

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**SELECCIÓN DE GANADO OVINO CON
MAYOR GRADO DE RESISTENCIA
*A Haemonchus contortus***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JUAN ANTONIO FIGUEROA CASTILLO

TUTOR:

JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS

COMITÉ TUTORAL:

**JORGE TÓRTORA PÉREZ
R. DANILO MÉNDEZ MEDINA
JULIO V. FIGUEROA MILLÁN
ROGELIO ALONSO MORALES
JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS**

MÉXICO, D.F.

2004



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 esta 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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Dedicatoria

Con todo mi amor para:

Marycarmen,

Miguel Ángel, Julieta y

mis padres.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan Antonio

Figueroa Castillo

FECHA: 10-03-04

FIRMA: 

Agradecimientos

Por este medio agradezco a todas las personas e instituciones que me apoyaron técnica, económica y emocionalmente para que concluyera este trabajo, en especial:

A mi comité tutorial y jurado de examen por la acertada dirección y las valiosas aportaciones que hicieron de este un mejor trabajo.

A los Proyectos PAPIIT IN218996 y CONACYT 1123PB por el financiamiento otorgado para la realización de gran parte de la investigación.

Al Dr. Raúl Ullóa Arvízu y Dr. Ignacio Méndez Ramírez por su colaboración en el análisis de los datos.

A la Biol. Amanda Gayosso Vázquez por el apoyo técnico en el área de genética molecular.

A la Dra. Rebeca Acosta por la asistencia técnica en la determinación de los alelos.

Al personal del CEIEGT por el apoyo logístico durante la realización del trabajo de campo, particularmente a: Dr. Jorge Armando Álvarez, Dr. Hugo Pérez Ramírez, Bernardino, Inocencio Castillo, Braulio Carranza y al buen amigo Jorge Becerra López.

Al personal del CENID-PAVET- PARASITOLOGIA de Jiutepec. Mor., especialmente a los Drs. Enrique Liébano Hernández y Víctor Vázquez Pratts por la asesoría y capacitación en la identificación de larvas de strongilidos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Molecular: Dr. Simón Martínez, Biol. Amanda Gayosso, M en C. "Hesper", Dra. Refugio Cortés, M en C. Belem Huerta, M en C. Mario Espinoza, MVZ. Felicitas Vázquez, Biol. Noé Reyes y M en C. Silvia Martínez, por el apoyo técnico y moral demostrado durante mi estancia en este laboratorio.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Parasitología:
M en C. Espiridión Ramos Martínez, M en C. Gilberto Ballesteros Rodea, To be Toríz,
MVZ Alberto Ramírez, MVZ. Nieves Cruz, M en C. Beatriz Salas, Antonio Yáñez,
José Luis Sandoval, MVZ. Jorge Cruz, Gabriel Beltrán, Dra. Cristina Guerrero y
Dra. Irene Cruz, por el afecto a mi persona y las sugerencias para mejorar este trabajo.

A las mejores ayudantes de investigación que he tenido:
MVZ. Fabiola Vanegas, MVZ. Patricia Negrete, MVZ. Paola González,
MVZ. Laura González y Guadalupe Guerra, que se distinguieron por su excelente
desempeño, generalmente más allá de su responsabilidad.

A los estudiantes de MVZ, Alexa, Antonio y Paula por la valiosa y constante ayuda
proporcionada en la colecta y análisis de las muestras.

Al Dr. Danilo Méndez Medina, le agradezco la confianza, sus consejos y paciencia, pero
aún más, el ayudarme a descubrir mis capacidades y reconocer mis errores.

A Mis Padres que me han apoyado toda la vida.

A mis hermanos, Moisés, Edgar y Roberto, y mis sobrinos Gerardo y Abraham, que en
varias ocasiones me acompañaron y ayudaron en el trabajo de campo.

A las hermanas Olvera Gamiño; María del Carmen, Martha y Yolanda, al Sr. Demetrio y
Ricardo Ramos, que haciendo a un lado sus ocupaciones, cuidaron (y todavía lo hacen)
de mi esposa e hijos, mientras yo me encargaba de martirizar borregos (ya no lo hago).

Finalmente, a Marycarmen por ser mi fuente de energía.

Contenido

Agradecimientos.....	ii
Lista de Cuadros	vi
Lista de Figuras	vii
Resumen	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Importancia de las nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino.....	3
1.2. Generalidades de las nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino.....	4
1.3. Terminología y definición del problema	5
1.4. Factores asociados con resistencia a los nematodos gastrointestinales en el ganado ovino.....	8
1.4.1. Estado nutricional y nivel de proteína en la dieta	8
1.4.2. Sexo.....	8
1.4.3. Raza.....	9
1.4.4. Edad.....	9
1.4.5. Tipo de hemoglobina.....	10
1.4.6. Genes.....	11
1.5. Valoración del grado de resistencia	11
1.6. Perspectivas	12
1.7. Desventajas	13
1.8. La raza Pelibuey	13
1.9. Hipótesis	15
1.10. Objetivos	15
1.11. Estrategia general.....	16
CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL ANTIHELMÍNTICO A UTILIZAR	18
2.1. Introducción	18
2.2. Material y métodos.....	19
2.3. Resultados y discusión.....	19
2.4 Cuadros	21
CAPITULO 3. INFECCIÓN ARTIFICIAL CON <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	22
3.1. Introducción.....	22
3.2 Material y métodos.....	22
3.3 Resultados y discusión.....	24
3.4 Figuras y Cuadros.....	28

CAPÍTULO 4. INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	36
4.1. Introducción	36
4.2. Material y métodos.....	36
4.3. Resultados y discusión.....	38
4.3. Figuras y Cuadros	41
CAPITULO 5. DINÁMICA MENSUAL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES ADULTOS EN BORREGOS RASTREADORES.....	49
5.1. Introducción	49
5.2. Material y métodos.....	49
5.3. Resultados y discusión.....	50
5.4. Cuadros y Figuras	53
CAPITULO 6. PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD OVINO EN LA RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD A <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	56
6.1. Introducción	56
6.2. Material y métodos.....	57
6.3. Resultados y discusión.....	59
6.4. Cuadros y figuras.....	61
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL.....	66
Literatura citada	69
Anexos	78
I. Obtención del aislado de <i>Haemonchus contortus</i> presente en el CEIEGT	78
II. Puesta a punto del ensayo inmunoenzimático para detectar anticuerpos contra un extracto crudo de <i>Haemonchus contortus</i>	79
III. Obtención de ADN de los corderos.....	81
IV. Haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en ovejas y promedios de eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en cada tipo de infección.....	82
V. Haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en corderos y promedios de eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en cada tipo de infección	83

Lista de Cuadros

CUADRO 1. LÍNEAS DE GANADO OVINO SELECCIONADAS POR RESISTENCIA A NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y HEREDABILIDAD ESTIMADA	7
CUADRO 2. PROMEDIO DE HUEVOS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EN OVINOS TRATADOS CON SULFÓXIDO DE ALBENDAZOL Y LEVAMISOL	21
CUADRO 3. PORCENTAJE DE BORREGOS POSITIVOS A <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> TRATADOS CON SULFÓXIDO DE ALBENDAZOL Y LEVAMISOL	21
CUADRO 4. PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE HUEVOS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EN OVINOS TRATADOS CON SULFÓXIDO DE ALBENDAZOL Y LEVAMISOL	21
CUADRO 5. PROMEDIOS GENERALES DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN CORDERAS INFECTADAS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	34
CUADRO 6. PROMEDIOS GENERALES DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	35
CUADRO 7. PROMEDIOS GENERALES DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN OVEJAS INFECTADAS NATURALMENTE CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	47
CUADRO 8. PROMEDIOS GENERALES DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN BORREGOS INFECTADOS NATURALMENTE CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES	48
CUADRO 9. VARIACIÓN MENSUAL DE LOS PRINCIPALES NEMATODOS GASTROINTESTINALES ADULTOS COLECTADOS EN BORREGOS RASTREADORES DE DICIEMBRE DE 1999 A DICIEMBRE DEL 2000 EN EL "CENZONTLE"	53
CUADRO 10. VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN PLUVIAL DE DICIEMBRE DE 1999 A DICIEMBRE DEL 2000 EN EL "CENZONTLE"	54
CUADRO 11. FRECUENCIA DE LOS ALELOS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD OVINO.....	61
CUADRO 12. ASOCIACIÓN ENTRE ALELOS DEL MHC, ELIMINACIÓN DE HUEVOS Y NÚMERO DE EOSINÓFILOS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>	62
CUADRO 13. ASOCIACIÓN ENTRE ALELOS DEL MHC, ELIMINACIÓN DE HUEVOS Y NÚMERO DE EOSINÓFILOS EN CORDEROS INFECTADOS NATURALMENTE CON <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> Y OTROS NEMATODOS INTESTINALES	62
CUADRO 14. CORRELACIONES DE SPEARMAN PARA LA ELIMINACIÓN DE HUEVOS, VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO, EOSINÓFILOS Y ANTICUERPOS, EN OVINOS INFECTADOS ARTIFICIAL Y NATURALMENTE CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	63

Lista de Figuras

FIGURA 1. PROMEDIO DE ELIMINACIÓN DE HUEVOS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>H. CONTORTUS</i> .	28
FIGURA 2. PROMEDIO DEL VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	29
FIGURA 3. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	30
FIGURA 4. PROMEDIO DEL NÚMERO DE EOSINÓFILOS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	31
FIGURA 5. PROMEDIO DE NIVELES DE ANTICUERPOS EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	32
FIGURA 6. PROMEDIO DE PESO CORPORAL EN CORDEROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON 3,000 LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .	33
FIGURA 7. PROMEDIO DE ELIMINACIÓN DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL.	41
FIGURA 8. PROMEDIO DEL VOLUMEN CELULAR AGLOMERADO EN BORREGOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.	42
FIGURA 9. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN BORREGOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.	43
FIGURA 10. PROMEDIO DEL NÚMERO DE EOSINÓFILOS EN BORREGOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.	44
FIGURA 11. PROMEDIO DEL NIVEL DE ANTICUERPOS EN BORREGOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.	45
FIGURA 12. PROMEDIO DE PESO CORPORAL EN BORREGOS DURANTE LA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES.	46
FIGURA 13. DINÁMICA MENSUAL DEL NÚMERO TOTAL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y ELIMINACIÓN DE HUEVOS EN BORREGOS RASTREADORES.	55
FIGURA 14. COMPARACIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN PLUVIAL DURANTE EL AÑO DE ESTUDIO Y 10 AÑOS (1981-1991).	55
FIGURA 15. CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO EN AGAROSA AL 3% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO (0.5µg/ML).	64
FIGURA 16. ELECTROFEROGRAMA.	65
FIGURA 17. CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE ADN DE CORDERO EN GEL DE AGAROSA AL 1% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO 0.5µg/ML.	81

Resumen

Con el propósito de identificar borregos Pelibuey resistentes a *Haemonchus contortus*, se midió la eliminación de huevos, volumen celular aglomerado, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y el peso en corderos infectados primero artificialmente con *H. contortus* y posteriormente en forma natural con nematodos gastrointestinales. También se midió la asociación del complejo principal de histocompatibilidad con resistencia. En la infección artificial, se identificaron 22 corderos como resistentes y 30 susceptibles, mientras que en la natural 23 se clasificaron resistentes y 29 susceptibles. En cada tipo de infección los animales resistentes eliminaron menos huevos y tuvieron mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos que los susceptibles. En la infección artificial, los alelos OMHCI 188 y DRB2 282 se asociaron con reducción de huevos en las heces (-330 y -396 por cada copia del alelo correspondiente, $P < 0.05$). El OMHCI 206 con incremento de huevos (576, $P < 0.05$). El OMHC1 200 además del incremento en eliminación de huevos (696, $P < 0.05$) se asoció con disminución en el número de eosinófilos (-87, $P < 0.05$). En la infección natural, el OMHCI 200 se asoció con disminución de eosinófilos (-130, $P < 0.05$) y el OMCHI 194 con incremento en anticuerpos (0.111, $P < 0.05$). Se concluye que la identificación de borregos resistentes está influenciada por el tipo de infección y que aunque los resultados apuntan en el sentido de que algunos alelos del complejo principal de histocompatibilidad podrían utilizarse como marcadores genéticos de resistencia hace falta mayor evidencia, sobretodo bajo condiciones naturales de infección.

