

2ej.  
3



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
" ZARAGOZA "

ESTABLECIMIENTO DE UNA CEPA DE  
Haemonchus contortus ARTIFICIALMENTE  
RESISTENTE A LOS BENCIMIDAZOLES.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
EDUARDO BELLO PADILLA

DIRECTORES DE TESIS:  
M. V. Z. RICARDO CAMPOS RUELAS, M. en C.  
BIOL. LOURDES DE LA ROSA G., M. en C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CONTENIDO	PAGS .
RESUMEN	I
INDICE	II
I. INTRODUCCION	1
A. PRESENTACION DEL PROBLEMA	1
B. <u>Haemonchus contortus</u>	2
C. CONTROL QUIMICO	6
OBJETIVO	16
HIPOTESIS	16
II. MATERIALES Y METODO	17
A. PARASITOS	17
B. ANIMALES DE EXPERIMENTACION	17
C. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
III. RESULTADOS	22
IV. DISCUSION	25
V. CONCLUSIONES	28
VI. LITERATURA CITADA	29
VII. FIGURAS	38
VIII. GRAFICAS	42
IX. CUADRO	49

## I. INTRODUCCION

### A. PRESENTACION DEL PROBLEMA

Las parasitosis de los ovinos domésticos se consideran como una de las principales causas que provocan cuantiosas pérdidas económicas, debido a que por sus efectos la lana, carne y otros productos se ven mermados en calidad y cantidad llegando hasta la muerte de los animales.

Actualmente para el control de las poblaciones de nemátodos gastroentéricos se emplean compuestos químicos conocidos como antihelmínticos, — los cuales se administran al ganado en combinación con prácticas de manejo como la rotación de potreros, pero, esto no ha evitado la selección de poblaciones de parásitos que evaden el efecto de los antihelmínticos.

Durante la década de los años sesenta, en los principales países productores de ovinos se identificó el fenómeno de evasión a los efectos de los antihelmínticos por algunos nemátodos del tracto gastroentérico. Este fenómeno es conocido como resistencia a los antihelmínticos.

El uso de los benzimidazoles para el control de nemátodos gastroentéricos comenzó en 1961, incrementándose con el tiempo debido a sus características tales como alta efectividad, amplio margen de seguridad y amplio espectro de acción, lo que permite su uso en gran escala; pero, se ha encontrado que paralelamente, se incrementan las poblaciones de nemátodos resistentes a ellos, siendo una característica indeseable del antihelmíntico.

A pesar de que la resistencia es un grave problema al crear un círculo vicioso entre la producción de nuevos fármacos y el desarrollo de poblaciones de parásitos resistentes, no ha sido estudiado en nuestro país. Por ello es importante establecer cepas de referencia resistentes a los

bencimidazoles como estrategia de estudio, ya que este grupo de fármacos es muy usado por los productores, debido a su fácil aplicación y bajo costo, lo cual ha provocado en ocasiones su uso desmedido e irracional, encontrando indicios de resistencia hacia ellos ( 12 ).

9. Haemonchus contortus ( Rudolphi, 1803 )

Se localiza en el abomaso de los ovinos y caprinos principalmente, - aunque se le puede encontrar en ruminantes silvestres; se le conoce como - el gusano del estómago de los ruminantes, y es uno de los nemátodos más - patógenos que existen ( 72 ).

a) CLASIFICACION TAXONOMICA ( 73 )

PHYLUM	Neurochelminthes
CLASE	Nematoda
SUBCLASE	Secernentea
ORDEN	Strongylida
SUPERFAMILIA	Trichostrongyloidea
FAMILIA	Trichostrongylidae
GENERO	<u>Haemonchus</u>
ESPECIE	<u>CONTORTUS</u>

b) MORFOLOGIA

Los miembros de este género de nemátodos son pequeños y filariformes - - - - -; los machos miden de 10 a 20 mm de longitud y las hembras de 18 a 30 mm. La fase adulta parasita el abomaso de ovejas y cabras, aunque se le - puede encontrar en otros ruminantes. Este nemátodo se encuentra en casi to- - - - - das las regiones del mundo, proliferando en zonas cálidas y húmedas (43). El macho es de color rojizo uniforme, mientras que la hembra al tener los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino de color - -

rojo, dando el aspecto de un " palo de barbería " ( 24,43,73,74 ). La cutícula del nemátodo se encuentra estriada transversalmente y en partes longitudinalmente. Las papilas cervicales son prolongaciones prominentes y en forma de espina de rosal dirigidas hacia atrás ( 74 ) (FIG. 1). Posee una cavidad bucal pequeña que contiene una lanceta en posición dorsal que utiliza para perforar la mucosa abomasal. En el extremo posterior del macho se encuentra la bursa copulatrix, la cual está muy desarrollada, tiene lóbulos alargados y está soportada por rayos delgados, su lóbulo dorsal es asimétrico y está situado en el lóbulo izquierdo, conteniendo el rayo dorsal en forma de Y invertida. Las espículas del macho tienen una longitud de 0.46 a 0.50 mm y presenta una pequeña estructura en forma de anzuelo cerca del extremo posterior y un gubernáculo ( 74 ) (FIG. 1).

En el caso de la hembra, la región vulvar se encuentra a 4 mm del extremo posterior y generalmente está cubierta por un proceso linguiforme conocido como " solada vulvar " (FIG. 1) que suele ser grande y prominente, pero en algunos casos puede estar reducida a un pequeño botón ( 22, 56,72 ). Los huevos son transparentes con pared delgada y miden de 70-85  $\mu$ m de longitud x 41 - 48  $\mu$ m de ancho y son expulsados al exterior con las heces del hospedero, conteniendo un embrión de 16 a 32 células ( 43 ).

#### c) CICLO BIOLÓGICO

El Haemonchus contortus tiene un ciclo directo y se divide en una fase parásita dentro del hospedero y una fase no parásita en el ambiente. Los parásitos adultos copulan en el abomaso del hospedero, las hembras ovíparas y su rango de ovoposición es de 5 000 a 10 000 huevos al día.

Los huevos salen con las heces del animal y caen a los pastos iniciándose el desarrollo de la fase no parásita del nemátodo, abarcando tres estadios; esta fase se ve influenciada por la temperatura y humedad principalmente. A una temperatura de 20 a 25 °C y una humedad relativa del 96%, la eclosión se efectúa aproximadamente en 6 horas; emerge como larva 1 (L<sub>1</sub>) la cual se alimenta de bacterias (FIG. 2), al completar su desarrollo sufre una primera muda de cutícula y se transforma en larva 2 (L<sub>2</sub>); la duración de estos dos estadios es de aproximadamente 2 días bajo condiciones óptimas, pero se prolonga en condiciones frías, una vez madura la L<sub>2</sub> muda nuevamente; sin embargo, en esta segunda muda la cubierta cuticular no se desecha sino que permanece como envoltura de la larva 3 (L<sub>3</sub>) protegiéndola del ambiente. Durante la fase de L<sub>2</sub> almacena alimento en sus células intestinales para mantenerse durante la fase de L3 debido a que, la vaina que la cubre no le permite alimentarse. La larva 3 es activa y asciende por las hojas de los pastos en horas crepusculares, facilitando la ingestión por el borrego al alimentarse ( 43,73,74 ).

La duración de la fase de L3 puede durar varios meses, aunque en general desde la eclosión de la L1 hasta la ingestión de la L3 no pasa de 90 días, esto se ve influenciado por las condiciones climáticas de la región y el sistema de manejo de los animales ( 68 ).

Una vez dentro del hospedero, necesita perder la vaina protectora; el desvainamiento es provocado por el líquido ruminal que tiene un pH entre 5.5 y 7.0 que estimula a las células neurosecretoras localizadas entre la base del esófago y el poro excretor de la larva, las cuales eliminan la enzima leucin-amino-peptidasa que fluye del poro excretor y ataca una zona anuloide alrededor de la vaina a nivel de ese anillo y la larva sale. Den-

tro de las primeras doce horas postingestión, las L3 aparecen en la superficie de la mucosa abomasal listas para penetrar en ella. Al final del primer día postingestión casi todas las larvas han penetrado la mucosa a nivel de las criptas gástricas donde se alimentan y crecen, posteriormente realizan una nueva muda dentro del tejido y se transforman en larvas de cuarto estadio ( L4 ) que regresan a la superficie de la mucosa, donde casi todas se encuentran a las 40 horas de su entrada al hospedero y ahí tiene lugar la muda final y los gusanos llegan a la madurez sexual entre los 14 y 21 días posinfección ( FIG. 2 ) ( 43,68,74 ).

#### d) EFECTOS SOBRE EL HOSPEDERO

La cuarta y quinta larva se alimentan de sangre que obtienen de la mucosa abomasal. Los adultos perforan la mucosa mediante la lanceta oral y succionan sangre, provocando severas lesiones.

Todo el desarrollo parasitario tiene lugar en el abomaso y no puede realizarse en otra parte del tracto digestivo. La actividad de la L4, L5 y gusanos adultos es irritante para la mucosa abomasal, provocando gastritis asimismo extraen cantidades considerables de sangre y si el hospedero no tiene la capacidad de reemplazo con rapidez, se presenta un cuadro anémico. Esta anemia se manifiesta como palidez en la mucosa de las encías, ano y vulva; también puede existir edema subcutáneo, principalmente en las partes ventrales del cuerpo. Cuando la anemia es avanzada, puede producirse edema abdominal; al examen postmortem se observa líquido en la cavidad peritoneal (ascitis), en la bolsa pericárdica (hidropericardio) y en la cavidad pleural entre sus dos hojas. El hígado muestra degeneración adiposa con zonas de color claro amarillento y su consistencia es friable. La mucosa del abomaso está hiperémica e inflamada, muestra coágulos en los puntos



donde los parásitos han succionado sangre, así como grados variables de -- ulceración ( 43,68,74 ).

