestantes tan diferentes, lo que posiblemente pudiera ser debido al incremento de la deposición fecal, relacionada con la edad, en la dosis de prueba con la consiguiente dilución de las formas parasitarias en los corderos de mayor edad.

### 3.1.2. Eliminación fecal de huevos de H. contortus en ovejas

Tras la infestación de los animales del Grupo A' con 7000 L-3 de H. contortus, los animales presentaron un periodo de prepatencia medio de 17 días, apareciendo dos picos de máxima eliminación de huevos (HPG), según se observa en la Fig. 3.2, los días 33 y 52 postinfestación, con valores de HPG de ca. 900-1000. Debido a que los animales que formaban el Grupo A' provenían de los Grupos A y B (menores de un año), pese a que no habían conseguido una inmunidad protectora tras las infestaciones (2500 y 5000 L-3) como lo demostraba la falta de diferencias significativas en la eliminación de huevos de los corderos tras la dosis de prueba, sí era cierto que los animales del Grupo A' habían sufrido, tanto distinto número de infestaciones como distintas dosis, lo que nos indujo a pensar que quizás esos dos máximos hallados fueran debidos a las contribuciones de los animales provenientes originalmente de los dos Grupos (A y B). El análisis estadístico mediante la aplicación de una prueba de homogeneidad de la muestra no permitió observar, sin embargo, que las diferencias existentes entre ellos fuesen estadísticamente significativas, y de hecho, los dos picos se observaron en los dos subgrupos (Fig. 3.3).

En la figura 3.2 se muestra la eliminación de huevos de H. contortus cuando los Grupos A' y B' se sometieron a una dosis

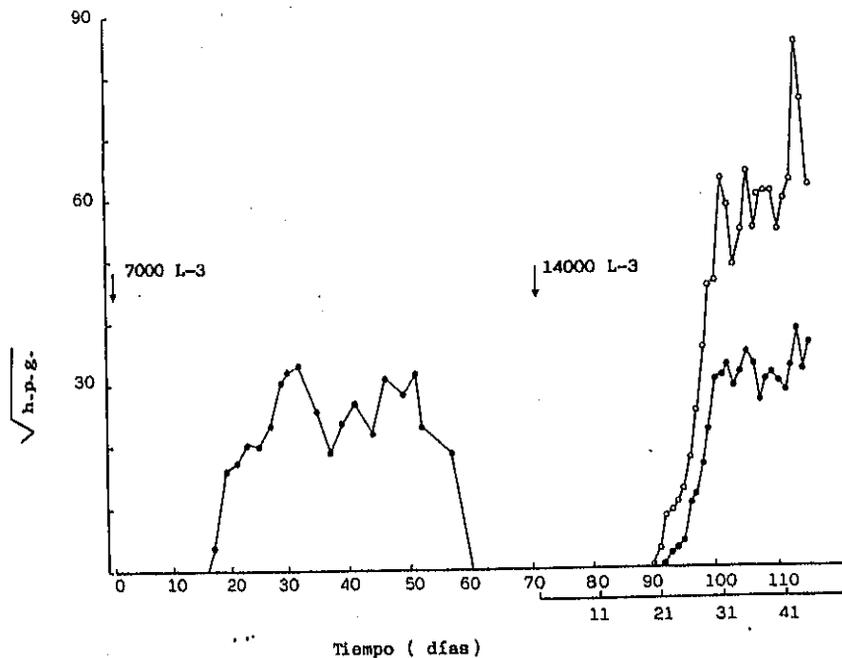


Fig. 3.2. Eliminación fecal media de huevos de *H. contortus* en ovejas Manchegas reinfestadas con 14000 L-3 después de una infestación con 7000 L-3 (●) y animales testigo sin la primoinfestación (○).

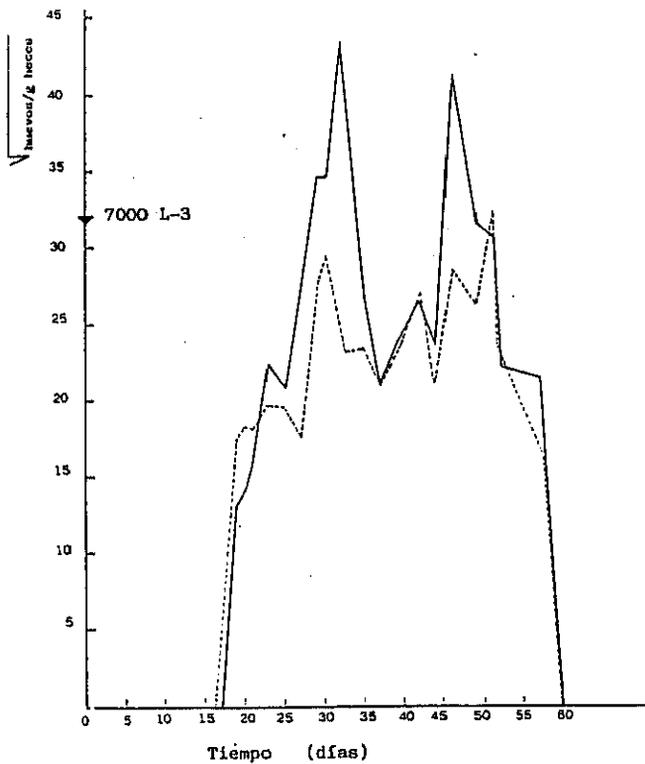


Fig. 3.3. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en ovejas Manchegas infestadas con 7000 L-3. (---): animales que habían sido infestados con 2500 + 5000 L-3. (—): animales que habían recibido 5000 L-3.

de prueba con 14000 L-3. En ambos casos, los periodos de prepatencia se alargaron.

Las ovejas primoinfestadas (Grupo A') mostraron un periodo de prepatencia medio de 23 días mientras que los animales sin infestación previa mostraron un periodo de prepatencia de 21 días. Además se observó una menor eliminación de huevos por parte del Grupo A', aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, respecto al Grupo B', al existir importantes variaciones individuales dentro de cada grupo. No obstante, los recuentos de HPG medios mostraron que los animales del Grupo A' se estabilizaron alrededor de 900 - 1000 HPG, mientras que la eliminación media del grupo de ovejas sin la infestación con 7000 L-3 llegó a superar los 3000 HPG. El día 117 p.i. (2 días antes del parto) se observó una elevación muy notable (elevación periparto) en la oveja n° 91 (Grupo A'), que se mantuvo hasta el día 137 p.i.; por ello la experimentación se suspendió en aquella fecha (día 117 p.i.).

### 3.2. Determinación de las proteínas séricas en corderos y ovejas infestados y reinfestados con H. contortus

#### 3.2.1. Niveles de proteínas séricas en corderos

Se realizó el estudio de la concentración de proteínas séricas durante la primoinfestación con 2500 L-3 de H. contortus en el Grupo A y en el Grupo B (testigo de la infestación) así como en la dosis de prueba de ambos grupos (A y B) con 5000 L-3. En la Tabla 3.I se muestran los resultados obtenidos:

	Infestación	Prot. séricas (g/100 ml)
2500 L-3	Día 4 p.i. (A)	7,15
	Día 8 p.i. (A)	7,18
	testigo (B)	6,86
	Día 32 p.i. (A)	6,94
	testigo (B)	7,1
5000 L-3	Día 16 p.i. (A)	6,7
	Día 16 p.i. (B)	6,56
	Día 37 p.i. (A)	6,62
	Día 37 p.i. (B)	6,88

Se observó, durante la prepatencia de la primoinfestación del Grupo A una concentración de proteínas séricas superior (en 0,32 g/ 100 ml) a la del Grupo B (testigo), y también, superior al valor hallado en la patencia (en 0,24 g/ 100 ml). A la vez que disminuyó la concentración de proteínas del Grupo A (en la patencia) aumentó en la misma proporción la del grupo testigo.

Tras el tratamiento antihelmíntico los animales se infestaron con 5000 L-3; observándose en la prepatencia una disminución de la concentración proteica en ambos grupos, mayor en el Grupo B (de 0,54 g/ 100 ml), mientras que en el Grupo A la disminución fue de 0,24 g/ 100 ml. Durante la patencia de la infestación la concentración de proteínas del Grupo A apenas varió (perdiendo 80 mg/ 100 ml); sin embargo, el Grupo B mostró un ligero incremento de 0,32 g/ 100 ml.

### 3.2.2. Niveles de proteínas séricas en ovejas

En la Tabla 3.II se muestran las concentraciones de proteínas séricas de las ovejas tras la infestación con 7000 L-3 (Grupo A') y la dosis de prueba con 14000 L-3 (Grupos A' y B').



	Infestación	Prot. séricas (g/ 100 ml)
7000 L-3	Día 14 p.i. (A')	7,98
	Testigo (B')	6,44
	Día 39 p.i. (A')	7,32
14000 L-3	Día 6 p.i. (A')	6,96
	Día 6 p.i. (B')	6,88
	Día 13 p.i. (A')	6,40
	Día 13 p.i. (B')	5,94
	Día 51 p.i. (A')	7,11
	Día 51 p.i. (B')	6,45

La infestación con 7000 L-3 produjo una disminución en las proteínas séricas del Grupo A' durante la patencia. La dosis de prueba con 14000 L-3 de H. contortus provocó una reducción en los niveles medios de proteínas en ambos grupos, algo más marcada en el Grupo B'. No obstante, hay que señalar que este grupo mostró menores valores antes de la infestación. En todos los casos, corderos y ovejas, los valores estuvieron dentro de la normalidad, sin evidencia de hipoproteïnemia.

3.3. Dinámica de la producción de anticuerpos específicos por corderos y ovejas infestados y reinfestados con H. contortus

3.3.1. Respuesta IgG sérica anti-Haemonchus

3.3.1.a. Respuesta IgG en corderos

Los corderos primoinfestados (Grupo A) no mostraron una clara respuesta IgG sérica específica anti-Haemonchus empleando ambas fuentes antigénicas (ESA y ESL) mediante el método de

ELISA indirecto. Los valores de densidad óptica (DO) con extracto soluble de L-3 (ESL) permanecieron en niveles bajos a lo largo de toda la infestación experimental, sin observarse diferencias significativas con los valores obtenidos para los corderos sin infestar (Grupo B). A su vez las D.O. halladas durante la infestación con 2500 L-3 fueron muy similares a las encontradas antes de la infestación (Fig. 3.4).

Las densidades ópticas empleando como antígeno extracto soluble de adultos (ESA) a pesar de que fueron más bajas se comportaron de forma similar (Fig. 3.5) aunque en este caso los valores del grupo infestado (Grupo A) fueron superiores a partir de la patencia de la infestación con 2500 L-3.

Cuando ambos grupos fueron sometidos a la dosis de prueba con 5000 L-3 de H. contortus, dos meses más tarde, se observó un incremento débil pero significativo en los valores de D.O. Este incremento comenzó alrededor del inicio de la patencia, alcanzando valores máximos los días 24-25 de ésta, con ambos extractos antigénicos. Con extracto soluble de L-3 los valores máximos alcanzados fueron de 0,51, mientras que con extracto soluble de adultos la D.O. máxima fue de 0,28. Los niveles de IgG anti-L-3 mostraron un incremento más notable y rápido que los de IgG anti-adultos.

Los resultados obtenidos, a pesar de tratarse de una respuesta débil por parte de los corderos mostraron una buena correlación con los hallazgos coprológicos (Tabla 3.III) con índices significativos de correlación entre ambos parámetros ( $P < 0,01$ ), siendo  $r = 0,448$  empleando como antígeno extracto de L-3 y  $r = 0,567$  cuando se utilizó extracto soluble de adultos de H. contortus. Hay que indicar además, que los niveles de IgG anti - H. contortus fueron en las dosis de prueba con 5000 L-3, superiores en los corderos primoinfestados y reinfestados (Grupo A) que en los animales que no habían estado expuestos a la

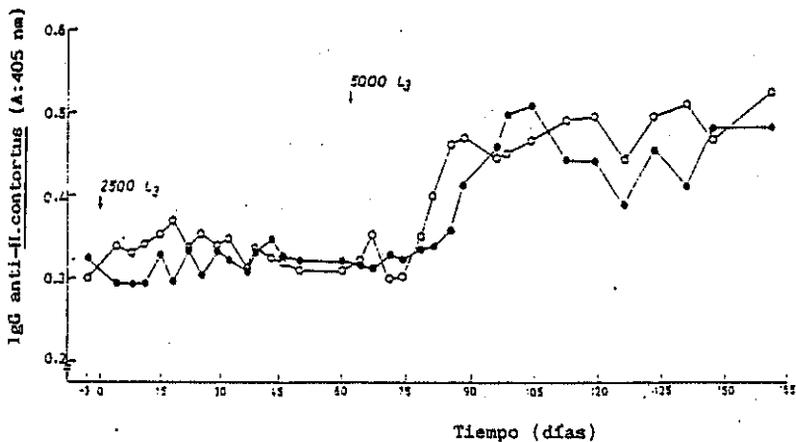


Fig. 3.4. Niveles de IgG específicas de mezclas séricas frente a extractos solubles de L-3 de *H. contortus* en corderos reinfestados con 5000 L-3 después de una infestación con 2500 L-3 (●) o sin la infestación previa (○).

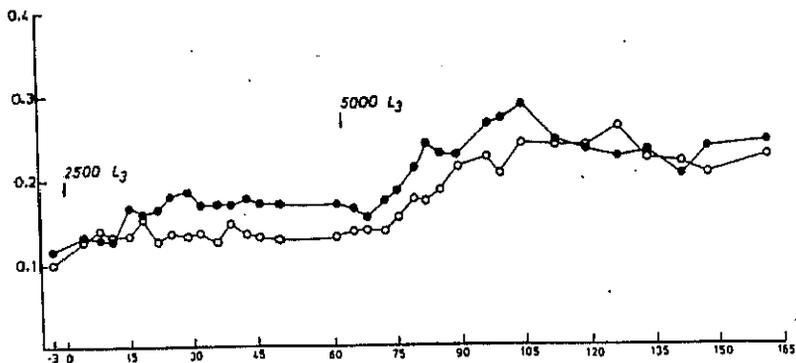


Fig. 3.5. Niveles IgG específicas de mezclas séricas frente a extractos solubles de Adultos de H. contortus en corderos reinfestados con 5000 L-3 después de una infestación con 2500 L-3 (●) o sin la infestación previa (○).

IgG séricas anti L-3		IgG séricas anti Ad.	
D.PI A	OD	Huevos	OD
4	0.299	0	0.113
8	0.294	0	0.130
11	0.295	0	0.123
15	0.327	0	0.165
18	0.298	140	0.158
22	0.335	640	0.166
25	0.308	540	0.181
29	0.329	760	0.184
32	0.323	970	0.171
36	0.312	1020	0.171
39	0.335	1437	0.169
43	0.348	975	0.176
46	0.327	1190	0.172
50	0.320	1130	0.182
60	0.321	0	0.169
64	0.316	0	0.164
67	0.313	0	0.155
71	0.329	0	0.172
74	0.325	0	0.186
78	0.335	0	0.210
82	0.339	540	0.242
85	0.359	730	0.228
88	0.414	1070	0.227
96	0.462	1350	0.264
<b>D.PI B</b>			
60	0.309	0	0.131
64	0.318	0	0.138
67	0.353	0	0.140
71	0.298	0	0.139
74	0.303	0	0.153
78	0.351	0	0.176
82	0.398	225	0.174
85	0.459	520	0.187
88	0.467	925	0.215
96	0.446	737	0.227
n = 34	r = 0.448		r = 0.567
	P < 0.01		P < 0.01

Tabla 3.III. Correlación entre la eliminación fecal de huevos de H. contortus y la respuesta IgG (anti-L3 y anti-Ad de H. contortus), en corderos Manchegos reinfestados con 5000 L-3 después de una infestación con 2500 L-3 (A) y animales testigo sin la primoinfestación (B). r= coeficiente de correlación. P= nivel de significación. n= número de datos.

primoinfestación con 2500 L-3 (Grupo B) aunque no existió evidencia de una típica respuesta secundaria.

### 3.3.1.b. Respuesta IgG en ovejas

#### a) Respuesta IgG sérica anti-L-3:

En las Figs. 3.6 y 3.7 se muestran los valores de D.O. obtenidos, cuando el ganado ovino mayor de un año, fue expuesto a una primoinfestación con 7000 L-3 en dosis única, y una dosis de prueba con 14000 L-3 de H. contortus, empleando como antígenos extractos solubles de L-3 y adultos.

La exposición de las ovejas de 12 - 12,5 meses de edad a una infestación con 7000 L-3 (Grupo A'), empleando como Ag en los ELISA, extracto soluble de L-3 (ESL) y mezclas séricas de los animales no provocó ninguna respuesta notable (Fig. 3.6). Tras el tratamiento antihelmíntico, la reinfestación de este grupo con 14000 L-3 y la infestación de los animales testigo (Grupo B') con la misma dosis de H. contortus provocó una rápida y significativa respuesta, iniciada ya en la prepatencia de la dosis de prueba y ligeramente anterior en el grupo de animales reinfestados (Grupo A'). Con excepción de este ligero adelantamiento de la respuesta en los animales del Grupo A' los títulos de IgG séricos anti-Haemonchus específicos fueron similares en los dos grupos de ovejas. El estudio estadístico de la correlación entre la respuesta IgG sérica y la eliminación fecal de huevos (HPG) mostró valores significativos y negativos frente al antígeno larvario ( $r = -0,47$ ,  $p < 0,01$ ) (Tabla 3.IV).

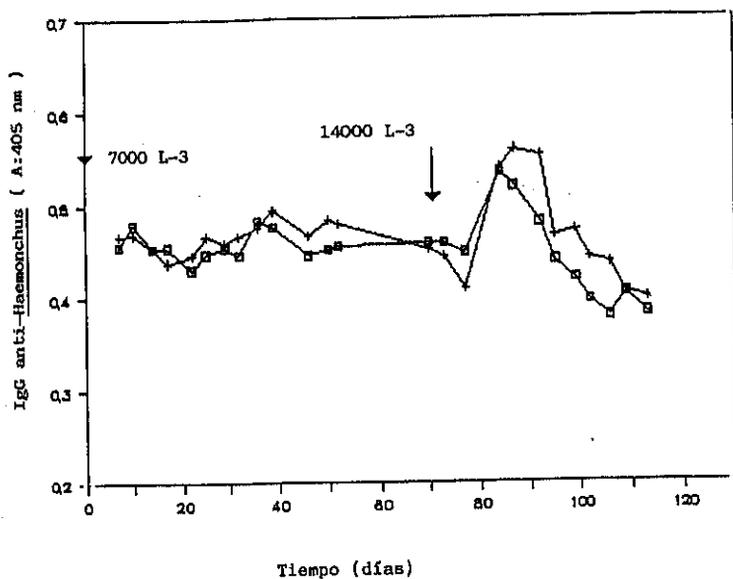


Fig. 3.6. Niveles medios de IgG específicas de mezclas séricas frente a extracto soluble de L-3 de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo: (□) o sin infestación previa (+).

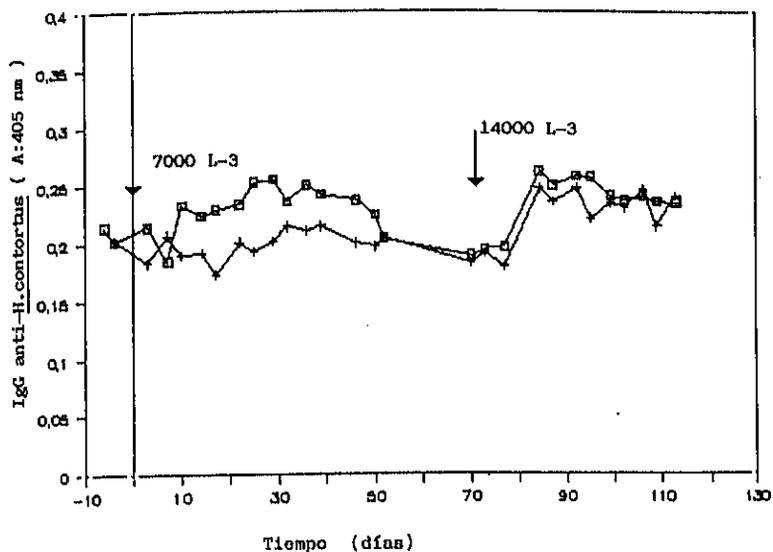


Fig. 3.7. Niveles medios de IgG específicas de mezclas séricas frente a extracto soluble de Adultos de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

IgG séricas anti L-3		IgG séricas anti Ad.	
D. PI A'	OD	Huevos	OD
7	0.455	0	0.184
10	0.478	0	0.232
14	0.453	0	0.223
17	0.454	12	0.228
22	0.430	300	0.233
25	0.447	400	0.252
29	0.453	940	0.254
32	0.446	1070	0.235
36	0.483	630	0.249
39	0.475	570	0.241
46	0.445	970	0.236
50	0.451	820	0.223
52	0.455	540	0.203
70	0.459	0	0.188
73	0.459	0	0.193
77	0.448	0	0.196
84	0.534	0	0.261
87	0.519	0	0.249
92	0.480	0	0.257
95	0.439	12	0.256
99	0.420	264	0.240
102	0.396	982	0.236
106	0.379	1190	0.240
109	0.404	890	0.235
113	0.382	1040	0.234
116	0.383	1370	0.234
D. PI B'			
70	0.451	0	0.182
73	0.444	0	0.191
77	0.409	0	0.179
84	0.539	0	0.246
87	0.559	0	0.235
92	0.552	15	0.247
95	0.466	112	0.221
99	0.472	1237	0.234
102	0.442	3887	0.230
106	0.436	3976	0.245
109	0.405	3580	0.214
113	0.398	3880	0.239
116	0.391	3850	0.224

n = 39    r = -0.47    P < 0.01    r = 0.143

Tabla 3.IV. Correlación entre la eliminación fecal de huevos de *H. contortus* y la respuesta IgG (anti-L3 y anti-Ad de *H. contortus*), en ovejas Manchegas reinfestadas con 14000 L-3 después de una infestación con 7000 L-3 (A') y animales testigo sin la primoinfestación (B'). r=coeficiente de correlación lineal. P= significación. n= nº de datos.

b) Respuesta IgG sérica anti-Adultos:

En la figura 3.7 se muestran las D.O. obtenidas. Se observó que el Grupo A' infestado con 7000 L-3 mostró una ligera elevación, durante la prepatencia, que persistió durante la patencia de la infestación, respecto al Grupo testigo (B'). Tras el tratamiento antihelmíntico de todos los animales e infestación con 14000 L-3, se incrementaron los títulos séricos en los dos Grupos (A' y B'), siendo los títulos hallados en el lote primoinfestado y reinfestado (A') ligeramente superiores. El estudio estadístico no mostró correlación ( $r = 0,143$ ,  $n = 39$ ) entre los títulos séricos y los recuentos de huevos en heces.

3.3.2. Respuesta IgM sérica anti-Haemonchus

3.3.2.a. Respuesta IgM en corderos

En la Fig. 3.8 y 3.9 se muestran los niveles de IgM séricos en los corderos primoinfestados y reinfestados (Grupo A) y los testigos sólo sometidos a la dosis de prueba (Grupo B) empleando ambas fuentes antigénicas.

Los corderos primoinfestados (Grupo A) no mostraron ninguna respuesta IgM sérica específica ni utilizando extracto soluble de larvas de tercer estadio (Fig. 3.8) ni de adultos (Fig. 3.9). Los valores de densidad óptica obtenidos variaron entre 0,51-0,64 (con mínimas oscilaciones) y entre 0,47-0,62 (con oscilaciones algo superiores), para L-3 y adultos respectivamente.

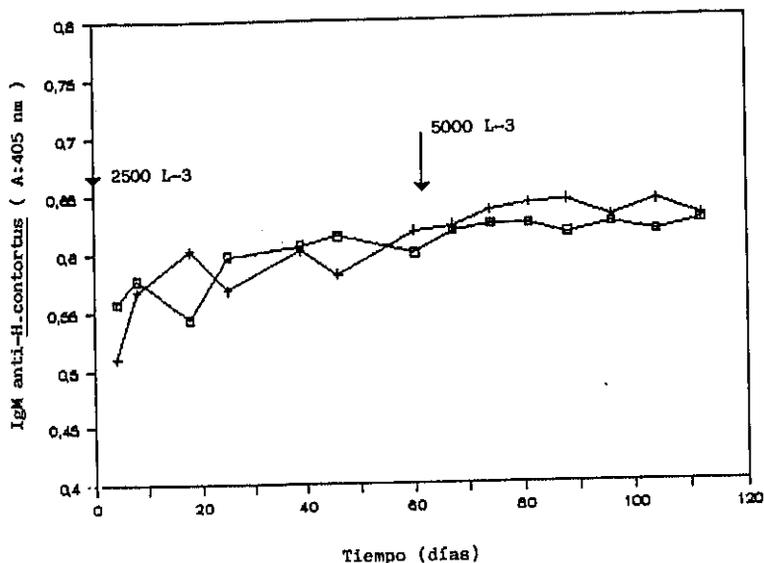


Fig. 3.8. Niveles de anticuerpos IgM de mezclas séricas frente a extracto soluble de L-3 de *H. contortus* en corderos reinfestados con 5000 L-3 tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

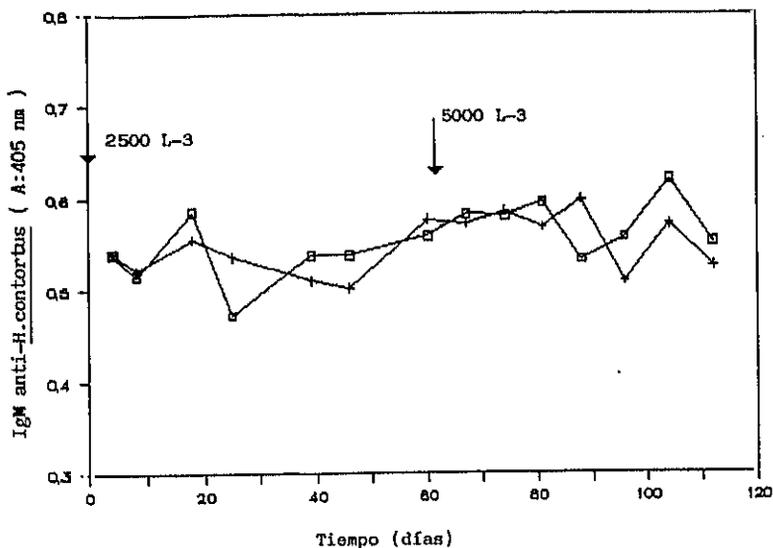


Fig. 3.9. Niveles de anticuerpos IgM de mezclas séricas frente a extracto soluble de Adultos de *H. contortus* en corderos reinfestados con 5000 L-3 tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

### 3.3.2.b. Respuesta IgM en ovejas

Se estudiaron los títulos de IgM anti-Haemonchus a lo largo de la infestación con 7000 L-3 de H. contortus del Grupo A' y del Grupo B' (testigo) con extracto soluble de L-3 (ESL) y de adultos (ESA). Los resultados obtenidos cuando se empleó Ag L-3, se muestran en la figura 3.10. Los valores de D.O. tras la infestación fueron muy similares en ambos grupos de ovejas sin cambios significativos ni durante la infestación ni respecto al Grupo testigo (B'). Después del tratamiento antihelmíntico e infestación de todos los animales con 14000 L-3, tampoco se observaron cambios en los títulos séricos de ambos grupos, aunque los valores obtenidos para el Grupo A' (primoinfestado + reinfestado) fueron durante la dosis de prueba, ligeramente superiores.

Cuando se estudió la respuesta frente a Ag de adultos de H. contortus (ESA), (Fig. 3.11) se observó en general una muy escasa respuesta y, aparentemente, los valores hallados para el Grupo A' fueron durante la primoinfestación menores que los del Grupo B' (testigos) aunque sin notables diferencias. Tras la infestación con 14000 L-3 los dos grupos igualaron sus valores de D.O. y mostraron con esta fuente antigénica una tendencia a la disminución de los títulos al contrario de lo observado con el extracto larvario (ver Fig. 3.10).