Capítulo 1. Introducción

Los métodos de control de parásitos gastrointestinales basados en los actuales antihelmínticos cada vez son menos efectivos, debido a que los nematodos han desarrollado progresivamente resistencia a los compuestos utilizados, aunado al hecho de que la presencia de residuos químicos en los productos de origen animal, representan un factor de riesgo para la salud humana y disminuyen el valor comercial de estos productos (Donald, 1994).

Lo anterior ha motivado la investigación sobre sistemas de control parasitario menos dependientes de antihelmínticos, que buscan aprovechar la capacidad individual de los animales para controlar y eliminar a sus parásitos. Al identificar a los animales resistentes, se podrían criar de manera selectiva y conformar un rebaño resistente, que al contaminar menos las praderas (porque eliminan menos huevos en las heces), se reinfectarían en menor grado y necesitarían de menos desparasitaciones, con lo que se reducirían los costos de producción y la resistencia a los antihelmínticos.

Sin embargo, aún no se establece cual es el mejor procedimiento para identificar a los borregos resistentes (una infección, varias infecciones, artificial o natural), ni cual es el mejor indicador de resistencia.

Los indicadores que comúnmente se utilizan (eliminación de huevos, anemia, eosinófilos, anticuerpos), requieren que los animales sean sometidos a un desafío parasitario, situación que se podría evitar si se tuvieran marcadores genéticos. Debido al papel que juegan en la respuesta inmune, alelos del complejo principal de histocompatibilidad se han señalado como posibles candidatos a marcadores de resistencia o susceptibilidad a parásitos.

En el presente estudio se evaluó la eliminación de huevos en las heces, como indicador de resistencia a nematodos gastrointestinales y su asociación con otros indicadores como el volumen celular aglomerado, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y genotipo del complejo principal de histocompatibilidad, en borregos de la raza Pelibuey bajo condiciones de infección artificial en corral y natural en pastoreo en clima de trópico húmedo.

1.1. Importancia de las nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino

Las enfermedades parasitarias son uno de los problemas sanitarios que afectan frecuentemente a los rumiantes y que representan un factor limitante en su producción. La especie ovina, es una de las más receptivas a la infección por nematodos, encontrándose que en un rebaño el 100% de los animales suelen estar infectados y si no se aplican medidas de control apropiadas la mortalidad puede llegar al 60% en los recién destetados (Valencia *et al.*, 1975).

Estos parásitos provocan un síndrome de baja de consumo, mal digestión y anemia; que se refleja en bajos índices de crecimiento y fertilidad, así como en la disminución de la cantidad y calidad de carne, lana y leche (Gasbarre y Miller, 2000).

Los costos por parasitismo son difíciles de cuantificar con precisión, en Estados Unidos de Norteamérica, las pérdidas ocasionadas por los nematodos gastrointestinales a la ganadería (en general) se estimaron en más de US\$ 2 billones por año (Gasbarre y Miller, 2000), mientras que en Nueva Zelanda, en 1990^{*} fue de 270 millones de dólares neozelandeses.

En 1985 en Australia, la mayor parte de las pérdidas por parasitismo gastrointestinal (83%), se debieron a la disminución en la producción de lana, carne y muerte de animales, mientras que el 17% fue por el gasto en prevención y tratamiento, sin contemplar las pérdidas por disminución en la fertilidad ni predisposición a enfermedades (Beck *et al.*, 1985),

A mediados de los años 1980, se estimó que una tercera parte de la producción ovina en Nueva Zelanda dependía de productos químicos para controlar a los nematodos; con esta finalidad, se gastaron 23 millones de dólares neozelandeses por año en antihelmínticos (7 tratamientos/ animal/ año) (Familton, 1991).

^{*} New Zealand Wool Board 1990

1.2. Generalidades de las nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino

Comúnmente estas nematodosis son mixtas, dentro de los géneros que con mayor frecuencia afectan al ganado ovino en México, destacan: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia* (sin. *Ostertagia*) *circumcincta*, *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Bunostomum* spp., *Strongyloides papillosus*, *Trichuris ovis*, *Oesophagostomum* spp. y *Chabertia ovina* (Quiroz, 1984).

Se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante, debido a su patogenicidad, ya que es un potente succionador de sangre y puede matar animales jóvenes e incluso a borregos adultos. Por otra parte, su elevada prolificidad, adaptabilidad y resistencia a diversas condiciones climáticas hacen que tenga amplia distribución geográfica y alta prevalencia, tanto en regiones con clima tropical (Vázquez y Nájera, 1986), como regiones templadas (Figueroa, 1993; Negrete *et. al.*, 1998)

Los borregos se infectan con *H. contortus* al ingerir la larva 3 (L3) que se encuentra en el pasto. En el abomaso, la L3 se libera de su cutícula, penetra en las glándulas gástricas y muda a L4, sale de las glándulas muda a L5 y madura a adulto. De 21 a 28 días posinfección, las hembras inician la postura de huevos, llegando a depositar de 5,000 a 10,000 huevos por día (Kaufmann, 1995).

Los signos clínicos de la infección no son característicos y suelen pasar inadvertidos, sin embargo, cuando la carga parasitaria es alta se observa decaimiento, anemia y edema generalizado. Las infecciones masivas pueden resultar en la muerte de los animales (Schallig, 2000).

El control de los nematodos gastrointestinales en el ganado ovino se basa en la aplicación de antihelmínticos. Sin embargo, el uso frecuente de estos fármacos conlleva al desarrollo de resistencia, debido a que en cada tratamiento sobrevive un porcentaje muy pequeño de nematodos resistentes a su efecto. De este modo, al cabo de varias desparasitaciones esta población se hace mayoritaria, y muestra una franca resistencia al antihelmíntico utilizado (Kelly y Hall, 1983).

La aparición de poblaciones de nematodos resistentes a los antiparasitarios, aunado al incremento en los costos de desarrollo y registro de nuevos biocidas, sugieren que los métodos de control basados en los actuales antihelmínticos no serán

sostenibles por mucho tiempo (Barger, 1989). Actualmente se ha notificado resistencia para la mayoría de los nematocidas disponibles en el mercado, incluyendo los de nueva generación como la ivermectina, moxidectina y doramectina (Shoop *et al.*, 1993; Vermunt *et al.*, 1996; Sangster, 1999).

Por otra parte, existe una creciente demanda para disminuir los residuos de fármacos en los alimentos y en el ambiente, por esto se investigan métodos alternativos de control parasitario (Donald, 1994).

Entre estos métodos se encuentran: la cría selectiva de animales con mayor grado de resistencia a la infección por nematodos gastrointestinales y la cría de animales con mayor capacidad para resistir la infección sin tener consecuencias desfavorables (Barger, 1989). Estos sistemas se basan en que los animales infectados desarrollan una respuesta que puede controlar, en cierta medida, a los nematodos; dicha respuesta varía entre razas e individuos, está determinada genéticamente y es heredable (Wakelin, 1995).

1.3. Terminología y definición del problema

Con el objetivo de describir con mayor precisión la interacción entre los parásitos y sus huéspedes se crearon los siguientes términos:

Resistencia. La mayoría de las definiciones coinciden con Albers y Gray (1987), quienes la precisan como la habilidad de un huésped para iniciar y mantener una respuesta, que evite o reduzca el establecimiento de los parásitos o que elimine la carga parasitaria. Los animales resistentes no son completamente refractarios a la infección y por definición, albergan menos parásitos que los animales susceptibles; en consecuencia, eliminan menos huevos en las heces (Woolaston y Baker, 1996).

Susceptibilidad. Es el inverso de resistencia (Gray, 1995).

Tolerancia. Es la habilidad de un huésped para sobrevivir y desarrollarse estando parasitado. Este término se usa ampliamente en la infección por tripanosomas en el ganado bovino (Gray, 1995).

“Resilience.” Término similar a tolerancia, fue acuñado para evitar la confusión con tolerancia inmunológica. Riffkin y Dobson (1979), lo definen como la habilidad de un huésped de resistir los efectos patogénicos de una infección parasitaria. Mientras que para Albers y Gray (1987); Woolaston y Baker (1996), es un término estrechamente vinculado con la actividad productiva y lo precisan como la habilidad que tiene un huésped de mantener o incrementar su nivel de producción ante un desafío parasitario.

Autocuración. Fenómeno reportado frecuentemente en diversas razas ovinas, caracterizado por la expulsión de la mayor parte de los nematodos establecidos, por lo que se relaciona con resistencia. Se asocia con pronunciados cambios inflamatorios en la mucosa abomasal, incremento en niveles de anticuerpos específicos (IgA, IgE e IgG), células cebadas, moco y alteraciones de las células epiteliales superficiales, causados por hipersensibilidad tipo I, elevados niveles de histamina en sangre y eosinofilia como respuesta a la reinfección con nematodos gastrointestinales (Luffau *et al.*, 1981).

Resistencia y “resilience”, a menudo se confunden y traslapan en un mismo huésped dificultando su identificación. Sin embargo, la resistencia mide la carga parasitaria (número de parásitos o eliminación de huevos), mientras que “resilience” mide características productivas o de salud, por ejemplo, ganancia de peso y hematocrito (Figueroa *et al.*, 2000).

Existe una correlación positiva ($r = 0.56$) entre ambas (Albers y Gray, 1987); aunque, la heredabilidad de “resilience” es menor (de 0.10 ± 0.03 a 0.19 ± 0.04) (Bissett y Morris, 1996), que la heredabilidad de la resistencia a nematodos (de 0.16 a 0.55) (Cuadro 1).

¹Del inglés = elasticidad, flexibilidad. Propiedad para volver a la forma original.

Cuadro 1. Líneas de ganado ovino seleccionadas por resistencia a nematodos gastrointestinales y heredabilidad estimada*

Raza	Edad (meses)	Tipo de infección	Nematodo	Criterio de selección eliminación de huevos en heces	Heredabilidad (\pm error estándar)
Hungarian Merino	6 – 7	Artificial	<i>H. contortus</i>	Promedio de 4 cuentas con segunda infección	0.49 \pm 0.17
Merino	5 – 6	Artificial	<i>H. contortus</i>	Cuenta máxima de 3 obs. semanales	0.23 \pm 0.03
Merino	18	Artificial	<i>H. contortus</i>	1 cuenta	0.23 \pm 0.04
Merino	4 – 5	Artificial	<i>T. colubriformis</i>	Promedio de 5 cuentas (3-7 semanas post infección)	0.41 \pm 0.04
Merino	6 – 8	Artificial	<i>H. contortus</i>	1 cuenta	0.30 \pm 0.13
Merino	5 –13	Artificial	<i>T. colubriformis</i>	1 cuenta	0.20 \pm 0.11
Merino	4 – 5	Artificial	<i>H. contortus</i>	1 cuenta (4 semanas post infección)	0.34 \pm 0.10
				1 cuenta (5 semanas post infección)	0.26 \pm 0.09
Romanov	6 –10	Artificial	<i>H. contortus</i>	Promedio de 6 cuentas	0.55
Merino	6, 12	Natural	Mixta	2 cuentas	0.42 \pm 0.14
Scottish Blackface	3 – 6	Natural	<i>O. circumcincta</i>	4 cuentas	0.33 \pm 0.15
Romney	6	Natural	Mixta	1 cuenta	0.16 \pm 0.12
Romney	5 – 8	Natural	Mixta	1 cuenta	0.27 \pm 0.07
Polish Longwool	6, 8	Natural	Mixta	2 cuentas	0.28 \pm 0.16
Romney y	5-8	Natural	<i>T. colubriformis</i>	1 cuenta	0.34 \pm 0.19
Romney cruza			<i>Teladorsagia spp.</i>		

* Adaptada de Eady *et al*, 1996 y Raadsma *et al*, 1997.