Al ir avanzando la enfermedad causada por los nematodos, las ovejas se vuelven tristes, anáxicas y se desnutren. La lana se vuelve quebradiza y -- sin brillo. Los animales pierden el apetito y son incapaces de recuperar el peso perdido. Esto último se ve influenciado por factores tales como: -- a) edad del animal, ya que los animales jóvenes sufren de forma severa la enfermedad; b) estado nutricional; c) estado fisiológico y reproductivo, -- por ejemplo, la susceptibilidad en las hembras se incrementa durante las -- etapas de gestación y lactación, asimismo esta susceptibilidad es mayor en animales débiles o en estado de "estrés" y el grado de inmunidad contra el parásito ( 43,59,68,74 ).

Sin embargo, cualquiera que sea la edad, estado fisiológico y salud del hospedero, la enfermedad no se manifiesta a menos que varios cientos de -- parásitos se encuentren presentes en el abomaso ( 43 ).

### C. CONTROL QUIMICO

#### a) ANTIHELMINTICOS

Los antihelmínticos son fármacos capaces de eliminar los helmintos parásitos del hospedero, provocando la muerte de los parásitos o bien, su expulsión del hospedero sin exterminarlos ( 55 ).

Las condiciones que debe reunir un antihelmíntico son:

- 1) El fármaco debe alcanzar al parásito en cualquier parte del organismo.
- 2) Debe penetrar en el helmineto y ejercer su acción de forma eficaz.
- 3) El fármaco administrado por vía oral no ha de irritar el tracto digestivo del hospedero.
- 4) Debe de persistir su eficacia en presencia del contenido intestinal.
- 5) No debe tener efectos nocivos sobre la mucosa intestinal.
- 6) Absorbido el fármaco debe tener poca toxicidad y un alto índice terapéutico.
- 7) Debe ser económico, ya que dada la frecuencia de las helmintiasis deben efectuarse tratamientos continuos.
- 8) El fármaco debe ser fácil de ingerir y de sabor agradable.

De acuerdo a los mecanismos de acción, estructura química, espectro de actividad y eficacia contra los parásitos, los antihelmínticos para ovinos se han clasificado en cinco grupos ( 50,55,62,67,76 ).

#### ANTHELMINTICOS DE AMPLIO ESPECTRO

<u>GRUPO</u>	<u>I</u>	<u>BENCIMIDAZOLES</u>	<u>Y</u>	<u>PRO-BENCIMIDAZOLES</u>
Tiabendazol	(TBZ)	2-(4-tiazolil)bencimidazol		
Parbendazol	(PBZ)	metil 5-butil-2-bencimidazol carbamato		
Combendazol	(CBZ)	isooctoil-2-(4-tiazolil)5-bencimidazol carbamato.		
Webendazol	(WBZ)	5-benzoil-bencimidazol carbamato de metilo		
Oxibendazol	(OBZ)	5-propoxil-bencimidazol-2-metil carbamato		
Fenbendazol	(FBZ)	metil-5-(feniltio)-2-bencimidazol carbamato		
Albendazol	(ABZ)	(metil-5-propiltio-1-4-bencimidazol-2-) carbamato.		
Febantel	(FB)	dimetil-(metoxiacetil)amino-4-feniltio-fenil carbonimidolil.		
Tiofanato	(TF)			

<u>GRUPO</u>	<u>II</u>	<u>IMIDAZOTIAZOLES</u>
Levamisol		(5-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazol (2,1-b)tiazol)
Morantel		(trans-2-(3-etil-2-tienilvinil) 1-metil -1,4,5,6, tetrahidropirimidina)

ANTHELMINTICOS DE ESPECTRO REDUCIDO

GRUPO III SALICILATOS Y NITROFENOLES SUSTITUIDOS

Clixanide  
Rafoxanide  
Bromasalan  
Nitroxinil

GRUPO IV ORGANOFOSFORADOS

Maloxon  
Naftalofos  
Diclorvos

GRUPO V AVERMECTINAS

Ivermectinas

b) BENCINIDAZOLES

Los bencimidazoles son un grupo de antihelmínticos de amplio espectro con alto margen de seguridad para ser utilizados en el ganado ovino, caprino y bovino ( 55 ).

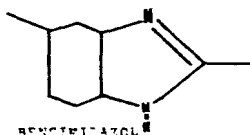
El tiabendazole fue el primer bencimidazol en el mercado, aparece en 1961 ( 10 ) y desde entonces, la industria farmacéutica mundial ha puesto en el mercado al Parbendazol ( 1 ), Cambendazol ( 28 ), Webendazol ( 11 ),

Oxibendazol ( 78 ), Fenbendazol ( 4 ), Oxfendazol ( 3 ) y Albendazol (79).

En términos generales, los bencimidazolehan demostrado ser efectivos contra formas adultas y larvianas de los nemátodos, céstodos y trematodos de los animales domésticos ( 55 ).

c) MECANISMO DE ACCION

Estos antihelmináticos son compuestos derivados del bencimidazol y poseen una estructura química similar entre ellos. El núcleo de que derivan es ( 55 ) :



La similitud de la estructura química entre ellos permite que tengan un mismo modo de acción, variando únicamente en el porcentaje de efectividad contra los distintos parásitos susceptibles.

De acuerdo a las evidencias que han encontrado diversos autores respecto a los mecanismos de acción de los bencimidazoles resulta complejo atribuir su acción a una sola, se ha visto que poseen efectos sobre el metabolismo energético, al inhibir la actividad de la enzima fumarato reductasa, tienen actividad antiproliferativa al producir desacoplamiento mitocondrial y fomentan la secreción de la acetilcolinesterasa ( 65 ).

Uno de los mecanismos de acción propuestos para el Tiabendazol en Haemonchus contortus es el que muestra Prichard (1976) ( 64 ) quien señala que éste inhibe la fumarato reductasa. Muchos parásitos viven en un me

dio bajo en oxígeno y excretan ácido succínico, por consiguiente, es probable que el mecanismo de la enzima fumarato reductasa es esencial para la regeneración de la nicotinamida (NAD) en estos parásitos.

También hay evidencias de que el Trifosfato de adenosina (ATP) es regenerado anaeróticamente en la oxidación de la nicotinamida-adenin (NADH) - ( 2,64,65 ).

En una cepa de Haemonchus contortus resistente al TBZ, se observó producción de etanol el cual no se involucra en la actividad de la fumarato reductasa; dicha producción se duplica en presencia del TBZ. Esta producción de etanol podría ayudar a las cepas de nemátodos resistentes a nante ner su producción de energía ( 67 ).

Existen otros estudios sobre el mecanismo de acción que apoyan el estudio de Prichard ( 66 ). El efecto inhibitorio del TBZ debe estar relacionado con altas concentraciones de cisteína, lo que sugiere que el TBZ debe estar relacionado con un grupo sulfidrilo involucrado en el mecanismo de la fumarato reductasa ( 62,65 ).

Otro mecanismo propuesto por Martín y Caracho ( 52 ), Boranovsky (69) y Prichard ( 66 ) al trabajar con una cepa susceptible y una resistente al TBZ observaron que la enzima fumarato reductasa de la cepa resistente es insensible al TBZ.

#### d) RESISTENCIA A LOS ANTIHELMINTICOS

Actualmente para controlar las poblaciones de parásitos gastroénte- ricos se requiere emplear compuestos conocidos como antihelmin- ticos, los que se administran al ganado mediante calendarios de desparasitación, que se acompañan con prácticas de sanejo, como es el traslado de los animales a potreros limpios o poco infestados con parásitos ( 67 ).

Algunos neófitos tienen la capacidad biológica que les permite eludir el efecto de los antiparasitarios, conociéndose esto como resistencia. La resistencia se define como el incremento significativo en la habilidad de algunos individuos para tolerar dosis de un compuesto que es letal para la mayoría de los integrantes de la población normal de la especie -- ( 67 ).

La característica más importante de la resistencia es que ésta se expresa genéticamente, por lo que se hereda a las generaciones siguientes ( 44,47,49,53 ). Debe señalarse que los individuos resistentes ya están presentes en la población normal de parásitos, aún antes del antiparasitario; el uso continuo del fármaco elimina paulatinamente a todos los individuos susceptibles así como algunos híbridos. Al mantenerse los híbridos restantes y los resistentes en los ovinos y los pastos, se incrementa el número de individuos resistentes en las generaciones siguientes. La resistencia a los antihelmínticos también puede ser inducida por la sobrevivencia de individuos que tienen contacto con dosis bajas del compuesto ( 31,35,67 ).

Existen tres tipos de resistencia ( 67 ):

Resistencia Lateral ésta se presenta en algunos compuestos similares en su estructura química y acción, como resultado del desarrollo de resistencia hacia uno de ellos.

Resistencia Cruzada es similar a la anterior, pero, involucra a grupos de antihelmínticos con diferentes mecanismos de acción.

Resistencia Múltiple ocurre cuando los parásitos son resistentes a dos o más grupos de antihelmínticos, como resultado de resistencia cruzada o selección independiente.

De las especies de nemátodos gastroentéricos, las únicas que se sabe han desarrollado resistencia son: Haemonchus contortus, Nematodirus spathiger, Trichostrongylus columbriformis, Ostertagia circumcincta ( 17, 18, 71 ).

El primer informe de una cepa de Haemonchus contortus resistente a la fenotiazina se detectó en Estados Unidos de Norteamérica ( 17, 18 ). Posteriormente se aisló en el mismo país otra cepa de H. contortus resistente a la Tiabendazol que requirió la administración de 150 mg/kg de peso corporal del fármaco, para obtener una efectividad del 95.2%, cuando la dosis comercial señalada era de 44 mg/kg de peso para alcanzar el 95% de efectividad ( 71 ).

En Australia se encontró por primera vez una cepa de Trichostrongylus columbriformis resistente al Tiabendazol ( 23 ), que requirió una dosis de 200 mg/kg de peso para eliminarla; Le Jambre ( 25 ) aisló una cepa de Ostertagia circumcincta resistente al TBZ, la cual aumentó su dosis letal 50% (  $DL_{50}$  ) de 9 a 108 mg/kg de peso en tan sólo ocho generaciones.