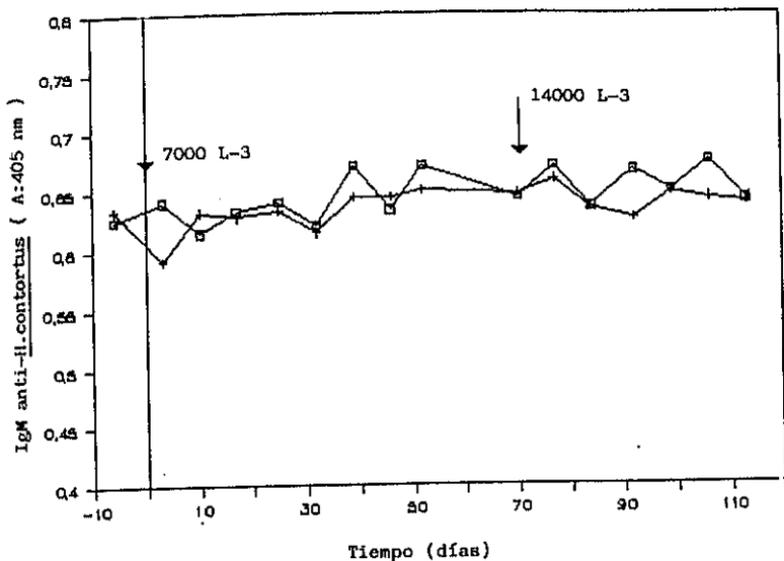


Fig. 3.10. Niveles de anticuerpos IgM de mezclas séricas frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

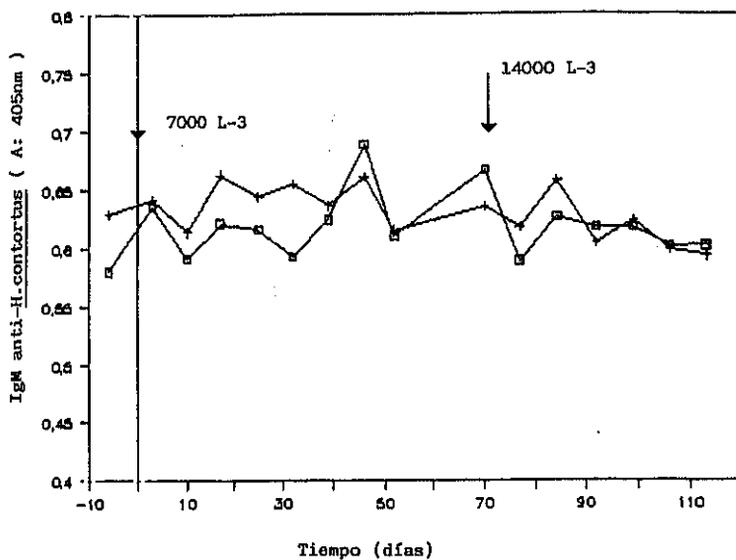


Fig. 3.11. Niveles de anticuerpos IgM de mezclas séricas frente a extracto soluble de Adultos de H. contortus en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

### 3.3.3. Respuesta IgA sérica anti-Haemonchus

#### 3.3.3.a. Respuesta IgA en corderos

En la Fig. 3.12 se muestran los títulos de las IgA séricas con extracto soluble de L-3 de H. contortus.

Tras la primoinfestación con 2500 L-3 del Grupo A, los títulos de IgA durante la prepatencia experimentaron una ligera elevación coincidiendo con el inicio de la patencia y alcanzaron su máximo valor el día 25 postinfección.

Los niveles de IgA anti-Haemonchus estuvieron relacionados en este Grupo (A) con la presencia de helmintos, ya que al final de la patencia disminuyeron los valores de D.O. Tras el tratamiento antihelmíntico e infestación de los dos grupos con 5000 L-3 se halló una elevación de los valores de D.O. en los dos grupos; esta elevación ya se observó en la prepatencia y fue más lineal para el Grupo A y más intensa en el Grupo B (corderos no expuestos a la primoinfestación con 2500 L-3).

Cuando se estimó la respuesta IgA sérica frente a extractos de adultos de H. contortus (Fig. 3.13) se observaron, durante la primoinfestación, variaciones tanto en el grupo de corderos infestados (A) como en el grupo testigo, aunque hay que destacar que, en general, el patrón hallado para el grupo de infestados mostró un comportamiento inverso con este material antigénico que cuando se empleó extracto de L-3 (ver Fig. 3.12).

Cuando ambos grupos fueron sometidos a la dosis de prueba de 5000 L-3 se incrementaron los títulos séricos hasta alcanzar valores máximos de D.O. durante la patencia de la infestación. No se observaron diferencias importantes en los valores de IgA

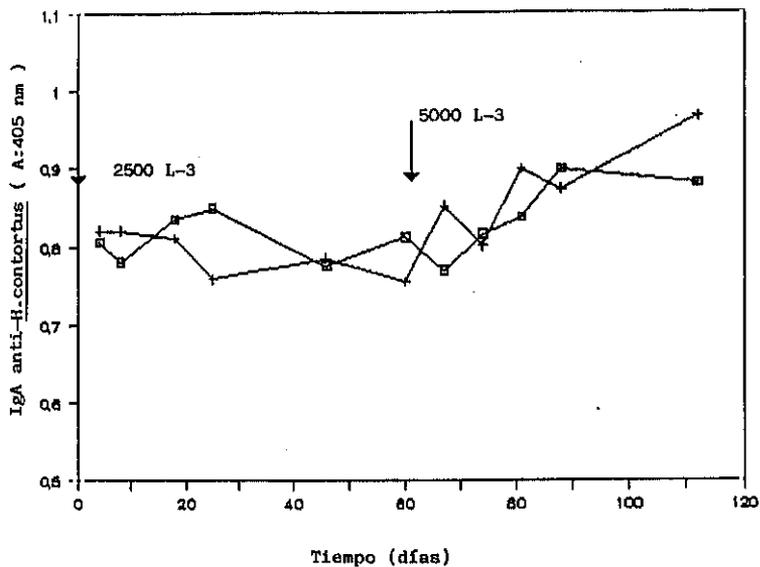


Fig. 3.12. Niveles de anticuerpos IgA de mezclas séricas frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus en corderos reinfestados con 5000 L-3, tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

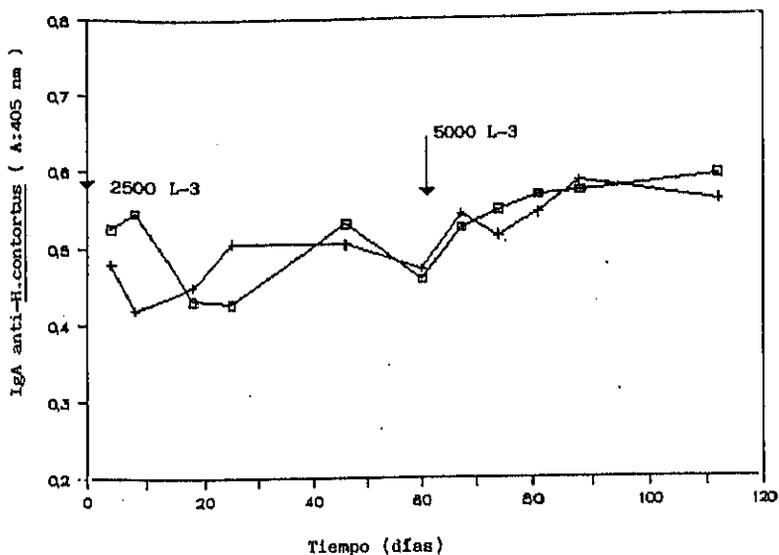


Fig. 3.13. Niveles de anticuerpos IgA de mezclas séricas frente a extracto soluble de Adultos de *H. contortus* en corderos reinfestados con 5000 L-3 tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

específica entre los animales del Grupo A y los del Grupo B.

### 3.3.3.b. Respuesta IgA en ovejas

La dinámica de la respuesta IgA anti-Haemonchus, estimada con mezclas séricas de los animales infestados (Grupo A') y sometidos a la dosis de prueba (Grupos A' y B'), se muestra en las Figs. 3.14 y 3.15. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los previamente observados en los corderos de 4 - 4,5 meses de edad. La infestación de 7000 L-3 no provocó ningún incremento significativo cuando se empleó ESL como Ag y, de hecho, algunos valores de los testigos no infestados (Grupo B') fueron superiores (Fig. 3.14).

Después del tratamiento antihelmíntico todos los animales fueron infestados con 14000 L-3 y todos los valores de absorbancia se elevaron. No obstante, la elevación fue superior en el grupo de animales que habían permanecido como testigos no infestados (Grupo B'). Esta elevación fue transiente y alcanzó sus máximos valores alrededor del día 20 después de la dosis de prueba.

Cuando se estudió la respuesta IgA sérica utilizando como Ag extracto soluble de adultos (ESA) (Fig. 3.15) se observó, al contrario que cuando utilizamos como fuente antigénica extracto soluble de L-3, un débil incremento del Grupo A' respecto al B' (testigos no infestados) durante la patencia de la infestación con 7000 L-3. Esta elevación pareció relacionarse con la presencia de los vermes, puesto que tras la aplicación del tratamiento antihelmíntico, sus valores disminuyeron. La dosis de prueba con 14000 L-3 en ambos grupos produjo una elevación transiente en ambos casos, similar en los dos grupos y comparable a lo obtenido cuando se empleó como Ag extracto soluble de L-3.

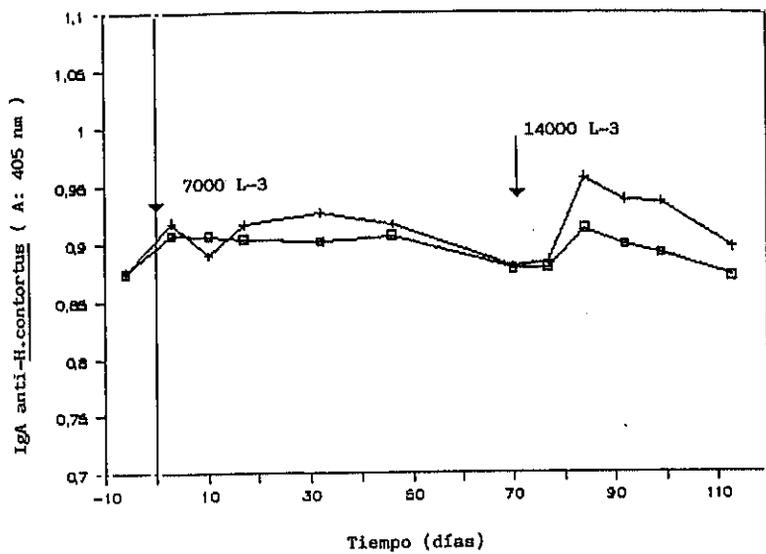


Fig. 3.14. Niveles de anticuerpos IgA de mezclas séricas frente a extracto soluble de L-3 de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

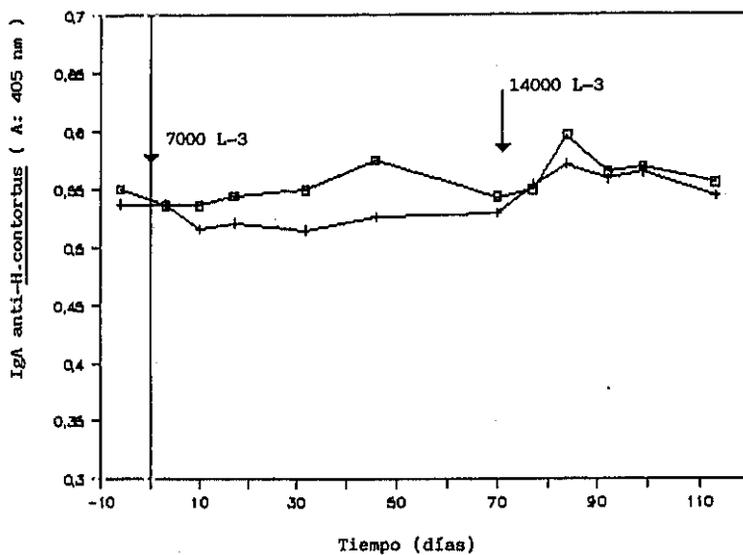


Fig. 3.15. Niveles de anticuerpos IgA de mezclas séricas frente a extracto soluble de Adultos de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+).

No obstante, las elevaciones observadas fueron menores con Ag de adultos de H. contortus.

### 3.3.4. Respuesta IgA fecal anti-Haemonchus

#### 3.3.4.a. Respuesta IgA en corderos

Durante la prepatencia de la infestación con 2500 L-3 no se observaron cambios notables respecto a los valores de D.O. obtenidos en el grupo testigo no infestado.

Se hallaron grandes variaciones en los valores obtenidos en los días de análisis, que se presentaron, en general, de forma simultánea en ambos Grupos (A y B) y con ambos extractos antigénicos empleados (Fig. 3.16 ~ L-3: Fig. 3.17 - Ad). El carácter simultáneo, independientemente del curso de las infestaciones, probablemente estuvo relacionado con las variaciones de la ingesta y grado de hidratación fecal, teniendo en cuenta que las muestras empleadas estuvieron constituidas por una emulsión fecal. No obstante, ambas fuentes antigénicas, se observó durante la primoinfestación del Grupo A con 2500 L-3 una elevación transiente coincidiendo con la patencia de la infestación, más notable frente a antígeno de larvario (Fig. 3.16) con un pico en el día 47 p.i., seguida de una disminución de sus valores tras la medicación antihelmíntica.

Cuando se reinfestaron los animales del Grupo A y primoinfestaron los del Grupo B (5000 L-3), los valores de las D.O. experimentaron un descenso durante la prepatencia, siendo más claro en los animales que ya habían padecido una primoinfestación (Grupo A). En la patencia se incrementaron los títulos paulatinamente, siendo la elevación más notoria en los

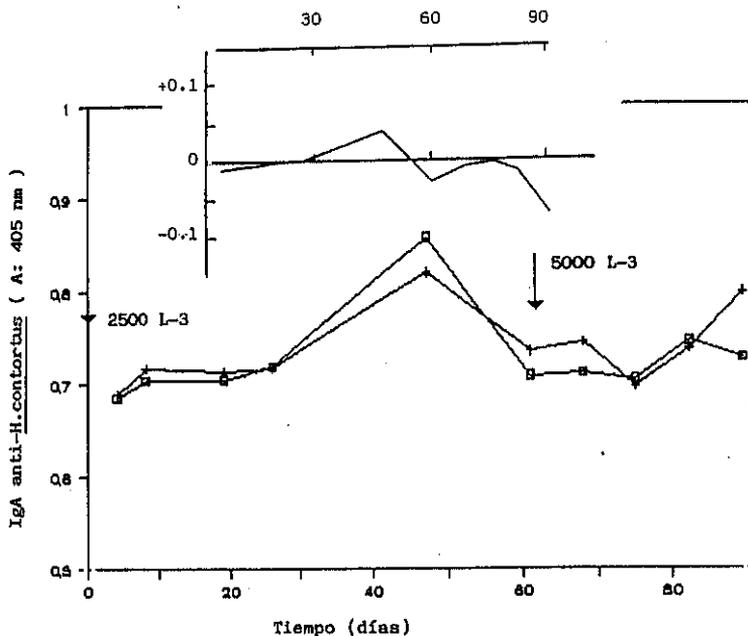


Fig. 3.16. Niveles de anticuerpos IgA específicos de extractos fecales frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus en corderos reinfestados con 5000 L-3 tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+). Inserto: variaciones netas de las IgA fecales anti-Haemonchus de corderos infestados y reinfestados. El cero representa los valores de D.O. obtenidos en los corderos del Grupo B.

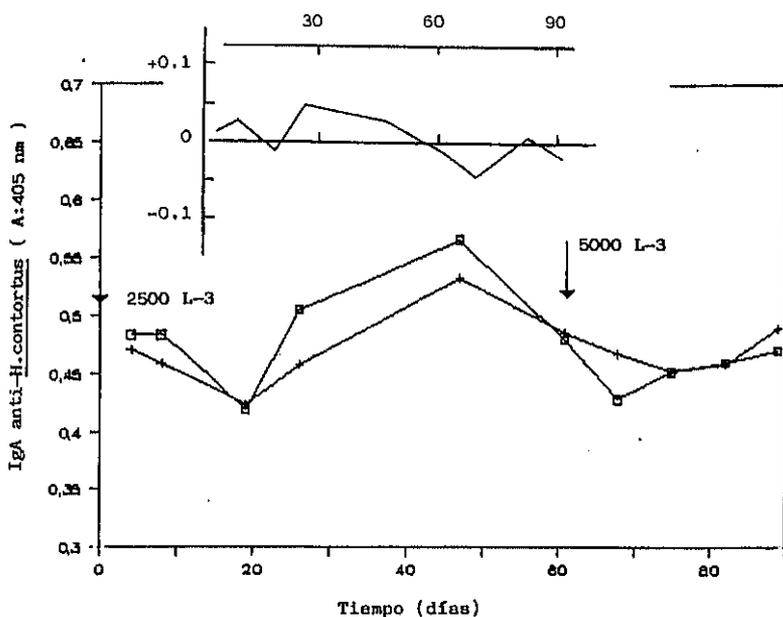


Fig. 3.17. Niveles de anticuerpos IgA específicos de extractos fecales frente a extracto soluble de Adultos de H. contortus en corderos reinfestados con 5000 L-3 tras previa infestación con 2500 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+). Inserto: variaciones IgA fecales anti-Haemonchus de corderos infestados y reinfestados. El cero representa los valores de D.O. obtenidos en los corderos del Grupo B.

IgA fecal anti L-3		IgA fecal anti Ad.	
D. PI A	OD	Huevos	OD
4	0.685	0	0.483
8	0.703	0	0.483
19	0.704	350	0.419
26	0.718	1280	0.504
47	0.857	1500	0.565
61	0.708	0	0.479
68	0.711	0	0.428
75	0.704	0	0.452
82	0.745	540	0.460
89	0.727	1330	0.470
D. PI B			
61	0.737	0	0.485
68	0.744	0	0.467
75	0.697	0	0.452
82	0.737	225	0.458
89	0.798	850	0.489

n = 15

r = 0.623

P &lt; 0.05

r = 0.59

P &lt; 0.05

Tabla 3.V. Correlación entre la eliminación fecal de huevos de H. contortus y la respuesta IgA fecal (anti-L3 y anti-Ad de H. contortus), en corderos Manchegos reinfestados con 5000 L-3 después de una infestación con 2500 L-3 (A) y animales testigo sin la primoinfestación (B). r= coeficiente de correlación lineal. P= nivel de significación. n=nº de datos.

corderos del Grupo B. Cuando se estudió la relación existente entre los títulos de IgA fecales anti-Haemonchus y la eliminación fecal de huevos (HPG) se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre los valores de IgA y los recuentos de huevos, siendo  $r = 0,59$  ( $P < 0,05$ ) para los títulos anti-adultos y  $r = 0,623$  ( $P < 0,05$ ) para la respuesta anti - L-3 (Tabla 3.V).

### 3.3.4.b. Respuesta IgA en ovejas

En la Fig. 3.18 se representan los títulos obtenidos a lo largo de la infestación con 7000 y 14000 L-3 de H. contortus, utilizando como antígeno extracto soluble de larvas de tercer estadio (ESL).

Se observaron importantes diferencias en los niveles fecales de IgA anti-Haemonchus, día a día, en los valores absolutos, y las variaciones netas se muestran en el inserto de la figura. La respuesta hallada fue esencialmente similar a la obtenida en los corderos de 4 - 4,5 meses. Además el incremento durante la infestación primaria (7000 L-3) fue similar, aunque ligeramente más alto. Del mismo modo que en los corderos, no se encontró una elevación de los niveles anti-Haemonchus del Grupo A', después de la dosis de prueba (14000 L-3) mientras que el Grupo B' mostró un incremento en los títulos IgA específicos. Esta respuesta en ambos grupos, especialmente visible en las ovejas que habían estado infestadas (Grupo A'), fue la responsable de que no se observase ninguna correlación significativa entre los títulos de IgA anti- ESL de H. contortus y la eliminación fecal de huevos (Tabla 3.VI) a pesar de la elevación hallada tras la primoinfestación.

La similitud de elevaciones, especialmente durante la primoinfestación del Grupo A', y la constancia del perfil en

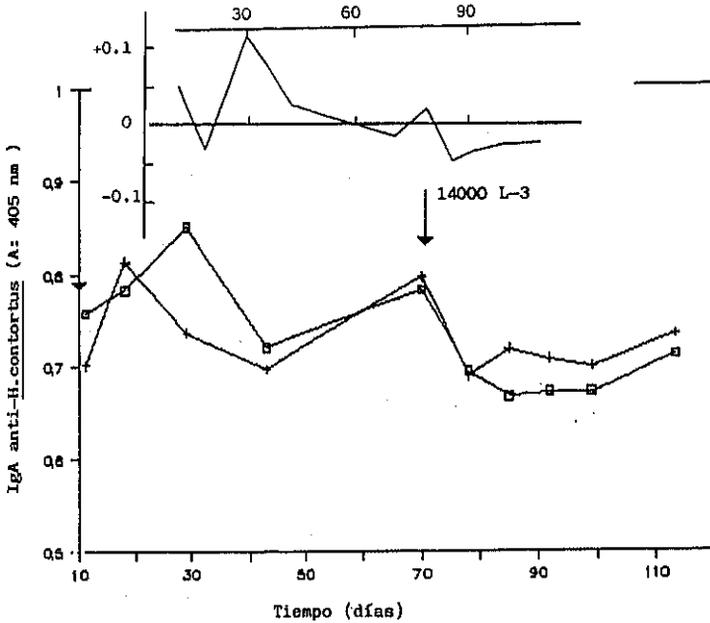


Fig. 3.18. Niveles de anticuerpos IgA específicos de extractos fecales frente a extracto soluble de L-3 de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+). Inseto: variaciones IgA fecales anti-*Haemonchus* de ovejas infestadas y reinfestadas. El cero representa los valores de D.O. obtenidos en las ovejas del Grupo B'.

IgA fecal anti L-3		IgA fecal anti Ad.	
D. PI A'	OD	Huevos	OD
11	0.757	0	0.463
18	0.782	121	0.522
29	0.850	940	0.597
43	0.719	720	0.488
70	0.781	0	0.508
78	0.693	0	0.482
85	0.666	0	0.466
92	0.671	0	0.474
99	0.671	264	0.492
113	0.711	1040	0.557
D. PI B'			
70	0.795	0	0.542
78	0.688	0	0.470
85	0.717	0	0.470
92	0.706	112	0.490
99	0.698	1237	0.523
113	0.733	3880	0.575

n = 16

r = 3.73 x 10<sup>-4</sup>

r = 0.643

P &lt; 0.01

Tabla 3.VI. Correlación entre la eliminación fecal de huevos de H. contortus y la respuesta IgA fecal (anti-L3 y anti-Ad de H. contortus), en ovejás Manchegas reinfestadas con 14000 L-3 después de una infestación con 7000 L-3 (A') y animales testigo sin la primoinfestación (B'). r = coeficiente de correlación lineal. P = nivel de significación. n = nº de datos.

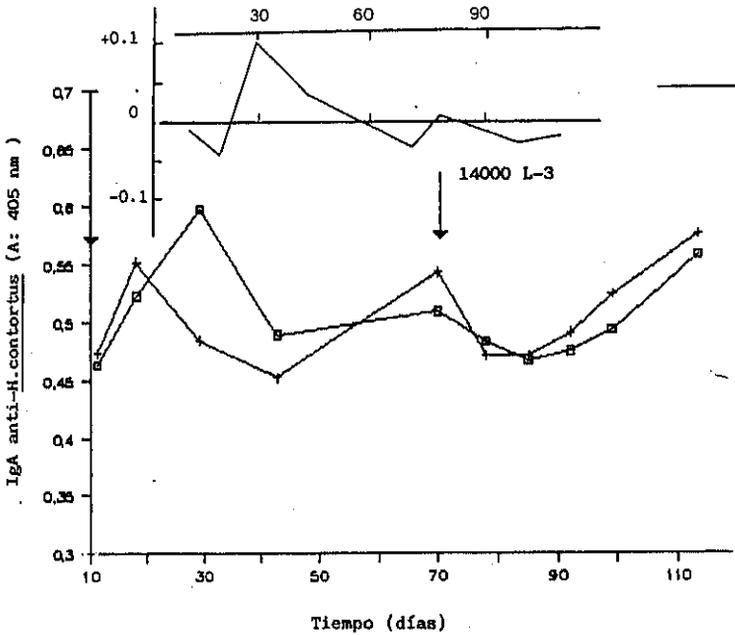


Fig. 3.19. Niveles de anticuerpos IgA específicos de extractos fecales frente a extracto soluble de Adultos de *H. contortus* en ovejas reinfestadas con 14000 L-3 tras previa infestación con 7000 L-3 del nematodo (□) o sin infestación previa (+). Inserto: variaciones IgA fecales anti-*Haemonchus* de ovejas infestadas y reinfestadas. El cero representa los valores de D.O. obtenidos en las ovejas del Grupo B'.

ambos grupos sugieren que las variaciones diarias observadas probablemente estuvieran relacionadas con la dieta de los individuos.

La respuesta IgA fecal valorada utilizando extracto soluble de Adultos (ESA) se representa en la Fig. 3.19. Mostró un perfil similar al exhibido con la otra fuente antigénica (ESL). Encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los recuentos de huevos y las IgA valoradas, durante la infestación del Grupo A' y la dosis de prueba de A' y B' ( $r = 0,643$ ,  $P < 0,01$ ).

#### 3.4. Sensibilidad del ELISA IgG anti-Haemonchus en el diagnóstico de la hemoncosis ovina

Para valorar la sensibilidad del método ELISA para el diagnóstico de la hemoncosis ovina, tanto en corderos como en ovejas, se emplearon los sueros de corderos (4-4,5 meses) y ovejas (12-12,5 meses de edad) durante las patencias de todas las primoinfestaciones (2500, 7000) y dosis de prueba realizadas (5000, 14000 L-3). También se emplearon los sueros negativos del grupo testigo, así como sueros positivos provenientes de infestaciones mono-específicas llevadas a cabo por los servicios técnicos de MSD-España.

Ya que en las hemoncosis ovinas existe una gran variabilidad en la respuesta individual, en los recuentos de HPG y la duración de los periodos de prepatencia, se estimó la necesidad de valorar los títulos de IgG anti-Haemonchus específicos de los sueros ovinos individuales. La Fig. 3.20 muestra los resultados obtenidos, en los ELISA, con un tiempo de incubación de 90 min, una dilución sérica 1/50 y empleando extracto de adultos como antígeno. Nuestros ELISA mostraron que la respuesta anti-

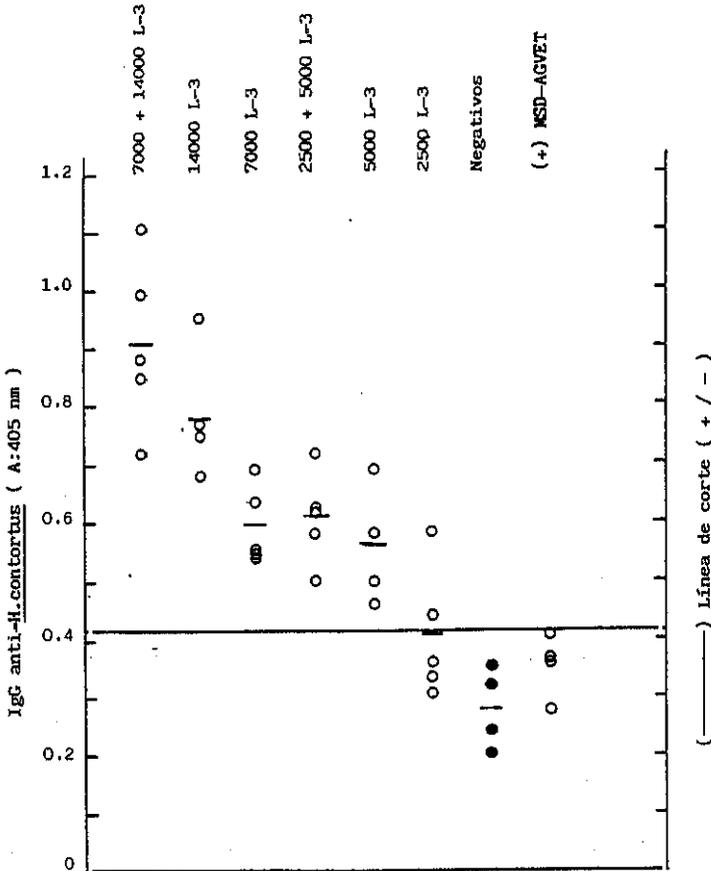


Fig. 3.20. Sensibilidad del ELISA (IgG) en el diagnóstico de la hemoncosis en función de la edad y dosis infestante recibida por el ganado ovino (1/50, 90 min). (o): animales infestados. (●): testigos no infestados.