1.4. Factores asociados con resistencia a los nematodos gastrointestinales en el ganado ovino

La variación individual en el grado de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades bacterianas y virales se conoce en forma empírica desde hace siglos, pero es a partir de 1930 que se comienzan a realizar las primeras observaciones científicas en animales y el hombre. No obstante, los mecanismos que confieren resistencia a la infección por nematodos gastrointestinales aún no han sido debidamente aclarados (Wakelin, 1995).

Dentro de los factores asociados se han señalado los siguientes:

1.4.1. Estado nutricional y nivel de proteína en la dieta

Sobre el nivel de proteína en la dieta y la infección por nematodos gastrointestinales en los borregos, el consenso general de los estudios de Abbott *et al.* (1985, 1986, 1988); Abbott y Holmes (1990), Coop y Holmes (1996); van Houtert y Sykes (1996), es que las dietas altas en proteína incrementan la resistencia hacia los efectos patógenos del parasitismo y aunque no influyen mucho en el establecimiento de los nematodos, si intervienen en la eliminación de los ya establecidos, debido a que mejora la respuesta inmune celular en la mucosa gastrointestinal.

Datta *et al.* (1999) sugirieron que elevar el nivel proteico de la dieta a los 5 - 7 meses de edad, por un periodo de 9 semanas, permite que los corderos resistan los efectos del parasitismo gastrointestinal y eliminen menos huevos en las heces. La suplementación parece favorecer más a los animales susceptibles que a los resistentes, posiblemente porque un mayor nivel de proteína en la dieta favorece la respuesta de IgA en el tracto gastrointestinal.

1.4.2. Sexo

Luffau *et al.* (1981) observaron que en hembras de la raza Merino es más evidente la autocuración que en machos de la misma raza, edad y tipo de hemoglobina, y también que la respuesta inmune es protectora y más temprana en las hembras que en los machos. Ambrosio y Bautista (1985) mencionan que las hembras de la raza Pelibuey son más resistentes que los machos. Para Klein (2000) estas diferencias

pueden ser ocasionadas por un efecto modulador en la respuesta inmune que tienen las hormonas sexuales.

1.4.3. Raza

Desde mediados de 1930 se han notificado diferentes grados de resistencia a nematodos gastrointestinales entre las diferentes razas ovinas. Las razas africanas autóctonas, como la Red Maasai, Blackhead Persian (Somalí), Djallonke y Sahelian, al igual que las razas de origen africano, pero que han proliferado en otros continentes como la Florida, St. Croix, Barbados Blackbelly y Navajo, poseen gran capacidad de adaptación y resistencia al parasitismo gastrointestinal en comparación con algunas razas europeas como la Rambouillet y Merino (Courtney *et al.*, 1985; Fitzhugh, 1991).

En general las razas de pelo, son más resistentes a la infección que las razas productoras de lana fina. No obstante, entre individuos de una misma raza, también existen diferencias en el grado de resistencia (Preston y Allonby, 1979; Patterson *et al.*, 1996). En Australia y Nueva Zelanda se han establecido líneas resistentes a partir de razas como la Merino, que es considerada susceptible, de esta raza el CSIRO* posee rebaños resistentes† a *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Teladorsagia circumcincta* (Woolaston, 1991).

1.4.4. Edad

Otro de los factores involucrados en resistencia a parásitos es la edad, se ha observado que los borregos desarrollan cierta resistencia a los nematodos gastrointestinales después de varias reinfecciones; sin embargo, los corderos que se infectan por primera vez o se reinfectan antes de los 4 meses de edad, son tan receptivos como aquellos que nunca han sido expuestos (Manton *et al.*, 1962, Stear *et al.*, 2000). De acuerdo con Windon *et al.* (1980), hasta los 5 meses de edad no existe resistencia inducida contra nematodos gastrointestinales.

* Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Armidale, Australia.

† Rebaño de la Universidad de Nueva Inglaterra "Golden Ram"; Núcleo Armidale; Línea Hamilton; Rebaño Rylington; Rebaño Yalanbee

La receptividad a nematodos gastrointestinales es mayor en animales jóvenes que en adultos, posiblemente debido a una pobre respuesta del sistema inmunológico y no al número de exposiciones o a la intensidad de la misma (Watson y Gill, 1991).

El sistema inmune del ovino requiere de un proceso de maduración que inicia en la vida fetal y continúa durante los primeros 12 meses de vida. En comparación a los animales adultos (3 a 6 años), los corderos menores a 8 meses de edad tienen significativamente menor proporción de linfocitos CD4+ y CD8+ en la sangre y linfa, y los linfocitos producen menos interferón gamma, por lo que su respuesta debida a anticuerpos es menor (Colditz *et al.*, 1996).

En cualquier edad, la resistencia está asociada con un incremento en el número de células cebadas y eosinófilos en la mucosa gastrointestinal, anticuerpos específicos, moco gastrointestinal y otras moléculas con actividad antiparasitaria, que son producidas por los animales resistentes a más temprana edad que en los susceptibles (Bisset *et al.*, 1996).

1.4.5. Tipo de hemoglobina

En 1964, las observaciones de Evans y Whitlock sugerían que el tipo de hemoglobina podría estar asociado con resistencia a la infección por *H. contortus*, de esta forma, los animales homocigóticos para el tipo A serían más resistentes que los heterocigóticos AB y aún más que los homocigóticos B. Aunque dicha observación es reforzada por Altaif y Dargie (1978), investigaciones posteriores difieren al respecto: Albers *et al.* (1987), trabajaron bajo las mismas condiciones, en el mismo lugar y con animales similares a los utilizados por Evans y Whitlock (1964) y no encontraron tal asociación. Kassai *et al.* (1990), tampoco encontraron relación entre el tipo de hemoglobina, la concentración de hemoglobina y los niveles séricos de IgG₁ e IgA.

Preston y Allonby (1979), sugieren que las diferencias observadas por Evans y los otros investigadores, pudieron ser producto de la habilidad de los borregos para responder a los antígenos de origen parasitario y no al tipo de hemoglobina.

1.4.6. Genes

Aunque la resistencia a nematodos gastrointestinales es el resultado de la expresión combinada de muchos genes (Barger, 1989), existe cierta evidencia de que para *H. contortus* hay asociado un gen principal. Al respecto, Whitlock (1958) y Albers y Gray (1987) notificaron que los carneros "Violet" y "Golden Ram" respectivamente, eran portadores de un gen, cuyo efecto consistía en disminuir la eliminación de huevos de *H. contortus* en las heces de su descendencia. En un estudio más amplio Woolaston *et al.* (1990^b) trabajando con la descendencia de "Golden Ram" no pudieron confirmar la presencia de dicho gen.

Por otra parte, el complejo principal de histocompatibilidad ovino (MHC), se ha involucrado con resistencia o susceptibilidad a *Trichostrongylus colubriformis* (Douch y Outteridge, 1989) y *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* (Buitkamp *et al.*, 1994; Schwaiger *et al.*, 1995; Patterson *et al.* 1998).

Con respecto a *H. contortus*, Outteridge *et al.* (1996) identificaron dos alelos; 3 y 4 del DRB en borregos con altos niveles de anticuerpos y eosinófilos pero sólo el alelo 3 se asoció con baja eliminación de huevos.

En contraparte, Cooper *et al.* (1989); Blattman *et al.* (1993) y Hulme *et al.* (1993) no encontraron evidencia de que algún alelo del MHC ovino estuviera asociado con resistencia o susceptibilidad a nematodos gastrointestinales.

1.5. Valoración del grado de resistencia

Ante la falta de adecuados indicadores fenotípicos o genotípicos para distinguir animales resistentes a nematodos gastrointestinales, el grado de resistencia se ha valorado a través de su carga parasitaria (Albers y Gray, 1987; Budle *et al.*, 1992; Gray, 1995; Nieuwoudt *et al.*, 2002).

Aunque la forma más exacta de medir la carga parasitaria es contando los parásitos en la necropsia, en algunas especies como *H. contortus* la eliminación de huevos en las heces correlaciona moderada (0.61) o altamente (0.91) con el número de nematodos (Baker *et al.*, 1991; Bisset *et al.*, 1996), por lo que es considerada una medida de la carga parasitaria; además, es heredable y sirve de referencia para otros

indicadores potenciales como el grado de anemia, producción de anticuerpos o eosinófilos (Albers *et al.*, 1987).

En Australia* y Nueva Zelanda† existen servicios de asistencia para los productores interesados en este tipo de ganado, en ambos países se utiliza la eliminación de huevos en las heces como indicador del grado de resistencia (Woolaston y Baker, 1996). De esta forma, se han establecido varias líneas de ganado ovino que son consideradas resistentes a nematodos gastrointestinales, algunas de las cuales se presentan en el Cuadro 1.

1.6. Perspectivas

El uso potencial de los borregos resistentes a nematodos es prometedor, de acuerdo con lo proyectado por Gray (1987), con una heredabilidad de 0.3, una variación en la resistencia dentro del rebaño de 40%, una intensidad de selección de 5% en machos y 30% en hembras, los niveles de resistencia del rebaño podrían incrementarse 6% en promedio por año. En términos de eliminación de huevos en las heces, significa que los niveles de eliminación se reducirían a la mitad después de aproximadamente tres generaciones de selección.

Gruner *et al.*, (2002), constataron que tras 4 años de seguimiento, los borregos resistentes tuvieron 50% menos eliminación de huevos y adultos de *T. circumcincta*, que los susceptibles. Resultados similares se observaron con *H. contortus*, mientras que la eliminación de huevos y el número de adultos de *Trichostrongylus colubriformis* fueron 75% y 99% (respectivamente), menores en los resistentes que en los susceptibles. También registraron una reducción del 25% en la población de larvas infectantes en los potreros de los resistentes.

Por otra parte, Barger (1989) tras nueve años de simulación en un programa de computadora (UNIVERSE‡) observó que el promedio de *H. contortus* albergados fue tan bajo en ovejas resistentes (sin tratamiento antihelmíntico) como en ovejas no resistentes (tratadas tres veces por año), con la ventaja de que en el rebaño resistente

* Nemesis Breeders Worm Control Network. CSIRO, Armidale, Australia.

† The WormFEC™ Service. Mosgiel, New Zealand.

‡ Desarrollado por Dobson y Barnes en el CSIRO McMaster Laboratory, en Sydney Australia.

no hubo gastos por tratamiento ni resistencia a los antihelmínticos. Al respecto, el rebaño Yalanbee del CSIRO, resistente a *H. contortus*, se ha mantenido sin tratamientos antihelmínticos durante más de 20 años (Woolaston y Eady, 1995).

1.7. Desventajas

Se contempla la posibilidad de que los nematodos sean capaces de adaptarse a los animales resistentes (Wakelin *et al.*, 2002); sin embargo, no existe evidencia aún para *H. contortus* el cual, de acuerdo con Woolaston *et al.* (1992), después de 14 generaciones parasitarias no se pudo adaptar a ovejas seleccionadas como resistentes.

Aunque la mayoría de las investigaciones concuerdan en que no existe relación (o es cercana a cero), entre el grado de resistencia y ganancia de peso o producción de lana, se han notificado algunas asociaciones no favorables. Eady *et al.* (1994), observaron en borregos de la raza Romney que existe una ligera desventaja en la producción de lana en animales resistentes cuando pastorean junto con animales no resistentes; sin embargo en este trabajo no se consideró el beneficio epidemiológico de los animales resistentes sobre las praderas y, en consecuencia, sobre los animales menos resistentes.

Por otra parte, Charon *et al.* (1998), notificaron que en borregas de la raza Wrzosowka existe una relación negativa entre la eliminación de huevos en las heces y el peso de la lana ($r = -.29$). En corderos de la misma raza también observaron una relación negativa entre la eliminación de huevos y la ganancia de peso a los 10 y 12 meses de edad ($r = -.34$) y ($r = -.29$) respectivamente.