El efecto por los cambios en la constitución genética debido a la resistencia a los antihelmínticos también se refleja en la patogenicidad e infectividad de los nemátodos; Drudge ( 17 ) señala que la cepa Kentucky de H. contortus resistente a la fenotiazina, tenía mayor infectividad en ovinos ( 52.2% ) que la cepa no resistente ( 33.1% ). Similarmente Kelly y col. ( 36 ), trabajando con una cepa de H. contortus resistente a benzimidazoles, observaron que se establecía altamente en ovinos ( 57.4% ) en comparación con la cepa susceptible ( 39.6% ).

Asimismo, se demostró que en los ovinos infectados con cepas resistentes de H. contortus, hay cambios significativos en el volumen del paquete

celular, en las concentraciones de proteína plasmática y en los niveles de hemoglobina; además la eliminación de huevos por hembras resistentes es mayor que en las susceptibles, teniendo las larvas de las primeras una mayor longevidad en los pastos que las segundas ( 36 ).

#### e) DIAGNOSTICO DE RESISTENCIA A LOS ANTIHELMENTICOS

Un cambio en la respuesta de la terapia antihelmíntica es generalmente el primer indicio para sospechar de resistencia, más aún, cuando los animales tratados continúan mostrando signos de la enfermedad, pero se debe considerar que el diagnóstico generalmente se basa en signos clínicos y la anemia, diarrea y debilidad, no son específicas de las parasitosis, siendo necesario el hallazgo del parásito para confirmar el diagnóstico ( 63,67 ) ya que otras enfermedades pueden manifestar el mismo cuadro clínico presentar como agentes etiológicos a bacterias, virus, protozoarios, céstodos, así como deficiencias nutricionales principalmente de minerales y vitaminas o intoxicaciones por plantas ( 63,75,81 ).

Al descartar otras etiologías y sospechar de un problema de resistencia antihelmíntica, se debe recabar información adicional acerca del tipo de los tratamientos, tiempo entre ellos, dosificación, producto (s) utilizado (s), si se realizan prácticas adicionales como rotación de potreros, hacinamiento en corrales y limpieza de éstos, número y edad de los animales infectados, así como la fecha de la última desparasitación y el tiempo transcurrido entre ésta y la presentación de la enfermedad ( 63,67 ).

Debido a esto se han diseñado algunos métodos de diagnóstico sobre todo con base a infecciones artificiales con sacrificio de los animales. éstos debido al costo y tiempo requerido se ha tratado de reemplazar por métodos in vitro o con base a cuentas de huevos principalmente, a continua--



ción se describen los más utilizados ( 5,26,45,86 ).

#### DIAGNOSTICO POR CONTEO DE HUEVOS

Este procedimiento se emplea para detectar resistencia en investigaciones de campo. Se requiere hacer un conteo breve y otro a los 5 ó 10 días después del tratamiento antihelmíntico; el método es un indicador incierto de resistencia. Las fallas que afectan la validez del diagnóstico son: en algunos géneros como Ostertagia spp, la relación entre huevos producidos y el número de parásitos presentes no es lineal; el conteo de huevos no detecta parásitos inmaduros que pueden sobrevivir al tratamiento, los que al desarrollarse contribuyen al conteo; la cantidad de huevos puede disminuir temporalmente sin que exista una reducción real de parásitos, por lo que el muestreo debe ser repetido; sólo sirve para infecciones mono específicas, ya que en infecciones mixtas, es difícil la diferenciación -- por huevo y se requiere el cultivo de larvas para su diagnóstico ( 67 ).

#### DIAGNOSTICO AL EXAMEN POSTMORTEM

Donde sea posible, el examen postmortem y conteo de gusanos adultos en animales tratados y no tratados deberá ser llevado a cabo. El sacrificio no será efectuado antes de 5 días después del tratamiento, dado que -- existen gusanos parcialmente resistentes que aunque no sobreviven al tratamiento, puede llevarse más tiempo removerlos por algunas drogas ( 67 ). El examen debe incluir la colecta de contenido de los órganos interesados, -- así como, raspado de la mucosa de ellos para realizar digestión artificial para recuperar larvas ( 27 ).

DIAGNOSTICO POR PRUEBAS CRITICAS

El mejor método para probar eficacia antihelmíntica es mediante pruebas controladas. De esta forma, carcas de gusanos adultos son comparados entre animales tratados y no tratados, los cuales están parasitados con poblaciones de parásitos resistentes. La eficacia puede ser comparada con reportes de Reichard y cols. ( 67 ) sobre una cepa susceptible del mismo género. Una desventaja del método es el gran número de animales que requiere ( 67 ).

DIAGNOSTICO POR PRUEBAS DE INCUBACION DE HUEVOS IN VITRO

Algunos fármacos previenen la embrionación y eclosión de larvas de nemátodos, entre ellos los bencimidazoles. Esta propiedad ha servido para idear técnicas que detectan cepas resistentes a estos compuestos ( 14,31, 42,44,84 ). Estos métodos son rápidos, baratos, sensibles y repetibles — cuando una sola especie está involucrada; para infecciones mixtas es necesaria la identificación larval. Hall y cols. ( 30 ) determinaron la Dosis letal 50% ( DL<sub>50</sub> ) de H. contortus y T. columbriformis con siete antihelmínticos del grupo de los bencimidazoles. Los resultados de éstas pruebas se expresan con un Índice de Resistencia, el cual se obtiene por la fórmula siguiente:

$$I. R. = \frac{\text{DOSIS LETAL 50\% DE LA CEPA RESISTENTE}}{\text{DOSIS LETAL 50\% DE LA CEPA SUSCEPTIBLE}}$$

Este método de diagnóstico es muy empleado para la búsqueda de cepas resistentes, tal y como lo demuestra Kemp y Smith ( 39 ).

En base a lo expuesto anteriormente, el presente trabajo plantea el siguiente objetivo:

#### O B J E T I V O

Establecer por selección artificial mediante tratamientos continuos con Albendazol una cepa de Haemonchus contortus resistente.

Asimismo, se plantea la siguiente hipótesis:

#### H I P O T E S I S

Una población de Haemonchus contortus en ovinos sometida a frecuentes contactos con Albendazol puede transformarse en resistente.

## II. MATERIALES Y METODO

### A. PARASITOS

En el estudio se empleó una población de nemátodos de Haemonchus contortus aislada en 1983 de un ovino ( Ovis aries ) de la raza Pelibuey del campo experimental " Las Margaritas " en Hueytamalco, Puebla, propiedad del INIFAP-SARH. El nemátodo se ha mantenido desde entonces en cultivo controlado en ovinos de raza pelibuey y criollos sin contacto con el anti-helmántico.

### B. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 6 ovinos ( Ovis aries ) de la raza Rambouillet con un promedio de 12 a 15 meses de edad libres de nematodos gastroentéricos por medio de tratamientos antihelmánticos y alojados individualmente en jaulas metabólicas, alimentándose con rastrojo de avena, alfalfa achicalada y agua.

### C. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### a) INOCULACION DEL PARASITO

Los ovinos del primero al sexto se inocularon con una cantidad conocida entre 8 000 a 15 000 larvas infectantes ( L3 ) de H. contortus por vía oral, las cuales se suspendieron en agua destilada en un volumen total de 10 ml. La inoculación se realizó por medio de una jeringa de plástico que se coloca dentro del hocico del animal, la toma fue lenta para evitar la formación de la " canaladura esofágica " que es un pliegue de la mucosa que llevaría a las larvas directamente al abomaso destruyéndolas, ya que es necesario que lleguen primero al rumen, donde la larva se libera de la

envoltura ( vaina ) que la protege.

b) TRATAMIENTO ANTIHELMINTICO

A partir de las 24 horas siguientes a la inoculación, se realizó un examen coproparasitoscópico por medio de la técnica de Mc Master ( 80,86 ) para determinar la cantidad de huevos por gramo de heces ( hpg ) eliminados, al llegar ésta a 1 000 hpg, lo cual ocurrió generalmente entre los días 18 a 21 postinfección, se procedió a realizar la desparasitación del animal con albendazol\* por vía oral, a dosis únicas dependiendo de su peso corporal ( p.c. ).

c) PRUEBA IN VITRO

Diez días después del tratamiento antihelmíntico, se realizaron nuevamente pruebas de Mc Master ( 80 ) para detectar huevos provenientes de nemátodos que sobrevivieron al tratamiento. Una vez detectados los huevos en heces se realizó la prueba in vitro de Whitlock ( 86 ), con la cual se midió el grado de resistencia que va adquiriendo la cepa. La prueba se realizó de la manera siguiente: el borrego fue muestreado directamente del recto, obteniendo sus heces en bolsas de plástico cuatro veces al día con intervalos de una hora entre ellos a partir de las 16 alas 20 hrs.p.m. manteniéndose en refrigeración hasta la última colección, posteriormente se mezclaron y se agregaron 500 ml de agua destilada, haciendo una suspensión acuosa y homogénea. Esta suspensión se pasó a través de una coladera para detener la basura gruesa. Al volumen resultante se le agregó un volumen igual de solución glucosada saturada, con la suspensión resultante se llenaron botellas de Mc Cartney para cultivo de tejidos, antes de tapar las se eliminó el aire de ellas. Una vez cerradas, se mantuvieron en reposo.

\*Valbazen, Smith & Kline, Norden de México.

so durante 30 minutos, sirviendo de base uno de sus lados más grandes. — Los huevos al flotar, se adhieren a la cara interna superior de las botellas, transcurrido el tiempo de reposo, se procedió a eliminar todo el líquido del interior, para lo cual se inclino lentamente la botella evitando el burbujeo que desprendiera los huevos.