Haemonchus fue, además de variable, dependiente de la dosis infestante recibida por los grupos de animales (Grupos A y B; A' y B') puesto que los títulos más elevados se hallaron en las ovejas que habían recibido dosis de L-3 más altas. Además, esta respuesta pareció ser dependiente de la edad de los corderos, puesto que los sueros de los corderos suministrados por MSD-España a pesar de las dosis infestantes recibidas (7000-9000 L-3) no exhibieron títulos anti-Haemonchus elevados. Ambas características sugerían que, en nuestras condiciones, la respuesta IgG estimada mediante ELISA fue tanto dosis -como edad- dependiente.

La línea de corte ("cut-off") de los sueros negativos (media + 2 desviaciones estándar, DE) fue de 0.41, lo que permitía un diagnóstico de las infestaciones por H. contortus de corderos de al menos 6 meses de edad y con dosis infestantes de al menos 5000 L-3 del nematodo gástrico. En estas condiciones, el ensayo mostró una sensibilidad y especificidad del 100% respecto a los corderos no infestados. No obstante, esta línea de corte no permitió el diagnóstico de la hemoncosis en los corderos manchegos de menos de 6-6,5 meses de edad, con independencia de la dosis infestante recibida, con escasas sensibilidad y especificidad. Teniendo en cuenta que las mezclas séricas mostraron una débil aunque significativa elevación de los títulos IgG anti-Haemonchus en los corderos, especialmente cuando se empleó como antígeno ESA (vide supra) y que el valor medio de las D.O. del grupo de corderos tras la infestación con 2500 L-3 fue de ca. 0,4, se procedió a realizar una caracterización antigénica de H. contortus (L-3 y Adultos).

### 3.5. Análisis proteico de los extractos solubles de L-3 (ESL) y Adultos (ESA) de H. contortus

En la Fig. 3.21 se muestra la composición proteica tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), teñida con azul de Coomassie (carril nº1, ESL; carril nº 3, ESA; carril nº 2 corresponde a los PM estándar). Las bandas resueltas en ambas fuentes proteicas más notables mostraron los PM estimados que aparecen en la Tabla 3.VII).

Ambos extractos solubles (ESA y ESL) exhibieron una gran variedad de péptidos en el intervalo de PM estimados (<94 kDa- >14,4 kDa). La concentración de acrilamida utilizada permitió una buena resolución a pesar de tratarse de geles uniformes, aunque no se investigaron las proteínas de PM superiores. En nuestras condiciones, el ESL fue más variado observándose hasta más de 30 péptidos, mientras que el ESA exhibió una gran variedad, aunque aparentemente fue menor.

Se observó una elevada similitud entre ambas fuentes antigénicas. La similitud electroforética se muestra en la Tabla 3.VII observándose que destacaron las regiones de 37 - 39 kDa y 53 kDa. Esta última se presentó en ESA de forma más notable que en ESL; además se detectaron péptidos comunes de 47, 43, 42, 34, 30, 28 y 26 kDa, así como péptidos de PM inferior a 20,1 kDa.

El patrón de proteínas obtenido mediante tinción con Nitrato de plata de los mismos extractos (Fig. 3.22) mostró asimismo una gran variedad de Ags, aunque aparecieron más intensamente teñidos los péptidos de bajo PM y en particular una amplia zona de PM medio ca. 20 kDa, presente en ambas fuentes antigénicas. Este método de tinción permitió además una superior resolución de las regiones de bajo PM, así como una gran acumulación de proteína de PM >94 kDa, que no pudieron ser fraccionadas dada la

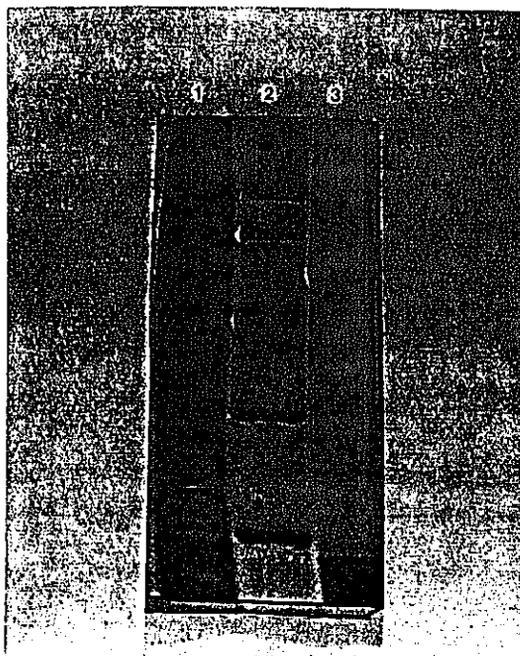


Fig. 3.21. Electroforesis (SDS - PAGE) teñida con Azul de Coomassie de extracto soluble de Adultos de H. contortus (ESA) (carril 1), marcadores de peso molecular (carril 2; 94, 67, 43, 30 y 20,1 kDa) y extracto soluble de L-3 de H. contortus (ESL) (carril 3).

ESL		ESA	
PM (kDa)	Más teñida	PM (kDa)	Más teñida
≥ 94	+	> 94	
81		85	
70	+		
63		67	
53	+	53	+
47		47	
43	+	43	
42		42	
41	+		
39	+	39	+
37	+	37	
34		34	
33			
30	+	30	
29			
28		28	
27			
26		26	
		25	
24			
22			
≤ 20.1	+	< 20.1	

Tabla 3.VII. Pesos moleculares estimados de las proteínas reconocidas en la electroforesis (SDS - PAGE), del extracto soluble de L-3 y de Adultos de H. contortus (teñidos con Azul de Coomassie). + = bandas notables.

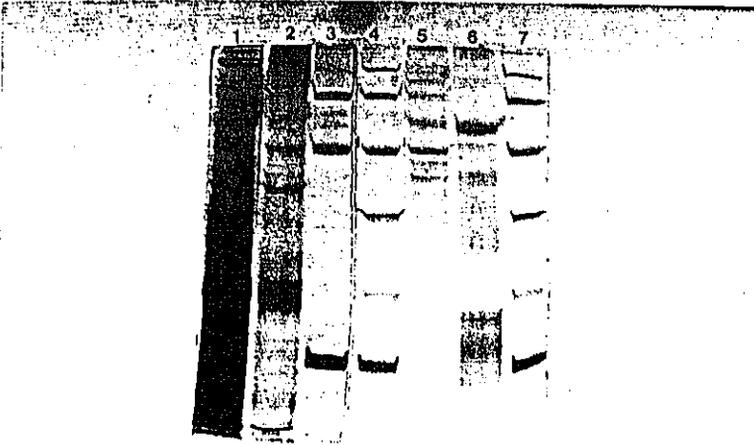


Fig. 3.22. Electroforesis (SDS - PAGE); carriles 1 - 3 teñidas con Nitrato de Plata; carriles 4 - 7 teñidas con Azul de Coomassie. 1 y 6: extracto soluble de Adultos; 2 y 5: extracto soluble de L-3; 3, 4 y 7: PM (94, 67, 43, 30, 20,1 y 14,4 kDa).

concentración de acrilamida empleada.

Teniendo en cuenta que a pesar de su elevado poder resolutivo, la motilidad electroforética de proteínas no constituye un criterio de identidad absoluta entre péptidos, nos propusimos conocer la similitud antigénica entre L-3 y Ad (ESL y ESA). Para ello se emplearon tres métodos diferentes: Agar inmunodifusión pasiva, ELISA indirecto e inmunodetección (inmunoimprontas, Western blotting).

La Fig. 3.23 muestra los resultados obtenidos en el "Western blot", cuando se enfrentó suero hiperinmune anti-extracto soluble de L-3 + adyuvante completo de Freund obtenido en conejo con un extracto soluble de Ad, separado mediante electroforesis desnaturante y reductora (SDS - PAGE). La inmunodetección mostró un elevado reconocimiento en todo el intervalo de PMS analizados lo que constituyó una evidencia de la elevada homología antigénica entre las L-3 y los adultos de H. contortus.

Esta elevada homología también se observó mediante un ELISA indirecto. En la Fig. 3.24, se observó la positividad del suero hiperinmune al enfrentarse a extracto soluble de L-3. De un modo similar, aunque con unos fondos más bajos, se determinó que el suero hiperinmune, también fue capaz de reconocer antígenos procedentes del extracto soluble de Adultos de H. contortus (Fig. 3.25).

En las pruebas de doble inmunodifusión en agar (Fig. 3.26) se enfrentaron sueros de corderos con infestaciones monoespecíficas por H. contortus, Teladorsagia circumcincta, Trichostrongylus colubriformis, Nematodirus battus, sueros de corderos sin infestar y suero hiperinmune anti-L-3 obtenido en conejo con ESL y ESA de H. contortus.

La figura muestra que sólo se observaron arcos de

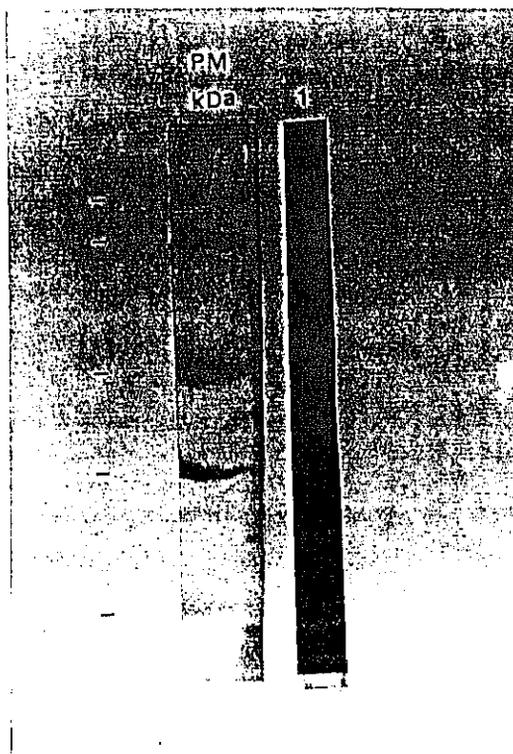


Fig. 3.23. Inmunodetección de extracto soluble de Adultos de H. contortus enfrentado a suero hiperinmune anti-extracto soluble de L-3 obtenido en conejo. PM : Peso molecular (94, 67, 43, 30, 20,1 y 14,4 kDa).

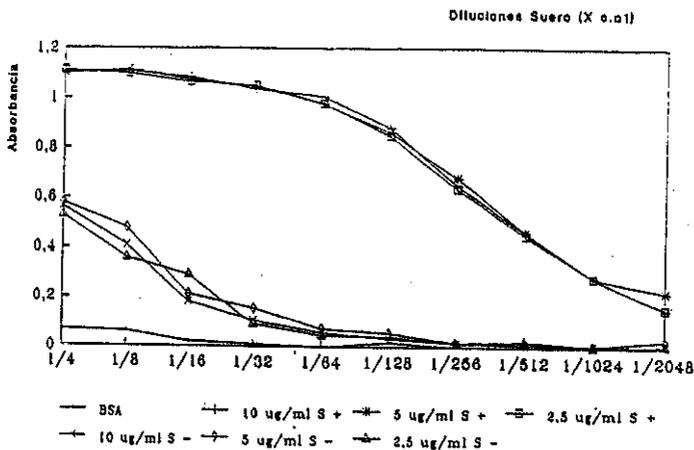


Fig. 3.24. Densidades ópticas obtenidas con (2,5, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) de ESL enfrentado a diluciones de suero hiperinmune de conejo anti-ESL [S+: (1/4 - 1/2048) X 0,01] y como blancos, BSA y diluciones de suero negativo de conejo (S-).

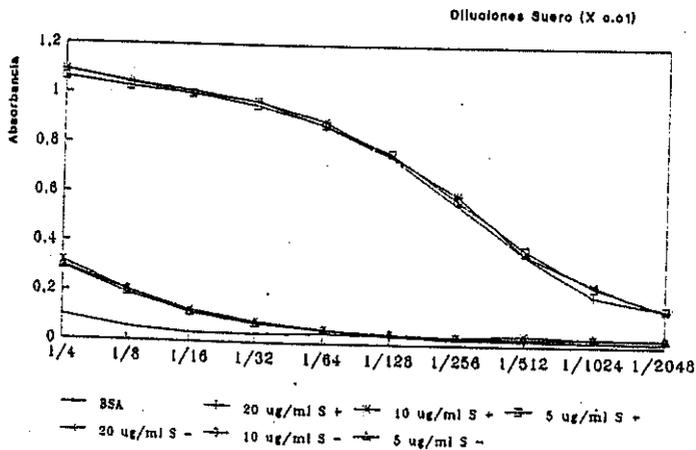


Fig. 3.25. Densidades ópticas obtenidas con (5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) de ESA enfrentado a diluciones de suero hiperinmune de conejo anti-ESA [S+: (1/4 - 1/2048) X 0,01] y como blancos, BSA y diluciones de suero negativo de conejo (S-).

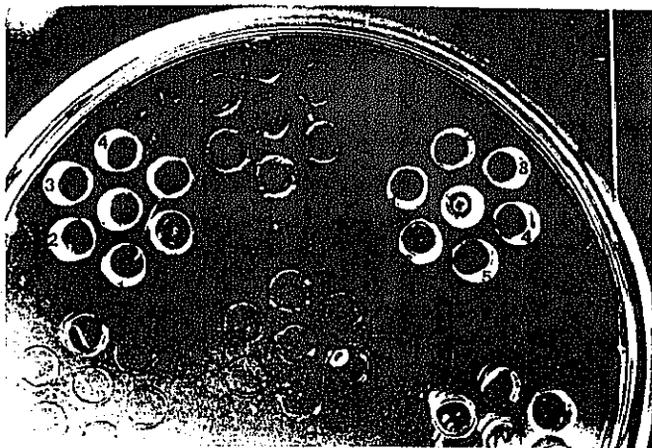


Fig. 3.26. Doble difusión en agar de sueros homólogos (1), heterólogos (2, 3, 4), negativos (5) e hiperimmune anti-L-3 obtenido en conejo (6) enfrentados a extractos solubles de Adultos (izda) y de L-3 (dcha) de H. contortus.

precipitación con ambas fuentes antigénicas en el caso de los pocillos con suero hiperimmune anti-L3. Además de señalar, en nuestras condiciones, la baja sensibilidad de esta técnica para el diagnóstico de la hemoncosis del ganado ovino, mostró la existencia de una gran similitud antigénica entre L-3 y Ad de H. contortus. Sin embargo, hay que señalar que las líneas de precipitación que aparecieron con los distintos extractos fueron distintas. Así se observó una única línea de precipitación cuando el suero hiperimmune se enfrentó al extracto soluble de Adultos y varias líneas de precipitación (menos marcadas), cuando reaccionó con el extracto soluble de L-3 de H. contortus; demostrándose, por tanto, que también existían variaciones antigénicas entre los dos extractos empleados por nosotros.

### 3.5.1. Dinámica del reconocimiento de antígenos a lo largo de las infestaciones

Tras la observación de los títulos séricos y fecales obtenidos con los extractos solubles (ESL) y (ESA) nos planteamos conocer las fracciones proteicas de dichos extractos que eran reconocidas por los sueros de los corderos. Para ello se realizaron inmunodetecciones seriadas a lo largo de las infestaciones y reinfestaciones.

#### 3.5.1.a. Reconocimiento de antígenos procedentes de ESL

En la Fig. 3.27 se muestran los patrones de reconocimiento tras la infestación de los corderos de 4 - 4,5 meses de edad. Las tiras nº 1 y nº 2 corresponden al patrón de reconocimiento por los sueros (mezclas séricas) de los Grupos A y B respectivamente, antes de la infestación. En la tira nº 3 hemos utilizado suero de

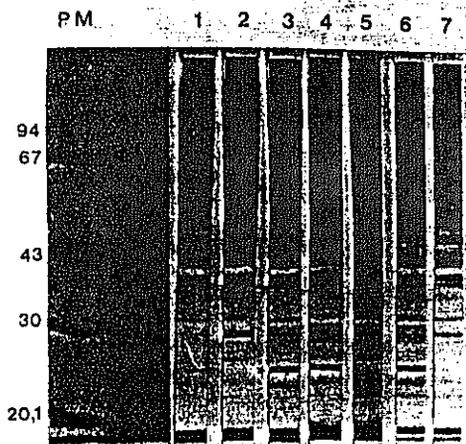


Fig. 3.27. Inmunodetecciones seriadas de extractos solubles de L-3 de *H. contortus* enfrentados a mezclas séricas de corderos infestados con 2500 L-3 y mezclas séricas de los corderos testigos. 1: muestra preinfestación Grupo A; 2: muestra preinfestación Grupo B; 3: periodo prepatente del Grupo A (8 días p.i.); 4: periodo patente del Grupo A (32 días p.i.); 5: Grupo B testigo (32 días p.i.); 6 y 7: mezclas séricas de ambos Grupos (A y B respectivamente) tras el tratamiento antihelmíntico. PM = marcadores de peso molecular (kDa).

la prepatencia de la primoinfestación del Grupo A (8 días.p.i.). La tira nº 4 muestra la patencia de la primoinfestación del Grupo A (32 días.p.i.). La tira nº 5 es la inmunodetección con suero del Grupo B (sin infestar). Las tiras nº 6 y 7 corresponden al tratamiento antihelmíntico de ambos grupos (ca. 50 días p.i.).

En todas las inmunodetecciones se observó un patrón similar desde 39 - 40 kDa hasta más de 94 kDa, destacando las bandas de 87, 74, 67, 63, 56, 50, 43 y 42 - 39 kDa. Probablemente estas bandas, que corresponden a regiones de PM con acúmulos de proteínas (ver testigo de transferencia) fueron debidas a las características de la membrana empleada.

En la tira nº 1 (Grupo A, antes de la infestación) no se observó ninguna banda de PM inferior a 39 kDa. Sin embargo, en la tira nº 3 (prepatencia) apareció una banda de 26-25 kDa y, más ligeramente, una de 23 kDa. Las tiras nº 4 y nº 6 fueron similares a la anterior.

En la tira nº 2 (el Grupo B, sin infestar) existió una banda de 31 kDa que se mantuvo con el tiempo aunque fue perdiendo intensidad gradualmente.

En la Fig. 3.28 se muestra el patrón de reconocimiento tras la dosis de prueba con 5000 L-3 (reinfestación del Grupo A y primoinfestación del Grupo B). Las tiras nº 8 y 8' se incubaron con los sueros de la prepatencia inicial de los Grupos A y B (9 días p.i.). Las tiras nº 9 y 9', corresponden al final de la prepatencia de A y B (16 días p.i.). Las tiras nº 10 y 10', pertenecen a la patencia (37 días p.i.).

En las tiras del Grupo A (nº 8, 9 y 10) se observó el mismo patrón de reconocimiento; la región de PM >31 kDa se mantuvo con igual reactividad. Las dos bandas de 26-25 y 23 kDa, ya observadas, se mantuvieron, mientras que apareció otra banda de

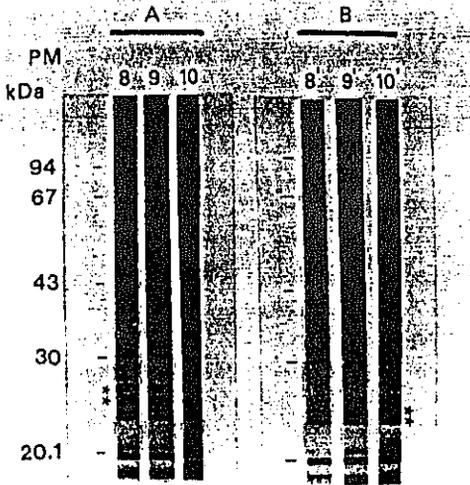


Fig. 3.28. Inmunodetecciones seriadas de extractos solubles de L-3 de *H. contortus* enfrentados a mezclas séricas de corderos infestados con 2500 L-3 del nematodo y reinfestados con 5000 L-3. (A) y mezclas séricas de corderos sin primoinfestar (B). 8 y 8': periodo prepatente temprano (9 días p.i.); 9 y 9': periodo prepatente tardío (16 días p.i.); 10 y 10': periodo patente (37 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular.

ca. 22 kDa. En las tiras del Grupo B también la parte superior permaneció similar, mientras que durante la prepatencia comenzaron a aparecer ligeramente (carril 8'); fueron observables al final de la prepatencia, y más claras en el periodo patente, péptidos con PM de 22 - 22,5 kDa, sin que existiesen patrones de reactividad comunes en ambos grupos con excepción de la reactividad, probablemente inespecífica, hallada en las regiones de PM superiores.

En la Fig. 3.29 se muestra la inmunodetección de sueros individuales de la prepatencia de los primeros contactos con H. contortus por ambos grupos; así los carriles 1 - 5 se incubaron con sueros individuales de animales primoinfestados con 2500 L-3 (Grupo A) y del 6 al 9 con los animales primoinfestados con 5000 L-3 (Grupo B).

Durante la prepatencia de las infestaciones se observó una gran variabilidad entre los distintos corderos empleados, sin que se asociase una mayor reactividad de los sueros a las distintas dosis utilizadas (corderos 97, 96, 67, 66 y 52 con 2500 L-3; corderos 92, 65, 91 y 89 con 5000 L-3). Existió, especialmente en las regiones de PM elevado, una alta heterogeneidad. Sin embargo, en la región comprendida entre 20 y 30 kDa, la respuesta ca. 26 kDa fue patente en los corderos nº 52 y 67. Existieron además algunos péptidos reconocidos de PM ca. 20 kDa e inferiores, quizás correspondientes a péptidos de degradación.

Una variabilidad comparable fue obtenida cuando se emplearon sueros individuales de la patencia. Los individuos del Grupo A, mostraron una cierta similitud en regiones de PM superior a 40 kDa, salvo el cordero 52 que reconoció las bandas de forma poco marcada. La reactividad observada en las mezclas séricas (ver Fig. 3.30) del Grupo A, de 26 - 25 kDa, parecieron ser debidas a la contribución de un único animal (nº 52) (carril 3). Similares consideraciones pueden ser hechas sobre el comportamiento del

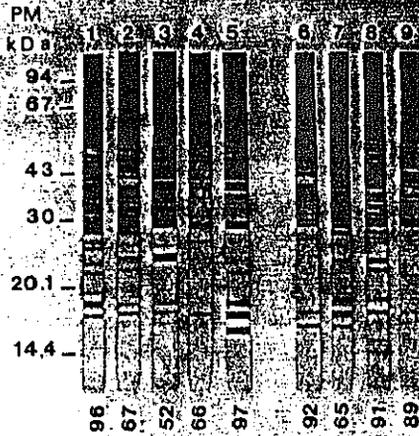


Fig. 3.29. Inmunodetecciones de extractos solubles de L-3 de H. contortus enfrentados con sueros individuales de corderos durante el periodo prepatente de la infestación con 2500 L-3 (tiras 1 - 5, Grupo A, 11 días p.i.) y la reinfestación con 5000 L-3 (tiras 6 - 9, Grupo B, 12 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular (kDa).

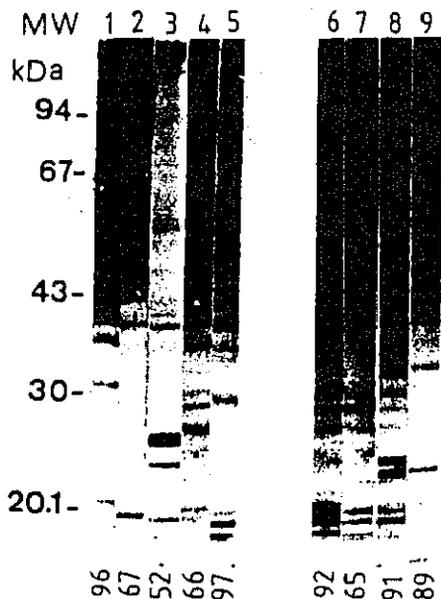


Fig. 3.30. Inmunodetecciones de extractos solubles de L-3 de *H. contortus* enfrentados con sueros individuales de la patencia de la infestación con 2500 L-3 (tiras 1 - 5, Grupo A, 32 días p.i.) y la dosis de prueba con 5000 L-3 (tiras 6 - 9, Grupo B, 37 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular (kDa).

Grupo B, aparte de la ya mencionada similitud en regiones de elevado PM. La inmunorreactividad notable de las mezclas séricas de 22 y 22,5 kDa sólo pertenecieron a un cordero (nº 91, carril 8), lo que indicaba que dichos anticuerpos no podían ser empleados como marcadores de infestación por H. contortus.

### 3.5.1.b. Reconocimiento de antígenos procedentes de ESA

Cuando de forma análoga a las ESL se enfrentaron electrotransferidos de ESA a mezclas séricas de los corderos durante la infestación con 2500 L-3 de H. contortus se obtuvieron los resultados de la Fig. 3.31.

Observamos en las tiras nº 1 y nº 2, las bandas reconocidas por los sueros de los Grupos A y B respectivamente, antes de la infestación. El carril nº 3 corresponde a la prepatencia de la primoinfestación del Grupo A (4-4,5 meses de edad). La tira nº 4 corresponde a la patencia de la primoinfestación del Grupo A. La tira nº 5 muestra el patrón del Grupo B sin infestar (testigo). Las tiras nº 6 y nº 7 corresponden a las incubaciones con sueros obtenidos de los dos grupos de corderos en el momento del tratamiento antihelmíntico.

Todas las mezclas séricas reconocieron bandas proteicas de PM > 69 kDa. El grupo de corderos infestados reconocían una banda de ca. 60 kDa antes de la infestación, que se mostró más marcada en la prepatencia (carril 3) y patencia (carril 4), desapareciendo tras el tratamiento (nº 6). Alrededor de 50 - 49 kDa, existieron bandas que permanecieron a lo largo de toda la primoinfestación. También se observaron dos bandas de 38 y 36 kDa. Más interesante resultó ser la región con PM entre 30 y 20 kDa. Tras la infestación de los corderos apareció en la prepatencia una fuerte inmunorreactividad en 26 - 27 kDa (carril

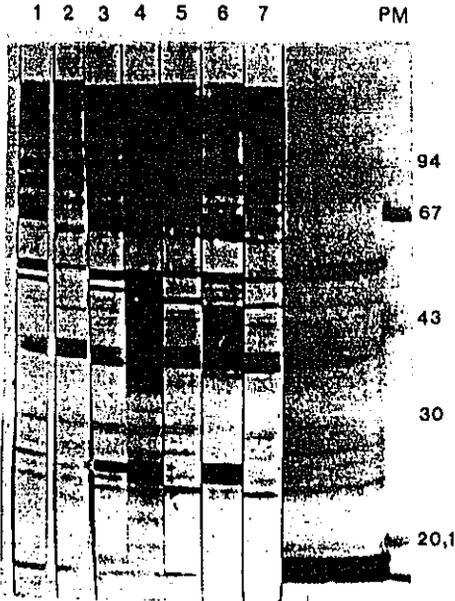


Fig. 3.31. Inmunodetecciones seriadas de extractos solubles de Adultos de *H. contortus* enfrentados a mezclas séricas de corderos infestados con 2500 L-3 del nematodo y mezclas séricas de los corderos testigos. 1: muestra preinfestación Grupo A; 2: muestra preinfestación Grupo B; 3: periodo prepatente del Grupo A (8 días p.i.); 4: periodo patente del Grupo A (32 días p.i.); 5: Grupo B testigo (32 días p.i.); 6 y 7: mezclas séricas de ambos Grupos (A y B respectivamente) tras el tratamiento antihelmíntico. PM : marcadores de peso molecular (kDa).

3), permaneciendo en la patencia (carril 4). La muestra correspondiente a la patencia de la infestación mostró además una clara inmunodetección entre 24 - 25 kDa así como una mayor reactividad de las bandas entre 50 y 37 kDa, especialmente una banda de PM aproximado 44 - 45 kDa.