1.8. La raza Pelibuey

Al parecer en el decenio de 1930 -1940, procedentes de Cuba, se introdujeron a la península de Yucatán los primeros borregos Pelibuey (Mason, 1980). Posteriormente, se establecieron rebaños importantes en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Veracruz y Puebla (Cruz, 1992).

De sus características productivas destacan el porcentaje de partos múltiples (19 a 40%) y su ciclo estral no estacional. Por su rusticidad y adaptabilidad al calor y humedad, representan una opción en las zonas tropicales y subtropicales, donde es

más difícil el aprovechamiento de otras razas (Castillo, 1973; Cruz, 1992). Sin embargo, en estos climas es donde las parasitosis cobran mayor importancia, debido a que prevalecen las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para un rápido desarrollo de los nematodos y para que existan prolongados periodos de transmisión, por lo que requiere desparasitar con mayor frecuencia.

En México, los estudios sobre resistencia en el ganado ovino, han sido encaminados a comparar la respuesta a la infección de razas de lana y razas de pelo como la Pelibuey, que es una de las principales razas tropicales establecidas en el país (Díaz-Rivera *et al.*, 2000).

1.9. Hipótesis

En la raza Pelibuey existen individuos resistentes a la infección por *Haemonchus contortus*.

1.10. Objetivos

General

Establecer criterios confiables para Identificar corderos resistentes a la infección por *Haemonchus contortus*.

Particulares

- Evaluar el antihelmíntico más efectivo contra la población de *H. contortus* presente en el lugar de estudio.
- Valorar los niveles de eliminación de huevos, volumen celular aglomerado, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y ganancia de peso de corderos Pelibuey infectados artificialmente con *H. contortus* y bajo condiciones de infección natural con nematodos gastrointestinales.
- Determinar la diversidad, dinámica mensual y los periodos de mayor transmisión de nematodos gastrointestinales en el lugar de estudio, durante la infección natural.
- Medir las asociaciones entre cada una de las variables registradas, con resistencia a la infección artificial y natural con *H. contortus*.
- Tipificar alelos del complejo principal de histocompatibilidad ovino y evaluar su asociación con resistencia a *H. contortus*.

1.11. Estrategia general

El estudio se realizó en el predio “El Cenzontle” del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el municipio de Tlapacoyan, Veracruz (97°03' longitud oeste, 20°04' latitud norte). El clima es cálido húmedo con lluvias todo el año, la temperatura media anual es de 26.5 °C (13-40 °C) y la precipitación pluvial media de 1,840 mm. (García, 1981).

El rebaño consta de 300 borregas reproductoras de la raza Pelibuey, mantenidas bajo un sistema de pastoreo sobre praderas introducidas, principalmente con zacate Estrella Santo Domingo (*Cynodon nlemfuensis*).

Estudios anteriores demostraron que la zona es endémica de *H. contortus*) y sugirieron resistencia a los antihelmínticos (Badillo e Islas, 1994; Salas *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1999), lo que motivó que se verificara la efectividad de los antiparasitarios que se utilizarían en el presente estudio. Para lo cual, se midió la efectividad del levamisol y el sulfóxido de albendazol, 7 y 14 días postratamiento mediante la prueba de reducción de huevos en las heces (Coles *et al.*, 1992), en 56 corderos infectados artificialmente con un aislado de *H. contortus* del mismo rancho (Capítulo 2).

En el capítulo 3, se valoró la respuesta de 52 corderos a la infección artificial con 3,000 larvas de *H. contortus* cada uno. Semanalmente durante 42 días, se midió la eliminación de huevos (Hpgh), volumen celular aglomerado (VCA), proteínas plasmáticas (Pp), eosinófilos (Eos), anticuerpos (Abs) y ganancia de peso (GP). Considerando el promedio de eliminación de huevos al finalizar la infección artificial, se formaron dos grupos: resistente y susceptible, se determinaron las diferencias entre los grupos y se midieron las asociaciones entre las variables registradas.

Posteriormente, los mismos 52 animales se integraron a un rebaño (de machos o hembras) y se infectaron en forma natural con nematodos gastrointestinales. Cada 28 días, durante 1 año se determinó la eliminación de huevos, VCA, Pp, Eos, Abs y ganancia de peso. Al concluir la infección natural se formaron dos grupos: resistente y

susceptible, se determinaron las diferencias entre los grupos y se midieron las asociaciones entre las variables registradas (Capítulo 4).

Paralelamente, durante el periodo de la infección natural, se determinaron la diversidad y la dinámica mensual de los nematodos gastrointestinales; así como los periodos de mayor transmisión de estos parásitos en el rebaño, a través de la técnica de animales rastreadores (Vázquez y Nájera, 1986), sacrificados cada 28 días. (Capítulo 5).

En el capítulo 6, se tipificaron los alelos de 3 microsatélites (DRB1, DRB2, OMHCI) del complejo principal de histocompatibilidad ovino (MHC) y se midieron las asociaciones con eliminación de huevos, VCA, Pp, Eos, Abs y ganancia de peso en los dos tipos de infección.

Los resultados se compararon y discutieron en conjunto con el fin de identificar las variables más importantes a considerar en la selección de animales resistentes (Capítulo 7).

Los exámenes coprológicos y sanguíneos se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Parasitología de la FMVZ y en el Laboratorio de Sanidad del CEIEGT que se habilitó *ex profeso*.

La obtención de ADN, amplificación de los microsatélites y obtención de antígenos parasitarios se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ UNAM. La tipificación de los microsatélites del MHC se efectuó en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE).

Capítulo 2. Evaluación del antihelmíntico a utilizar

2.1. Introducción

La resistencia antihelmíntica ha sido definida como la habilidad individual y heredable de los nematodos, de sobrevivir a la dosis terapéutica de un antihelmíntico (Rowlands, 1989). Las primeras evidencias surgieron en 1957, cuando la fenotiacina falló en el control de *Haemonchus contortus* en un rebaño ovino. Para los años 1960 las notificaciones de fallas de los tratamientos involucraban al tiabendazol (Rowlands, 1993). Posteriormente se incluyeron antiparasitarios de nueva generación como la ivermectina, moxidectina y doramectina (Shoop *et al.*, 1993; Vermunt *et al.*, 1996).

En el mundo, *H. contortus* es uno de los nematodos que desarrolla rápidamente resistencia a los antihelmínticos, en tres años para el tiabendazol y en cuatro años para la ivermectina (Vieira *et al.*, 1992).

En México, *H. contortus* también es el principal nematodo involucrado en la resistencia a los antihelmínticos, concretamente a los bencimidazoles (Campos, 1990; Campos *et al.*, 1992; Negrete *et al.*, 1998; Salas *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1999). Por lo que es necesario verificar periódicamente la efectividad de los antihelmínticos que se utilicen regularmente.

En varias etapas de la presente investigación fue preciso que los animales estuvieran libres de nematodos, por lo que se requería de un antihelmíntico altamente efectivo, pero con un periodo de protección corto para no interferir demasiado con la reinfección natural en los potreros. El levamisol y el sulfóxido de albendazol protegen de una reinfección durante un tiempo muy corto (menos de 14 días) y suelen ser altamente efectivos (100%). No obstante, debido a la sospecha de resistencia a los antihelmínticos (Figueroa *et al.*, 1999), se decidió verificar su efectividad antes de utilizarlos en las desparasitaciones.

El objetivo de este experimento fue evaluar la efectividad del levamisol y sulfóxido de albendazol contra la población de *H. contortus* presente en el CEIEGT.

2.2. Material y métodos

Se utilizaron 56 borregos de la raza Pelibuey de 6 meses de edad, infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus* (Anexo I). Para evitar que se reinfectaran con nematodos, se alojaron en corrales elevados con piso de rejilla y se alimentaron con concentrado y avena henificada. Se les colectaron muestras de heces directamente del recto y se cuantificó la eliminación de huevos mediante la técnica de McMaster modificada (MAFF, 1986).

Con los animales que tuvieron eliminaciones de huevos iguales o mayores a 500 huevos por gramo de heces (hpgh), se formaron 3 grupos con similares promedios de eliminación ($p < 0.05$). Los animales de cada grupo se pesaron y desparasitaron de acuerdo al siguiente esquema.

El Grupo I ($n = 19$) fue desparasitado vía intramuscular con sulfóxido de albendazol^{*} a dosis de 5 mg/kg.

El Grupo II ($n = 19$) se desparasitó vía intramuscular con levamisol[†] a dosis de 7.5 mg/kg. En ambos casos, las dosis utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante.

El Grupo III ($n = 18$) permaneció como testigo y no recibió tratamiento.

Los días 7 y 14 después del tratamiento se colectaron heces y se calculó el porcentaje de reducción de huevos y el intervalo de confianza al 95%, de acuerdo con los lineamientos de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (Coles *et al.*, 1992)

2.3. Resultados y discusión

Por procedimiento, el día del tratamiento los tres grupos tuvieron en promedio eliminaciones de huevos similares (GI 2,297, GII 2,326 y GIII 2,322). Postratamiento (días 7 y 14) el grupo testigo tuvo los mayores promedios de eliminación (2,389 y 2,300), mientras que en el grupo tratado con levamisol se presentaron los menores promedios; 8 y 0 hpgh respectivamente. En el grupo tratado con sulfóxido de albendazol los promedios fueron 813 y 776 correspondientemente (Cuadro 2).

^{*} Pharma-Logic, Inc.

[†] Novartis.

En cuanto al porcentaje de animales positivos a huevos, el día cero todos los animales lo fueron. En el grupo testigo, 100% de los animales continuaron positivos hasta el día 14 postratamiento, en tanto que en el grupo tratado con levamisol, el día 14 se observó el menor porcentaje de positivos (8%) (Cuadro 3).

El sulfóxido de albendazol (GI) redujo la eliminación de huevos en las heces en 65.9% el día siete y 66.2% el día catorce, mientras que el levamisol (GII) lo hizo en 99.7% y 100% respectivamente (Cuadro 4).

El sulfóxido de albendazol no redujo significativamente la eliminación de huevos en las heces ni el número de animales positivos a diferencia del levamisol, lo que debe interpretarse como resistencia antihelmíntica.

De acuerdo con los lineamientos de la WAAVP, hay resistencia a los bencimidazoles o ivermectina cuando el porcentaje de reducción de huevos en las heces es inferior a 95% y el intervalo de confianza al 95% es inferior a 90%. Si solo se presenta alguno de estos dos criterios, se sospecha de resistencia (Coles *et al.*, 1992).

El análisis de los datos obtenidos en este trabajo, demuestran que la población de *H. contortus* presente en este rebaño es resistente al sulfóxido de albendazol y sensible al levamisol. Los resultados coinciden con un ensayo previo realizado en el mismo lugar con ovinos infectados naturalmente (Salas *et al.*, 1998; Figueroa *et al.*, 1999).

Por lo anterior, en las desparasitaciones contra nematodos gastrointestinales requeridas a lo largo de la presente investigación se utilizó el levamisol.

2.4 Cuadros

Cuadro 2. Promedio de huevos de *Haemonchus contortus* en ovinos tratados con Sulfóxido de albendazol y levamisol

Tratamiento	Día 0	Día 7	Día 14
S. de albendazol (I)	2,297 ±1,607	813 ±744	776 ±783
Levamisol (II)	2,326 ±1,458	8 ±19	0 ±0
Testigo	2,322 ±1,481	2,389 ±1,220	2,300 ±1,092

Promedio ± desviación estándar

Cuadro 3. Porcentaje de borregos positivos a *Haemonchus contortus* tratados con Sulfóxido de albendazol y levamisol

Tratamiento	n	Día 0	Día 7	Día 14
S. de albendazol	19	100	100	84
Levamisol	19	100	16	8
Testigo	18	100	100	100

Cuadro 4. Porcentaje de reducción de huevos de *Haemonchus contortus* en ovinos tratados con Sulfóxido de albendazol y levamisol

Tratamiento	% de reducción (IC*) día 7	% de reducción (IC*) Día 14
S. de albendazol	65.9 (44 – 79)	66.2 (13 – 70)
Levamisol	99.7 (99 – 100)	100 (100 – 100)

* IC intervalo de confianza al 95%

Capítulo 3. Infección artificial con *Haemonchus contortus*

3.1. Introducción

El número de huevos en las heces ha probado ser un buen criterio de selección para mejorar la resistencia a nematodos gastrointestinales, además de ser fácil de medir es más preciso que otros indicadores fisiológicos (como el número de eosinófilos o anticuerpos) y aunque indirecta, proporciona una medida de la cantidad de parásitos que podrían contaminar en un momento dado las praderas (Woolaston y Baker, 1996).