Una vez eliminado el líquido, se lavaron las paredes internas de la botella, con excepción de la superior, esto para eliminar impurezas. Finalmente se agregaron 50 ml de agua destilada y con movimientos ligeros se desprenden los huevos adheridos ( 4,15,72 ).

Una vez obtenidos los huevos, se trabajaron series de ocho frascos de vidrio, a cada uno se le agregó 5 ml de agua destilada con diferentes concentraciones de albendazol en partes por millón ( 9 ppm ). Las concentraciones fueron el doble de la requerida, ya que se les agregó un volumen igual de agua destilada conteniendo los huevos previamente aislados. Las concentraciones finales fueron de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 y 1.1 ppm de albendazol y un testigo en un volumen de 10 ml.

Este procedimiento tuvo cuatro repeticiones por cada repetición se dejó un frasco testigo conteniendo agua destilada sin albendazol en el mismo volumen, con el fin de corroborar que la temperatura y el tiempo de incubación fueron los correctos.

Los frascos se incubaron a 27-30 C durante 20-24 horas. El frasco testigo se examinó a partir de las 20 horas de incubación hasta alcanzar el 95% de eclosión larval, cuando llegó a este porcentaje, el desarrollo de las larvas en los frascos con fármaco fue detenido mediante la adición de unas gotas de yodo en solución al 1%. Posteriormente se realizó el conteo de 100 formas para determinar el porcentaje de huevos no embrionados,

huevo larvado y larvas eclosionadas, considerándose como huevo no embri<sub>o</sub> nado, aquel en cuyo interior no se observa formación de larva, huevo larva<sub>o</sub> do el que presentaba larva en su interior y larva ( L1 ) aquella fuera del huevo. Para el conteo se homogenizó la suspensión de cada frasco y se to<sub>m</sub>ó una gota de ella, se colocó en un portaobjetos, se cubrió con un cubre<sub>o</sub> objetos y se procedió al conteo de 100 formas ( 60,85 ).

d) ANALISIS PROBIT

Los resultados obtenidos son una relación entre dosis y concentración aplicada y mortalidad resultante. El registro gráfico de los porcentajes - de mortalidad se expresan en unidades de probabilidad ( PROBITS ), en co<sub>r</sub>relación con los logaritmos de la dosis. El análisis requirió conocer la dosis empleadas y transformarlas posteriormente a logaritmos, así como el número de individuos probados por dosis, en este caso fueron 100, el núme<sub>r</sub>o de respuesta alcanzado por cada uno de ellos ( huevos y larvas ) sin - considerar al grupo testigo; con estos datos se obtuvo el porcentaje de - respuesta al dividir el número de respuesta entre los individuos probados multiplicado por 100; posteriormente se obtuvieron los PROBITS: a) empíri<sub>c</sub>o, es un valor tabular que corresponde al % de mortalidad o respuesta; b) esperado, es un valor gráfico obtenido al graficar el logaritmo de las - dosis ( eje X ) y los PROBIT empíricos ( eje Y ), a cada valor esperado se le busca su coeficiente de ponderación y su ponderación y c) de trabajo, - que es un valor tabular que relaciona el PROBIT esperado y el porcentaje - de respuesta, siendo muy parecido al PROBIT empírico, esto se realiza para cada concentración del fármaco.

El análisis proporciona los valores medios, suma de cuadrados y coefi<sub>c</sub>iente de regresión, varianza, desviación estándar y límites de confianza

de la dosis letal 50% calculada.

En la interpretación de resultados, se considera la Dosis Letal 50% ( $DL_{50}$ ) por ser el límite inferior donde la resistencia tiene importancia práctica. La pendiente es inicio de la variabilidad de la población ( matemáticamente es el incremento de la mortalidad en PROBITS por cada aumento de dosis) ( 33 ). Se obtuvo posteriormente el índice de resistencia ( IR ) con la siguiente fórmula:

$$I. R. = \frac{\text{DOSIS LETAL 50 \% DE LA CEPA RESISTENTE}}{\text{DOSIS LETAL 50 \% DE LA CEPA SUSCEPTIBLE}}$$

e) CULTIVO LARVARIO

Simultáneamente se colectaron heces de los ovinos tratados con albendazol para cultivarse en palanganas de plástico, utilizando aserrín como sustrato, aereándose diariamente para obtener larvas en aproximadamente -- 10 días, preparando un inóculo de 8 000 a 10 000 larvas infectantes para infectar al siguiente ovino.

La metodología de experimentación utilizada para el primer ovino se -- empleó para los restantes cinco animales, variando únicamente la dosis del antihelmintico, la cual fue de 2.5 mg/kg de peso corporal ( pc ), 3.9 mg/kg pc, 3.9 mg/ kg pc, 3.9 mg/kg pc, 3.9 mg/kg pc para los ovinos 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente.



### III. RESULTADOS

Primer paso. Como se muestra en la gráfica 1, el berrago inoculado con 8 000 larvas infectantes de Haemaphysalis contorta, inició la eliminación de huevos el día 20 postinfección con 350 huevos por gramo de heces ( hpg ), alcanzando la mayor eliminación el día 31 postinfección ( p.i. ) con 3 800 hpg, cinco días después desparasitó con albendazol ( A ) a dosis de 1.9 mg/ kg peso corporal ( pc ) y once días después se realizó la prueba in vitro de Whitlock ( b ) obteniéndose una dosis letal  $DL_{50}$  de 0.175 y un índice de resistencia (IR) de 7.80 ( Cuadro 1 ). Posteriormente se iniciaron los cultivos para obtener larvas para el siguiente paso.

Segundo paso. El segundo berrago se inoculó con 8 000 larvas infectantes provenientes del primer paso y como se muestra en la Gráfica 2, 24 días p.i. se detectaron 3 250 hpg, llegando cuatro días después a 13 463 hpg. Esta cantidad disminuyó y se mantuvo alrededor de los 5 000 hpg. El día 37 p.i., el ovino se trató con albendazol a dosis de 2.5 mg/kg pc ( A ) y once días después se realizó la prueba de Whitlock ( B ), obteniendo una  $DL_{50}$  de 0.3019 y un I.R. de 13.1 ( Cuadro 1 ); nueve días después se iniciaron los cultivos para el siguiente paso.

Tercer paso. Como se muestra en la Gráfica 3, el berrago se inoculó con 15 000 larvas infectantes del segundo paso, iniciando la eliminación de huevos a los 34 días p.i. con 8 500 hpg, alcanzando la mayor eliminación de éstos el día 46 p.i. con 10 550 hpg, un día después se desparasitó con albendazol ( A ) a dosis de 3.9 mg/kg pc y 4 días después se realizó la prueba de Whitlock ( B ), obteniendo una  $DL_{50}$  de 0.298 y un I.R. de 12.95 ( Cuadro 1 ); iniciándose la colecta de heces para cultivos 6 días después.

Cuarto pase. El cuarto borrego se inoculó con 10 000 larvas de H. contortus, iniciando la eliminación de huevos a los 21 días p.i. con 4 700 hpg, alcanzando su máximo el día 36 p.i. con 19 650 hpg ( Gráfica 4 ). -- Ese mismo día se desparasitó a una dosis de 3.9 mg/kg pc (A) y 18 días después se realizó la prueba de Whitlock (B) obteniendo una  $DL_{50}$  de 0.280 y - un I.R. de 12.17, ocho días después se inician los cultivos para obtener - larvas infectantes para el siguiente pase.

Quinto pase. Como se muestra en la Gráfica 5, el quinto borrego se inoculó con 10 000 larvas infectantes, iniciando la eliminación de huevos el día 26 p.i. con 600 hpg, alcanzando su máximo el día 30 p.i. con 1 600 hpg, seis días después se desparasitó con albendazol (A) a dosis de 3.9 mg/kg pc, once días después se realizó la prueba de Whitlock (B), obteniendo una  $DL_{50}$  de 0.300 y un I.R. de 13.04 ( Cuadro 1 ), iniciando los cultivos - cuatro días después.

Sexto pase. Se inoculó con 10 000 larvas obtenidas del pase anterior, iniciando la eliminación de huevos a los 24 días p.i. con 600 hpg -- ( Gráfica 6 ), nueve días después se desparasitó a dosis de 3.9 mg/kg pc - (A), y tres días después se realizó la prueba de Whitlock (B) obteniendo una  $DL_{50}$  de 0.297 y un I.R. de 12.91 ( Cuadro 1 ). Cuatro días después se inician los cultivos para obtención de larvas, las cuales fueron parte de otro experimento.

Como valor de referencia se utilizó el de la cepa de Haemonchus -- contortus que no estuvo en contacto con el antihelmíntico, cuyo índice de resistencia fue de 7.6, 6.4 y 6.1 que coincidieron con el primer, tercero y sexto pases respectivamente ( Gráfica 7 ).

En general, se observó que el índice de Resistencia de la cepa de Haemonchus contortus del estudio se incrementó de 7.60 a 13.0 en seis pa--  
ses, manteniéndose alrededor de este valor, con respecto a la cepa suscep-  
tible sus valores fueron menores a los de la cepa resistente.

#### IV. D I S C U S I O N

El problema de la resistencia ha sido detectado en los principales países ovinocultores y donde el control de las parasitosis se realiza por medio de fármacos ( 5, 8, 19, 20, 26, 40, 41, 58, 77 ) lo que muestra que es un problema común.

En nuestro país los estudios al respecto son mínimos, dado que sólo se ha detectado resistencia en cepas de Haemonchus contortus ( 12 ) aunque en la literatura se han encontrado cepas resistentes de los géneros - Haemonchus ( 5,58,77,83 ); Trichostrongylus ( 87 ); Ostertagia ( 5,87 ); Cooperia ( 9,34 ) y Nematodirus ( 13 ).