Las mezclas séricas de los corderos del Grupo B (carriles 2, 5 y 7) no incrementaron, en ningún momento su patrón. Los animales reconocieron antes de la infestación una región de PM ca. 36 - 38 kDa que fue desapareciendo gradualmente a lo largo del periodo experimental.

Después del tratamiento antihelmíntico se procedió a la reinfestación y primoinfestación de los Grupos A y B respectivamente, con 5000 L-3. En la Fig. 3.32 se muestran las bandas reconocidas por los sueros en la prepatencia inicial (tiras nº 8 y 8'), final de prepatencia (tiras nº 9 y 9') y patencia (tiras nº 10 y 10').

En la reinfestación del Grupo A (tiras 8, 9 y 10) el patrón de reconocimiento fue muy similar. Fueron especialmente notables algunas proteínas de PM > 94 kDa, de 86, 77, 65, 52-48, entre 44 y 35 y, finalmente, el doblete de 27-26 y 25-24 kDa.

En la primoinfestación del Grupo B (tiras 8', 9' y 10'), además del reconocimiento de antígenos de PM > 35 kDa (65, 54, 48, 44, 41, 39, 37 kDa) los sueros exhibieron, de forma similar a los sueros del Grupo A (infestados + reinfestados), una gran reactividad en la región de PM comprendidos entre 27-23 kDa que apareció durante el inicio de la prepatencia (tira nº 8'), se incrementó y dio un triplete claro al final de la prepatencia (tira nº 9') de PM estimados en 27-26, 25-24 y 23 kDa. Finalmente, ya en la patencia (tira nº 10'), mostraron una mayor reactividad general que los corderos del Grupo A en la misma situación.

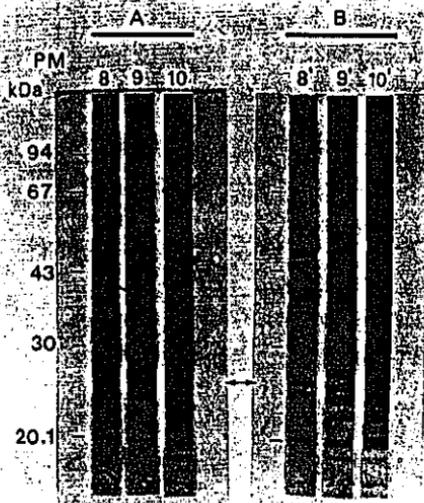


Fig. 3.32. Inmunodetecciones seriadas de extractos solubles de Adultos de *H. contortus* enfrentados a mezclas séricas de corderos infestados con 2500 L-3 del nematodo y reinfestados con 5000 L-3 (A) y mezclas séricas de corderos sin primoinfestar (B). 8 y 8': periodo prepatente temprano (9 días p.i.); 9 y 9': periodo prepatente tardío (16 días p.i.); 10 y 10': periodo patente (37 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular (kDa).

Ya que todos los experimentos anteriores habían sido realizados con mezclas de sueros, teniendo en cuenta los resultados obtenidos cuando se empleó como antígeno extracto soluble de L-3 (ESL), se exploró la posible variabilidad individual en el reconocimiento, tanto durante la prepatencia, como durante la patencia de las infestaciones de ambos Grupos (A y B) tras su primer contacto con H. contortus.

Los resultados obtenidos durante la prepatencia y patencia se muestran en las Figs. 3.33 y 3.34. Los carriles nº 1 - 5, corresponden a los corderos # 97, 96, 67, 66 y 52 (Grupo A, infestados con 2500 L-3) y los carriles nº 6 - 9, corresponden a los patrones de inmunodetección de los corderos # 92, 65, 91 y 89 (Grupo B, sometidos a la dosis de prueba con 5000 L-3).

Los modelos de inmunodetección fueron muy variables entre los distintos corderos, con independencia de la dosis infestante empleada en cada caso. Así, mientras algunos corderos mostraron patrones de reconocimiento complejos (# 52, 91), la respuesta de otros animales -a excepción de la más que probable reacción inespecífica en PM > 63 kDa- fue relativamente escasa (# 89, 67, 66, entre otros). En nuestras condiciones no se observó ningún antígeno en la región comprendida entre 20 y 30 kDa con las mezclas séricas que fuese reconocida por todos los corderos; mientras los corderos # 52, 92 y 91 aparentemente reconocieron un doblete de PM similar al señalado en las mezclas séricas, los animales # 96, 89, 65, no mostraron más que una reacción muy débil en dicha región.

Los patrones de inmunodetección obtenidos durante la patencia de la infestación con 2500 (Grupo A) y 5000 L-3 (Grupo B) se muestran en la Fig. 3.34.

Las tiras nº 1 al 5 se incubaron con los sueros pertenecientes al Grupo A (la tira nº 1: animal nº 96, la tira nº

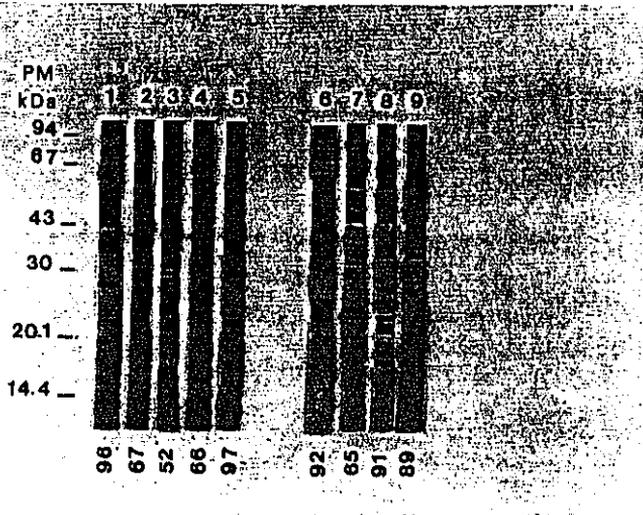


Fig. 3.33. Inmunodetecciones de extractos solubles de Adultos de *H. contortus* enfrentados con sueros individuales de corderos durante el periodo prepatente de la infestación con 2500 L-3 (tiras 1 - 5, Grupo A, 11 días p.i.) y la reinfestación con 5000 L-3 (tiras 6 - 9, Grupo B, 12 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular (kDa).

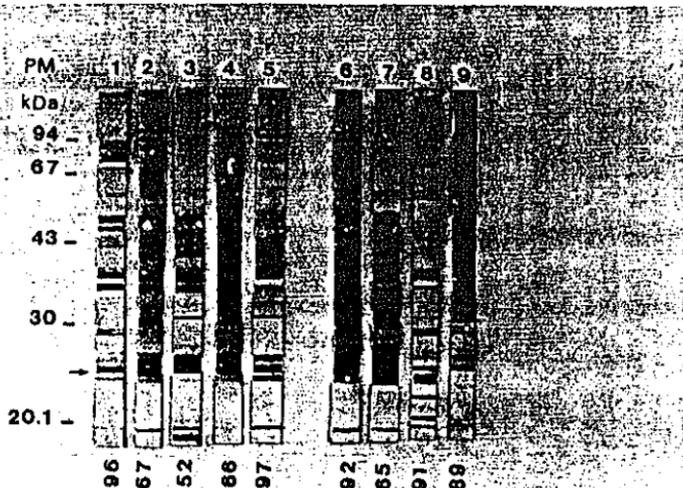


Fig. 3.34. Inmunodetecciones de extractos solubles de Adultos de *H. contortus* enfrentados con sueros individuales de la patencia de la infestación con 2500 L-3 (tiras 1 - 5, Grupo A, 32 días p.i.) y la dosis de prueba con 5000 L-3 (tiras 6 - 9, Grupo B, 37 días p.i.). PM = marcadores de peso molecular (kDa).



2 era del nº 67, la nº 3 era del nº 52, la nº 4 era del nº 66, la nº 5 era del nº 97). El análisis individual con los sueros de los corderos mostró la existencia de grandes variaciones individuales entre los patrones de inmunorreconocimiento, de forma similar a lo hallado en la prepatencia de la infestación.

Así, en la tira nº 1 se observaron algunas bandas muy marcadas (89, 74, 50, 48, 38 y 36 kDa) similares a las que aparecen en los otros animales. Los otros cuatro animales del grupo mostraron un bandeo similar. Destacó una banda de 65 kDa en la tira nº 2; en la tira nº 4 aparecía un bandeo muy marcado desde 50 a 33-32 kDa y en la tira nº 5, una fuerte reactividad desde 43 - 36 kDa.

Se observó que la banda de 25-24 kDa estuvo presente en todos los animales; la de 27-26 kDa también, aunque en la nº 1, menos marcada; en cuanto a la reactividad de 23 kDa apareció en la nº 5 principalmente, aunque también se apreció en las tiras nº 1, 2 y 4 no mostrándose en la tira nº 3.

Las tiras del nº 6 al nº 9 se enfrentaron a los sueros pertenecientes al Grupo B (la tira nº 6 se incubó con suero del animal nº 92, la tira nº 7 era del nº 65, la tira nº 8 era del nº 91 y la tira nº 9 era del animal nº 89). También mostraron cierta heterogeneidad, aunque se observaron bandas muy conservadas en todas las tiras (desde 50 a 36, 33 y 30 kDa). En la tira nº 9 apareció una banda muy marcada de PM > 94 kDa. Cabe destacar que los 4 sueros reconocieron la banda de 25-24 kDa; que en las tiras nº 6, 7 y 8 apareció marcada la de 23 kDa; y que los cuatro sueros detectaron la de 27-26 kDa, aunque en la tira nº 8 se observó muy poco marcada. El suero del animal nº 91 reconoció dos bandas inferiores a 23 kDa que no aparecieron con los demás sueros.

Hay que destacar la presencia de este triplete y de forma

más notable las bandas de 27-26 y 25-24, que fueron más constantes. Una de ellas, de 25-24 kDa, fue específicamente reconocida por todos los sueros de los corderos, con independencia de la edad y de la dosis infestante utilizada. Además de esta región común, fueron también características las proteínas reconocidas en la región de 38-35 kDa presentes en todos los modelos de inmunorreconocimiento.

### 3.5.2. Identificación de antígenos relevantes para el diagnóstico

A fin de comprobar, dado el tratamiento desnaturalizante y reductor (SDS y mercaptoetanol) de las muestras antigénicas procesadas en las electroforesis, si los antígenos parasitarios reconocidos en los ensayos mediante ELISA eran similares a los reconocidos mediante "Western blotting" se procedió a realizar una inmuoadsorción en fase sólida (placa de microtitulación). Tras el tapizado de las placas con Ag de Ad de H. contortus (ESA) en condiciones similares a las empleadas en los ELISA, se incubaron con una mezcla sérica de animales infestados (57 días p.i.). Los anticuerpos fijados a los Ags de la placa fueron eluidos mediante un tratamiento con Tris-glicina y enfrentados a un electrotransferido de Ad de H. contortus tras SDS - PAGE. Los inmunocomplejos fueron detectados mediante "Western blotting".

En la Fig. 3.35 se muestran los resultados obtenidos. Mientras que cuando se enfrentó una mezcla sérica de sueros positivos (patencia de la infestación con 5000 L-3) (carril 1) se obtuvo un patrón de reconocimiento muy amplio, comparable a los obtenidos en ensayos anteriores, la incubación previa de los sueros con Ag de H. contortus y posterior inmunodetección (carril 2) sólo permitió observar ligeras reactividades con proteínas de PM comprendidas entre 30 y 63 kDa y una fuerte reactividad en un doblete de PM estimado en 25-27 kDa, correspondiente a las

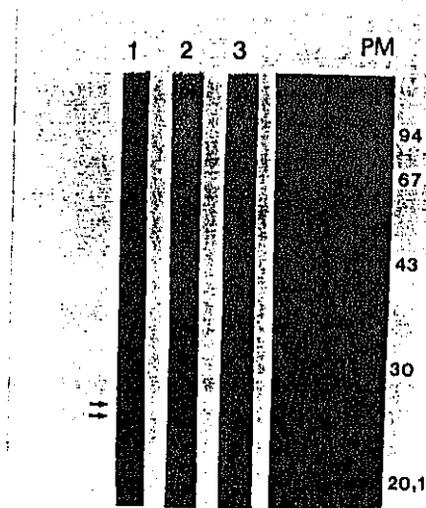


Fig. 3.35. Inmunodetección de extracto soluble de Adultos de H. contortus enfrentado a 1: mezcla de sueros de animales infestados con H. contortus; 2: anticuerpos eluidos, previamente inmuoadsorbidos a fase sólida; 3: segundo pico de anticuerpos eluidos. PM = marcadores de peso molecular (kDa).

mayores reactividades en la tira nº 1, con sueros sin adsorber, lo que constituyó una evidencia de que dichos Ags eran reconocidos tanto en los ELISA como en los "Western blots".

La tira nº 3 se incubó con el resto de los anticuerpos que en la primera extracción no se habían separado de los antígenos que tapizaban la placa de microtitulación (pico 2), y no se apreció un bandeado claro, lo que significó que la mayoría de los anticuerpos habían sido separados en la primera extracción correspondiente a la tira nº 2.

### 3.5.3. Antigenicidad cruzada entre H. contortus y otros Trichostrongyloidea

#### 3.5.3.a. Infestaciones de corderos con otros Trichostrongyloidea

A pesar de que el método desarrollado por nosotros era adecuado para realizar un diagnóstico de las infestaciones ovinas (corderos y ovejas) por H. contortus, particularmente si se evaluasen los títulos de anticuerpos frente a los antígenos comprendidos entre 20 y 30 kDa (vide supra), la regla, en condiciones naturales, son las infestaciones mixtas, implicando varios géneros de Trichostrongyloidea. Teniendo en cuenta esta circunstancia y las disponibilidades se realizó un estudio preliminar de la posible antigenicidad cruzada entre L-3 y Ad de H. contortus y Teladorsagia circumcincta, Trichostrongylus colubriformis y Nematodirus battus, mediante ELISA, así como una exploración de los Ags comunes entre estos nematodos ("Western blotting" e inmunoadsorción).

Para ello se llevaron a cabo dos infestaciones monoespecíficas de corderos, cuyos resultados de los análisis coprológicos se muestran en las Tablas 3.VIII y 3.IX.

D.p.i.	H.c.	N.b.	T.c.	Te.c.
	nº 70	nº 77	nº 69	nº 80
16	-	15	100	-
17	-	50	250	-
20	1050	15	500	-
28	7000	-	1550	45
30	2750	-	300	-
51	3600	15	300	30
59	750	15	4300	30
60	2700	-	1450	15
61	1825	25	100	-
72	1350	9,4	75	-

Tabla 3.VIII. Eliminación fecal de huevos (HPG) del 1er lote experimental de donadores de H. contortus, N. battus, T. colubriformis y Ta. circumcincta. D.p.i. = días post infestación.

D.p.i.	H.c.	T.c.	N.b.	Te.c.
	O	B	C	G
18	600	100	50	50
19	6500	50	45	200
20	8800	250	100	400
25	24000	500	45	850
27	26500	500	45	1100
32	39800	450	30	250
56	6650	50	15	450
84	225	100	15	350

Tabla 3.IX. Eliminación fecal de huevos (HPG) del 2º lote experimental de donadores de H.contortus, T.colubriformis, N.battus y Ta.circumcincta. D.p.i. = días post infestación.

### 3.5.3.a.1. Especificidad del método ELISA indirecto (IgG anti-H.contortus)

Se emplearon sueros de la patencia de las infestaciones con los Trichostrongyloidea. La Tabla 3.X muestra los resultados obtenidos cuando se representaron las D.O. halladas con los sueros procedentes de infestaciones monoespecíficas, al utilizar como fuente antigénica ESL de H.contortus, respecto a los corderos infestados con H.contortus.

La similitud de valores de D.O. no permitió una adecuada diferenciación entre las infestaciones por H.contortus y las restantes trichostrongilidosis, por lo que se estudió el efecto de las diluciones séricas y los alargamientos de los periodos de incubación (30 y 90').

El efecto de la dilución sérica (1/50, 1/100 y 1/200) sobre la especificidad del ELISA indirecto con ESL, aunque permitió separar las infestaciones con Te.circumcincta y N.battus, no fue suficiente para discriminar entre las infestaciones por H.contortus y T.colubriformis. En este sentido, además, resultó sorprendente que los corderos infestados con T.colubriformis reconocieran de forma más adecuada los ESL de H.contortus que los propios sueros procedentes de infestaciones con este helminto. Así, mientras los corderos con H.contortus mostraron una D.O. de 1,27, los sueros heterólogos de T.colubriformis produjeron 1,34.

Ya que los ESL incluso llegaron a determinar D.O. superiores con sueros heterólogos, se investigó el efecto del alargamiento de los periodos de incubación con ESA y tres diluciones séricas (1/50, 1/100 y 1/200). Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 3.36, 3.37 y 3.38, respectivamente. Como en el caso precedente, las cinéticas de los sueros heterólogos sólo permitieron una adecuada discriminación con N.battus y

	30'			90'		
	1:50	1:100	1:200	1:50	1:100	1:200
<b>H.c.</b>	0,478	0,411	0,329	1,272	1,095	0,877
<b>Te.c.</b>	0,348	0,257	0,173	0,927	0,684	0,401
<b>T.c.</b>	0,504	0,455	0,396	1,341	1,211	1,054
<b>N.b.</b>	0,359	0,268	0,183	0,950	0,713	0,488

Tabla 3.X. Densidades ópticas (D.O.) a 405 nm de los ELISA con ESL de *H.contortus* y sueros homólogos (H.c.) y heterólogos (Te.c.; T.c. y N.b) de la patencia de las infestaciones con *Trichostrongyloidea* (T.i.= 30 y 90 min.).

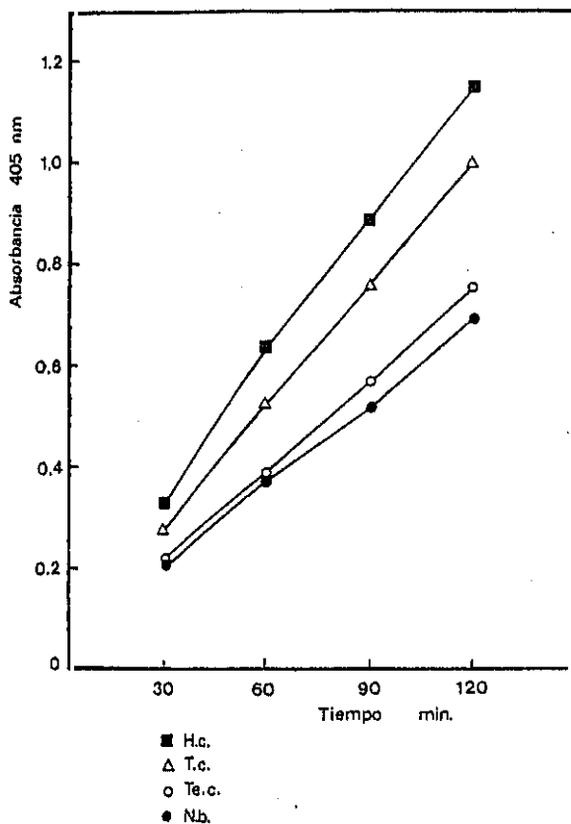


Fig. 3.36. Efecto del alargamiento de la incubación en la especificidad del ELISA al utilizar extracto soluble de Adultos de H.contortus con sueros diluidos (1/50) procedentes de infestaciones monoespecíficas con H.contortus, Te.circumcincta, N.battus y T.colubriformis.

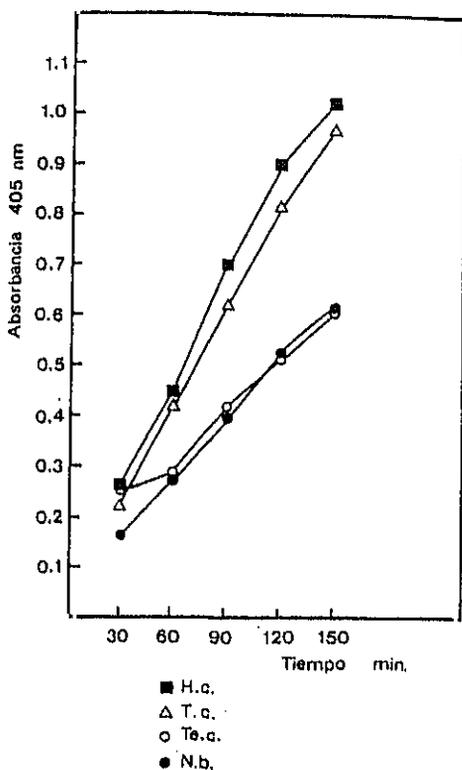


Fig. 3.37. Efecto del alargamiento de la incubación en la especificidad del ELISA al utilizar extracto soluble de Adultos de H. contortus con sueros diluidos (1/100) procedentes de infestaciones monoespecíficas con H. contortus, Ta. circumcincta, N. battus y T. colubriformis.

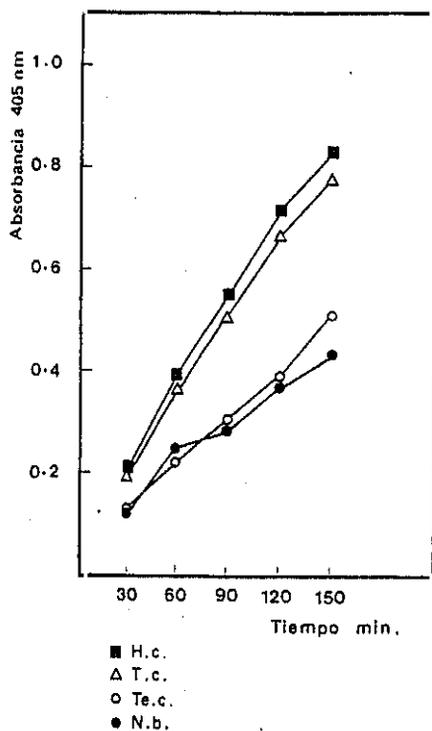


Fig. 3.38. Efecto del alargamiento de la incubación en la especificidad del ELISA al utilizar extracto soluble de Adultos de H.confortus con sueros diluidos (1/200) procedentes de infestaciones monoespecificas con H.confortus, Te.circumcineta, N.battus y T.colubriformis.

Te.circumcincta pero no con T.colubriformis, ni siquiera al cabo de 150 min. Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a realizar un análisis de los Ags de H.contortus reconocidos por los sueros de los corderos infestados con otros Trichostrongyloidea.

### 3.5.3.a.2. Pruebas de reactividad cruzada

#### 3.5.3.a.2.1. Pruebas de antigenicidad cruzada con ESL

Pese a la falta de bandas reconocidas específicamente por todos los sueros de los animales infestados con H.contortus decidimos estudiar los posibles antígenos de ESL inmunodetectados que pudieran aparecer en el patrón de reconocimiento cuando se utilizaron sueros de animales infestados con otras especies de Trichostrongyloidea. Así en la Fig. 3.39 se representan los patrones de inmunodetección de sueros homólogos y heterólogos obtenidos en la prepatencia y patencia. El ESL fraccionado mediante SDS - PAGE se enfrentó a sueros de corderos infestados monoespecíficamente con H.contortus, Te.circumcincta, N.battus y T.colubriformis. Se muestra además el testigo de transferencia y los marcadores de PM transferidos y teñidos con Negro Amido.

Las muestras correspondientes a la prepatencia fueron obtenidas al cabo de 1 semana p.i. La edad de los corderos (3,5 meses H.c.; 4 meses T.c.; 2,5 meses N.b. y Te.c.) excluían razonablemente la presencia de anticuerpos calostrales dada la vida media de estos Ac.

En la prepatencia de la infestación con H.contortus se reconocían principalmente dos bandas (50 y 36 kDa) (ver Tabla 3.XI). En la patencia existió un patrón de bandeo más complejo

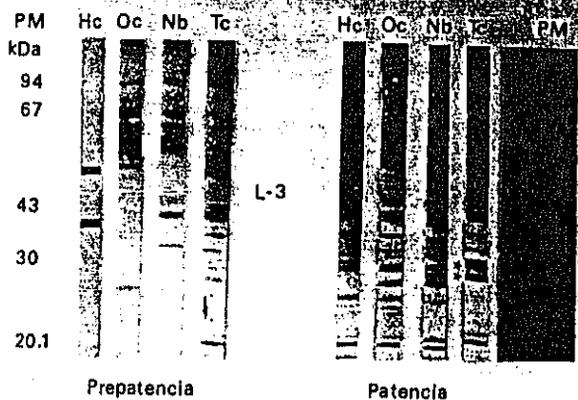


Fig. 3.39. Inmunodetecciones de extractos solubles de L-3 de H. contortus enfrentados con sueros individuales de corderos con infestaciones monoespecíficas durante la prepatencia y patencia. 1 y 1': infestación con H. contortus; 2 y 2': infestación con T. circumcincta; 3 y 3': infestación con N. battus; 4 y 4': T. colubriformis. PM = marcadores de peso molecular (kDa).

## PREPATENCIA (ESL)

PM (kDa)	H.c.	Te.c.	N.b.	T.c.
67		+		
54		+		
50	+ *			+
43				+
40			+	+
36	+ *		+	+
32				+
30				+
27				+
25		+		

\* Muy marcada

Tabla 3.XI. Reactividad homóloga y heteróloga frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus, durante la prepatencia (Fig.3.39). PM= Peso molecular (kDa). + = banda notable. \* = banda muy reactiva.

## PATENCIA (ESL)

H.c.		Te.c.		N.b.		T.c.	
A	M	A	M	A	M	A	M
	50*						
				47			
43		43		43		43	
40		40			40	40	
36		36			36	36	
32		32		32		32	
31		31		31			
30		30		30		30*	
				28			
		27*					27*
25		25					
		23					
		22					

\*: muy marcada

A: aparece

M: se mantiene

Tabla 3.XII. Reactividad homóloga y heteróloga frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus, durante la patencia (Fig. 3.39).  
PM = Peso molecular (kDa).

(ver Tabla 3.XII) con un fuerte reconocimiento de 50 kDa, así como entre 30 y 43 kDa (43, 40, 36, 32, 31 y 30 kDa) y uno de 25 kDa.

En la prepatencia de la infestación con Te.circumcincta se reconocían bandas de 67, 54 y, en menor medida, 25 kDa. En la patencia aparecían más reactividades hasta 54 kDa (similares a las de la prepatencia) y otras como 43, 40, 36, 32, 31, 30, 27, 25, 23 y 22 kDa, siendo más notable la de 27 kDa.

En la prepatencia de la infestación por N.battus la reactividad fue muy escasa (ca. 36 kDa). Ya en la patencia se observaron más inmunorreconocimientos (ver Tabla 3.XII).

En la prepatencia de la infestación por T.colubriformis el bandeo fue más heterogéneo (50, 43, 40, 36, 32, 30 y 27 kDa). En la patencia no aparecieron bandas nuevas, pero las que había ganaron intensidad, sobre todo las de 30 y 27 kDa. Sin embargo, no se detectaron bandas de PM inferior, lo que serviría para diferenciarlo de las infestaciones por H.contortus. El patrón de reconocimiento con suero de la patencia de N.battus tampoco presentaba estas bandas inferiores, aunque el suero de Te.circumcincta reconoció una proteína de PM ca. 25 kDa, en la patencia, al igual que H.contortus.

Según se observó existió un notable grado de antigenicidad cruzada, visible tanto en la prepatencia como en la patencia especialmente en la región de PM comprendida entre 43 y 30 kDa, en la que todos los sueros (homólogo y heterólogos) reconocieron el mismo perfil antigénico. Resultó además notable observar que algunos Ags de H.contortus larvarios (L-3) (ESL) fueron reconocidos más intensamente por los sueros heterólogos que por los homólogos.

Se procedió a realizar un análisis de antígenos larvarios de

H. contortus y su ulterior reconocimiento homólogo y heterólogo mediante electroforesis en dos dimensiones y "Western blotting". La primera dimensión separó a las proteínas de los extractos solubles de ESL y ESA mediante su carga eléctrica y la segunda dimensión por su PM.

Así en las Figs. 3.40 - 3.42 observamos las distintas inmunodetecciones con los sueros de los animales infestados con Te. circumcincta, T. colubriformis y con N. battus, respectivamente. Hallamos una gran similitud de proteínas reconocidas, cuyos PM se representan en la Tabla. 3.XIII.