Como indicadores indirectos de la carga parasitaria, además de la eliminación de huevos, se han propuesto los niveles de eosinófilos, volumen celular aglomerado, anticuerpos específicos y marcadores genéticos como el tipo de hemoglobina, polimorfismos en genes del complejo principal de histocompatibilidad y de las interleucinas, que correlacionan en forma variable con la eliminación de huevos (Outteridge *et al.*, 1988; Douch y Outteridge, 1989; Schwaiger *et al.*, 1995; Doligalska *et al.*, 1999).

En el caso particular de *H. contortus*, Roberts y Swan (1981); Barger y Dash (1987); Bissett *et al.* (1992); Parker (1991); Woolaston y Piper (1996) han utilizado el volumen del paquete celular como un indicador del grado de resistencia.

El objetivo en este capítulo fue identificar corderos Pelibuey resistentes a una infección artificial con *Haemonchus contortus* y valorar su respuesta en cuanto a eliminación de huevos, VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y peso.

3.2 Material y métodos

Al destete (4-5 meses de edad), se obtuvieron muestras de heces y sangre de 62 corderos Pelibuey (35 hembras y 27 machos), se pesaron y desparasitaron* para eliminar por completo los nematodos y cestodos que pudieran albergar en ese momento en el tracto gastrointestinal. Para evitar una posible reinfección con nematodos gastrointestinales se alojaron bajo techo en corrales elevados, con piso de rejilla, en donde recibieron agua, forraje seco y alimento concentrado.

* Levamisol (7.5 mg/kg) + albendazol (10 mg/kg)

El día 10 después de la desparasitación se les colectaron heces para verificar que no eliminaran huevos de nematodos gastrointestinales. El día 14 postratamiento (día 0), 52 corderos (30 hembras y 22 machos) se infectaron cada uno con 3,000 larvas de tercer estadio de *Haemonchus contortus* * y 10 (5 hembras y 5 machos), permanecieron sin infectar para que sirvieran como grupo testigo negativo.

Los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 posinfección se recolectaron muestras de heces y sangre. Las heces se obtuvieron directamente del recto y en cada muestra se determinó el número de huevos por gramo mediante la técnica de McMaster modificada (MAFF, 1986).

La sangre se obtuvo de la vena yugular, en tubos estériles al vacío con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante. De cada muestra se determinó el volumen celular aglomerado mediante la técnica de microhematocrito (Jain, 1986); la concentración de proteínas plasmáticas mediante la técnica de refractómetro y cuenta directa de eosinófilos mediante la técnica de Hinkleman (Benjamín, 1988).

Se extrajo el suero y se determinó la producción de anticuerpos contra *H. contortus* mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) estandarizado con este objetivo (Anexo 2).

Formación de grupos

Los grupos testigos fueron establecidos desde el inicio del experimento, mientras que los resistentes y susceptibles se constituyeron al analizar los datos al finalizar la infección artificial.

Los promedios de eliminación de huevos se transformaron (Log_{10}), para homogenizar las varianzas y se introdujeron en el paquete estadístico JMP ver 4.02. (SAS Inc., 2000), para analizarlos por el método de conglomerados con restricción a dos grupos.

- **Resistentes.** Animales cuyo promedio de eliminación de huevos al finalizar la infección artificial fue menor que el promedio de los susceptibles. Constituidos por 10 machos (MR) y 12 hembras (HR), con promedios de eliminación de huevos de 608 ± 193 y 470 ± 179 respectivamente

* Las larvas se obtuvieron e inocularon de acuerdo al anexo 1

- **Susceptibles.** Animales que al concluir la infección artificial eliminaron en promedio más huevos que los resistentes. Conformados por; 12 machos (MR) y 18 hembras (HR), con promedios de eliminación de huevos de $1,940 \pm 480$ y $1,808 \pm 803$ respectivamente.
- **Testigos.** Formados por 5 machos (MT) y 5 hembras (HT). No se infectaron con *H. contortus*, pero se mantuvieron bajo las mismas condiciones de alojamiento y alimentación que los infectados. Sirvieron para comparar el efecto de la infección con *H. contortus* sobre VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y peso, y para determinar si había transmisión de nematodos en los corrales.

Una vez definidos los grupos, se determinó si existían diferencias en cuanto a VCA, concentración de proteínas plasmáticas, cuenta de eosinófilos, anticuerpos, peso y ganancia de peso, mediante análisis de varianza ($\alpha = 0.05$).

En aquellos casos en que se observó efecto, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa honesta de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Gill, 1978).

3.3 Resultados y discusión

Se identificaron como resistentes 42% de los animales; 12 hembras (HR) y 10 machos (MR), como susceptibles el 58%; 18 hembras (HS) y 12 machos (MS). El porcentaje de animales resistentes (42%) fue muy superior al 10 -20% estimado por Barger (1989) y Anderson y May (1985). Lo que indica, que posiblemente en el borrego Pelibuey los genes de resistencia a los nematodos han aumentado en frecuencia mediante, un proceso de selección natural, como sucedió con la raza Red Maasai (Baker, 1999).

Las hembras y machos testigo (HT y MT respectivamente), que no fueron infectados artificialmente con *H. contortus*, pero se mantuvieron en los corrales junto con animales infectados, no eliminaron huevos de nematodos en las heces, lo cual indica que bajo las condiciones de manejo en los corrales no hubo transmisión de nematodos.

En los grupos infectados la eliminación de huevos fue ascendente, llegando a los niveles más altos el día 42 posinfección (pi). Los animales resistentes tuvieron los promedios más bajos en todos los muestreos. Las HR iniciaron con una eliminación de 254 y finalizaron con 679 hpgh mientras que las HS tuvieron 839 y 2,811 hpgh respectivamente. En los machos sucedió algo similar, los resistentes tuvieron 230 al inicio y 1,015 hpgh al final, mientras que los susceptibles 883 y 3,233 hpgh correspondientemente (Figuras 1A, 1B).

Los promedios generales de eliminación de huevos fueron de 470 y 608 en HR y MR mientras que en HS y MS de 1,808 y 1,940 hpgh respectivamente (Cuadros 5 y 6).

El VCA promedio en HR, HS y MR se redujo paulatinamente hasta el día 28 pi y posteriormente se mantuvieron con poca variación dentro de los valores de referencia para la raza Pelibuey (24 a 50%, Larios *et al.*, 1976). En contraste, en los MS el VCA fue en descenso continuo y llegó a niveles por debajo de los valores de referencia en los días 28 y 42 pi (23.4 y 23.7% respectivamente) (Figuras 2A, 2B).

En promedio general, no se observaron diferencias estadísticas entre el VCA de HR (28.7%) y HS (28.0%), ni entre HR y HT (30.8%), pero si las hubo ($P < 0.05$) entre HS y HT. Entre MR (28.4%), MS (26.1%) y MT (28.5%) no se encontraron diferencias estadísticas (Cuadros 5 y 6).

La concentración de proteínas plasmáticas se ubicó dentro de los valores de referencia (de 6 a 8 g/d, Larios *et al.*, 1976) en todos los muestreos (Figuras 3A, 3B). En promedio general, se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre HS (6.3 g/dl) y HT (6.7 g/dl) y no se observaron entre MR (6.6 g/dl), MS (6.3 g/dl) y MT (6.7 g/dl) (Cuadros 5 y 6).

Desde el día cero los animales resistentes tuvieron mayores promedios de eosinófilos y los mantuvieron elevados pero, dentro de los valores de referencia (de 80 a 400 /ml, Larios *et al.*, 1976) en todos los muestreos. Los susceptibles al igual que los testigos tuvieron promedios bajos y no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos (Figuras 4A, 4B). En las hembras, en el promedio general se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre HR (199 /ml), HS (87 /ml) y HT (58 /ml). En los machos entre MR (204 /ml), MS (62 /ml) y MT (73 /ml) (Cuadros 5 y 6).

El incremento en el número de eosinófilos y anticuerpos circulantes, como respuesta a una infección por nematodos, es una situación frecuentemente reportada, particularmente cuando se trata de *H. contortus* o *Trichostrongylus colubriformis* (Douch y Outteridge, 1989; Gill, 1991; Budle *et al.*, 1992; Stear y Murray, 1994; Wanyangu *et al.*, 1997 y Hohenhaus *et al.*, 1998).

Sin embargo, aunque se ha demostrado que los eosinófilos en presencia de anticuerpos específicos inmovilizan y matan a las larvas infectantes *in vitro* (Rainbird *et al.*, 1998) y que los anticuerpos pueden tener un efecto directo sobre los parásitos al inactivar enzimas metabólicas vitales o participando en reacciones de hipersensibilidad (Gill *et al.*, 1993; Bottjer *et al.*, 1985; Miller, 1996), los estudios sobre su intervención en el caso de los estadios adultos no son definitivos (Gill *et al.*, 1993; Meeusen y Balic, 2000).

Respecto a los anticuerpos circulantes, en los grupos testigos no hubo gran variación en los valores de absorbancia (a 492 nm) a través de los muestreos, mientras que en los animales susceptibles se incrementa los días 7 y 14 y posteriormente se mantiene sin gran variación. En los animales resistentes la absorbancia aumenta conforme transcurre el tiempo de infección, particularmente en las hembras que llegan al pico máximo el día 35 (0.595 D.O) (Figuras 5A, 5B). En el promedio general, las HR (0.426 D.O) fueron diferentes estadísticamente ($P < 0.05$) a HS (0.317 D.O) y HT (0.206 D.O), no se encontraron diferencias entre HS y HT. Entre los MR (0.397 D.O), MS (0.262 D.O) y MT (0.180 D.O) se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), (Cuadros 5 y 6).

En todos los grupos el peso se incremento en cada muestreo (Figuras 6A, 6B). De las hembras, las HR (25.1Kg) tuvieron el mayor peso promedio y las HT (22.3Kg) el menor, pero las diferencias no son estadísticamente significativas. En cuanto a los machos, los MT (29.2Kg) registraron los mayores pesos, seguidos de los MS (28.1Kg) y por último los MR (27.6Kg); pero al igual que en las hembras, las diferencias no son estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias estadísticas en ganancia de peso (Cuadros 5 y 6).

Tanto hembras como machos resistentes tuvieron mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos que los susceptibles, resultados que coinciden en lo general con los de Budle *et al.* (1992), Stear y Murray (1994) y Eady (1995).

No se detectaron diferencias estadísticas en cuanto a peso y ganancia de peso entre animales resistentes, susceptibles y testigos. Lo que contradice en parte, las observaciones sobre el efecto negativo que tiene *H. contortus* en el peso. Sin embargo, el VCA y la concentración de proteínas plasmáticas si disminuyeron, sobretodo en los grupos susceptibles.

Posiblemente la dosis de 3,000 L3 no fue suficiente para causar un fuerte impacto en estos parámetros o dentro de los grupos resistentes y susceptibles existen animales "resilientes". Para maximizar las diferencias entre los grupos se recomienda elevar la dosis infectante.

Se concluye que bajo las condiciones de alojamiento y manejo de los corderos no hubo transmisión de nematodos en los corrales y que los animales resistentes tuvieron mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos que los susceptibles.