En el país la mayoría de las explotaciones ovinas se localizan en la parte centro y sur del país, en climas tropicales y subtropicales; lugares donde siempre se encuentra a H. contortus, que es uno de los más patógenos y que aunado al sobrepastoreo, aumenta el grado de infección de los animales, presentando un cuadro de infección continua y en ocasiones severa, por lo que se utiliza la desparasitación continua como medida de control, con la desventaja de que al desparasitar se toma en cuenta el peso promedio del rebaño o de la observación " al ojo " del que aplica el tratamiento, encontrando animales sobre o subdesarrollados siendo éstos los portadores de poblaciones resistentes que se van disseminando y predominan en las generaciones parásitas siguientes hasta afectar a toda la población ovina; siendo éste el momento en que se detecta la ineficacia del fármaco ( 21,37,57 ).

Debido a estas razones es necesario contar con una cepa que sirva de referencia para comparar con cepas de diferentes lugares del país y establecer el rango de resistencia que exista así como el o los productos ha-

cia el cual (es) son resistentes.

Se logró establecer una población resistente de Haemonchus contortus a un bencimidazol, el albendazol, como antihelmíntico desencadenador de la resistencia. El proceso de selección de la resistencia se vió favorecido ya que el albendazol no es 100% efectivo contra H. contortus en ovinos y se ha señalado que tiene una efectividad de 95 a 100%, esto quiere decir que sólo elimina al 95% o más de la población parásita presente, que corresponden a la fracción susceptible quedando sin ser afectados el 5% o menos de la población presente, correspondiendo a la fracción resistente, la cual se va incrementando con cada desafío al antihelmíntico ( 79 ).

El grado de resistencia está influido por factores como el número de generaciones del parásito en contacto con el fármaco ( 32,82 ); la genética del mismo ( 36,38,45,48 ) y el fármaco utilizado ( 7,19 ), principalmente. En estudios realizados por conteo de parásitos adultos se han detectado hasta el 100% presentes después de un tratamiento antihelmíntico a la dosis recomendada ( 3 ), esto habla de una efectividad nula del fármaco, aunque lo más común es un 50% de eliminación de la población parásita; aunque en este estudio no se tomó en cuenta este parámetro, es probable un aumento en el número de individuos resistentes en cada pase.

El Índice de Resistencia alcanzado por la población de Haemonchus contortus en el presente estudio, fluctuó en el rango de 7.60 a 13.04, no incrementándose más, probablemente porque la dosis de albendazol no se elevó a más de 3.9 mg/kg pc, aunque algunos autores han encontrado que aún después de 20 generaciones la resistencia es inconstante y puede disminuir si se retira por un tiempo el fármaco hacia el cual son resistentes ( 44,54,70 ).

La Dosis Letal 50% (  $DL_{50}$  ) en este estudio fue de 0.023 ppm para la cepa susceptible y de 0.161 a 0.299 ppm para la cepa resistente, mientras que en la literatura se encuentran valores de 0.026 a 9.9 ppm para diversos bencimidazoles en parásitos como Nematodirus sp ( 13 ); Cooperia spp ( 9 ); Haemonchus spp ( 19,20,39,72 ) y Ostertagia ( 23,39,54,87 ); para el albendazol específicamente varían de 0.03 a 0.24 ppm para la cepa susceptible y 0.07 a 0.99 ppm para la cepa resistente ( 6 ). lo cual coincide con los resultados de este trabajo.

Respecto a la eliminación de huevos en heces se encontró que su número se incrementaba por pase hasta el cuarto comparado con el pase inicial hecho que concuerda con los resultados de Kelly y cols. ( 36 ), que señalan que el incremento de la resistencia aumentaba la ovoposición, así como su infectividad, aunque Douch y col. ( 16 ), encontraron que hembras resistentes tienen menor producción de huevos in utero; después del tratamiento en el cuarto pase, la ovoposición disminuye abruptamente, reiniciándose el día 18 postratamiento, es posible que este resultado se deba a que la población de nemátodos no era 100% resistente, sino que aún tenían material genético de susceptibilidad y resistencia, es decir, eran gusanos híbridos y por tal motivo, el tratamiento afectó a la población con características de susceptibilidad, la cual estaba presente en la mayoría de los parásitos; otra posible causa de este resultado pudo ser que involuntariamente se administrará una dosis mayor del antihelmíntico, de tal suerte que la mayoría de los gusanos ya resistentes a una dosis determinada, fueran susceptibles a dosis mayores, sin embargo esto no pueda probarse.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

- a) Se estableció una población de Haemonchus contortus resistente al albendazol como antihelmíntico.
- b) La Dosis Letal 50% de la cepa resistente aumentó de 0.175 a - 0.300 ppm y su Índice de Resistencia de 7.6 a 13.04 a través de seis pases.
- c) Es necesario realizar más estudios sobre resistencia con diferentes nemátodos, mayor número de generaciones de éstos y probar otros antihelmínticos tanto benzimidazoles como de otros grupos para determinar si se ha fijado genéticamente la característica, si es resistencia cruzada o lateral.
- d) La metodología aplicada permite el aislamiento de un solo género de parásito, con lo cual se pueden hacer estudios de otro tipo.

L I T E R A T U R A   C I T A D A

1. Actor, P., Anderson, E.J., Di Cuollo, C.J., Ferlauto, R.J., Hoover, J.F., Pagano, J.F., Ravin, L.R., Sherty, S.P., Stedman, R.J. & Theodorides, V.J. (1967): New broad spectrum anthelmintic, Methyl 5(6)-butyl-2-benzimidazol carbamate. *Nature* 215: 321-322.
2. Albers, G.A., Grey, G.D., Piper, L.R., Briker, J.S., Le Jasbre, L.F. & Baurger, I.A. (1988): The genetics of resistance and resilience to infection in young serino sheep. *Abst. Vet. Bull.* 58: 842.
3. Averkin, K.A., Beard, C.C., Dvorak, Edwards, J.A., Fried, J.H., Kilian, J.G and W.A. Schiltz (1975): Methyl 5(6)-phenylsulfinyl-2-benzimidazol carbamate, a new potent anthelmintic. *J. Med. Chem.* 18: -- 1164-1166.
4. Baeder, C., Bahr, H., Christ, O., Dwell, D., Kellner, M., Kirach, R., -- Loeve, H., Shultes, R., Schutz, E., and W. Western (1974): Fenbendazole, a new highly effective anthelmintic. *Experientia* 30 753-754.
5. Barton, N.J., Trainor, B.L., Urie, J.S., Atkins, J.W., Pyman, W.F. and I.R. Wolstencroft (1985): Anthelmintic resistance in nematode parasites of goats. *Aust. Vet. J.* 62: 224-227.
6. Bauer, C., Ulrich, D., Flage, N., K&ouml;sig, D., Luft, W., and H.J. B&uor;ger (1987): Benzimidazole-resistant Haemonchus contortus in a sheep - flock in southern Germany. *Abst. Vet. Bull.* 57: 669.
7. Berger, J. (1975): The resistance of a field strain of Haemonchus contortus to five benzimidazole anthelmintics in current use. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 46: 369-372.
8. Boersma, J.H., Borgsteede, F.H., Eysker, M., Hendriks, W., Jansen, J., and C.M. Smith-Buys (1988): Prevalence of benzimidazole resistance of nematodes in sheep in Netherlands. *Abst. Vet. Bull.* 58: 40.
9. Borgsteede, F.H. (1987): Resistance of Cooperia curticei against - fenbendazole. *Abst. Vet. bull.* 57: 669.



10. Brown, H.G., Matrun, A.K., Lives, I.R., Peterson, L.H., Harris, S.A., Saret, L.H., Egerton, J.R., Yakstis, J.J., Campbell, W.C., and A.D. - Cucler (1965): Anthelmintic drugs. IV 2-(4-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. J. Am. Chem. Soc. 83: 1764-1765.
11. Bruggans, J.P., Thiespon, D.C., Wijngaerden, V., Vanparys, O.F., Selvermans, V.L. and N.L. Lauwers (1971): Mebendazole in enterobiasis radiochemical and pilot clinical study in 1,278 subjects. J. Am. Med. Assoc. 277: 312.
12. Campos, R.R., Herrera, S.D., Quiroz, R.H. y J.S. Olazarán (1987): Primera notificación en México de una cepa de Haemonchus contortus resistente a benzimidazoles. Memorias de la VIII Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. U.A.E.M. Cuernavaca, Morelos.
13. Chalmers, K. (1985): Detection of benzimidazole resistant Haemonchus contortus. Abstr. Vet. Bull. 55: 777.
14. Coles, G.C. and K.G. Simkin (1977): Resistance of nematode eggs - to the ovicidal activity of benzimidazoles. Res. Vet. Sci. 22: 386-387.
15. Dobson, R.J., Donald, A.D., Waller, P.J. and K.I. Snowden (1986): An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. Abstr. Vet. Bull. 56: 814.
16. Douch, P.G., Harrison, G.B., Buchanan, L.L. and K.S. Green (1989): - Relationship of nematode burdens to the development of resistance to trichostrongyle infection in sheep. Abstr. Vet. Bull. 59: 307.
17. Drudge, J.H., Leland, S.E. and Z.N. Wyant (1957): Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. I. studies of mixed infections in experimental animals. Am. J. - Vet. res. 133-141.
18. Drudge, J.H., Szanto, J., Wyant, Z.N., and G. Elm (1964): Field studies on parasite control in sheep comparison of thiabendazole, - ruelene and phenothiazine. Am. J. Vet. res. 25: 1512-1518.
19. Duval, D., Schmid, K. and G. Bechmann (1987): Benzimidazole-resistant Haemonchus contortus in sheep in the Federal Republic of Ger