En la Fig. 3.43 se muestra un Western blot representativo al incubar una mezcla sérica de animales infestados con H. contortus, en la patencia. Se observó en la parte superior una elevada reactividad cerca del origen de migración (cátodo), debido a su escaso carácter electronegativo. Es de destacar que apareció una clara inmunorreactividad en regiones fuertemente electronegativas y con un PM estimado en ca. 27 kDa.

En las Figs. 3.40, 3.41 y 3.42 se muestran las inmunodetecciones con los sueros heterólogos probados. Fue notable, en todos los casos, la fuerte inmunorreacción de proteínas poco electronegativas,  $PM > 94$  kDa. El modelo hallado con N. battus fue el menos marcado. Por el contrario el más similar al obtenido con H. contortus correspondió a T. colubriformis, con un péptido de aproximadamente 27 - 30 kDa de motilidad electroforética, similar a la proteína antes indicada para H. contortus. Esta proteína también fue visible cuando se empleó una mezcla de sueros heterólogos (no mostrado) similar a la obtenida para T. colubriformis, aunque con mayor reconocimiento en PM elevados.

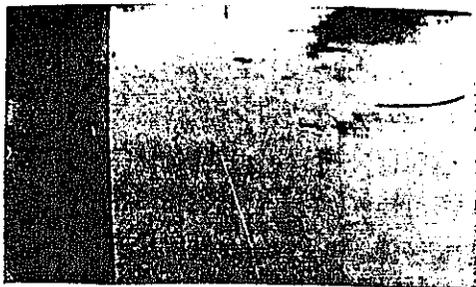


Fig. 3.40.



Fig. 3.41.

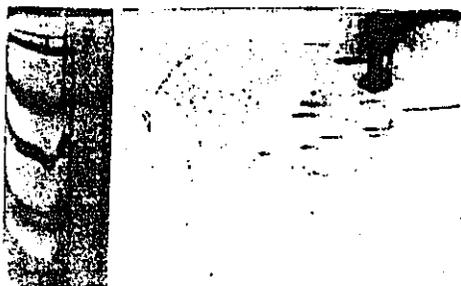


Fig. 3.42.

Figs. 3.40 - 3.42. Inmunodetección en dos dimensiones (2DE) de extracto soluble de L-3 de H. contortus enfrentado a sueros de la patencia de una infestación monoespecífica con:

3.40. Ta. circumcincta. PM= Peso molecular (kDa).  
+: ánodo; -: cátodo.

3.41. T. colubriformis. PM= Peso molecular (kDa).

3.42. N. battus. PM= Peso molecular (kDa).

## RECONOCIMIENTO BIDIMENSIONAL (ESL)

H.c.	Te.c.	N.b.	T.c.
>94	+	+	+
74-68	+	+	+
63-61	+	+	+
58-54	+	+	+
50-47	+	+	+
43-40	+	+	+
-	38	+	+
-	36-35	+	-
30-27	-	-	+

Tabla 3.XIII. Inmunodetecciones bidimensionales de extracto soluble de L-3 de H. contortus cuando se enfrentó con sueros procedentes de animales con infestaciones patentes, monoespecíficas de H. contortus, T. colubriformis, Te. circumcincta y N. battus. PM = Peso molecular (kDa). + = presente. - = ausente.



Fig. 3.43. Inmunodetección en dos dimensiones (2DE) de extracto soluble de L-3 de H. contortus enfrentado a sueros de animales infestados con H. contortus. PM: Peso molecular (kDa). +: ánodo; -: cátodo.

### 3.5.3.a.2.2. Pruebas de antigenicidad cruzada con ESA

A pesar de que el bandeado de reconocimiento de los sueros de los animales infestados con H.contortus fue muy amplio, existieron bandas cuyos PM oscilaron entre 30 y 20 kDa que no aparecían antes de la infestación y que, por tanto, podrían ser consideradas como marcadores de la hemoncosis ovina.

Siguiendo una metodología similar a la empleada con ESL, se emplearon sueros homólogos y heterólogos frente a un electrotransferido de ESA de H.contortus fraccionado mediante SDS - PAGE (12,5 %). Los sueros procedentes de infestaciones monoespecíficas en corderos por H.contortus, N.battus, T.colubriformis y Te.circumcincta fueron obtenidos durante los periodos prepatente y patente de las infestaciones. Como indicamos anteriormente, no era esperable la presencia de anticuerpos calostrales en animales de esta edad. Los patrones de inmunodetección obtenidos se muestran en la Fig. 3.44.

Durante la prepatencia de las infestaciones (Tabla 3. XIV) existió un escaso reconocimiento de proteínas de H.contortus Ad (ESA) por los sueros heterólogos, observándose, en especial una reactividad común ca. 38 kDa y 73 kDa. El patrón de H.contortus fue más complejo, existiendo una intensa inmunodetección alrededor de 25 kDa, 37 - 38 kDa y 47 kDa. El patrón más similar entre los sueros heterólogos, correspondió a T.colubriformis aunque Te.circumcincta mostró una mayor reactividad en ca. 25 kDa y N.battus, en 38 kDa.

En las patencias, la tira correspondiente a la incubación con suero homólogo apareció nuevamente con un patrón de reconocimiento más complejo, que por otra parte se asemejó al que encontramos en los animales infestados con H.contortus en los estudios anteriores (bandas de 27, 23 y más intensa la de 25 kDa,

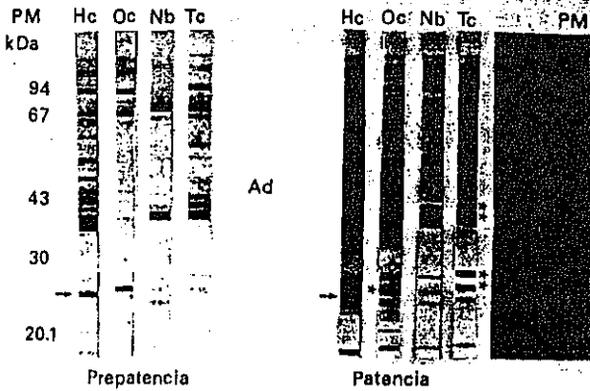


Fig. 3.44. Inmunodetecciones (SDS-PAGE) de extractos solubles de Adulto de H. contortus enfrentados con sueros individuales de corderos con infestaciones monoespecíficas durante la prepatencia y patencia. 1 y 1': infestación con H. contortus; 2 y 2': infestación con Te. circumcincta; 3 y 3': infestación con N. battus; 4 y 4': T. colubriformis. PM = marcadores de peso molecular (kDa).

## PREPATENCIA (ESA)

PM (kDa)	H.c.	Te.c.	N.b.	T.c.
>94				+
90	+	+		
73	+	+	+	
68				+
61	+			+
53	+			+
47	+ *			
40	+			+ *
38	+ *	+	+ *	+ *
37	+ *			
31				+
27				+ -
25	+ *	+ *		+

\* Muy marcada, - Ligera

Tabla 3.XIV. Reactividad homóloga y heteróloga de las inmunodetecciones de extracto soluble de Adultos de H.contortus, cuando se enfrentó con sueros procedentes de ~~animales con~~ infestaciones prepatentes, monoespecíficas de H.contortus, T.colubriformis, Te.circumcincta y N.battus.

ver Fig. 3.44). La patencia de Te.circumcineta también ganó intensidad a la vez que se amplió la similitud con el patrón obtenido con el suero de H.contortus. En la patencia de N.battus se observaron las bandas de 27, 25 y 23 kDa, aunque poco nítidas. En la patencia de T.colubriformis se observó que ganaba bastante intensidad hasta 40 kDa, a la vez que se marcaban las de 27, 25 y 23 kDa (de forma más intensa, la de 27 kDa). No obstante, a pesar de la similitud hallada en la banda de 25 kDa, ésta se mostró mucho más marcada con el suero homólogo obtenido durante la patencia de la hemoncosis. En la Tabla 3.XV se representan los PM de las bandas existentes, así como la similitud entre las inmunoimprontas obtenidas.

Las inmunodetecciones realizadas por nosotros con los sueros homólogos y heterólogos enfrentados a ESA de H.contortus habían mostrado una cierta especificidad del triplete de 23, 25 y 27 kDa. Mientras T.colubriformis reconoció la de 27 kDa y Te.circumcineta la de 25 kDa, H.contortus reconoció las 3. No obstante, la más importante parecía ser la de ca. 25 kDa, por cuanto en las inmunodetecciones seriadas ésta había sido la banda reconocida por todos los sueros individuales. Fue notable además, en nuestras inmunoimprontas, la mayor similitud de T.colubriformis y H.contortus, seguida de Te.circumcineta y el patrón menos semejante correspondió a N.battus.

Teniendo en cuenta la reactividad cruzada demostrada por las IgG ELISA anti-Haemonchus; y el estado alterado de las proteínas en estas electroforesis (desnaturalización y reducción frente al estado casi nativo de las proteínas en los ELISA) se realizaron 2 tipos de ensayos: Electroforesis en 2 dimensiones (2DE) e inmunoadsorción a una fase sólida.

## PATENCIA (RSA)

H.c.	Te.c.	N.b.	T.c.
61	-	-	61
53	53	53*	-
-	-	51*	-
49	49	-	-
40*	40*	40*	40*
38*	38*	38*	38*
37	37	37	37
35	35	-	-
31	-	-	-
27	27	27	27*
25*	25	25	25
23*	23	23	23

\* Muy marcada

Tabla 3.XV. Reactividad homóloga y heteróloga de las inmunodetecciones de extracto soluble de Adultos de H. contortus, cuando se enfrentó con sueros procedentes de animales con infestaciones patentes, monoespecíficas de H. contortus, T. colubriformis, Te. circumcincta y N. battus.

En las Fig. 3.45 se muestra la inmunodetección con una mezcla sérica procedente de infestaciones mono-específicas de Te.circumcincta, N.batus y T.colubriformis. La similitud más notable se halló, además de en las regiones de PM elevados y escasa electronegatividad, en una región muy conservada más reconocida por la mezcla heteróloga que por el suero homólogo de PM ca. 50 kDa (Tabla 3.XVI). Este hecho también había sido hallado en las inmunoimprontas unidimensionales con péptidos de H.contortus (ESL y ESA) más intensamente reconocidos por los sueros heterólogos que por los sueros homólogos (Tabla 3.XVII).

En la Fig. 3.46 se representa la inmunodetección con suero homólogo (H.contortus), en la que se observaron proteínas de más de 94 kDa y escasa electronegatividad, así como proteínas de 53, 52, 41 kDa y de forma especialmente marcada una de 25 kDa de electronegatividad media.

El interés diagnóstico del Ag de adultos (ESA) de H.contortus de PM estimado en ca. 25 kDa observado en las inmunodetecciones de las SDS - PAGE fue así confirmado mediante inmunodetecciones de las electroforesis bidimensionales. Se realizó, además, una prueba de inmuoadsorción en las mismas condiciones indicadas anteriormente, sobre placas de microtitulación. Se utilizó una mezcla de sueros heterólogos (anti-Teladorsagia + anti-Trichostrongylus + anti-Nematodirus). Los resultados se muestran en la Fig. 3.47. En el carril 1 se observa un Western blot sin adsorción, de las muestras séricas heterólogas. En el carril 2 se muestra el Western blot realizado mediante inmuoadsorción. Estos resultados apuntan que el antígeno soluble señalado de aproximadamente 25 kDa de ESA constituye un buen candidato para el diagnóstico específico de la hemoncosis ovina, al no ser reconocido por los sueros heterólogos, en nuestras condiciones.

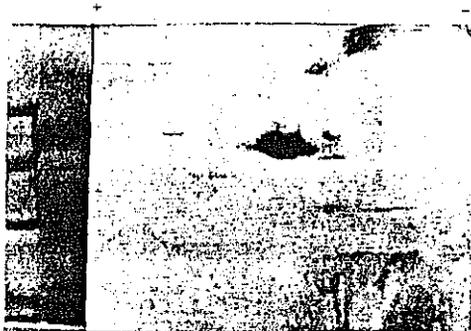


Fig. 3.45. Inmunodetección en dos dimensiones (2DE) de extracto soluble de Adultos de H. contortus enfrentado a una mezcla de sueros heterólogos (T. colubriformis, Te. circumcincta y N. battus). PM= Peso molecular (kDa). +: ánodo; -: cátodo.



Fig. 3.46. Inmunodetección en dos dimensiones (2DE) de extracto soluble de Adultos de H. contortus enfrentado a sueros de animales infestados con H. contortus (35 d.p.i.). PM= Peso molecular (kDa). +: ánodo; -: cátodo.

H.c.	Te.c., N.b., T.c.
>94	>94
53-50	53-43
41-40	41
-	36
-	32
24-25	-

Tabla 3.XVI. Reactividad cruzada de las inmunodetecciones bidimensionales de extracto soluble de Adultos de H. contortus, cuando se enfrentó con una mezcla de sueros procedentes de animales con infestaciones patentes, monoespecíficas de (T. colubriformis, Te. circumcincta y N. battus) y con suero en patencia de la infestación con H. contortus. Pesos moleculares en kDa.

ANTIGENOS RECONOCIDOS MAS INTENSAMENTE  
CON LOS SUEROS DE LAS OTRAS ESPECIES

H.c.	Te.c.	N.b.	T.c.	
53	-	53*	-	ESA
-	-	51	-	
27	-	-	27*	
-	-	47	-	ESL
40	-	40*	40*	
30	-	-	30*	
-	-	28	-	
-	27*	27	27*	
-	23	-	-	
-	22	-	-	

\*: muy marcada

Tabla 3.XVII. Pesos moleculares estimados de los antígenos de ambos extractos de H. contortus (ESL y ESA), más inmunodetectadas con sueros heterólogos (procedentes de animales con infestaciones patentes, monoespecíficas de T. colubriformis, Te. circumcincta y N. battus), que con sueros de la patencia de la infestación con H. contortus.

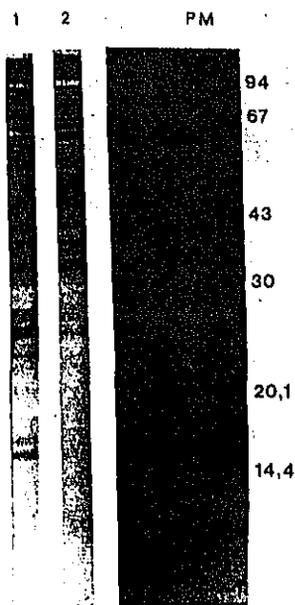


Fig. 3.47. Inmudetección de extracto soluble de Adultos de H. contortus enfrentado a 1: mezcla de sueros heterólogos (T. colubriformis, Ta. circumcincta y N. battus); 2: anticuerpos de los sueros heterólogos eluidos, previa inmuoadsorción a una fase sólida. PM = marcadores de peso molecular (kDa).

### 3.6. Antígenos (ESL y ESA) de H. contortus relacionados con la protección frente a la hemoncosis

Ya que habíamos hallado una aparente protección parcial frente a las dosis de prueba con 14000 L-3, en las ovejas primoinfectadas con 7000 L-3 a los 12 - 12,5 meses de edad, al menos respecto a los periodos de prepatencia de la infestación y los recuentos de HPG medios de los grupos (Grupo A' y B'), se estudió el patrón de inmunodetección con ESL y ESA de H. contortus enfrentados a los sueros individuales de las ovejas durante la patencia de la dosis de prueba.

En las inmunodetecciones realizadas por nosotros con ESL, se observó una gran heterogeneidad individual aunque existió homología en regiones de PM estimado en (>94, 80, 56, 42 kDa) existiendo animales muy reactivos (nº 97, 66, 92) y otros con excaso reconocimiento (p.e: 89 y 65), la mayor variabilidad individual se observó entre 39 y 18 - 20 kDa, sin que se apreciase, en ningún caso, un claro patrón relacionado con la resistencia.

Cuando se estudió de forma similar con ESA (Fig. 3.48), además de confirmarse la reactividad homóloga en regiones de PM > 43 kDa así como la presencia de anticuerpos frente a las regiones entre 20 y 30 kDa, relacionadas con el diagnóstico, ya observadas en corderos de 4 - 4,5 y 6 - 6,5 meses de edad, se comprobó la gran variabilidad individual en todos los sueros probados. El estudio de los patrones de inmunodetección, no obstante, no permitió identificar antígenos marcadores de protección en el Grupo A', a pesar de sus menores recuentos de HPG y alargamiento de la prepatencia. El análisis pormenorizado tampoco mostró que los animales con menores eliminaciones reconociesen más intensamente ninguno de los ESA en el intervalo de PM estudiados por nosotros.

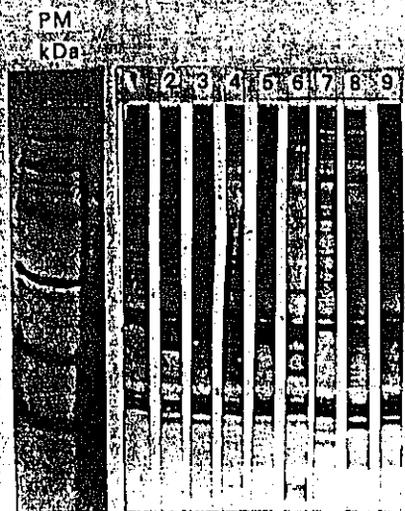


Fig. 3.48. Inmunodetecciones de extractos solubles de Ad de *H. contortus* enfrentados con sueros individuales de la patencia de la dosis de prueba con 14000 L-3 (tiras 1 - 9, animales nº 52, 65, 66, 67, 89, 91, 92, 96 y 97). PM = marcadores de peso molecular (94, 67, 43, 30, 20.1 y 14.4 kDa).

#### 4. DISCUSION

4.1. Respuesta del ganado ovino manchego a las infestaciones por H. contortus. Resultados parasitológicos. Dependencia de la edad de los hospedadores.

En nuestras condiciones experimentales, los corderos Manchegos de 4- 4,5 meses de edad infestados con 2500 L-3 de H. contortus fueron incapaces de desarrollar una respuesta inmunitaria protectora contra la reinfestación (dosis de prueba) homóloga, con 5000 L-3, administrada 2 meses más tarde. Esta aparente falta de respuesta en la raza manchega, al menos según de desprende de los recuentos de HPG y las duraciones de la prepatencia, parece seguir el modelo general encontrado en otras razas ovinas (Merino, Blackface, Dorset, Préalpes du Sud) (Manton y col., 1962; Urquhart y col., 1966; Knight y Rodgers, 1974; Charley-Poulain y col., 1984) y contrario de lo que sucedía en otras razas, en las que la madurez inmunológica frente a H. contortus se alcanzaba a edades más tempranas (en corderos Romanov y nativos de Florida) (Radhakrishnan y col., 1972; Courtney y col., 1985a y b ;Berezkho y col., 1987; Neilson y Van de Walle, 1987; Zajac y col., 1990).

Estas variaciones raciales observadas por los distintos autores mencionados y confirmadas en distintos trabajos experimentales, involucrando diferentes razas ovinas (Altaif y Dargie, 1978a y b; Presson, 1986; entre otros) e incluso intrarraciales (Barger, 1989) han sido reconocidas desde muy tempranamente en las investigaciones sobre la respuesta del ganado ovino a las infestaciones por H. contortus (Whitlock y Madsen, 1958) y han sido relacionadas con los tipos de hemoglobina (Evans y col., 1963; Radhakrishnan y col., 1972; Allonby y Urquhart, 1976 ; Luffau y col., 1981a). Investigaciones

más recientes, sin embargo, han mostrado la relativa independencia entre estos factores (Courtney y col., 1985a, 1985b; Kassai y col., 1990) y apuntan a la falta de relación íntima entre los determinantes del tipo de hemoglobina y el/los genes responsables de una mayor resistencia natural a las hemoncosis (Luffau y col., 1990).

Estos factores genéticos, especialmente la posesión de distintos haplotipos del OLA han sido responsabilizados de la resistencia o receptividad a algunos vermes gastrointestinales (Dineen y Windon, 1980; Gogolin-Ewens y col., 1990; Gill, 1991; Gill y col., 1991) aunque la información en las hemoncosis ha sido discutida, puesto que mientras que Luffau y col. (1990) hallaron esta relación, Cooper y col. (1989) en merinos australianos no obtuvieron evidencias de dicha asociación. Ya que no existe información al respecto en el ganado ovino manchego, hasta donde sabemos, no es posible señalar la existencia o ausencia de tal correlación (OLA- receptividad a H. contortus).

La incapacidad de los corderos Manchegos primoinfectados para dar lugar a una respuesta secundaria típica al ser reinfestados, posiblemente esté relacionada con la edad de los corderos. En efecto, se ha sugerido que, salvo algunas razas especialmente reactivas (vide supra, Romanov, Florida Native) la mayoría de las razas ovinas alcanzaban su madurez inmunitaria frente a H. contortus en algún momento entre los 6-7 meses de edad y el año de vida (Urquhart y col., 1966).

Este lento desarrollo de la respuesta inmunitaria eficaz frente a las hemoncosis ha sido ampliamente referenciado (López y Urquhart, 1967; Knight y Rodgers, 1974; Duncan y col., 1978; Smith y Angus, 1980; Courtney y col., 1985a y b) y ha sido relacionado con la lentitud del desarrollo ontogenético de los mecanismos efectores, complejidad antigénica y escasa inmunogenicidad de H. contortus (Urquhart y col., 1966) así como

con la posible transferencia, desde las madres, de sustancias inmunosupresoras (Soulsby, 1979). Sin embargo, la edad de los corderos empleados por nosotros en las primoinfestaciones (4-4,5 meses de edad) probablemente excluye la presencia de estos factores inmunosupresores.

Nuestros resultados en la ovejas de 12-12,5 meses de edad, infestadas con 7000 L-3 y reinfestadas, dos meses más tarde, con una dosis de prueba de 14000 L-3 de H. contortus mostraron una aparente protección parcial, evidenciada por el alargamiento del periodo de prepatencia medio y recuentos medios de HPG, de las ovejas que habían sido sometidas a la primoinfestación, que estaría en la línea de los resultados obtenidos con otras razas ovinas estudiadas (ver Manton y col., 1962; Urquhart y col., 1966 y vide supra).

Ya que no se han realizado sacrificios de los animales empleados por nosotros en la experimentación no ha sido posible evaluar la resistencia a la reinfestación en términos de implantación larvaria en abomaso, grado de desarrollo de los estadios parásitos, fertilidad de las hembras adultas implantadas y se han utilizado como criterios de resistencia, la duración del periodo de prepatencia y los recuentos de HPG.

Aunque no existe una relación lineal simple entre los números de vermes en cuajar y la producción fecal de huevos (HPG) (Jordan y Stair, 1984) y que ésta está influida por factores tales como el sexo, alimentación, o estado fisiológico-especialmente los periodos de paridera- (Connan, 1968; Kloosterman y col., 1984/1985; Gibbs, 1986), en general parece constituir el recuento de huevos en heces una adecuada medida indirecta del grado de parasitación (Rubin, 1967; Luffau y col., 1981a, 1990; Kassai y col., 1990), por lo que ambos parámetros estimativos (duración de la prepatencia, eliminación de huevos) parecen ser una medida aproximada del grado de resistencia frente

a las dosis de prueba con H. contortus, tal y como ha sido mantenido por Silverman y Patterson (1960); y según tales parámetros, el ganado ovino manchego de alrededor de 1 año de edad ya es capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria protectora, al menos parcialmente, frente a la hemoncosis tras una primoinfestación.

En nuestros resultados globales no existió una clara correlación entre las dosis infestantes empleadas en los corderos (2500 versus 5000 L-3) y en las ovejas (7000 versus 14000 L-3). La falta de correlación directa en los corderos podría ser debida a la curva de ganancia ponderal en los animales empleados (4-4,5 frente a 6-6,5 meses de edad) con la consiguiente dilución parasitaria en los hospedadores (vermes adultos) y la mayor deposición fecal de los corderos de más edad (HPG). Una razón similar podría ser invocada para explicar, al menos parcialmente, los HPG hallados tras la infestación con 7000 L-3, en las ovejas. Sin embargo, las diferencias observadas en la reinfestación de las ovejas (14000 L-3), su relativa independencia del sexo de los individuos empleados, su dependencia de la existencia o ausencia de dosis inmunizante (7000 L-3) y la escasa ganancia ponderal esperable entre ambas infestaciones parecen confirmar la base inmunitaria de los menores recuentos fecales medios del Grupo A' y el alargamiento del periodo de prepatencia.

Obviamente, ya que nuestro diseño experimental incluyó la utilización de tratamientos antihelmínticos con Tiabendazol (corderos) y Rafoxanida (ovejas) para eliminar las infestaciones primarias, no podemos excluir la posibilidad de una depresión inmunológica debida a la quimioterapia, como ha sido sugerido en distintos diseños experimentales (Benítez-Usher y col., 1977; Altaif y Dargie, 1978b; Barger, 1988; Luffau y col., 1990). No obstante, hemos de señalar que, en nuestras condiciones, fueron medicados ambos grupos de animales -infestados y testigos - por lo que el efecto inmunodepresor o inmunomodulador de los

antiparasitarios debió ser comparable en todos los animales empleados.

En los estudios sobre la resistencia del ganado ovino a H. contortus se han empleado una variedad de diseños experimentales (edades, sexos, razas, dosis infestantes, dosis de prueba, periodos transcurridos entre las infestaciones y reinfestaciones) (ver p.a. Donald y col., 1969; Adams y Beh, 1981; Charley-Poulain y col., 1984 y Zajac y col., 1990), por lo que la comparación directa entre los resultados obtenidos es muy dificultosa. Todas las hembras empleadas por nosotros estuvieron preñadas durante la dosis de prueba con 14000 L-3. A pesar de que nuestro experimento se detuvo al detectar la 1ª elevación periparto en los recuentos de HPG, en un individuo (nº 91) y que esta elevación no ha sido relacionada con una significativa reducción de la inmunidad celular y humoral del ganado ovino en otras helmintosis (Te. circumcincta) (Jeffcoate y col., 1990), la respuesta del ganado ovino a la seroalbúmina bovina ha sido menor - de forma más clara en las IgM y dependiente del adyuvante empleado - durante la última parte de la preñez (Reynolds y Griffin, 1990). El número de ovejas empleadas por nosotros, el sistema estimativo de la respuesta protectora y algunas variables (sexo, nº de dosis infestantes) excluyen, por nuestra parte, el establecimiento de conclusiones definitivas pero apuntan a la aparición de la madurez inmunitaria del ganado manchego frente a H. contortus a partir del año de vida, aunque creemos que se trata de un extremo que debiera ser profundamente investigado.

#### 4.2. Dinámica de las inmunoglobulinas séricas y fecales anti-Haemonchus contortus en el ganado ovino manchego

La información concerniente a la respuesta humoral

(anticuerpos) sérica y local -o sus estimaciones- del ganado ovino a las infestaciones por H.contortus ha sido muy confusa, tanto en infestaciones / reinfestaciones, intentos de vacunación como en dependencia de los diseños experimentales y edad de los animales empleados. En nuestros resultados no logramos identificar, mediante ELISA, una respuesta IgM anti- Haemonchus ni en corderos ni en ovejas, e independientemente del antígeno empleado (ESL, ESA). Hallazgos similares han sido realizados por Charley-Poulain y col. (1984) y sólo se han detectado niveles muy bajos de células productoras de IgM en corderos infestados con H.contortus ( Gill y col., 1992). A pesar del carácter de "anticuerpos ventana" de este isotipo (IgM) nosotros hemos empleado como antígeno en los ELISA , extractos solubles de L-3 y Adultos de H.contortus, y por ello, probablemente, no desencadenantes de una respuesta IgM. Alternativamente, las dificultades inherentes a las interpretaciones de las valoraciones de las IgM en los ELISA podrían explicar la falta de sensibilidad.

En general, la respuesta humoral, de corderos y ovejas frente a los extractos solubles utilizados del helminto fue baja, al igual que ocurre con otras nematodosis gastrointestinales de rumiantes (Klesius y col., 1986). No obstante, existieron variaciones significativas en los títulos séricos y fecales de las IgG e IgA anti-Haemonchus por lo que serán discutidas de forma pormenorizada.

#### 4.2.1. Inmunoglobulinas IgG anti-Haemonchus

Los corderos manchegos de 4-4.5 meses de edad, infestados con 2500 L-3 de H.contortus, mostraron un incremento de los títulos IgG específicos, mediante ELISA, cuando se utilizó como fuente antigénica un extracto soluble de adultos (ESA) de

H. contortus, al final del periodo prepatente y a lo largo de la patencia de la infestación, respecto a los niveles IgG séricos del grupo testigo (Grupo B). Dicho incremento no fue observado cuando los sueros se enfrentaron con extracto soluble de L-3.