3.4 Figuras y Cuadros

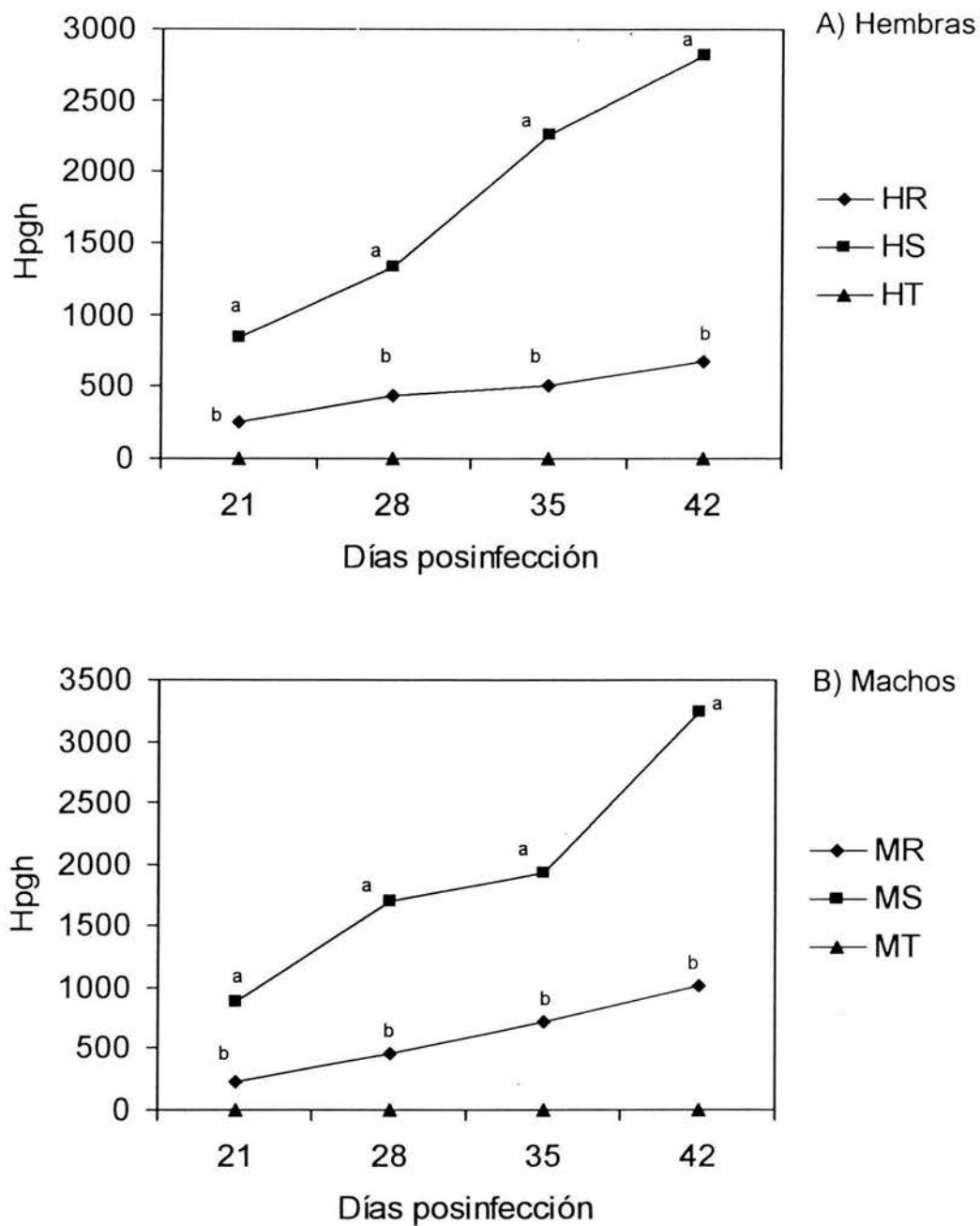


Figura 1. Promedio de eliminación de huevos en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *H. contortus*.

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. Hpgh =huevos por gramo de heces. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

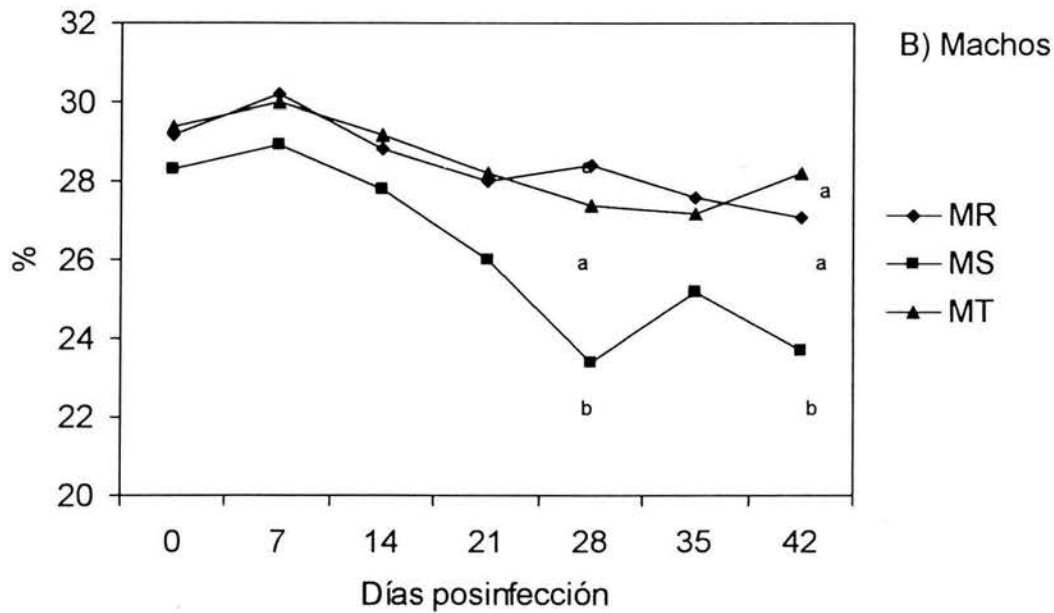
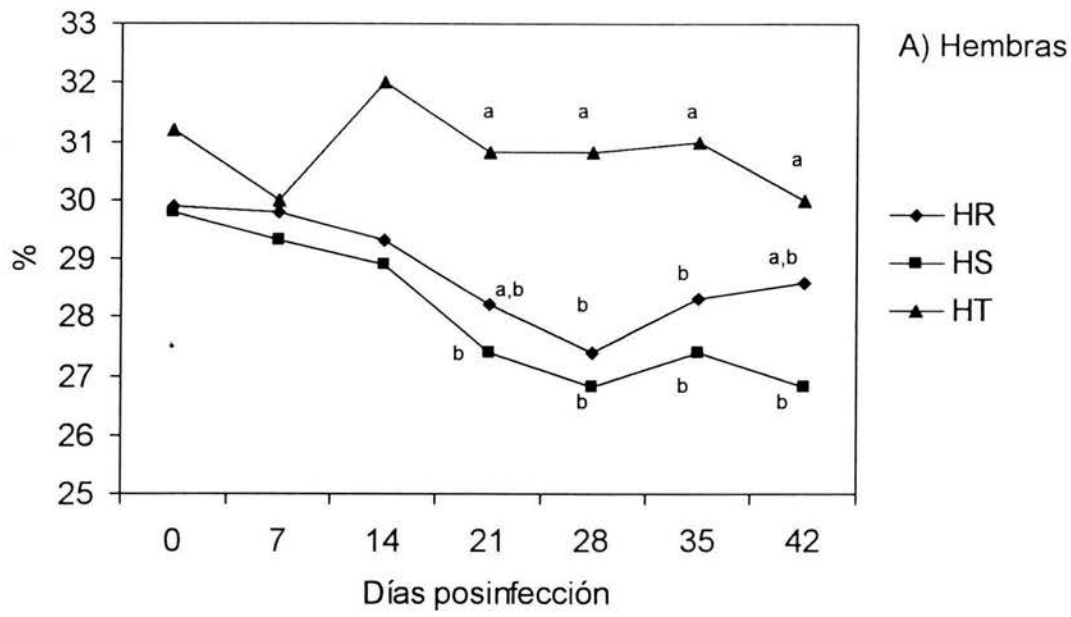


Figura 2. Promedio del volumen celular aglomerado en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*.

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

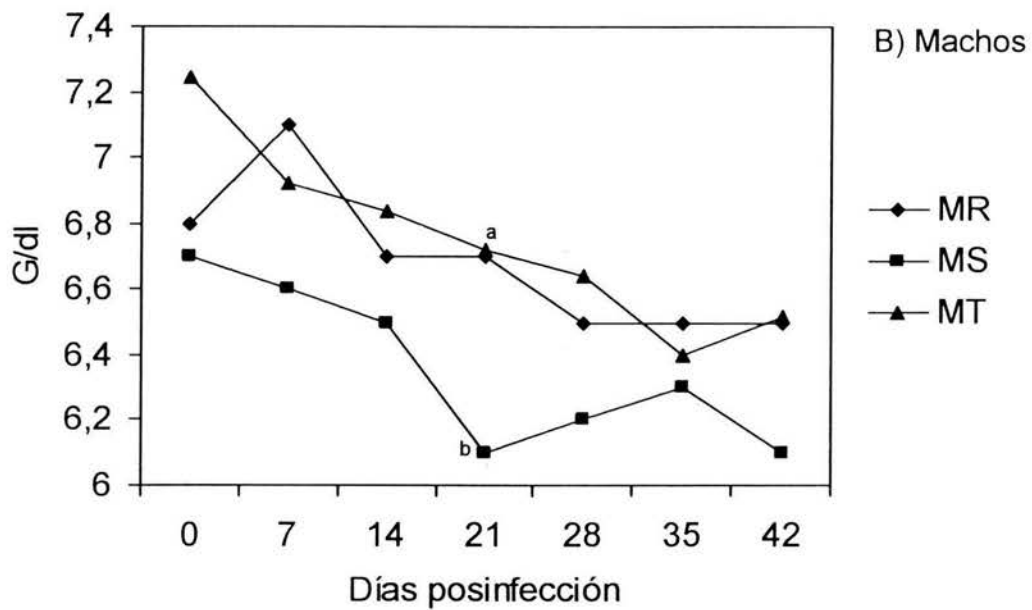
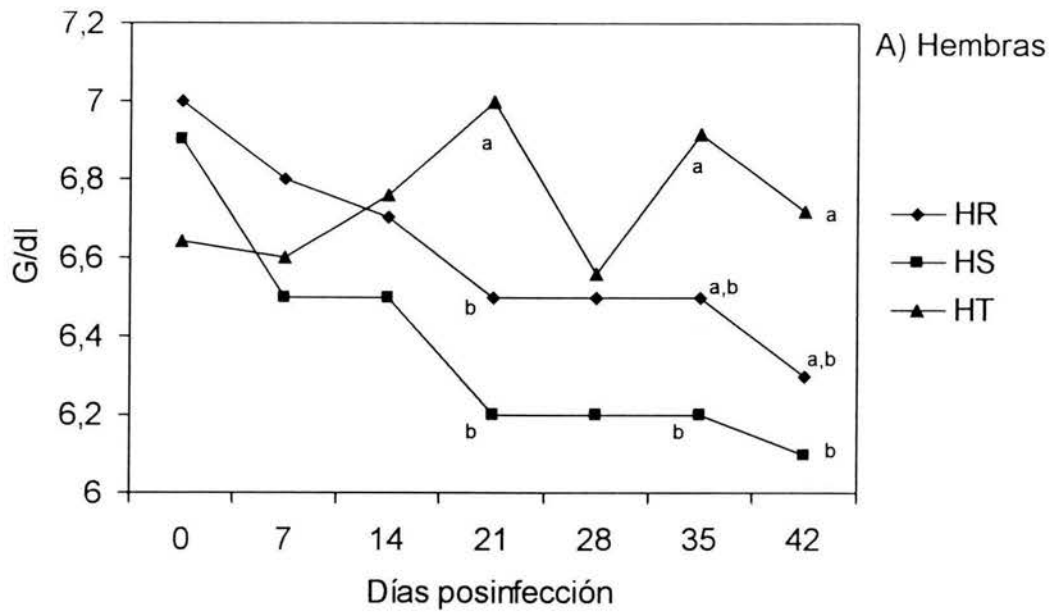


Figura 3. Promedio de la concentración de proteínas plasmáticas en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*.