- any. Abst. Vet. Bull. 57: 669.
20. Edwards, J.R. and G. de Chaneet. (1980): Resistance of Haemonchus contortus to thiophanate. Res. Vet. Sci. 29: 370-372.
  21. Edwards, J.R., Wroth, R., Chaneet, G., Besier, R.B., Karisoon, J., Morcombes, P.W., Dalton, M.G. and D. Roberts (1986): Survey of anthelmintic resistance in Western Australian sheep flocks. I. Prevalence II. Relationship with sheep management and parasite control practices. Aust. Vet. J. 63: 135-138.
  22. Ganong, W.F. (1972): Manual de Fisiología Médica. 7a. ed. Ed. El Manual Moderno. México.
  23. Geerts, S., Brandt, J., Kumar, V., L. Biesemans (1987): Suspected - resistance of Ostertagia ostertagi in cattle to levamisole. Abst. Vet. Bull. 57:7.
  24. Georgi, J.R. (1972): Parasitología Animal. Ed. Interamericana.
  25. Goodwin, L.G., and R.H. Nimmo-Smith: Drugs, parasites and hosts. A Symposium on relation between chemotherapeutic drugs. Infecting - organisms and hosts. London. A. Churchill 367-369.
  26. Grunner, L., Kerboen, L.D., Beaumont, C. and J. Mubert (1986): Resistance to benzimidazole of Haemonchus contortus utkalensis in --- sheep on Martinique. Vet. Rec. 118: 276.
  27. Herlich, M. (1977): Anthelmintic efficacy of albendazole in cattle comparison of critical and controlled tests. Am. J. Vet. Res. 38: 1247-1248.
  28. Hoff, D.R., Fisher, M.N., Bochs, R.J., Lusi, A., Wakamunski, F., Egerton, J.R., Yakstis, J.J., Cuckler, A.C. and W.C. Campbell (1970): - A new broad-spectrum anthelmintic: 2-(4-thiazoly)-5-isopropoxycarbonylamino benzimidazole. Experientia. 26: 550-551.
  29. Motson, I.K. (1982): The Avermectins: A new family of antiparasitic agents. J. S. Afr. Vet. Ass. 53: 87-90.
  30. Hall, C.A., Campbell, M.J., W.J. Richardson (1978): Levels of benzimidazole resistance in Haemonchus contortus and Trichostrongylus

- columbriformis recorded from an eggs hatch test procedure. Res. --  
Vet. Sci. 25: 360-363.
31. Hall, C.A., Campbell, N.J. and S.M. Carroll (1979): Resistance to --  
thiabendazole in a field population of Ostertagia circumcincta --  
from sheep. Aust. Vet. Res. 55: 229-231.
  32. Hall, C.A., Kelly, S.D., Whitlock, H.V., Martin, I.C., Mc Donnell, P.A.  
& M. Gunswan (1981): Five generations of selection with benzimidazole  
and non-benzimidazole anthelmintics against benzimidazole resistant  
strains of Haemonchus contortus and Ostertagia spp in --  
sheep. Res. Vet. Sci. 30: 138-142.
  33. Infante G.S. y A.I. Calderón (1982): Manual de Análisis Probit. --  
Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Posgraduados. Chapingo  
México.
  34. Jackson, R.A., Townsend, K.G., Pyke, C. and D.M. Jance (1988): Isola-  
tion of oxfendazole-resistant Cooperia oncophora in cattle. Abst.  
Vet. Bull. 58: 447.
  35. Kelly, J.D., Hall, C.A., Whitlock, H.V., Campbell, H.G. and Martin, I.  
(1977): Res. Vet. Sci. 22: 161.
  36. Kelly, J.D., Whitlock, H.V., Thompson, H.G., Hall, C.A., Martin, I.C. &  
Le Jambre L.F. (1978): Physiological characteristics of free-living  
and parasitic stages of strains of Haemonchus contortus suscepti-  
ble or resistant to benzimidazole anthelmintics. Res. Vet. Sci. --  
25: 376-385.
  37. Kelly, J.D. and C.A. Hall (1979): Resistance of animal helminths to  
anthelmintics. Adv. Pharmacol. Chemother. 16: 89-126.
  38. Kelly, J.D. and C.A. Hall (1983): Resistance of animal helminths to  
anthelmintics. Advances in pharmacology and chemotherapy. 16: 89-94.
  39. Kemp, G.K. and C.F. Smith (1982): Anthelmintic resistance survey in  
New Zealand. N.Z. Vet. J. 30: 141-144.
  40. Kerboeuf, D., J. Hubert (1987): Changes in the response of ----  
Haemonchus contortus eggs to the ovicidal activity of thiabendazole  
during the course of infection. Annales de Recherche Vétérinaire

-res. 1A: 365-370.

41. Kerboeuf, D., and J. Hubert (1985): Benzimidazole resistance in field strains of nematodes from goats in France. *Vet. Rec.* 116: 133.
42. Lacey, E., Snowdon, F.L., (1989): A routine diagnostic assay for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes using tritiated benzimidazole carbamates. *Abst. Vet. Bull.* 59: 304.
43. Lapage, G. (1975): Parasitología Veterinaria. Ed. Continental Méx.
44. Le Jambre, L.F. (1976): Egg hatch as in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 2: 385-391.
45. Le Jambre, L.F., Southcott, W.M. and K.H. Dash (1976): Resistance of selected lines of Haemonchus contortus to thiabendazole, morantel and levamisole. *Int. J. Parasitol.* 6: 217.
46. LeJambre, L.F. and N.M. Royal (1977): Genetics of vulvar morphology in Haemonchus contortus from the Northern Tablelands of New South Wales. *Int. J. Parasitol.* 7: 481-487.
47. Le Jambre, L.F., Martin, P.J. and R.F. Webb (1979): Thiabendazole resistance in field populations of Haemonchus contortus resistant to anthelmintics. *Aust. Vet. J.* 55: 163-166.
48. Le Jambre, L.F., Royal, N.M. and P.J. Martin (1979): The inheritance of thiabendazole resistance in Haemonchus contortus. *Parasitol.* 78: 107-119.
49. Le Jambre, L.F., Martin, P.J. and R.G. Jarrett (1982): Comparison of changes in resistance of Haemonchus contortus eggs following withdrawal of thiabendazole selection. *Res. Vet. Sci.* 32: 39-43.
50. Litter, W. (1990): Farmacología Experimental y Clínica. 6a ed. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
51. Harriner, S.E. and J.A. Bogan (1981): Pharmacokinetics of Oxfendazole in sheep. *Am. J. Vet. Rec.* 42: 1143-1145.
52. Martin, F., Malkin and Remedios M. Camacho (1972): The effect of thiabendazole-sensitive and resistant Haemonchus contortus. *The Journal of Parasitology.* 58: 845-846.

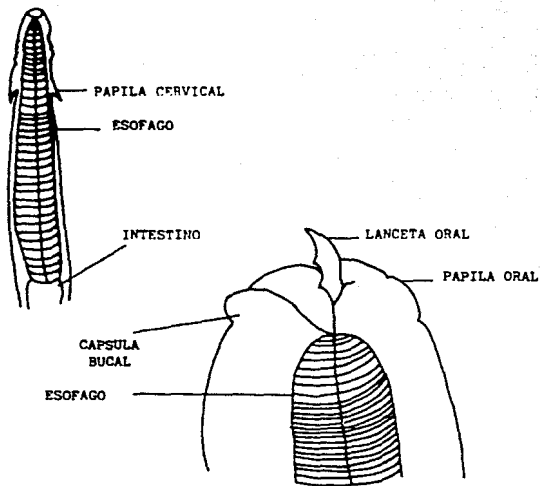
53. Martin, P.J., Le Jambre, L.F. and J.H. Claxton (1981): The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in Haemonchus contortus. Int. J. Parasitol. 11:35-41.
54. Martin, P.J., Anderson, W., Brown, T.H. and D.W. Miller (1989): Changes in resistance of Ostertagia spp. to thiabendazole following natural selection or treatment with levamisole. Abst. Vet. Bull. -- 59 : 43.
55. Martínez, F.J. y M.M. Jaramillo (1987): Estudio bibliográfico de la efectividad antihelmíntica de los benzimidazoles más frecuentemente empleados contra los parásitos gastrointestinales en rumiantes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
56. Mc Farland, J.W. (1976): Chemotherapy of intestinal nematodes. Progress in drug research. Ed. Jucker.
57. Mejía, E.F. (1986): Estudio recapitulativo de la distribución geográfica de Helminetos y Eimeria spp. de rumiantes domésticos en la República Mexicana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina -- Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. México.
58. Miller, J.E. and M.F. Baker (1980): Thiabendazole-resistant strain of Haemonchus and Ostertagia in California lambs. Am. J. Vet. Res. 41: 1674-1676.
59. Nemeseri, L. y J.P. Hólló (1961): Diagnóstico parasitológico Veterinario. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
60. Niec, N. (1968): Cultivo e Identificación de larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales del bovino y ovino. 3er. Manual Técnico. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
61. Olsen, O.W. (1977): Animal Parasites. The Life Cycles and Ecology. University Park Press. London, England.
62. Pouplard, L. (1961): Les Anthelminthiques en Médecine Vétérinaire. Ann. Med. Vet. 120: 515-529.
63. Presidente, P.J.A. (1985): Methods for detections of resistance to anthelmintics resistance in nematodes to anthelmintic drugs. Divi--

- sion of animal health. Ed. CSIRO. Australian Wool Corporation.
64. Prichard, R.K. (1970): Mode of action of the anthelmintic Thiabendazole in Haemonchus contortus. Nature 228: 684-685.
  65. Prichard, R.K., Hennesy, D.R. and A.D. Griffiths (1974): Endocrine - responses of sheep to infection with Trichostrongylus columbiformis. Res. Vet. Sci. 17: 182-187.
  66. Prichard, R.K., Hennesy, D.R. and J.W. Steel (1978): Prolonged administration: A new concept for increasing the spectrum and effectiveness of anthelmintics. Vet. Parasitol. 4:309-315.
  67. Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D. Martin, I.C. and A.D. Donald (1980): The problem of anthelmintic resistance in nematodes. Aust. Vet. Jour. 56: 239-252.
  68. Quiroz, R.H. (1984): Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Ed. Limusa México.
  69. Bonanoski, R.D., Rhoads, M.L., Colgrazier, M.L. and F.C. Kates (1975) : Effect of Cambendazole, Thiabendazole and Levamisole on fumarate reductase in Cambendazole-resistant and sensitive strain of Haemonchus contortus. J. Parasitol. 61: 777-778.
  70. Simpkin, K.G. and G.C. Coles (1978): Instability of benzimidazole resistance in nematode eggs. Res. Vet. Sci. 25: 249-250.
  71. Smeal, M.G., Cough, P.A., Jackson, A.R. and I.K. Hutson (1968): The occurrence of strains of Haemonchus contortus resistant to Thiabendazole. Aust. Vet. J.
  72. Smith-Buija, C.W., Borgsteed, F.H. (1986): Effect of cool storage of faecal samples containing Haemonchus contortus eggs on the results of an in vitro egg development assay to test anthelmintic resistance. Res. Vet. Sci. 40: 4-7.
  73. Soulsby, E.J.L. (1976): Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated animals. 6th ed. The Williams and Wilkins C. U.S.A.
  74. Soulsby, E.J.L. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los animales domésticos. 7a. ed Ed. Interamericana.