Al administrar la dosis de prueba de 5000 L-3, se observó, en ambos grupos (primoinfestados y reinfestados), un aumento de las IgG séricas anti-Haemonchus específicas con ambos extractos antigénicos (ESL, ESA). En todos los casos, sin embargo, las elevaciones de los títulos fueron bajas, confirmando, nuestros resultados, la baja respuesta tras las infestaciones con H. contortus, observada por Smith (1977a, 1977b) ; Duncan y col. (1978) en corderos de dos meses de edad -sin diferencias significativas en los individuos inmunizados y los testigos-; Smith y Angus (1980); Charley-Poulain y col. (1981); Adams y col. (1981) e incluso en ganado ovino de 7 meses de edad (Charley-Poulain y col., 1984), no hallando ninguna elevación notable en los niveles séricos de IgG anti-Haemonchus tras las primoinfestaciones. Por el contrario, Adams y Beh (1981) observaron elevaciones tras las primoinfestaciones, de igual modo que Neilson y Van de Walle (1987), en una raza reactiva (Florida Native), a los seis meses de edad.

De una forma similar, cuando las ovejas de 12-12,5 meses de edad fueron sometidas a una primoinfestación con 7000 L-3 de H. contortus, existió una elevación en los títulos IgG anti-Haemonchus (ELISA) cuando se empleó extracto de Adultos (ESA), no visible con el ESL, durante la patencia de la infestación. La dosis de prueba (14000 L-3), produjo una elevación transiente de los niveles séricos de las IgG específicas, seguida de una depresión, que pudo deberse al acomplejamiento de los anticuerpos. Alternativamente podría estar relacionado con la transferencia de IgG1 hacia mamás ca. 2 semanas antes del parto (Pellerin y col., 1990; Reynolds y Griffin, 1990) aunque Jeffcoate y col. (1990) no observaron en un modelo similar

(ovejas preñadas- Te. circumcincta ) ninguna reducción notable en los títulos de anticuerpos hemaglutinantes. Los títulos séricos más elevados hallados por nosotros en los individuos de mayor edad están de acuerdo con la mayor capacidad reactiva observada en pruebas vacunales e infestaciones de ganado ovino de edad superior a 6-7 meses (Smith y Christie, 1978; Duncan y col., 1978; Christie y col., 1978; Abbott y Holmes, 1990). En ningún caso existió evidencia de una típica respuesta secundaria de los animales infestados.

Se obtuvieron valores superiores de D.O. cuando se emplearon antígenos larvarios (ESL) al igual que ha sido observado previamente (Charley-Poulain y col., 1984; Byszewska- Szpocinska y Stankiewicz, 1985) encontrando niveles de anticuerpos más elevados cuando utilizaban antígenos de L-3 del helminto. Las mayores diferencias (infestados versus testigos) fueron obtenidas, en corderos y ovejas, con ESA, lo que podría apuntar al superior poder inmunógeno de los adultos de H. contortus, como ha sido mantenido por Adams (1989) quien no logró una adecuada inmunización con un sonicado completo de L-3 y sí consiguió una apreciable protección con una cantidad equivalente de sonicado de adultos, y como parece sugerir el fallo vacunal, con extractos solubles de L-3 y L-4, de Smith (1977a).

No pudimos observar, en nuestras condiciones, una secuencia de títulos IgG anti-Haemonchus (ELISA), en función de los antígenos empleados. Además de a la, quizás, escasa antigenicidad de las L-3 de H. contortus, podría deberse a la similitud antigénica entre ambos extractos (Ozerol y Silverman, 1969, 1970; nuestros resultados) y a la falta de estrecho contacto entre los ESL empleados en los tapizados de las placas de microtitulación (ELISA) por nosotros y el sistema inmunitario de los animales, al contrario que los ESA, al establecer un contacto estrecho los Ad de H. contortus con el torrente circulatorio de sus hospedadores, que de hecho ha permitido una inmunización con

"contortina" (Munn y col., 1987) y con antígenos parasitarios del tubo digestivo de H. contortus (Jasmer y McGuire, 1991).

En nuestras condiciones experimentales no se observó, en ningún caso, una evidencia de memoria inmunitaria, no sólo en corderos (2500 + 5000 L-3) sino tampoco en las ovejas de 12-12,5 meses de edad, tras ser infestadas con 7000 L-3, sin que pudiésemos observar en estos animales una típica respuesta secundaria. Hay que señalar que esta memoria no fue hallada tampoco por Smith (1977b) en corderos. Alternativamente, es posible -y serían necesarios más estudios- que el estímulo inmunógeno suministrado a estos animales fuese insuficiente, ya que se ha conseguido una inmunización pasiva de ovejas mediante transferencia linfocitaria a partir de ovejas inmunes (Smith y col., 1984). No es posible, sin embargo, excluir que todos los individuos primoinfestados con 7000 L-3, y que habían estado en contacto previamente con H. contortus, respondiesen adecuadamente frente al helmineto, con formación de inmunocomplejos circulantes no detectados mediante nuestro ensayo (ELISA). No obstante, la similitud de recuentos de HPG (vide supra) y la similitud de los títulos anti-ESL y anti-ESA apuntan a una baja respuesta y a una falta de memoria inmunológica de estos animales. Además, la detección de antígenos circulantes de H. contortus en los animales infestados ha sido infructuosa (Petit y col., 1981).

En nuestras condiciones, la respuesta IgG anti-Haemonchus ha sido dosis- y edad-dependiente, al haber obtenido los títulos más altos en los animales que habían recibido mayores dosis infestantes, con independencia del calendario de las mismas, y en los individuos de mayor edad (ovejas). Resultados similares han sido obtenidos en infestaciones con dosificación diaria de L-3 (Smith, 1977b) o inoculación de antígenos de L-3 y L-4 (Smith, 1977a) y apuntan tanto a la falta de respuesta secundaria ante las reinfestaciones como a la necesidad de persistencia de estímulo inmunógeno para el mantenimiento de los títulos séricos.

La respuesta sérica fue además dependiente de la edad de los animales, ya que infestaciones de corderos con números más elevados de L-3 no determinaron títulos séricos IgG más altos.

No se pudo hallar ninguna relación consistente entre los títulos IgG séricos anti-Haemonchus y el nivel de protección observado en las ovejas, ni considerando los valores medios de los grupos de animales con protección parcial (Grupo A') ni con los valores individuales de HPG y D.O. en los ELISA. Se ha señalado, en algunos experimentos, la existencia de una correlación positiva entre los títulos séricos y la protección, por algunos autores (Smith y Christie, 1978; Duncan y col., 1978; Byszewska - Szpocinska y Stankiewicz, 1985; Abbott y Holmes, 1990). Sin embargo, nuestros resultados parecen sugerir el papel poco relevante de los anticuerpos IgG séricos en la protección del ganado ovino a las infestaciones por H. contortus. Hallazgos similares han sido obtenidos por Adams y Beh (1981); Adams y col. (1981); Charley- Poulain y col. (1984); Neilson y Van de Walle (1987), sin correlación entre los títulos séricos y el número de vermes en abomaso, y más recientemente, Luffau y col. (1990) en un estudio multifactorial, Boisvenue y col. (1991) en pruebas vacunales y Gamble y Zajac (1992), con importantes diferencias en los recuentos de vermes con valores de IgG anti-Haemonchus sin diferencias significativas.

Ya que nosotros no hemos determinado, por falta de disponibilidad comercial, los títulos de IgG1 e IgG2 anti-Haemonchus, no es posible excluir completamente su relevancia, puesto que en otras nematodosis gastrointestinales, el papel de estos isotipos ha sido demostrado (Pritchard y col., 1983 : en las infestaciones por Nematospiroides dubius; Gasbarre y Canals, 1989; en las infestaciones por Oesophagostomum radiatum, p.e.). En las hemoncosis, los dos estudios disponibles, sin embargo han producido resultados dispares. Así, mientras una determinación puntual de Gill y col. (1991) de IgG1 anti-Haemonchus mostró una

estrecha correlación, el estudio llevado a cabo en un elevado número de ovejas por Kassai y col. (1990) no demostró ninguna relación entre sus niveles y la resistencia del ganado ovino lo que apunta a su carácter escasamente relevante en la inmunoprotección.

#### 4.2.2. Inmunoglobulinas IgA anti-Haemonchus

Es difícil discutir los resultados obtenidos por nosotros en el estudio de las IgA anti-Haemonchus, especialmente los niveles séricos, debido al escaso número de contribuciones existentes. En nuestros resultados, tanto en corderos como en ovejas, las infestaciones primarias (2500 L-3 en corderos; 7000 L-3 en ovejas) no provocaron ninguna elevación notable en los títulos séricos de IgA anti-Haemonchus estimados mediante un ELISA de tres pasos. Estos resultados confirman los obtenidos por Charley-Poulain y col. (1984) y más recientemente por Kassai y col. (1990). Esta falta de elevaciones tras las infestaciones primarias fue la responsable de que no existiesen correlaciones entre los recuentos de HPG y los títulos séricos. Las dosis de prueba en ambos grupos de edad (corderos: 5000 L-3; ovejas: 14000 L-3) provocaron una elevación transiente, similar a la obtenida por Charley-Poulain y col. (1984) en ensayos de autocuración (adición de una infestación sobre otra presente), más clara en el ganado ovino mayor y empleando como antígeno ESA. La falta de correlación global entre los recuentos de huevos fecales de H. contortus y los niveles séricos de IgA específicos parecen descartar a esta inmunoglobulina como marcadora de infestaciones (diagnóstico) y/o resistencia, lo que apoya las conclusiones de Kassai y col. (1990). Esta falta de elevación de las IgA específicas contrasta con los mayores niveles séricos de IgA totales (específicas e inespecíficas) hallados en una determinación puntual por Smith y Christie (1978) en ensayos

vacunales, sin que dispongamos de una adecuada explicación para sus resultados ya que no observaron, sin embargo, una elevación de los títulos de IgA anti-Haemonchus específica. El hecho de hallar mayores diferencias (infestados versus testigos) cuando se empleó ESA como antígeno confirmaría los resultados obtenidos por nosotros en la respuesta de tipo IgG y apuntaría al ya mencionado superior poder inmunógeno de los adultos del nematodo (Adams, 1989). Las elevaciones observadas, tanto en los testigos como en los infestados (corderos y ovejas), tras la dosis de prueba parece constituir una evidencia de la falta de una respuesta secundaria típica, tras la primoinfestación, y no ser consecuencia más que del superior estímulo inmunógeno. Es notable, en este sentido, señalar que las elevaciones fueron superiores en las ovejas. Dada la edad de los animales en los momentos de la infestación y la curva ponderal de los individuos en dichas edades, era esperable que esta elevación fuese superior en el ganado ovino mayor, por cuanto los individuos recibieron en el intervalo de 2 meses una dosis infestante doble (7000, 14000 L-3), sin incrementos notables del peso corporal, al contrario que en el caso de los corderos, con una dilución importante del estímulo antigénico.

Finalmente, señalar la aparente relación inversa entre los títulos obtenidos frente a ambas fuentes antigénicas -no observado en el caso de la respuesta IgG- y que de confirmarse indicarían una estimulación antigénica secuencial por las fases parasitarias de H. contortus, como ha sido señalado en otros modelos parásito-hospedador (Wedrychowicz y col., 1983).

Aparentemente el estudio de la respuesta local, en abomaso, podría suministrar una mayor información sobre las infestaciones por H. contortus (Gill y col., 1992). Como una estimación indirecta de la respuesta inmunitaria local en abomaso, dado el coste de los animales de experimentación y los resultados obtenidos en otros sistemas helminto / hospedador (Sinski y

Holmes, 1977; Wedrychowicz y col., 1983, 1984b; Maclean y col., 1986) se determinó la respuesta fecal, mediante la determinación de IgA anti-Haemonchus, dado el importante papel que esta inmunoglobulina desempeña en la protección de las mucosas (Newby y Bourne, 1976; Befus, 1986; Goldblum, 1990; McGhee y col., 1992; entre otros) así como el paralelismo observado entre las estimaciones de la mucosa intestinal y las heces (vide supra) y la resistencia de este isotipo -por su componente secretor- a la digestión.

La respuesta de los animales (corderos y ovejas) estimada mediante la valoración de los niveles IgA fecales anti-Haemonchus específicos fue muy similar con ambas fuentes antigénicas (ESL, ESA), con mayores valores de D.O. en los ELISA cuando se empleaba extracto soluble de larvas. En los dos grupos de edad el perfil de la respuesta fue similar, aunque más marcado en el ganado ovino mayor, con elevaciones ligeras tras las primeras exposiciones a H. contortus, sin observar una respuesta secundaria tras las dosis de prueba (Grupo A: corderos; Grupo A': ovejas) y, de hecho, existiendo una disminución relativa tras la reinfestación. Contrastan estos resultados con los notables incrementos observados, tanto en IgG como en IgA, en la mucosa gástrica de corderos sometidos a infestaciones repetidas (Smith, 1977b), pruebas de inmunización de ovejas (Duncan y col., 1978; Smith y Angus, 1980); elevaciones transientes en mucosa gástrica en ensayos de autocuraciones (Charley-Poulain y col., 1984). Smith y Christie (1978), en inmunizaciones, observaron que aunque las primoinfestaciones no sirvieron para incrementar la producción local de IgA específicas en la mucosa de abomaso de ovejas infestadas con H. contortus sí estimularon el sistema inmunitario ovino para provocar una drámatica elevación tanto de las IgG como de las IgA inespecíficas del mucus del cuajar. Nuestros resultados, sin embargo, están más en la línea de los obtenidos por Zajac y col. (1990), quienes observaron elevaciones de los niveles de la mucosa del abomaso superiores durante las

primoinfestaciones, al igual que nosotros. Estas elevaciones tras las primeras exposiciones a H. contortus han sido interpretadas por Zajac y col. (1990) como consecuencia de una posible respuesta anamnésica frente a otros nematodos (p.e. Strongyloides). Aunque es segura la existencia de esta antigenicidad cruzada (Charley y col., 1981; Anderson y col., 1989; Shamansky y col., 1989; Gamble y col., 1990) no parece una explicación plausible, puesto que nosotros empleamos los animales de distintas edades en ambos experimentos (corderos y ovejas) y las respuestas obtenidas fueron esencialmente similares.

Es posible que los diferentes modelos de respuesta IgA anti-Haemonchus puedan estar relacionados con los diferentes diseños experimentales, al menos en algunos casos, ya que el tratamiento antihelmíntico empleado por Zajac y col. (1990) y nosotros, parece evitar los riesgos de la falta de repetibilidad de los ensayos de autocuración, con infestaciones sobreañadidas (Adams, 1983).

Además, hemos de tener en cuenta que las anteriores elevaciones halladas -específicas o inespecíficas- (Smith, 1977b; Smith y Christie, 1978; Duncan y col., 1978) fueron obtenidas en determinaciones puntuales y que se han realizado hallazgos similares a los nuestros en otros modelos parásito / hospedador (Dobson, 1966; Sinski y Holmes, 1977; Maclean y col., 1986), con valoraciones secuenciales, al igual que hemos realizado nosotros.

Las observaciones de Smith y Christie (1978), Duncan y col. (1978) y Gill y col. (1991) apoyarían la estrecha correlación existente entre la respuesta inmunitaria protectora frente a H. contortus y las elevaciones locales de IgA. En este sentido Charley-Poulain y col. (1984) observaron una elevación transiente en los niveles de IgA de la mucosa del cuajar, coincidente con la expulsión de los vermes, lo que apoyaba esta relación. Sin embargo, ni Smith y Angus (1980), ni Wedrychowicz y col. (1984a)

en su estimación de IgA fecales anti-Haemonchus, ni Zajac y col. (1990) en sus estudios de la mucosa gástrica de ovinos infestados y reinfestados, pudieron hallar una clara relación entre los niveles de IgA específicos y los niveles de protección frente a H. contortus.

Es posible que los niveles elevados en la mucosa y por tanto en las heces (Sinski y Holmes, 1977; Wedrychowicz y col., 1983; Maclean y col., 1986) estén más relacionados con la presencia de la población adulta parásita que con el número de infestaciones y el estado inmunitario de los animales (receptividad, resistencia). Consideraciones similares fueron realizadas por Dobson (1966) cuando obtuvo mayores niveles en las infestaciones primarias con Oesophagostomum columbianum que tras las reinfestaciones. Una evidencia circunstancial de esta posibilidad sería la correlación positiva hallada entre los recuentos de huevos (HPG) en las heces y los valores de D.O. de las IgA fecales observada por nosotros. Si ello fuera así, las elevaciones de IgA locales serían el resultado de la estimulación patotópica debida a los estadios parasitarios, especialmente los hematófagos. Nuestros resultados estarían de acuerdo con los incrementos hallados en los números de células productoras de IgA en la mucosa del abomaso tras una infestación por H. contortus (Gill y col., 1992).

No es posible, sin embargo, excluir la posibilidad de un acomplejamiento rápido en la mucosa gástrica de los antígenos y anticuerpos relevantes en la protección. Ello supondría que los anticuerpos detectados en las heces serían de diferente especificidad a los hallados en la mucosa gástrica, siendo los fecales, no funcionales desde un punto de vista protector (Wedrychowicz y col., 1983), y por ello, la depresión observada por nosotros y por Zajac y col. (1990), tras las dosis de prueba (5000 y 14000 L-3) sólo representaría un incremento de los inmunocomplejos, no detectados por nosotros. Una explicación

similar ha sido empleada por Charley-Poulain y col. (1984) para justificar la rápida depresión de los títulos de inmunoglobulinas en la mucosa gástrica de los corderos sobreinfestados con H. contortus.

Los diferentes perfiles observados en la dinámica de la respuesta IgA sérica y local, en el caso de los anticuerpos anti-L-3 de H. contortus, podrían ser relacionados con los diferentes mecanismos de presentación de los antígenos parasitarios y consiguientemente la diferente especificidad de los anticuerpos séricos y fecales (Wedrychowicz y col., 1983). Alternativamente podría deberse al trasvase activo de las IgA séricas al tubo digestivo, por la existencia de soluciones de continuidad en la mucosa gástrica como consecuencia de la actividad erosiva de H. contortus o por la disponibilidad de componente secretor (Sheldrake y col., 1984) a fin de actuar localmente.

Como conclusión podríamos señalar que, según nuestros resultados, los niveles de IgA fecales anti-Haemonchus guardan una buena relación con el curso de las primoinfestaciones por este helminto, por lo que su estimación así como la determinación de los antígenos reconocidos sería de interés para el diagnóstico de la hemoncosis ovina, tanto en corderos como en ovejas.

#### 4.3. Valor del ELISA IgG anti-Haemonchus en el diagnóstico de la hemoncosis ovina

Teniendo en cuenta que en ambos grupos de edad, los incrementos observados en los títulos IgG anti-Haemonchus (ELISA) en los estudios seriados, durante las primoinfestaciones (2500 L-3: corderos; 7000 L-3: ovejas) se obtuvieron con ESA; que probablemente las elevaciones halladas en las IgA específicas (fecales) eran demasiado bajas para ser empleadas en el



diagnóstico; y que los IgG ELISA son de más fácil interpretación, se valoró la línea de seroconversión (negativos a positivos) de los sueros ovinos con el extracto soluble de adultos (ESA) y la determinación de las IgG específicas.

Como línea de corte de negatividad se tomó la media de los sueros negativos + 2 DE (Catty y Raykundalia, 1989) y a tenor de las variaciones interindividuales se emplearon los negativos del mismo grupo (Bennett y Riley, 1992). En nuestras condiciones el límite superior de negatividad estuvo en una D.O. = 0.41, en las condiciones estándar del ELISA, con un periodo de incubación de 90 min y una dilución sérica de 1/50. Con esta línea de corte ("cut-off") el ensayo con extracto soluble de adultos mostró una sensibilidad y especificidad del 100% para los animales de más de 12-12,5 meses de edad. Sin embargo, en los corderos de nuestro lote experimental, la sensibilidad y especificidad del ensayo pareció ser dosis-dependiente, ya que esta línea (>0.41 D.O.) permitió diagnosticar a todos los corderos de 6-6,5 meses de edad que recibieron al menos 5000 L-3 de H. contortus. Por el contrario, nuestro ensayo mostró una baja sensibilidad (40%) y especificidad para las infestaciones de corderos manchegos de 4-4,5 meses de edad tras la infestación con 2500 L-3. Es dificultoso interpretar estos resultados, ya que además de la dosis infestante, la respuesta IgG anti-Haemonchus parece depender tanto de la edad de los corderos como de la existencia o ausencia de sucesivas reinfestaciones. Además, ni las diluciones séricas (1/50, 1/100, 1/200) ni las variaciones de los periodos de incubación (30, 60, 90, 120 min) consiguieron incrementar la sensibilidad o especificidad del ensayo.

En efecto, el estudio de la respuesta de corderos de 2-3 meses de edad, infestados con dosis únicas elevadas ( 7000 - 9000 L-3) de H. contortus, tampoco mostró títulos superiores. Aunque los corderos sometidos a una infestación con este helminto parecen reconocer a H. contortus (Emery y Wagland, 1991; nuestras

inmunodetecciones), la respuesta incrementada parece depender críticamente de la edad de los animales, además de la dosis infestante. Ya que no disponemos de sueros de ovejas sin ningún contacto con el nematodo gástrico ni otro relacionado, no podemos confirmar este supuesto por lo que serían necesarios nuevos estudios. Es posible, no obstante, que los extractos antigénicos empleados (proteínas solubles) sólo provoquen una respuesta escasa (Parkhouse y col., 1987) responsable del escaso valor diagnóstico de este ensayo con dosis infestantes bajas en corderos de 4-4,5 meses de edad, por otra parte similar a lo hallado en otras nematodosis gastroentéricas de ruminantes (Klesius y col., 1986).

#### 4.4. Caracterización antigénica de L-3 y Adultos de H. contortus y su potencial valor diagnóstico

La baja respuesta hallada en las valoraciones de las IgA anti-Haemonchus específicas; la escasa sensibilidad del ELISA IgG empleando ESL y ESA, como antígenos, en el diagnóstico de las hemoncosis con bajas dosis infestantes y/o en corderos nos indujeron a realizar una caracterización de los ESA y ESL de H. contortus mediante electroforesis (SDS-PAGE, EF2D, doble agar inmunodifusión, inmunoadsorción e inmuncimprontas ("Western blotting") con los electroferogramas obtenidos.

Se ha indicado que, en los nematodos, los antígenos de superficie y de secreción/excreción serían más útiles para la inmunoprofilaxis e inmunodiagnosia respecto a las proteínas solubles somáticas (Parkhouse y col., 1987) y esto podría explicar la escasa reactividad encontrada mediante ELISA cuando se utilizaba una mezcla antigénica somática de H. contortus (Charley-Poulain y col., 1984, entre otros). Incidentalmente, ésta podría ser la razón de la falta de una estrecha correlación

entre los niveles de anticuerpos séricos y el estado inmune de un cordero determinado (Duncan y col., 1978; Neilson y Van de Walle, 1987; Zajac y col., 1990; Luffau y col., 1990; Gamble y Zajac, 1992; nuestros resultados), la falta de una respuesta mensurable tras las primoinfestaciones en corderos, empleando como antígeno extractos solubles larvarios o de adultos (Duncan y col., 1978; Charley-Poulain y col., 1984) y la escasa sensibilidad del ELISA en corderos manchegos (< 4-4,5 meses) observada por nosotros.

No obstante, hemos de tener en cuenta la íntima relación establecida entre los estadios de L-4 y adultos de este parásito y sus hospedadores. La actividad hematófaga de este nematodo posiblemente permita la entrada al torrente circulatorio del hospedador de algunos productos solubles capaces de dar lugar a algún tipo de reacción cuantificable. De hecho esta posibilidad ha sido sugerida por Munn y col. (1987) para justificar la protección parcial obtenida en ganado ovino frente a la hemoncosis al utilizar un extracto somático de H. contortus enriquecido en "contortina" y más recientemente los hallazgos de Jasmer y McGuire (1991). Además, a pesar de que los tratamientos del material antigénico inicial (L-3 y Ad del parásito) no contenían ningún detergente, parte de las proteínas de la cutícula obviamente se hallaban en los extractos solubles obtenidos mediante congelación-descongelación.

En este sentido, aunque no mostrado, el fraccionamiento de componentes cuticulares y solubles del parásito, mediante detergentes, mostró tras la electroforesis una notable similitud en algunas regiones que evidenciarían esta posibilidad. No es posible, además, descartar la similitud antigénica entre los extractos solubles de L-3 y los líquidos de desenvainamiento, como ha sido demostrado por Ozerol y Silverman (1969, 1970) al observar líneas de precipitación entre el extracto soluble de larvas y el líquido de la L-3 desenvainada, lo cual evidenciaba su similitud antigénica.

Aunque se han llevado a cabo algunas caracterizaciones de la composición proteica de H. contortus, tanto de sus extractos solubles de adultos y larvas como de distintos componentes (cuticulares, antígenos de secreción/ excreción) (Neilson, 1969; Ozerol y Silverman, 1969, 1970; Neilson, 1975; Clarke y Slocombe, 1984) y más recientemente por Fetterer (1989); Fetterer y Urban (1989); Gamble y col. (1989); Bird (1990); y con muy variada tecnología (SDS-PAGE, cromatografía, inmunodifusión, inmunolectroforesis), el estudio de las posibles proteínas antigénicas ha sido considerablemente más escaso, aunque existen algunas caracterizaciones con sueros hiperinmunes y con anticuerpos monoclonales (Cox y col., 1989, 1990; Gamble y col., 1990). Sin embargo, y hasta donde sabemos, los únicos estudios llevados a cabo mediante inmunodetección en sueros de ganado ovino infestado con H. contortus han sido realizados por Haig y col. (1989) y Hendrikx (1990).

El hallazgo fundamental de nuestro trabajo de inmunodetección de ESL y ESA de H. contortus por los sueros de los corderos y ovejas infestados ha sido, de una parte que existe una respuesta específica anti-Haemonchus, tanto frente al extracto soluble de adultos como de L-3, lo que confirma y extiende los resultados obtenidos en ovejas infestadas por Haig y col. (1989) y por Hendrikx (1990) en ganado ovino inmunizado. Aunque algunos estudios mediante RIA (Duncan y col., 1978) o ELISA (Charley-Poulain y col., 1984) no permitieron obtener datos concluyentes, nuestros resultados muestran que los corderos de raza manchega -y presumiblemente de otras razas-, tanto de 4-4,5 meses como los de 6-6,5 meses de edad reconocen específicamente algunos antígenos solubles de H. contortus. Por ello, la falta de sensibilidad y especificidad de los ELISA empleando ambos extractos solubles (vide supra) podría estar relacionada con la complejidad de las mezclas antigénicas utilizadas en los inmunoensayos (RIA, ELISA) (Charley-Poulain y col., 1984) y no

con la falta de reconocimiento del parásito por los corderos (Emery y Wagland, 1991). De otra parte, hemos hallado una extrema heterogeneidad de los patrones de inmunorreconocimiento exhibidos por los corderos, tanto en las primoinfestaciones como en las reinfestaciones, y con independencia del extracto antigénico analizado (ESL, ESA).

La elevada heterogeneidad en los patrones podría reflejar las variadas respuestas inmunitarias individuales del ganado ovino a las infestaciones por H. contortus, observadas mediante otros sistemas de monitorización de la respuesta (Adams, 1989; Kassal y col., 1990; Zajac y col., 1990) y supone la necesidad de estudiar los posibles antígenos de interés diagnóstico o inmunoprolifáctico sobre la base de análisis individuales.