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. G/dl =Gramos por decilitro. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

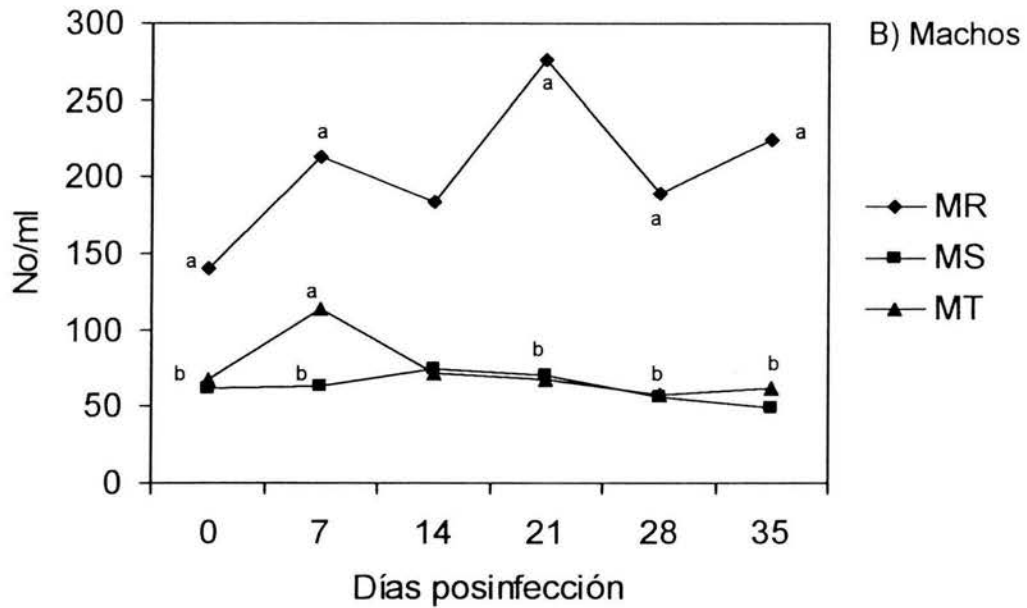
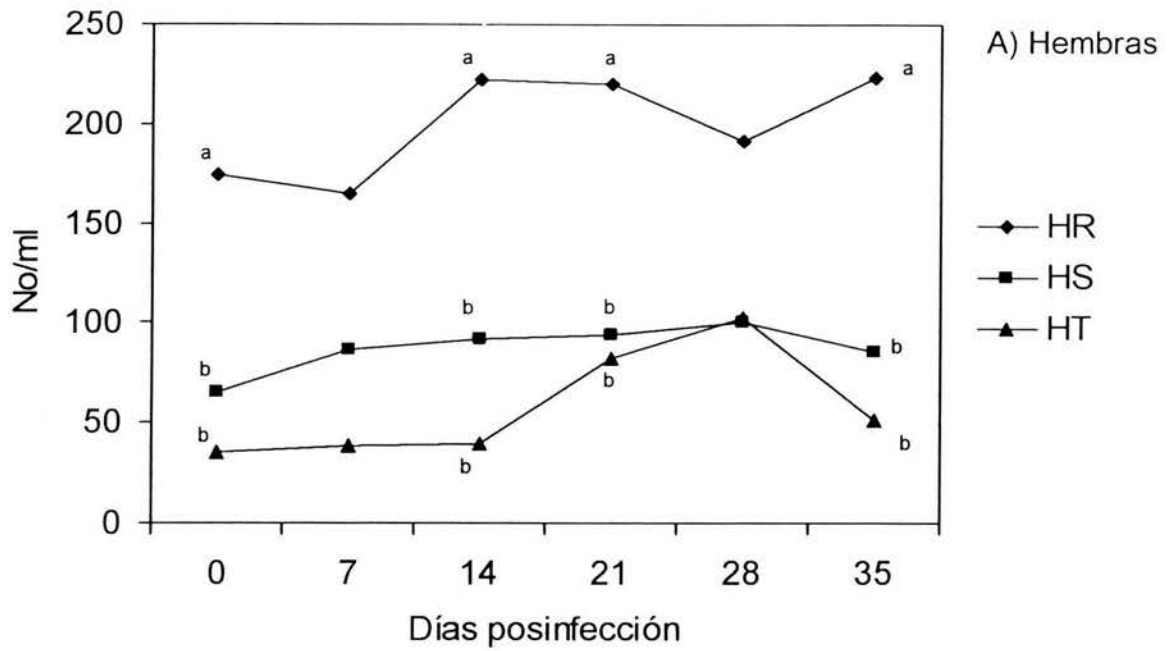


Figura 4. Promedio del número de eosinófilos en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

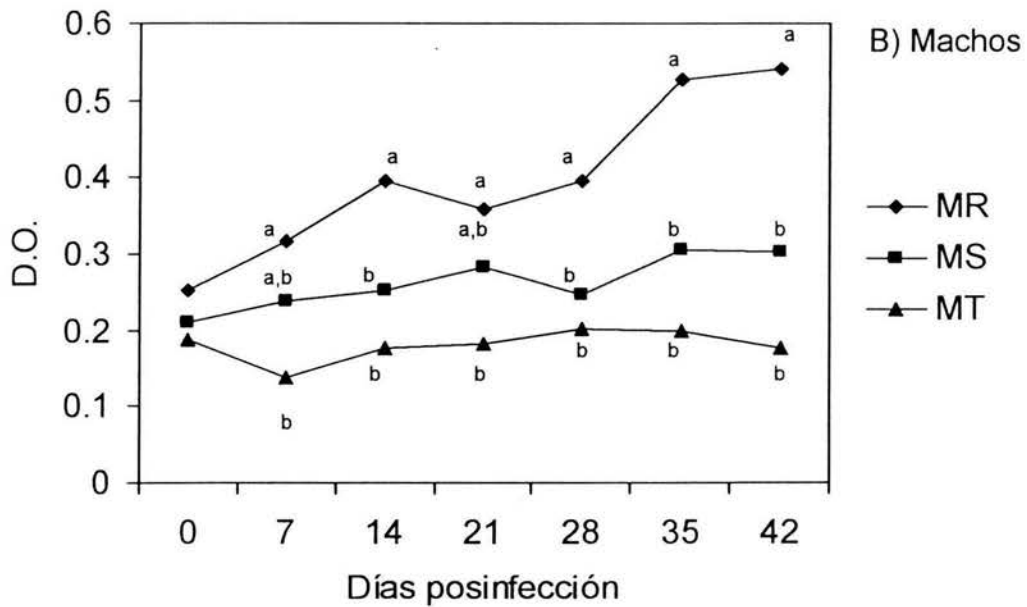
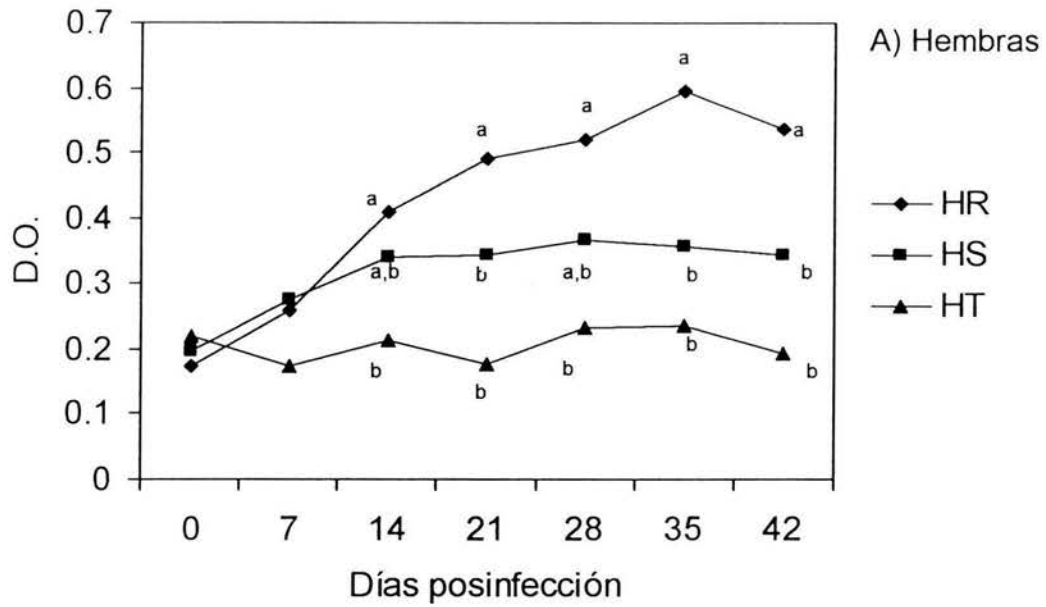


Figura 5. Promedio de niveles de anticuerpos en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. D.O. = Densidad óptica. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

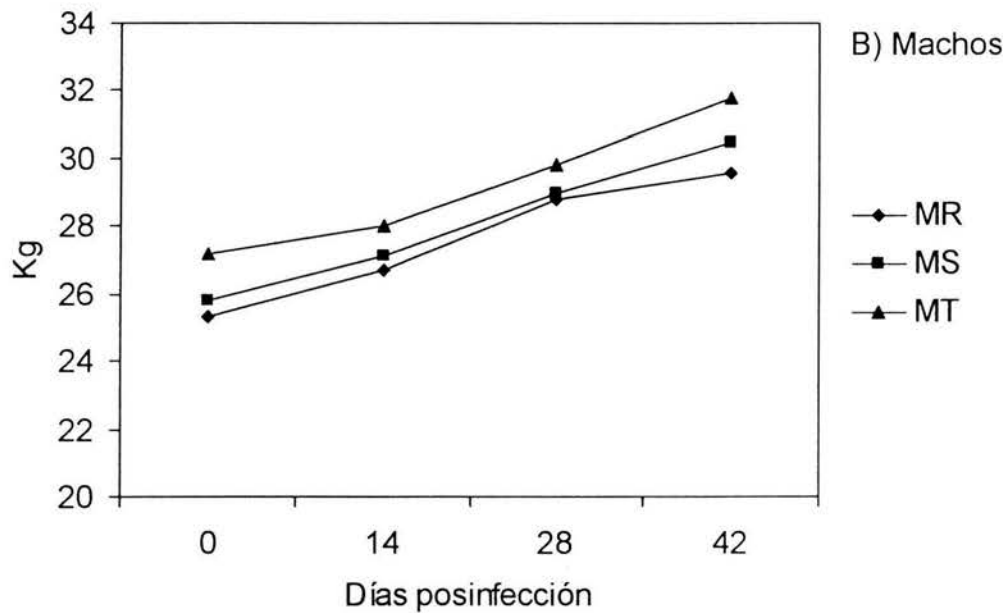
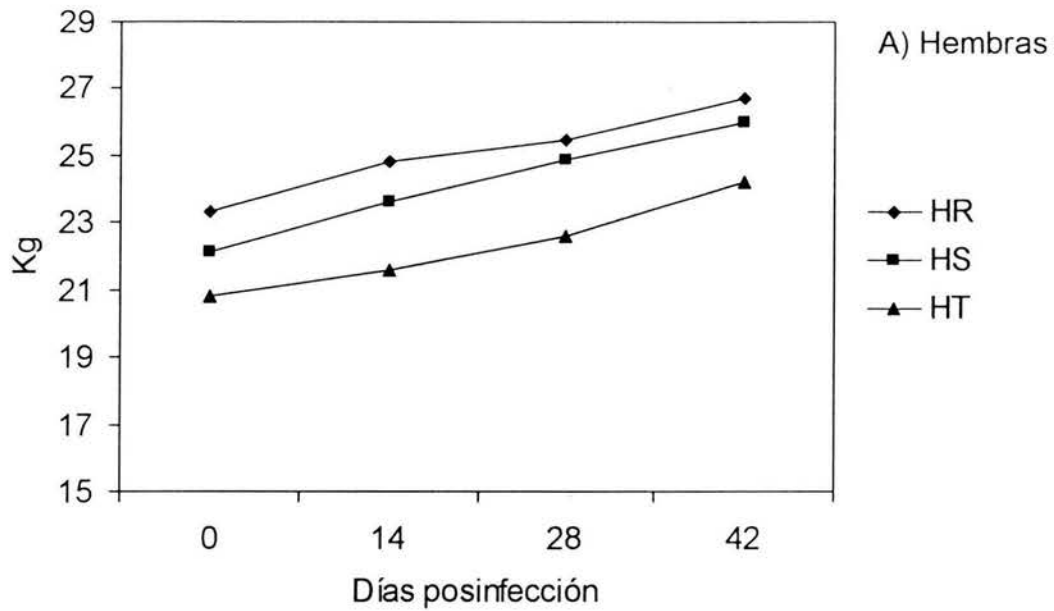