75. Tarazona, J.M. (1986): A method for the interpretation of parasite egg count in faeces of sheep. *Vet. Parasitol.* 22: 113-119.
76. The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals and drugs. 9th. ed. Ed. Merck & Co. Inc. U.S.A. (1976).
77. Theodorides, V.J., Scott, G.C. and M. Lederman (1970): Strain of — Haemonchus contortus resistant against benzimidazole anthelmintic. *Am. J. Vet. res.* 31: 859-863.
78. Theodorides, V.J., Chang, J., Di Cuollo, C.J., Grass, C.M., Parish, R. C. and G.C. Scott (1973): Oxibendazole, a new broad spectrum anthelmintic effective against gastrointestinal nematodes of domestic animals. *Br. Vet. J.* 129: XCVII-XCVIII.
79. Theodorides, V.J., Cyrik, R.J., Kingsbury, W.D. and R.C. Parish (1976): Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms. *Experientia* 32: 702-703.
80. Thiabendazole para ganado ovino y caprino. (1970). Boletín técnico de los Laboratorios Merck, Sharp & Dhome.
81. Thomas, R.J. (1982): The ecological basis of parasite control: nematodes. *Vet. Par.* 11: 9-24.
82. Van Wyk, J.A. and H.M. Gerber (1980): Benzimidazole-resistant — Haemonchus contortus. The effect of cryopreservation on the resistance of successive generations. *J. Vet. res.* 47: 143-146.
83. Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Gerber, H.M. and R.M. Alves (1987): Two field strains of Haemonchus contortus resistant to rafoxanide. *J. Vet. res.* 54: 143-146.
84. Webb, R.F. and U.C. Mc Cully (1979): Resistance of Haemonchus contortus to oxfendazole. *Aust. Vet. J.* 55: 347-350.
85. Whitlock, H.V. (1959): The recovery and identification of the first stage larvae of sheep nematodes. *Aust. vet. J.* 32: 310-316.

86. Whitlock, H.V., Kelly, J.D., Porter, C.J., Griffin, D.L. and C.A. Martin (1990): In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongylids of sheep and horses. Vet. Par. 7: 215-232.
87. Whitlock, H.V., Sangster, M.C., Gunawan, M., Porter, C.J. and J.D. Kelly (1990): Trichostrongylus columbriformis and Ostertagia spp resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: Isolation into pure strain and anthelmintic titration. Res. Vet. Sci. - 29; 31-35.



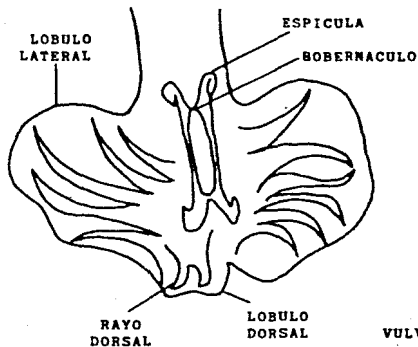


OLSEN, W. (61)

FIGURA 1 MORFOLOGIA DE LA REGION ANTERIOR  
DE Haemonchus contortus .

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BURSA COPULATRIZ DEL MACHO



H E M B R A

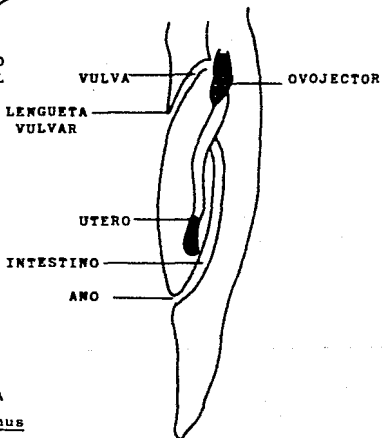
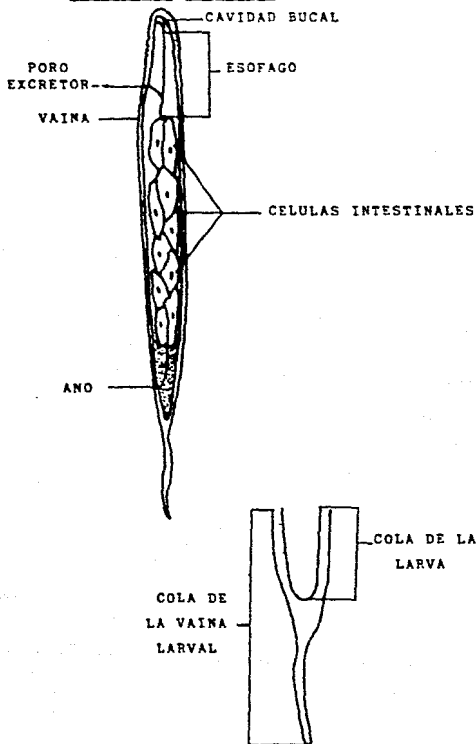


FIGURA 1 MORFOLOGIA DE LA PARTE POSTERIOR DE Haemonchus contortus. (tomado de Oisen, W)

FIGURA 1 MORFOLOGIA DE LA LARVA INFECTANTE (L<sub>3</sub>)  
DE Haemonchus contortus (Olsen, W. (61))



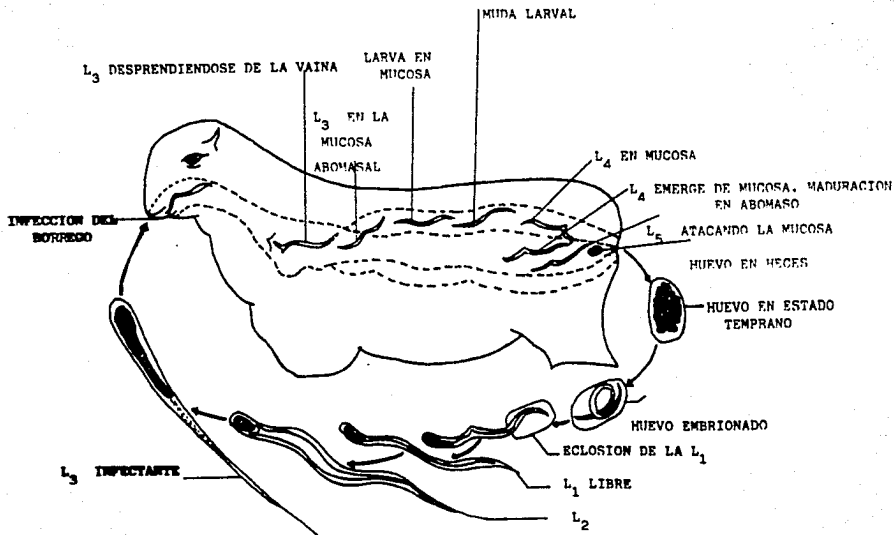
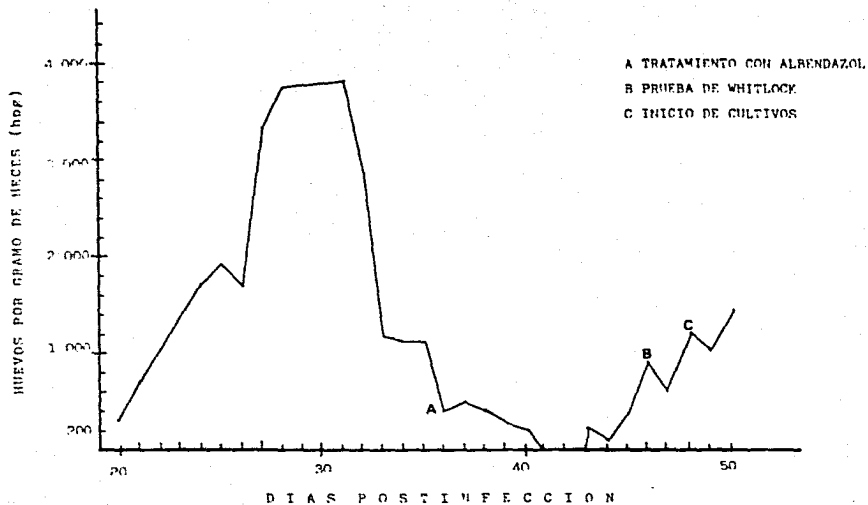
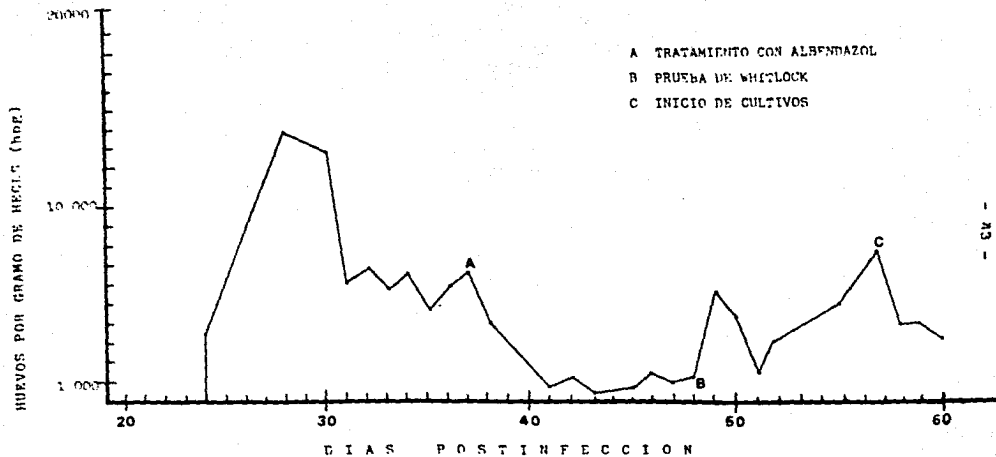