Se ha señalado que las L-3 de H. contortus podrían comportarse como "durmientes" desde el punto de vista inmunológico (Adams, 1989). Aunque la inmunodetección mediante "Western blotting" no constituye un ensayo cuantitativo, se apreció una mayor reactividad con extracto soluble de L-3 (ESL) que con extractos de adultos (ESA), al igual que en las valoraciones de anticuerpos específicos en suero mediante la técnica de ELISA. Nuestros resultados confirman los obtenidos por Charley-Poulain y col. (1984) con la misma técnica y análogos antígenos y por Biszewska-Szpocimska y Stankiewicz (1985) mediante determinación de anticuerpos hemaglutinantes. No obstante, esta mayor reactividad general en las mezclas séricas enfrentadas a los electrotransferidos de ESL y ESA fraccionados mediante SDS-PAGE fue hallada en regiones de PM elevado, que podrían deberse a un insuficiente bloqueo de la membrana, con las consiguientes uniones inespecíficas o bien a la existencia de anticuerpos anti-fosforilcolina -muy frecuentes pero irrelevantes-. De hecho, en las muestras previas a la infestación ya existió esta mayor reactividad y por ello no estuvo relacionada con la infestación por H. contortus. Parte de estas

uniones en regiones de alto PM podrían ser, además, debidas a las propias características de la membrana, especialmente útil para péptidos de bajo PM. Otra posibilidad aún sería la probable reactividad cruzada con otros helmintos presentes (p.e. Strongyloides) como ha sido sugerido en otros experimentos (Zajac y col., 1990) (vide infra).

Nosotros hallamos, en las mezclas séricas provenientes de las primeras exposiciones al helminto (corderos de 4-4,5 meses de edad infestados con 2500 L-3; corderos de 6-6,5 meses de edad infestados con 5000 L-3) una respuesta variada en el intervalo de PM estudiados (94-20.1 kDa). No podemos excluir la débil reactividad hallada por Haig y col. (1989) en animales de 9-12 meses de edad, en regiones de PM 180, 100-90 kDa de extracto soluble de L-3. La inmunorreactividad hallada en regiones de PM inferior (45-50, 38-40 kDa) no fue constante en sus resultados aunque también ha sido hallada por nosotros. En este sentido, Hendrikx (1990) estimó que la región entre 42 y 18 kDa de extracto soluble de L-3, era la que podía contener antígenos específicos del parásito. No obstante, en ambos casos se emplearon exclusivamente mezclas séricas, por lo que dada la heterogeneidad observada por nosotros, sus resultados no parecen ser concluyentes.

Nuestros resultados han mostrado que la respuesta frente a extracto soluble de L-3 de H. contortus fue más heterogénea en los animales experimentales y no pudimos apreciar claramente antígenos de potencial valor diagnóstico. Sin embargo, la respuesta detectada frente a ESA fue más definida y aunque existía heterogeneidad, especialmente en las regiones de bajo PM en los corderos (6-6,5 meses de edad) sólo sometidos a la dosis de prueba (5000 L-3), quizás relacionable con la edad de los animales, algunos antígenos (ca. 25 y 31-33 kDa) fueron reconocidos por todos los animales, independientemente de la edad y de la dosis infestante, por lo que podrían ser considerados

como adecuados marcadores de infestaciones por H. contortus, ya fuese mediante el empleo de anticuerpos monoclonales u otro sistema.

Hay que señalar, en este sentido, que a pesar de la menor antigenicidad de péptidos de bajo PM, algunos han sido útiles en el diagnóstico de otras helmintosis (Cabrera y Parkhouse, 1986) y que los análisis fueron realizados en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), por lo que el PM de la proteína original no es conocido. Teniendo en cuenta el claro reconocimiento, en las inmunodetecciones, de los antígenos de H. contortus, la escasa sensibilidad del ELISA debe estar relacionada por tanto con la complejidad antigénica de las muestras o la baja afinidad de los anticuerpos específicos. Además ya que el tratamiento desnaturalizante y reductor no impidió el reconocimiento del péptido de ca. 25 kDa tras la incubación con los sueros inmuoadsorbidos a la fase sólida, estos anticuerpos parecen corresponder a determinantes antigénicos " continuos o secuenciales" (Schmidt, 1989) sólo definidos por la estructura primaria (secuencia de restos de aminoácidos) de la proteína.

Es particularmente interesante que algunos antígenos de adultos de H. contortus fueron reconocidos durante la prepatencia y no fueron reconocidos cuando se empleó ESL, lo que sugiere que los mecanismos de presentación de antígenos larvarios y de adultos son muy diferentes o que pueden corresponder a antígenos presentes desde el estadio de L-4. Esta antigenicidad cruzada entre L-3 y adultos, ya mostrada en las pruebas vacunales con sonicados completos de adultos ( Adams, 1989) de H. contortus, también ha sido observada en otras nematodosis intestinales de rumiantes (Gasbarre y Canals, 1989). En este sentido, nosotros hemos comprobado la antigenicidad cruzada existente entre ambos extractos antigénicos (L-3 y adultos) al ser reconocidas, mediante inmunodetecciones, un amplio número de proteínas del

extracto soluble de adultos con el suero hiperinmune anti-L-3 de H. contortus en conejo y mediante doble inmunodifusión en agar, en la que el suero anti-L-3 mostró una precipitación más compleja (> 2 arcos) frente a ESL, mientras que cuando el suero hiperinmune se enfrentó a ESA, sólo existió un arco, pero más intenso.

#### 4.5. Antigenicidad cruzada .

A pesar del posible valor inmunodiagnóstico del antígeno de ESA de H. contortus de ca. 25 kDa, en condiciones reductoras y desnaturalizantes, en el diagnóstico de la hemoncosis ovina, ya que la norma son las infestaciones mixtas por otros tricostrongiloideos, se realizó un ensayo preliminar de esta antigenicidad cruzada. Sólo se ha dispuesto de infestaciones monoespecíficas (2 animales/especie) ovinas con Nematodirus battus, Teladorsagia circumcincta y Trichostrongylus colubriformis y los ensayos han sido realizados sólo en un sentido (antígenos de H. contortus, sueros homólogos y heterólogos -obtenidos de los corderos con estas infestaciones con otros Trichostrongyloidea-).

Las tres líneas de evidencia empleadas por nosotros (ELISA con sueros homólogos y heterólogos; inmunodetecciones uni (SDS-PAGE) y bi- (EF 2D) dimensionales; inmunoadsorción) mostraron la existencia de un notable grado de antigenicidad cruzada entre los tricostrongiloideos estudiados, lo que está de acuerdo, tanto con los resultados obtenidos en los estudios sobre la inmunidad cruzada entre nematodos gastrointestinales ovinos (Blanchard y Wescott, 1985; Adams y col., 1989) como con la antigenicidad señalada (Charley-Poulain y col., 1981; Anderson y col., 1989; Shamansky y col., 1989; Gamble y col., 1990; Hendrixx, 1990).

Esta elevada homología hallada por nosotros, confirman los

hallazgos analíticos mediante electroforesis con extractos de T.colubriformis y Te.circumcincta (Milner y col., 1987) y no debe sorprender, teniendo en cuenta que incluso se han hallado antígenos conservados aparentemente entre Fasciola hepatica y Ostertagia ostertagi (Cross y col., 1988); la alta conservación del colágeno de nematodos (Cox y col., 1990a) y otros componentes (Shamansky y col., 1989); la elevada homología entre los fragmentos de restricción del ADN de H.contortus, Te.circumcincta y T.colubriformis (Beh y col., 1989).

A pesar de esta fuerte reactividad cruzada, nuestros resultados mediante ELISA mostraron que la mayor antigenicidad cruzada se produjo entre T.colubriformis y H.contortus, ya que el alargamiento de los periodos de incubación, tanto con ESL como con ESA, como antígenos, permitió diferenciar, en nuestras condiciones, los sueros provenientes de la patencia de las infestaciones heterólogas con N.battus y Te.circumcincta. Sin embargo, resultó sorprendente que los sueros de T.colubriformis presentasen una mayor reactividad con el ESL de H.contortus que los propios sueros homólogos (anti-Haemonchus) - mayor reactividad no visible cuando se utilizó ESA como antígeno-. Ya que, dada la edad de los animales (> 2,5 meses de edad), la presencia de anticuerpos calostrales no es esperable, teniendo en cuenta su vida media (18-24 días) (Watson, 1992) - a pesar de que Ozerol y Silverman (1969) hallaron anticuerpos anti-Haemonchus al cabo de 5 semanas -, esta mayor reactividad con ESL en los ELISA podría estar relacionada con mecanismos de presentación antigénica diferentes en ambas especies y una menor antigenicidad de las L-3 de H.contortus (Adams, 1989), además de su estrecha similitud genética (Beh y col., 1989). Alternativamente, dado que sólo se dispuso de dos corderos/infestación heteróloga, no es posible excluir las posibles reacciones inespecíficas relacionadas con otros nematodos frecuentes (p.e. Strongyloides, ver Zajac y col., 1990). Esta mayor reactividad de los sueros anti-Trichostrongylus con los ESL

de H. contortus parece ser real, sin embargo, ya que las inmunodetecciones unidimensionales (SDS-PAGE) mostraron asimismo un patrón de inmunorreconocimiento del ESL de H. contortus superior cuando se empleó suero anti-Trichostrongylus, especialmente notable en la patencia de las infestaciones.

Las inmunodetecciones con ESL y ESA mostraron un muy elevado grado de antigenicidad cruzada, con algunos antígenos de H. contortus más intensamente reconocidos por los sueros heterólogos que por los homólogos, sobre los cuales se pueden hacer las mismas consideraciones anteriores, a pesar de que el patrón obtenido con los sueros de individuos infestados con H. contortus fue, en general, más variado que con los provenientes de infestaciones con otros trichostrongiloideos. La mayor antigenicidad cruzada entre H. contortus y T. colubriformis de los ELISA se correspondió en los "Western blots" con una elevada homología entre 35- >94 kDa, visible en los demás casos, aunque de forma menos clara, así como una intensa reactividad ca. 27 kDa de PM estimado. La menor reactividad de N. battus está de acuerdo con la separación de este género en otra familia (Molineidae) de la Spfam. Trichostrongyloidea así como la mayor proximidad de T. colubriformis y H. contortus, respecto a Te. circumcincta (Durette-Desset, 1983; ver Lichtenfelds, 1986) y no con la taxonomía de las Subfam. de los Trichostrongylidae propuesta por Gibbons y Khalil (1982), con una neta separación entre Trichostrongylinae y Haemonchinae.

A pesar de la fuerte homología existente entre 35-45 kDa entre Te. circumcincta y H. contortus, los resultados de los ELISA, con una neta separación entre ambas infestaciones son de difícil interpretación, ya que compartían una reactividad ca. 25 kDa (en los ESA) que había sido señalada como potencialmente importante en el diagnóstico de la hemoncosis ovina. Las separaciones electroforéticas en 2 dimensiones, además de mostrar esta elevada homología, especialmente en regiones de alto PM, lo

que estaba de acuerdo con Milner y col. (1987) y O'Donnell y col. (1985) en regiones de PM > 94 kDa, mostraron el reconocimiento de un antígeno de L-3 de PM ca. 24 kDa que podría corresponder a una proteína cuticular, débilmente unida, ya señalada (Cox y col., 1989, 1990). La fuerte reactividad hallada con los sueros de T.colubriformis alrededor de 30 kDa también ha sido señalada por Hendrikx (1990) enfrentando suero de ganado ovino inmunizado con H.contortus a un extracto de L-3 de T.colubriformis.

A pesar de las limitaciones de este ensayo preliminar sobre la antigenicidad cruzada (nº de corderos, dosis infestantes, edades de los animales empleados), el valor diagnóstico del antígeno soluble de ca. 25 kDa de ESA de H.contortus fue confirmado en las inmunodetecciones bidimensionales; con una clara reacción homóloga, no visible ni en los sueros heterólogos monoespecíficos ni en una mezcla de éstos. Además, la inmunoadsorción permitió confirmar este extremo, mientras que las mezclas séricas heterólogas no reconocieron dicho antígeno. Dada la más que probable proteólisis, así como el tratamiento de las muestras, este extremo necesita ulteriores confirmaciones mediante infestaciones mono- y pluriespecíficas implicando un mayor número de animales, teniendo en cuenta la variabilidad individual. No obstante, los resultados de la inmunoadsorción y de las EF2D parecen suministrar cierta evidencia de su valor en el diagnóstico específico de la hemoncosis ovina.

La mayor reactividad observada entre algunos antígenos de H.contortus (ESL, ESA) con sueros heterólogos, por otra parte ya observada por Anderson y col. (1989) con un heterohibridoma anti-Te. corcumcinota, podría ser, de confirmarse, de utilidad para el diagnóstico múltiple.

A pesar de las diferencias observadas en las eliminaciones de HPG y la variable duración de los periodos de prepatencia, no pudimos observar en las inmunoprintas individuales realizadas

al cabo de 35 días después de la dosis de prueba con 14000 L-3, en las ovejas, un claro patrón, en el intervalo de PM examinados, asociable a la resistencia o a la receptividad a H. contortus. Aunque se confirmó el valor diagnóstico de la región de PM ca. 25 kDa, son necesarios más estudios, pero nuestros resultados parecen apoyar las opiniones sobre el escaso papel desempeñado por los anticuerpos séricos en la protección frente a las hemoncosis ovinas (Adams y Beh, 1981; Charley-Poulain y col., 1984; Kassai y col., 1990; Zajac y col., 1990; Gamble y Zajac, 1992).

## 5. CONCLUSIONES

1.- Se comprueba el carácter dependiente de la edad, en la capacidad de respuesta protectora del ganado ovino manchego frente a las infestaciones por H. contortus, apareciendo una resistencia parcial a partir del año de edad.

2.- Los títulos séricos de los ELISA IgG anti-Haemonchus mostraron una clara relación con las dosis infestantes y, aparentemente, con la edad del ganado ovino y permiten un diagnóstico de la hemoncosis ovina a partir de los 6 - 6,5 meses de edad.

3.- Los niveles de IgA anti-Haemonchus adultos y los recuentos de huevos del parásito en las heces del ganado ovino infestado estuvieron relacionados. Aunque las débiles variaciones halladas en los ELISA probablemente no permitan su empleo en el diagnóstico, la correlación existente entre las IgA y la eliminación fecal de huevos apunta al importante papel de estas inmunoglobulinas en las infestaciones por H. contortus y al valor de las detecciones de anticuerpos en heces en esta parasitosis.

4.- Se demuestra la elevada similitud proteica de L-3 y adultos de H. contortus, al contrario de lo mantenido en general, mediante agar inmunodifusión, ELISA e inmunodetección.

5.- Las inmunodetecciones con sueros de corderos infestados frente a extractos solubles de L-3 y Adultos de H. contortus demostraron la capacidad del sistema inmunitario ovino para reconocer al helmineto durante la primoinfestación por lo que los bajos títulos obtenidos con los ELISA podrían estar relacionados con la complejidad antigénica de las muestras empleadas.

6ª.- A pesar de la gran variabilidad interindividual en la respuesta humoral anti-Haemonchus, tanto cuantitativa (ELISA) como cualitativa (inmunoimprontas), los animales infestados reconocieron un antígeno soluble de adultos de aproximadamente 25 kDa. El variable reconocimiento individual de antígenos parasitarios apoya la necesidad de estudiar sueros individuales en la exploración de antígenos de potencial valor diagnóstico.

7ª.- Se ha demostrado un elevado grado de antigenicidad cruzada entre Haemonchus contortus y, Teladorsagia circumcincta, Nematodirus battus y Trichostrongylus colubriformis. El análisis antigénico, no obstante, confirmó el valor diagnóstico en la hemoncosis ovina de un péptido de ca. 25 kDa.

8ª.- Los resultados de los ELISA con sueros heterólogos y las inmunoimprontas parecen apoyar la mayor proximidad filogenética de H. contortus con T. colubriformis.

9ª.- Se confirma el mayor reconocimiento de algunos antígenos (L-3 y Adultos) de H. contortus por sueros heterólogos, lo que sugiere la existencia de importantes diferencias en los mecanismos de presentación de antígenos de trichostrongiloides al sistema inmunitario del ganado ovino.

10ª.- La falta de una clara relación entre la respuesta humoral estimada mediante ELISA e inmunodetecciones y los niveles de protección parcial observados en el ganado ovino manchego parece sugerir la escasa relevancia de los anticuerpos en la protección frente a la hemoncosis ovina.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abbott, E.M. y Holmes, P.H., (1990). Influence of dietary protein on the immune responsiveness of sheep to *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci., 48: 103-107.

Abbott, E.M., Parkins, J.J. y Holmes, P.H., (1986). The effect of dietary protein on the pathogenesis of acute ovine haemonchosis. Vet. Parasitol., 20: 291-306.

Adams, D.B., (1981). Changes in blood leukocytes, bone marrow and lymphoid organs in sheep infected with *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 11: 309-317.

Adams, D.B., (1982). Time of onset and target of immune reactions in sheep with acquired immunity against *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 12: 439-443.

Adams, D.B., (1983). Observation on the self-cure reaction and other forms of immunological responsiveness against *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol., 13: 571-578.

Adams, D.B., (1986). Developmental arrest of *Haemonchus contortus* in sheep treated with a corticosteroid. Int. J. Parasitol., 16: 659-664.

Adams, D.B., (1988a). The effect of dexamethasone on a single and a superimposed infection with *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol., 18: 575-579.

Adams, D.B., (1988b). Infection with *Haemonchus contortus* in sheep and the role of adoptive immunity in selection of the parasite. Int. J. Parasitol., 18: 1071-1075.

Adams, D.B., (1989). A preliminary evaluation of factors affecting an experimental system for vaccination-and-challenge with *Haemonchus contortus* in sheep. Int. J. Parasitol., 19: 169-175.

Adams, D.B., (1990). Infection of immunosuppressed mice with the abomasal nematode parasite of ruminants, *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 20: 631-636.

Adams, D.B. y Beh, K.J., (1981). Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 11: 381-386.

Adams, D.B. y Davies, H.I., (1982). Enhanced resistance to infection with *Haemonchus contortus* in sheep treated with a

corticosteroid. Int. J. Parasitol., 12: 523-529.

Adams, D.B. y Rothwell, T.L.W., (1977). *Trichostrongylus colubriformis*: Host factors influencing the transfer of immunity in guinea pigs using mesenteric lymph node cells. Exp. Parasitol., 42: 121-128

Adams, D.B., Anderson, B.H. y Windon, R.G., (1989). Cross-immunity between *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. Int. J. Parasitol., 19: 717-722.

Adams, D.B., Merritt, G.C. y Cripps, A.W., (1980). Intestinal lymph and the local antibody and immunoglobulin response to infection by *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci., 58: 167-177.

Albers, G.A.A. y Burgess, S.K., (1988). Serial passage of *Haemonchus contortus* in resistant and susceptible sheep. Vet. Parasitol., 28: 303-306.

Albers, G.A.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, J.S.F., LeJambre, L.F. y Barger, I.A., (1987). The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. Int. J. Parasitol., 17: 1355-1363.

Allonby, E.W. y Urquhart, G.M., (1976). A possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in merino sheep in Kenya. Res. Vet. Sci., 20: 212-214.

Altaif, K.I. y Dargie, J.D., (1978a). Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with *Haemonchus contortus*. Parasitol., 77: 161-175.

Altaif, K.I. y Dargie, J.D., (1978b). Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin on the response of sheep to re-infection with *Haemonchus contortus*. Parasitol., 77: 177-187.

Anderson, D.V., Dixon, S.C., Graham, R.B., Smith, W.D. y Tucker, E.M., (1989). Ovine monoclonal antibody to *Ostertagia circumcincta*. Biochem. Soc. Trans., 17: 736.

Barger, I.A., (1988). Resistance of young lambs to *Haemonchus contortus* infection, and its loss following anthelmintic treatment. Int. J. Parasitol., 18: 1107-1109.

Barger, I.A., (1989). Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. Vet. Parasitol., 32: 21-35.

Barger, I.A. y Le Jambre, L.F., (1988). Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep: mortality of established worms.

Int. J. Parasitol., 18: 269-273.

Befus, D., (1986). Immunity in intestinal helminth infections: present concepts, future directions. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 80: 735-741.

Beh, K.J., Foley, R.C. y Goodwin, E.J., (1989). Restriction fragment length patterns of DNA from parasitic nematodes of sheep. Res. Vet. Sci., 46: 127-128.

Benítez-Usher, C., Armour, J., Urquhart, G.M. y Gettinby, G., (1977). A study of some factors influencing the immunization of sheep against *Haemonchus contortus* using attenuated larvae. Vet. Parasitol., 3:327-342.

Bennett, S. y Riley, E.M. (1992). The statistical analysis of data from immunoepidemiological studies. J. Immunol. Methods, 146: 229-239.

Berezkho, V.K., Akulin, N.A., Buzmakova, R.A. y Kurochkina, K.G., (1987). Immunoallergic reactions and a phenomenon of self-cure in experimental haemonchosis (*Haemonchus contortus*) of sheep depending on host's age. Helminthologia, 24: 119-131.

Bird, A.F., (1990). Vital staining of glycoprotein secreted by infective third stage larvae of *Haemonchus contortus* prior to exsheathment. Int. J. Parasitol. 20: 619-623.

Blanchard, J.L. y Wescott, R.B., (1985). Enhancement of resistance of lambs to *Haemonchus contortus* by previous infection with *Ostertagia circumcincta*. Am. J. Vet. Res., 46: 2136-2140.

Blitz, N.M. y Gibbs, H.C., (1972a). Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep-I. The induction of arrested development. Int. J. Parasitol., 2: 5-12.

Blitz, N.M. y Gibbs, H.C., (1972b). Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep -II. Termination of arrested development and the spring rise phenomenon. Int. J. Parasitol., 2: 13-22.

Blood, D.C. y Radostits, O.M., (1989). Veterinary Medicine. Bailliére Tindall, London. pp. 1018-1019, 1056-1060.

Boisvenue, R.J., Galloway, R.B. y Hendrix, J.C., (1987). Protection of lambs with a purified metabolite of exsheathed third-stage *Haemonchus contortus* larvae. Am. J. Vet. Res., 48: 1236-1238.

Boisvenue, R.J., Stiff, M.I., Tonkinson, L.V. y Cox, G.N., (1991). Protective studies in sheep immunized with cuticular collagen proteins and peptides of *Haemonchus contortus*. Parasite

Immunol., 13: 227-240.

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

Butterworth, A.E., (1984). Cell mediated damage to helminths. Adv. Parasitol., 23: 143-235.

Byszewska-Szpocinska, E. y Stankiewicz, M., (1985). Immunological studies on experimental haemonchosis in sheep. IV. Multiple infections of Polish long-wool sheep. Acta Parasitol. Pol., 30: 95-108.

Cabrera, Z. y Parkhouse, R.M.E., (1986). Identification of antigens of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca gibsoni* for diagnostic use. Mol. Biochem. Parasitol., 20: 225-231.

Canals Caballero, A., (1986). Estudios epidemiológicos de la gastroenteritis parasitaria ovina: factores que modifican los niveles de pepsinógeno. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Capron, A. y Dessaint, J.P., (1988). Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens. Ann. Inst. Pasteur/ Immunol., 139: 109-117.

Castro, G.A., (1989). Immunophysiology of enteric parasitism. Parasitol. Today, 5: 11-19.

Catty, D. y Raykundalia, C., (1989). ELISA and related enzyme immunoassays. In: Catty, D. (Edit.) Antibodies. Volumen II. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press. pp. 97-154.

Clarke, M.W. y Slocombe, J.O.D., (1984). Partial biochemical and serological characterization of exsheathing fluid and somatic extracts of infective larvae and adult females of *Haemonchus contortus*. Can. J. Comp. Med., 48: 166-170.

Coadwell, W.J. y Ward, P.F.V., (1977). Annual variation in the growth of *Haemonchus contortus* in experimental infections of sheep and its relations to arrested development. Parasitol., 74: 121- 132.

Coadwell, W.J. y Ward, P.F.V., (1982). The use of faecal egg counts for estimating worm burdens in sheep infected with *Haemonchus contortus*. Parasitol., 85: 251-256.

Connan, R.M. (1968). The post-parturient rise in fecal nematode egg count of ewes: its aetiology and epidemiological

significance. World Rev. Animal Production, 4: 53-58.

Coop, R.L., Mellor, D.J., Jackson, F., Flint, D.J. y Vernon, R.G., (1990). Teladorsagia circumcincta egg output at the onset of natural and induced lactation in ewes. Vet. Parasitol., 35: 295-305.

Cooper, D.W., Van Oorschot, R.A.H., Piper, L.R. y Le Jambre, L.F., (1989). No association between the ovine leucocyte antigen (OLA) system in the Australian merino and susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Int. J. Parasitol., 19: 695-697.

Cordero del Campillo, M. y col., (1980). Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos. Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Madrid. 579 pp.

Courtney, C.H., Parker, C.F., McClure, K.E. y Herd, R.P., (1984). A comparison of the periparturient rise in fecal egg counts of exotic and domestic ewes. Int. J. Parasitol., 14: 377-381.

Courtney, C.H., Parker, C.F., McClure, K.E. y Herd, R.P., (1985a). Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol., 15: 101-109.

Courtney, C.H., Parker, C.F., McClure, K.E. y Herd, R.P., (1985b). Resistance of nonlambling exotic and domestic ewes to naturally acquired gastrointestinal nematodes. Int. J. Parasitol., 15: 239-243.

Cox, G.N., Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J., (1989). Identification and preliminary characterization of cuticular surface proteins of *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol., 36: 233-242.

Cox, G.N., Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J., (1990a). *Haemonchus contortus*: evidence that the 3A3 collagen gene is a member of an evolutionarily conserved family of nematode cuticle collagens. Exp. Parasitol., 70: 175-185.

Cox, G.N., Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J., (1990b). *Haemonchus contortus*: a simple procedure for purifying surface proteins from third and fourth-stage larvae. Exp. Parasitol., 70: 227-235.

Cross, D.A., Klesius, P.H. y Williams, J.C., (1988). Preliminary report: Immunodiagnosis of pre-type II ostertagiasis. Vet. Parasitol., 27: 151-158.

Charley-Poulain, J., Luffau, G. y Péry, P., (1984). Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol., 14: 129-141.

- Charley-Poulain, J., Bourdieu, C., Luffau, G. y Péry, P., (1981). Immune response of sheep to *Haemonchus contortus*: serum antibodies against cross reacting antigens between parasites. Ann. Rech. Vét., 12: 123-128.
- Christie, M.G., Brambell, M.R. y Charleston, W.A.G., (1964). Worm populations in young sheep dosed daily with 10,000 larvae of *Haemonchus contortus*. J. Comp. Path., 74: 435-446.
- Christie, M.G., Hart, R., Angus, K.W., Devoy, J. y Patterson, J.E., (1978). Resistance to *Haemonchus contortus* in sheep given repeated daily doses of 10.000 infective larvae. J. Comp. Path., 88: 157-165.
- Dash, K.M., (1985). Distribution of Trichostrongylid nematodes in the abomasum of sheep. Int. J. Parasitol., 15: 505-510.
- Díaz Díaz, E., (1949). Epizootia de tricostrongilosis o verminosis gastrointestinal de los pequeños rumiantes. Ciencia Veterinaria, 10: 531-539.
- Díez Baños, N., Díez Baños, P. y Cordero del Campillo, M., (1989). Infestación natural por nematodos del abomaso de ovinos, en la provincia de León (España). Acta VI Cong. Nac. Parasitol., Cáceres: p. 133.
- Dineen, J.K. y Windon, R.G., (1980). The effect of sire selection on the response of lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. Int. J. Parasitol., 10: 189-196.
- Dobson, C., (1966). Studies on the immunity of sheep to *Oesophagostomum columbianum*: proteins and haemagglutinating antibodies in mucous exudates and intestinal tissue extracts. Aust. J. Agric. Res., 17: 779-796.
- Donald, A.D., Dineen, J.K. y Adams, D.B., (1969). The dynamics of the host-parasite relationship. VII. The effect of discontinuity of infection on resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. Parasitol., 59: 497-503.
- Dopheide, T.A.A., Tachedjian, M., Phillips, C., Frenkel, M.J., Wagland, B.M. y Ward, C.W., (1991). Molecular characterisation of a protective, 11 kDa excretory-secretory protein from the parasitic stages of *Trichostrongylus colubriformis*. Mol. Biochem. Parasitol., 45: 101-108.
- Duncan, J.L., Smith, W.D. y Dargie, J.D., (1978). Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to immune unresponsiveness of lambs to *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol., 4: 21-27.

Emery, D.L. y Wagland, (1991). Vaccines against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. Parasitol. Today, 7: 347-349.

Evans, J.V., Blunt, M.H. y Southcott, W.H., (1963). The effect of infection with *Haemonchus contortus* on the sodium and potassium concentrations in the erythrocytes and plasma, in sheep of different haemoglobin type. Aust. J. agric. Res., 14: 549-558.

Fernández Díez, M., (1967). Epizootiología de las infestaciones por Trichostrongylidae en los ovinos de León. An. Fac. Vet. León, 13: 53-109.

Fetterer, R.H., (1989). The cuticular proteins from free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*-I. Isolation and partial characterization. Comp. Biochem. Physiol., 94B: 383-388.

Fetterer, R.H. y Urban, J.F., (1988). Developmental changes in cuticular proteins of *Ascaris suum*. Comp. Biochem. Physiol., 90B: 321-327.

Fleming, M.W. y Conrad, S.D., (1989). Effects of exogenous progesterone and/or prolactin on *Haemonchus contortus* infections in ovariectomized ewes. Vet. Parasitol., 34: 57-62.

Fox, M.T., Jacobs, D.E. y Sani, R.A., (1991). Blood gastrin and pepsinogen of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 85: 263-267.

Gamble, H.T. y Zajac, A.M. (1992). Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. Vet. Parasitol., 41: 211-225.

Gamble, H.R., Purcell, J.P. y Fetterer, R.H., (1989). Purification of a 44 kilodalton protease which mediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. Mol. Biochem. Parasitol., 33: 49-58.

Gamble, H.R., Purcell, J.P. y Fetterer, R.H., (1990). Biochemical characterization of cuticle polypeptides from the infective larvae of *Haemonchus contortus*. Comp. Biochem. Physiol., 96B: 421-429.

Gasbarre, L.C. y Canals, A., (1989). Induction of protective immunity in calves immunized with adult *Oesophagostomum radiatum* somatic antigens. Vet. Parasitol., 34: 223-238.

Gibbs, H.C., (1986). Hypobiosis in parasitic nematodes- an update. Adv. Parasitol., 25, 129-174.

Gibbons, L.M. y Khalil, L.F. (1982). A key for the identification of genera of the nematode family Trichostrongylidae Leiper, 1912. J. Helminthol., 56: 185-233.

Gill, H.S., (1991). Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. Parasite Immunol., 13: 617-628.

Gill, H.S., Gray, G.D. y Watson, D.L., (1991). Mechanisms underlying genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. In: Gray, G.D. y Woolaston, R.R. (Edits.). Breeding for disease resistance in sheep. Australian Wool Corporation, Melbourne. pp. 67-75.

Gill, H.S., Husband, A.J. y Watson, D.L., (1992). Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 31: 179-187.

Goldblum, R.M., (1990). The role of IgA in local immune protection. J. Clin. Immunol. 10 (Nov. Suppl.): 648-718.

Gogolin-Ewens, K.J., Meeusen, E.N.T., Scott, P.C., Adams, T.E. y Brandon, M.R., (1990). Genetic selection for disease resistance and traits of economic importance in animal production. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 9: 865-896.

Grey, H.M., Sette, A. y Buus, S., (1990). Así reconocen las células T a los antígenos. Investigación y ciencia, 160 : 26-35.

Gruner, L., (1991). Breeding for helminth resistance in sheep and goats. In: Owen, J.B. & Axford, R.F.E. (Edits.). Breeding for disease resistance in farm animals. CAB International, U.K., pp. 187- 200.

Gruner, L. y Cabaret, J., (1988). Resistance of sheep and goats to helminth infections: a genetic basis. In: Thomson, E.F. & Thomson, F.S. (Edits.). Increasing small ruminant productivity in semi-arid areas. ICARDA, Netherlands, pp. 257-265.

Haig, D.M., Windon, R., Blackie, W., Brown, D. y Smith, W.D., (1989). Parasite-specific T cell responses of sheep following live infection with the gastric nematode *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol., 11: 463-477.

Hendrikx, W.M.L., (1990). De nematode *Haemonchus contortus*: antigeenkarakter en immuunrespons bij konijnen en schapen. Tijdschr. Diergeneesk., 115: 1092-1101.

Holmes, P.H., (1986). Pathophysiology of nematode infections. In: Howell, M.J. (Edit.). Parasitology: Quo vadit?. Australian Academy of Science, Canberra. pp. 443-451.

Honde, C., Chayvialla, J.A., Cuber, J.C. y Bueno, L., (1985). Early changes in plasma pancreatic polypeptide, somatostatin, gastrin and motilin levels induced by *H. contortus* infection in

lamb. Ann. Rech. Vét., 16: 195-200.

Hudson, L. y Hay, F.C., (1979). Inmunología práctica. Edit. Jims, Barcelona.

Hunter, A.R. y Mackenzie, G., (1982). The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. J. Helminthol., 56: 135-144.

Hunter, A.R., Mackenzie, G. y Ross, J.G., (1983). The effects of transfer factor, parasitic antigen and precipitated immunoglobulin treatments in lambs infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol., 13: 45-53.

Huntley, J.F., Gibson, S., Brown, D., Smith, W.D., Jackson, F. y Miller, H.R.P., (1987). Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. Parasite Immunol., 9: 603-614.

Husband, A.J., Beh, K.J. y Lascelles, A.K., (1979). IgA-containing cells in the ruminant intestine following intraperitoneal and local immunization. Immunology, 37: 597-601.

Jasmer, D.P. y McGuire, T.C., (1991). Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. Infection and Immunity, 59: 4412-4417.

Jeffcoate, I.A., Fishwick, G. Bairden, K. Armour, J. y Holmes, P.H., (1990). Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. Res. Vet. Sci., 48: 295-300.

Jenkins, M.C. y Dame, J.B., (1987). Identification of immunodominant surface antigens of *Eimeria acervulina* sporozoites and merozoites. Mol. Biochem. Parasitol., 25: 155-164.

Jordan, H.E. y Stair, E.L., (1984). The importance of endoparasite counts at necropsy. Modern Vet. Prac., October: 763-766.

Kassai, T., Fésús, L., Hendrikx, W.M.L., Takáts, Cs., Fok, É., Redl, P., Takács, E., Nilsson, Ph.R., Van Leeuwen, M.A.W., Jansen, J., Bernadina, W.E. y Frankena, K., (1990). Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in merino lambs? Vet. Parasitol., 37: 61-77.

Keith, K.A., Duncan, M.C., Murray, M., Bairden, K. y Tait, A., (1990). Stage-specific cuticular proteins of *Ostertagia circumcincta* and *Ostertagia ostertagi*. Int. J. Parasitol., 20: 1037-1045.

Kennedy, M.W., (1989). Genetic control of the immune repertoire

in nematode infections. Parasitol. today, 5: 316-324.

Klesius, P.H., Washburn, S.M. y Haynes, T.B., (1986). Serum antibody response to soluble extract of the third-larval stage of *Ostertagia ostertagi* in cattle. Vet. Parasitol., 20: 307-314.

Kloosterman, A., Borgsteede, F.H.M. y Eysker, M., (1984/85). The effect of experimental *Ostertagia ostertagi* infections in stabled milking cows on egg output, serum pepsinogen levels, antibody titres and milk production. Vet. Parasitol., 17: 299-308.

Knight, R.A. y Rodgers, D., (1974). Age resistance of lambs to single inoculation with *Haemonchus contortus*. Proc. Hel. Soc. Was., 41: 116.

Laemli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Le Jambre, L.F., (1982). Genetics and control of trichostrongylid parasites of ruminants. In Biology and control of endoparasites (Symons, L.E.A., Donald, A.D. y Dineen, J.K., eds.) Academic Press, Sidney, 53-80.

Lichtenfels, J.R., (1986). Phylogenetic inference from adult morphology in the Nematoda with emphasis on the bursate nematodes, the Strongylida; advancements (1982-1985) and recommendations for further work. In: Howell, M.J. (Edit.). Parasitology: Quo vadit?. Australian Academy of Science, Canberra. pp.269-279.

Lightowlers, M.W. y Rickard, M.D., (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. Parasitol., 96: S123-S166.

López, V. y Urquhart, G.M., (1967). The immune response of merino sheep to *Haemonchus contortus* infection. 3rd Int. Conf. of the World Association for the Advance of Veterinary Parasitology, Lyon. V.G. Elbert, Marburg-Lahn, pp. 153-159.

Lubega, G.W. y Prichard, R.K., (1990). Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol., 38: 221-232.

Luffau, G., Péry, P. y Petit, A., (1981a). Self-cure and immunity following infection and reinfection in ovine haemonchosis. Vet. Parasitol., 9: 57-67.

Luffau, G., Péry, P. y Charley, J., (1981b). Réponse immunitaire chez les ovins infestés expérimentalement par *Haemonchus contortus*. Étude comparative chez la mâle et chez la femelle. Ann. Rech. Vét., 12: 173-181.

Luffau, G., Vu Tien Khang, J., Bouix, J., Nguyen, T.C., Cullen, P. y Ricordeau, G., (1990). Resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Romanov sheep. Genet. Sel. Evol., 22: 205-229.

Lloyd, S., Amerasinghe, P.H. y Soulsby, E.J.L., (1983). Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. J. Small Animal Practice, 24: 237-247.

Mackenzie, C.D., Preston, P.M. y Ogilvie, B.M., (1978). Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. Nature, 276: 826-828.

Maclean, J.M., Abebe, M., Wedrychowicz, H. y Holmes, P.H., (1986). Local and systemic responses in gerbils following vaccination with irradiated or non-irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. J. Helminthol., 60: 263-278.

Manton, V.J.A., Peacock, R., Poynter, D., Silverman, P.H. y Terry, R.J., (1962). The influence of age on naturally acquired resistance to *Haemonchus contortus* in lambs. Res. Vet. Sci., 3: 308-314.

Martínez Gómez, F., (1971). Contribución al diagnóstico de las verminosis gastrointestinales de los ovidos. Rev. Ibér. Parasitol., 31: 89-94.

Martínez Gómez, F., (1985). Problemas parasitarios de los rumiantes en régimen extensivo en el valle del Guadalquivir. Comunicaciones INIA. Serie: Higiene y Sanidad Animal, 11: 93-105.

Martínez Gómez, F. y Hernández Rodríguez, S., (1971). Helminth parasites from sheep (*Ovis aries*) in Córdoba (Spain). Archiv. Zootechnia, 20: 1-7.

Meana Mañes, A., (1991). Fisiopatología de las gastroenteritis parasitarias ovinas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. y Kiyono, H., (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine, 10: 75-88.

McGillivray, D.J., Yong, W.K., Riffkin, G.G. y Adler, B., (1989). Extraction and identification of a 31,000 mol. wt glycoprotein antigen of *Ostertagia circumcincta* by sera from resistant sheep. Int. J. Parasitol., 19: 473-478.

Michel, J.F., (1976). The epidemiology and control of some

nematode infections in grazing animals. Adv. Parasitol. 14:355-397.

Michel, J.F., Lancaster, M.B. y Hong, C., (1973). Ostertagia ostertagi: protective immunity in calves. The development in calves of a protective immunity to infection with Ostertagia ostertagi. Exp. Parasitol. 33: 179-186.

Miller, H.R.P., (1984). The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. Vet. Immunol. Immunophatol. 6: 167-259.

Miller, H.R.P., (1986). Vaccination against intestinal parasites. In: Howell, M.J. (Edit.), Parasitology: Quo Vadit?, Australian Academic of Science, Canberra. pp. 43-51.

Miller, H.R.P. (1987). Immunopathology of nematode infestation and expulsion. In: Marsh, M.N. (Edit.). Immunopathology of the small intestine. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 177-208.

Miller, H.R.P., Jackson, F., Newlands, G. y Appleyard, W.T., (1983). Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci. 35: 357-363.

Milner, A.R. y Mack, W.N., (1988). Trichostrongylus colubriformis: analysis of monoclonal antibody and lectin binding to the larval cuticle. Parasite immunol. 10: 425-432.

Milner, A.R., Beall, J.A. y Orwat, A., (1987). Two-dimensional electrophoretic comparison of the antigens and biosynthetically labelled proteins of Trichostrongylus colubriformis and Ostertagia circumcincta. Parasite immunol. 9: 615-626.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, (1971). Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. HMSO, London.

Miró Corrales, G., (1991). Epizootiología de las gastroenteritis parasitarias ovinas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Mostofa, M., Mckellar, Q.A., Eckersall, P.D. y Gray, D., (1990). Pepsinogen types in worm-free sheep and in sheep infected with Ostertagia circumcincta and Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci. 48: 108-111.

Munn, E.A., Greenwood, C.A. y Coadwell, W.J., (1987). Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult Haemonchus contortus. Parasitol. 94: 385-397.

Murray, M., (1973). Local immunity and its role in vaccination. Vet. Rec. 93: 500-504.

Neilson, J.T.M., (1969). Gel filtration and disc electrophoresis of a somatic extract and excretions and secretions of *Haemonchus contortus* larvae. Exp. Parasitol., 25: 131-141.

Neilson, J.T.M., (1975). Failure to vaccinate lambs against *Haemonchus contortus* with functional metabolic antigens identified by immunoelectrophoresis. Int. J. Parasitol., 5: 427-430.

Neilson, J.T.M. y Van de Walle, M.J., (1987). Partial protection of lambs against *Haemonchus contortus* by vaccination with a fractionated preparation of the parasite. Vet. Parasitol., 23: 211-221.

Newby, T.J. y Bourne, F.J., (1976). The nature of the local immune system of the bovine small intestine. Immunol., 31: 475-480.

Newlands, G.F.J., Miller, H.R.P. y Jackson, F., (1990). Immune exclusion of *Haemonchus contortus* larvae in the sheep: effects on gastric mucin of immunization, larval challenge and treatment with dexamethasone. J. Comp. Path., 102: 432-442.

O'Donnell, I.J., Dineen, J.K., Rothwell, T.L.W. y Marshall, R.C., (1985). Attempts to probe the antigens and protective immunogens of *Trichostrongylus colubriformis* in immunoblots with sera from infected and hiperimmune sheep and high-and low-responder guinea pigs. Int. J. Parasitol., 15: 129-136.

Ouchterlony, O., (1953). Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 32: 231-240.

Outteridge, P.M., Windon, R.G. y Dineen, J.K., (1985). An association between a lymphocyte antigen in sheep and the response to vaccination against the parasite *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol., 15: 121-127.

Outteridge, P.M., Windon, R.G., Dineen, J.K. y Smith, E.F., (1986). The relationship between ovine lymphocyte antigens and faecal egg count of sheep selected for responsiveness to vaccination against *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol., 16: 369-374.

Ozerol, N.H. y Silverman, P.H., (1969). Partial characterization of *Haemonchus contortus* exsheathing fluid. J. Parasitol., 55: 79-87.

Ozerol, N.H. y Silverman, P.H. (1970). Further characterization of active metabolites from histotropic larvae of *Haemonchus contortus* cultured in vitro. J. Parasitol., 56: 1199-1205.

Parkhouse, R.M.E., Almond, N.M., Cabrera, Z. y Harnett, W.,

(1987). Nematode antigens in protection, diagnosis and pathology. Vet. Immunol. Immunopathol., 17: 313-334.

Pellerin, J.L., Lefevre, S. y Bodin, G., (1990). L'immunité humorale au cours de la gestation chez la brebis et sa transmission a l'agneau. Rev. Méd. Vét., 141: 469-478.

Petit, A., Péry, P. y Luffau, G., (1981). Circulating antigens in ovine haemonchosis. Ann. Rech. Vét., 12: 1-9.

Presson, B.L., (1986). Initial investigation into the level and substance of breed dependent resistance of sheep to prevalent gastrointestinal nematode parasites. Dissertation abstracts int., 47: 118.

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

Preston, J.M. y Allonby, E.W., (1978). The influence of breed on the susceptibility of sheep and goats to a single experimental infection with *Haemonchus contortus*. Vet. Rec., 103: 509-512.

Pritchard, D.I., Williams, D.J.L., Behnke, J.M. y Lee, T.D.G., (1983). The role of IgG1 hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius*. The immunochemical purification, antigen-specificity and in vivo anti-parasite effect of IgG1 from immune serum. Immunol., 49: 353-365.

Radhakrishnan, C.V., Bradley, R.E. y Loggins, P.E., (1972) Host responses of worm-free Florida native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Am. J. Vet. Res., 33: 817-823.

Rahman, W.A. y Collins, G.H., (1990). Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. Br. Vet. J., 146: 543-550.

Reina, D., Navarrete, I., Hernández Rodríguez, S. y Habela, M., (1987). Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. II. Helmintos. Rev. Ibér. Parasitol. vol. extraordinario: pp.85-90.

Reynolds, G.E. y Griffin, J.F.T., (1990). Humoral immunity in the ewe. 2. The effect of pregnancy on the primary and secondary antibody response to protein antigen. Vet. Immunol. Immunopathol. 25: 155-166.

Riffkin, G.G. y Dobson, C., (1979). Predicting resistance of

sheep to *Haemonchus contortus* infections. Vet. Parasitol., 5: 365-378.

Roberts, J.A. y Adams, D.B., (1990). The effect of level of nutrition on the development of resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. Aus. Vet. J., 67: 89-91.

Roberts, J.L. y Swan, R.A., (1981). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 1. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. Vet. Parasitol., 8: 165-171.

Roberts, J.L. y Swan, R.A., (1982a). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 2. Relationship between total worm counts of *Haemonchus contortus*, haemoglobin values and bodyweight. Vet. Parasitol., 9: 201-209.

Roberts, J.L. y Swan, R.A., (1982b). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 3. The interpretation and diagnostic significance of the changes in serial egg counts of *Haemonchus contortus* in a sheep flock. Vet. Parasitol., 9: 211-216.

Ross, J.G. y Halliday, W.G., (1979a). Investigations of "transfer factor" activity in the transfer of immunity to *Trichostrongylus axei* infections in sheep. Res. Vet. Sci., 26: 41-46.

Ross, J.G. y Halliday, W.G., (1979b). Investigations of "transfer factor" activity in immunity to *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. Int. J. Parasitol., 9: 281-284.

Ross, J.G., Duncan, J.L. y Halliday, W.G., (1978). Investigation of *Haemonchus contortus* infections in sheep. Comparison of irradiated larvae and transfer factor treatment. Res. Vet. Sci., 27: 258-259.

Rotwell, T.L.W. y Love, R.J., (1974). Vaccination against the nematode *Trichostrongylus colubriformis*-I. Vaccination of guinea-pigs with worm homogenates and soluble products released during in vitro maintenance. Int. J. Parasitol., 4: 293-299.

Rowe, J.B., Nolan, J.V., de Chaneet, G. y Teleni, E., (1988). The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. British J. Nutrition, 59: 125-139.

Rubin, R., (1967). Some observations on the interpretation of egg counts. Am. J. Vet. Clin. Path., 1: 145-148.

Salman, S.K. y Duncan, J.L., (1984). The abomasal histology of worm-free given primary and challenge infections of *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol., 16: 43-54.

Salman, S.K. y Duncan, J.L., (1985). Studies on the abomasal

pathology of immunized and non-immunized sheep infected with *Haemonchus contortus*. J. Helminthol., 59: 351-359.

Scicchitano, R., Husband, A.J. y Cripps, A.W., (1984). Biliary transport of serum IgA in sheep. Immunology, 53: 1211-29.

Schmidt, M.A., (1989). Development and application of synthetic peptides as vaccines. Biotech. Adv., 7: 187-213.

Shamansky, L.M., Pratt, D., Boisvenue, R.J. y Cox, G.N., (1989). Cuticle collagen genes of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* are highly conserved. Mol. Biochem. Parasitol., 37: 73-86.

Sheldrake, R.F., Husband, A.J., Watson, D.L. y Cripps, A.W., (1984). Selective transport of serum-derived IgA into mucosal secretions. J. Immunol., 132: 363-368.

Shepherd, J.C. y McManus, D.P., (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. Mol. Biochem. Parasitol., 25: 143-154.

Silverman, P.H. y Patterson, J.E., (1960). Histotrophic (parasitic) stages of *Haemonchus contortus*. Nature, 185: 54-55.

Simón Vicente, F., (1962). Nematodes Trichostrongylidae en los rumiantes domésticos españoles. Rev. Ibér. Parasitol., 22: 97-105.

Simpson, A.J.G., (1986). The influence of molecular heterogeneity in helminth identification, protective immunity and immunodiagnosis. In: Howell, M.J. (Edit.) Parasitology: Quo Vadit?. Australian Academy of Science, Canberra, pp.69-79.

Sinski, E. y Holmes, P.H., (1977). *Nippostrongylus brasiliensis*: systemic and local IgA and IgG immunoglobulin responses in parasitized rats. Exp. Parasitol., 43: 382-389.

Sivanathan, S., Duncan, J.L. y Urquhart, G.M. (1984). Some factors influencing the immunisation of sheep with irradiated *Haemonchus contortus* larvae. Vet. Parasitol., 16: 313-323.

Smith, T.S. y Munn, E.A., (1990). Strategies for vaccination against gastro-intestinal nematodes. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 9: 577-595.

Smith, W.D., (1977a). Serum and mucus antibodies in sheep immunised with larval antigens of *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci., 22: 128-129.

Smith, W.D., (1977b). Anti-Larval antibodies in the serum and abomasal mucus of sheep hyperinfected with *Haemonchus contortus*.

Res. Vet. Sci., 22: 334-338.

Smith, W.D. y Angus, K.W., (1980). *Haemonchus contortus*: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. Res. Vet. Sci., 29: 45-50.

Smith, W.D. y Christie, M.G., (1978). *Haemonchus contortus*: local and serum antibodies in sheep immunised with irradiated larvae. Int. J. Parasitol., 8: 219-223.

Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E. y Williams, J. (1985). Age immunity to *Ostertagia circumcincta*: comparison of the local immune responses of 4 1/2- and 10-month-old lambs. J. Comp. Path., 95: 235-245.

Smith, W.D., Jackson, F., Graham, R. Jackson, E. y Williams, J., (1987). Mucosal IgA production and lymph cell traffic following prolonged low level infections of *Ostertagia circumcincta* in sheep. Res. Vet. Sci., 43: 320-326.

Smith, W.D., Jackson, F., Williams, J., Willadsen, S.M. y Fehilly, C.B., (1984). Resistance to *Haemonchus contortus* transferred between genetically histocompatible sheep by immune lymphocytes. Res. Vet. Sci., 37: 199-204.

Smith, W.D., Jackson, F., Jackson, E., Graham, R., Williams, J., Willadsen, S.M. y Fehilly, C.B., (1986). Transfer of immunity to *Ostertagia circumcincta* and IgA memory between identical sheep by lymphocytes collected from gastric lymph. Res. Vet. Sci., 41: 300-306.

Soulsby, E.J.L. (1979). The immune system and helminth infection in domestic species. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 23: 71-102.

Tarazona Vilas, J.M., (1974). Aportaciones al estudio de las gastroenteritis producidas por nematodos parásitos en los ovinos españoles. An. INIA. Serie: Higiene y Sanidad Animal, 1: 63-85.

Tarazona Vilas, J.M., (1984). Parasitic gastroenteritis in goats in Spain. In: Les maladies de la chèvre, Ed. INRA Publ. pp. 507-512.

Tarazona Vilas, J.M., (1985). Los parasitismos de los rumiantes en pastoreo de la provincia de Huesca. Comunicaciones INIA. Serie: Higiene y Sanidad Animal, 11: 83-89.

Tarazona Vilas, J.M., Sanz Pastor, A., Cea, L. y Babín, M.M., (1976-1977). Aportaciones al estudio de las gastroenteritis producidas por nematodos parásitos en los ovinos españoles. III. Periodos teóricos de transmisión favorable de las tricostrogilidosis. An. INIA. Serie: Higiene y Sanidad Animal, 3: 11-21.

- Tarazona Vilas, J.M., Sanz Pastor, A., Babín, M.M., Domínguez, T. y Parra, I., (1982). Trichostrongilidosis caprina.II. Estudios clínicos en infestaciones de campo. An. INIA, Serie: Ganadera, 14: 111-124.
- Tarazona Vilas, J.M., Sanz Pastor, A., Babín, M.M., Canals, A., Domínguez, T., Martín, M. y Trujillo, J., (1985). Problemas parasitarios de los rumiantes en pastoreo en la meseta meridional. Comunicaciones INIA, Serie: Higiene y Sanidad Animal, 11: 63-69.
- Taylor, D.M. y Thomas, R.J., (1986). The development of immunity to *Nematodirus battus* in lambs. Int. J. Parasitol., 16: 43-46.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Wilson, C.A. y Quick, J.M., (1990). Clinical observations, diagnosis and control of *H. contortus* infections in periparturient ewes. Vet. Record, 126: 555-556.
- Thomas, R.J. y Ali, D.A., (1983). The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. Int. J. Parasitol., 13: 393-398.
- Urban, J.F., Gamble, H.R. y Katona, I.M., (1989). Intestinal immune responses of mammals to nematode parasites. American Zoologist, 29: 469-478.
- Uriarte, J., (1990). Epidemiología de la trichostrongilidosis de los rumiantes en praderas de regadío. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- Uriarte, J., Tanco, J.A., Guillén, A. y Marco, M.M., (1984). Evolución y supervivencia de los estados libres de la Familia Trichostrongylidae en los secanos de la provincia de Zaragoza. An. INIA, Serie: Ganadera 11-23.
- Urquhart, G.M., Jarret, W.F.H., Jennings, F.W., McIntyre, W.I.M. y Mulligan, W., (1966). Immunity to *Haemonchus contortus* infection: Relationship between age and successful vaccination with irradiated larvae. Am. J. Vet. Res., 27: 1645-1648.
- Van Wyk, J.A. y Malan, F.S., (1988). Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. Vet. Rec., 123: 226-228.
- Vray, B., De Vos, L. Josens, G., Pecheur, M. y Losson, B., (1988). Etude en microscopie électronique à balayage de ver mirilton *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803). Ann. Méd. Vét., 132: 13-24.
- Wakelin, D., (1985). Genetic control of immunity to helminth infections. Parasitol. Today, 1: 17-23.

- Watson, D.L., (1992). Biological half-life of ovine antibody in neonatal lambs and adult sheep following passive immunization. Vet. Immunol. Immunopathol., 30: 221-232.
- Wedrychowicz, H., (1986). Studies on the antigens of *Ostertagia ostertagi*. III. Somatic and metabolic antigens of adult nematodes. Acta parasitol. Pol., 30: 317-326.
- Wedrychowicz, H. y Bezubik, B., (1981). Studies on the antigens of *Ostertagia circumcincta*. I. Somatic antigens of infective larvae. Acta Parasitol. Pol., 28: 233-245.
- Wedrychowicz, H., Abbott, E.M. y Holmes, P.H., (1984a). Use of coproantibody measurement to assess the influence of diet on local immune responses of sheep vaccinated against *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci., 36: 240-246.
- Wedrychowicz, H., Bezubik, B. y Krasuska, M., (1986). Investigations on allergenic properties of various developmental stages of *Nippostrongylus brasiliensis*. Acta Parasitol. Pol., 31: 101-110.
- Wedrychowicz, H., Maclean, J.M. y Holmes, P.H., (1983). The detection and measurement of coproantibodies to *Nippostrongylus brasiliensis* in rats following a primary infection. Parasite Immunol., 5: 277-287.
- Wedrychowicz, H., Maclean, J.M. y Holmes, P.H., (1984b). Secretory IgA responses in rats to antigens of various developmental stages of *Nippostrongylus brasiliensis*. Parasitol., 89: 145-157.
- Wedrychowicz, H.Z., Maclean, J.M. y Holmes, P.H., (1985). Some observations on a possible role of lung and fecal IgA antibodies in immunity of rats to *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Parasitol., 71: 62-69.
- Wesley Alexander, J. y Good, R.A., (1980). Principios de inmunología clínica, Editorial Reverté, S.A., Barcelona. pp: 13-23, 11-117.
- Williams, R.O. y Burden, D.J., (1987). Measurement of class specific antibody against *Cryptosporidium* in serum and faeces from experimentally infected calves. Res. Vet. Sci., 43: 264-265.
- Windon, R.G., (1990). Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz., 9: 555-576.
- Windon, R.G., (1991). Genetic control of host responses involved in resistance to gastrointestinal nematodes of sheep. In: Owen,

J.B. & Axford, R.F.E. ( Edits.). Breeding for disease resistance in farm animals. CAB International, U.K., pp. 162-186.

Zajac, A.M., (1987). The role of gastrointestinal immunity in parasitic infections of small animals. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal), 2: 274-281.

Zajac, A.M., Krakowka, S., Herd, R.P. y McClure, K.E., (1990). Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. Vet. Parasitol., 36: 221-235.