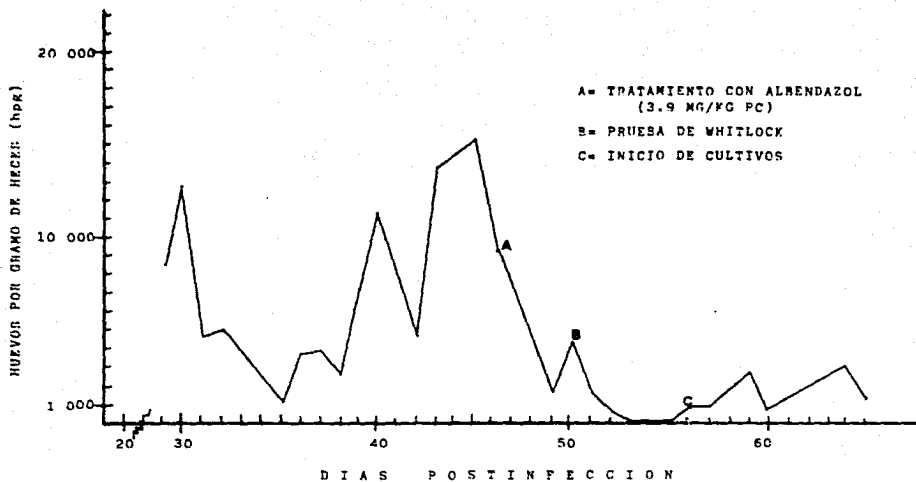
FIGURA 2 CICLO BIOLÓGICO DE Haemonchus contortus  
 (tomado de Olsen, W.O. (1977))



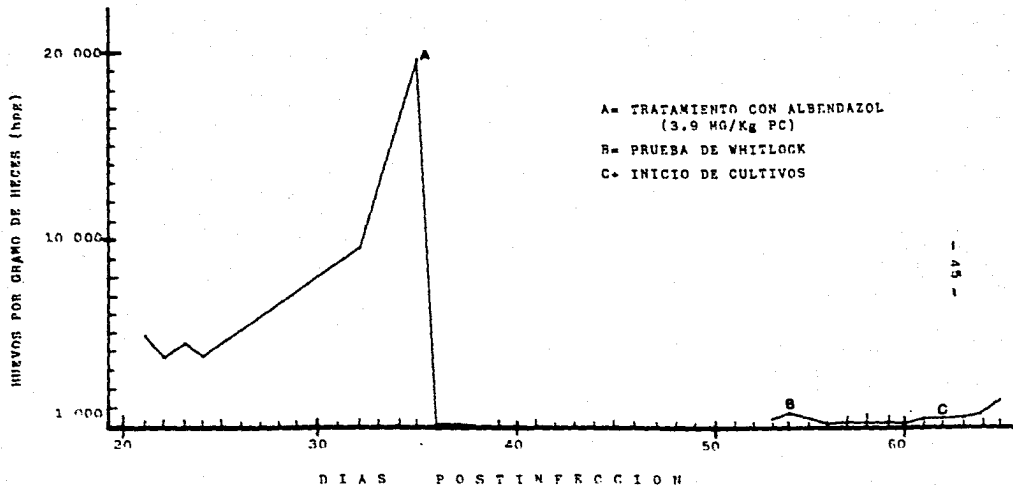
GRAFICA 1 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECE  
 POR EL OVINO DURANTE EL PRIMER PASE.



GRAFICA 2 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECES POR EL OVINO DURANTE EL SEGUNDO PASE.

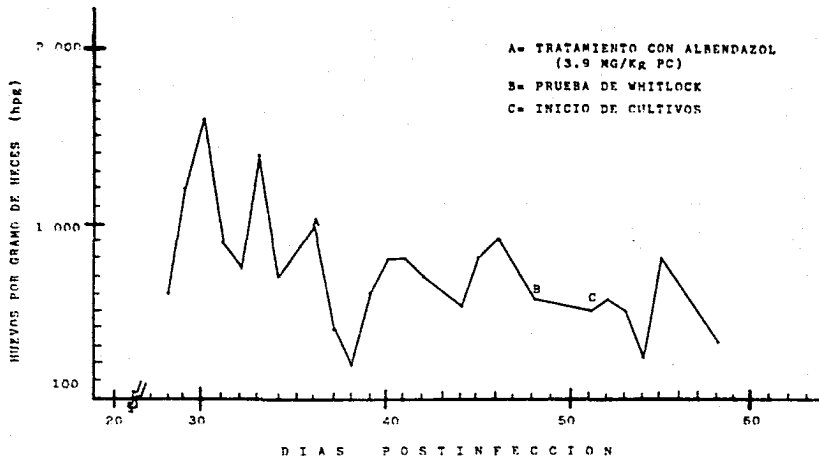


GRAFICA 3 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECES POR  
 EL OVINO DURANTE EL TERCER PASE.

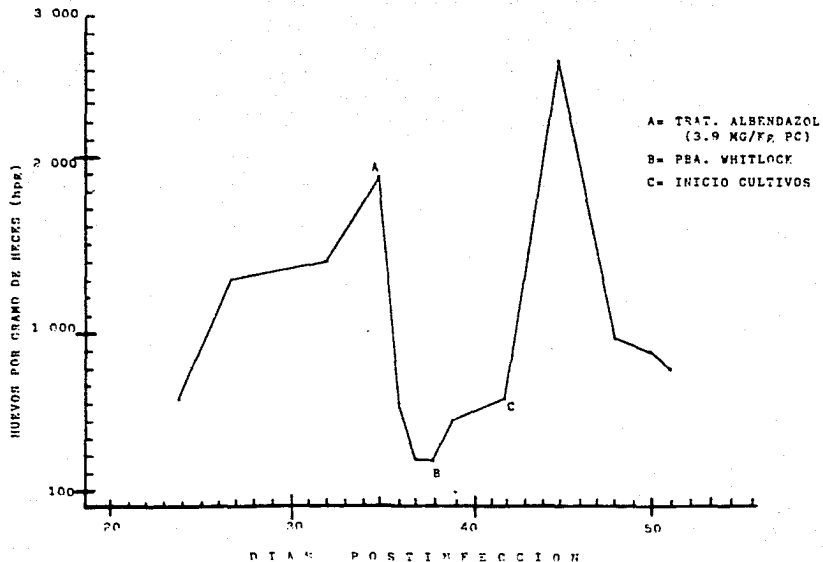


GRAFICA 4 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECEZ POR EL  
 EL OVINO DURANTE EL CUARTO PASE.

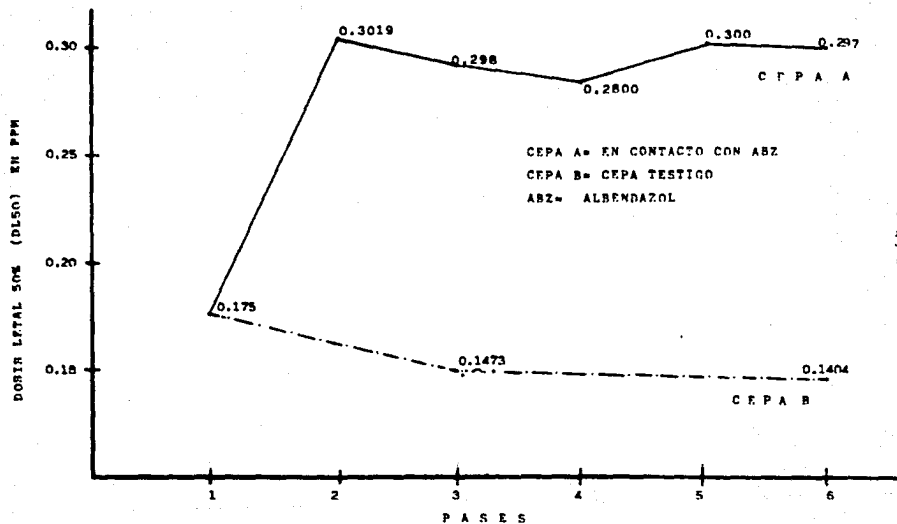




GRAFICA 5 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECEAS POR EL OVINO DURANTE EL QUINTO PASE.



GRAFICA 6 ELIMINACION DE HUEVOS EN HECEES POR  
 EL OVINO DURANTE EL SEXTO PASE.



GRAFICA 7 DOSIS LETAL 50% DE LAS CEPAS DE Haemonchus contortus DURANTE EL ESTUDIO.

C U A D R O 1

INDICE DE RESISTENCIA ALCANZADO POR LA POBLACION  
DE Haemonchus contortus DURANTE LOS PASES.

PASES	D O S I S DE ABZ ( PPM)	DL50% TRATADA (mg/kg dc)	INDICE DE RESISTENCIA TRATADA	DL50% NO TRATADA (mg/kg dc)	INDICE DE RESISTENCIA NO TRATADA
1	1.9	0.175	7.6008	0.175 .	7.6008
2	2.5	0.3019	13.1260		
3	3.9	0.298	12.9565	0.1473	6.4043
4	3.9	0.2800	12.1739		
5	3.9	0.300	13.0434		
6	3.9	0.297	12.9130	0.1404	6.1043

- 45 -