Figura 6. Promedio de peso corporal en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Promedios generales de los parámetros evaluados en corderas infectadas artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*

Grupo	Hpgg	VCA (%)	Proteínas plasmáticas (g/dl)	Eosinófilos (No./ml)	Anticuerpos (D.O)	Peso (kg)	Ganancia de peso (kg)
HR (n 12)	470 ^a ±179	28.7 ^{a,b} ±1.9	6.6 ^{a,b} ±0.2	199 ^a ±120	0.426 ^a ±0.160	25.1 ^a ±2.8	3.9 ^a ±1.1
HS (n 18)	1,808 ^b ±803	28.0 ^b ±1.9	6.3 ^a ±0.3	87 ^b ±60	0.317 ^b ±0.079	24.1 ^a ±2.5	3.3 ^a ±1.1
HT (n 5)	0 ^c ±0	30.8 ^b ±1.6	6.7 ^b ±0.4	58 ^b ±7	0.206 ^b ±0.007	22.3 ^a ±1.3	3.4 ^a ±0.5

Promedio general ±desviación estándar. Hpgg =huevos por gramo de heces. VCA =Volumen celular aglomerado. D.O =Densidad óptica
 HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo.
 Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Cuadro 6. Promedios generales de los parámetros evaluados en corderos infectados artificialmente con 3,000 larvas de *Haemonchus contortus*

Grupo	Hpggh	VCA (%)	Proteínas plasmáticas (g/dl)	Eosinófilos (No./ml)	Anticuerpos (D.O)	Peso (kg)	Ganancia de peso (kg)
MR (n 10)	608 ^a ±193	28.4 ^a ±2.6	6.6 ^a ±0.4	204 ^a ±101	0.397 ^a ±0.066	27.6 ^a ±2.3	4.3 ^a ±1.4
MS (n 12)	1,940 ^b ±480	26.1 ^a ±1.6	6.3 ^a ±0.4	62 ^b ±21	0.262 ^b ±0.562	28.1 ^a ±3.6	4.7 ^a ±0.8
MT (n 5)	0 ^c ±0	28.5 ^a ±1.8	6.7 ^a ±0.1	73 ^b ±20	0.180 ^c ±0.007	29.2 ^a ±0.9	4.6 ^a ±1.1

Promedio general ±desviación estándar. Hpggh =huevos por gramo de heces. VCA =Volumen celular aglomerado. D.O =Densidad óptica.

MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo.

Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Capítulo 4. Infección natural con nematodos gastrointestinales

4.1. Introducción

En los distintos rebaños resistentes a nematodos que existen en el mundo, la selección se basó en la respuesta de los animales a infecciones de tipo natural o artificial. Sin embargo, el valor potencial de los genes de resistencia a nematodos gastrointestinales en la industria ovina, depende de su expresión bajo condiciones comerciales de explotación, que la mayoría de las veces es en pastoreo (Gray *et al.*, 1992).

Durante la infección natural con nematodos, intervienen factores que influyen en la expresión de la resistencia y que en una infección artificial se controlan, como son la cantidad y estado de desarrollo de las larvas ingeridas y los hábitos de pastoreo. Este último se sospecha tiene también un componente genético (Eady, 1995).

Aún no se define cual es el tipo de infección más efectivo, posiblemente en cada una actúe un grupo de genes distinto, no obstante, debe existir correspondencia entre ambas infecciones (Woolaston y Eady, 1995; Eady, 1995).

El objetivo de este estudio fue identificar corderos resistentes a *H. contortus* bajo condiciones de pastoreo y valorar su respuesta en cuanto a VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y peso.

4.2. Material y métodos

Se utilizaron (previa desparasitación) los mismos 52 corderos que fueron infectados artificialmente. Los machos se unieron al rebaño de sementales y las hembras al rebaño de reproductoras. Ambos rebaños pastaron en potreros diferentes y recibieron distinto manejo, excepto los días en que se colectaban las muestras.

Cada 28 días durante un año, todos los animales se pesaron y se les colectaron muestras fecales y sanguíneas para observar su respuesta a la infección natural en cuanto a: número de huevos de nematodos gastrointestinales eliminados en las heces, volumen celular aglomerado, proteínas plasmáticas, eosinófilos y ganancia de peso

Las heces se obtuvieron directamente del recto y en cada muestra se determinó el número de huevos por gramo mediante la técnica de McMaster modificada (MAFF, 1986).

La sangre se obtuvo de la vena yugular, en tubos estériles al vacío con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante. De cada muestra se determinó el volumen celular aglomerado mediante la técnica de microhematocrito (Jain, 1986); la concentración de proteínas plasmáticas mediante la técnica de refractómetro y cuenta directa de eosinófilos mediante la técnica de Hinkleman (Benjamín, 1988).

Se extrajo el suero y se determinó la producción de anticuerpos contra *H. contortus* mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) estandarizado con este objetivo (Anexo 2).

Durante el año, los machos recibieron 4 desparasitaciones (enero, julio, noviembre y diciembre), mientras que las hembras se desparasitaron 5 veces (enero, febrero, agosto, octubre y noviembre). La aplicación de los tratamientos se hizo siguiendo el esquema de desparasitación del rancho.

Formación de grupos

Los promedios de eliminación de huevos se transformaron (Log_{10}), para homogenizar las varianzas y se introdujeron en el paquete estadístico JMP ver 4.02. (SAS Inc., 2000), para su análisis por el método de conglomerados con restricción a dos grupos.

- **Resistentes.** Animales cuyo promedio de eliminación de huevos en la infección natural fue menor que su contraparte susceptible. Constituidos por; 13 machos (MR) y 10 hembras (HR) y con promedios de eliminación de huevos de 558 ± 198 y 236 ± 79 respectivamente.
- **Susceptibles.** Animales cuyo promedio de eliminación de huevos en la infección natural fue mayor que el promedio de su contraparte resistente. Conformados por; 9 Machos (MS) y 20 hembras (HS), con promedios de eliminación de huevos de 1602 ± 557 y 863 ± 414 correspondientemente.

- **Testigos.** Los mismos que en la infección artificial. Se mantuvieron bajo las mismas condiciones de pastoreo y alimentación que el rebaño de hembras o sementales, según el sexo. Sirvieron para determinar si la infección artificial tuvo algún efecto protector a las reinfecciones naturales.

Una vez definidos los grupos, se determinó si existían diferencias en cuanto a % de VCA, concentración de proteínas plasmáticas, cuenta de eosinófilos, anticuerpos, peso y ganancia de peso, mediante análisis de varianza ($\alpha = 0.05$).

En aquellos casos en que se observó efecto, las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa honesta de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Gill, 1978).

4.3. Resultados y discusión

Veintitrés animales (44%) se clasificaron como resistentes (13 machos y 10 hembras) y 29 (56%) como susceptibles (9 machos y 20 hembras). El porcentaje de resistentes fue muy superior al 10 a 20%, estimado por Barger, (1989) y Anderson y May, 1985.

Los promedios mensuales de eliminación de huevos en los MR no sobrepasaron los 1,000 hpgh y en las HR fueron siempre inferiores a 500 hpgh. Los animales susceptibles tuvieron las mayores cuentas, de diciembre a agosto los MS y de julio a octubre las HS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre HR y HS de mayo a agosto y en octubre. Entre MR y MS las diferencias se detectaron de marzo a agosto. Los grupos testigo (HT y MT), tuvieron eliminaciones de huevos similares a las de los grupos susceptibles (Figuras 7A, 7B).

En promedio general, los grupos resistentes eliminaron menos huevos que los susceptibles (HR 236 y HS 863 hpgh) (MR 558 y MS 1,602 hpgh) (Cuadros 7 y 8).

La dinámica de eliminación de huevos fue diferente en machos y hembras, mientras en los machos la máxima eliminación ocurrió en abril (MS 2,800 hpgh), en las hembras se presentó en agosto (HS 2,061 hpgh), estas diferencias pueden explicarse por el distinto manejo que recibieron, a que pastaron en diferentes potreros y se desparasitaron en distintas fechas.

Los valores del VCA en HR y MR fluctuaron dentro del rango de referencia para la raza Pelibuey (24 a 50%). Los valores más bajos en las HS se registraron de mayo a agosto, pero particularmente en julio (22.8%) y agosto (22.3%) estuvieron por debajo de los de referencia, sólo se encontraron diferencias estadísticas en mayo y agosto, coincidiendo con los mayores valores de eliminación de huevos. En MS durante febrero, marzo y mayo tuvieron bajos porcentajes, pero de junio a diciembre mostraron niveles altos (Figuras 8A, 8B). El promedio general de VCA más alto fue el de MS (27.1%), seguido por MR (26.9%) y HR (26.5%), el más bajo fue el de HS (24.8%), sin embargo las diferencias entre los grupos, dentro de cada sexo, no son estadísticamente significativas (Cuadros 7 y 8).

Los valores de proteínas plasmáticas también fluctuaron dentro del rango de referencia para la raza Pelibuey (6 a 8 g/dl), únicamente se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.5$) en agosto en las hembras y en marzo y septiembre en los machos. En la mayoría de las observaciones los MR tuvieron los valores más altos (Figuras 9A, 9B) y su promedio general (7.0 g/dl) fue estadísticamente diferente a los MS (6.7 g/dl). No se encontraron diferencias estadísticas entre HR (6.9 g/dl) y HS (6.8 g/dl) (Cuadros 7 y 8).

Los mayores promedios de eosinófilos se registraron de marzo a mayo en los grupos resistentes, posteriormente descienden pero se mantienen por encima de los susceptibles. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas de marzo a julio entre las hembras y en abril y mayo entre los machos (Figura 10A, 10B). En promedio general se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre HR (489 /ml) y HS (288 /ml) y entre MR (438 /ml) y MS (300 /ml) (Cuadros 7 y 8).

Las lecturas de absorbancia para detección de anticuerpos (a 492nm) fueron notablemente mayores en las HR, mientras que las más bajas se observaron en los MS (Figuras 11A, 11B). En promedio general se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre HR (0.782 D.O) y HS (0.534 D.O), también entre MR (0.595 D.O) y MS (0.442 D.O) (Cuadros 7 y 8).

El peso en los machos fue siempre en ascenso, mientras que en las hembras se incrementa hasta abril y después se mantiene con poca variación. Los MR registraron los mayores pesos (Figuras 12A, 12B), no obstante su promedio general (46.3kg) no

difiere estadísticamente del promedio de los MS (44.3kg). Las HS tuvieron mayores pesos que las HR, pero en promedio general (HS 33.6 y HR 32.3kg) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tampoco las hubo en ganancia de peso (Cuadros 7 y 8).

En general los animales resistentes tuvieron significativamente, menor eliminación de huevos y mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos que los susceptibles. No se observaron diferencias estadísticas en cuanto a volumen celular aglomerado, hematocrito, peso y ganancia de peso.

4.3. Figuras y Cuadros

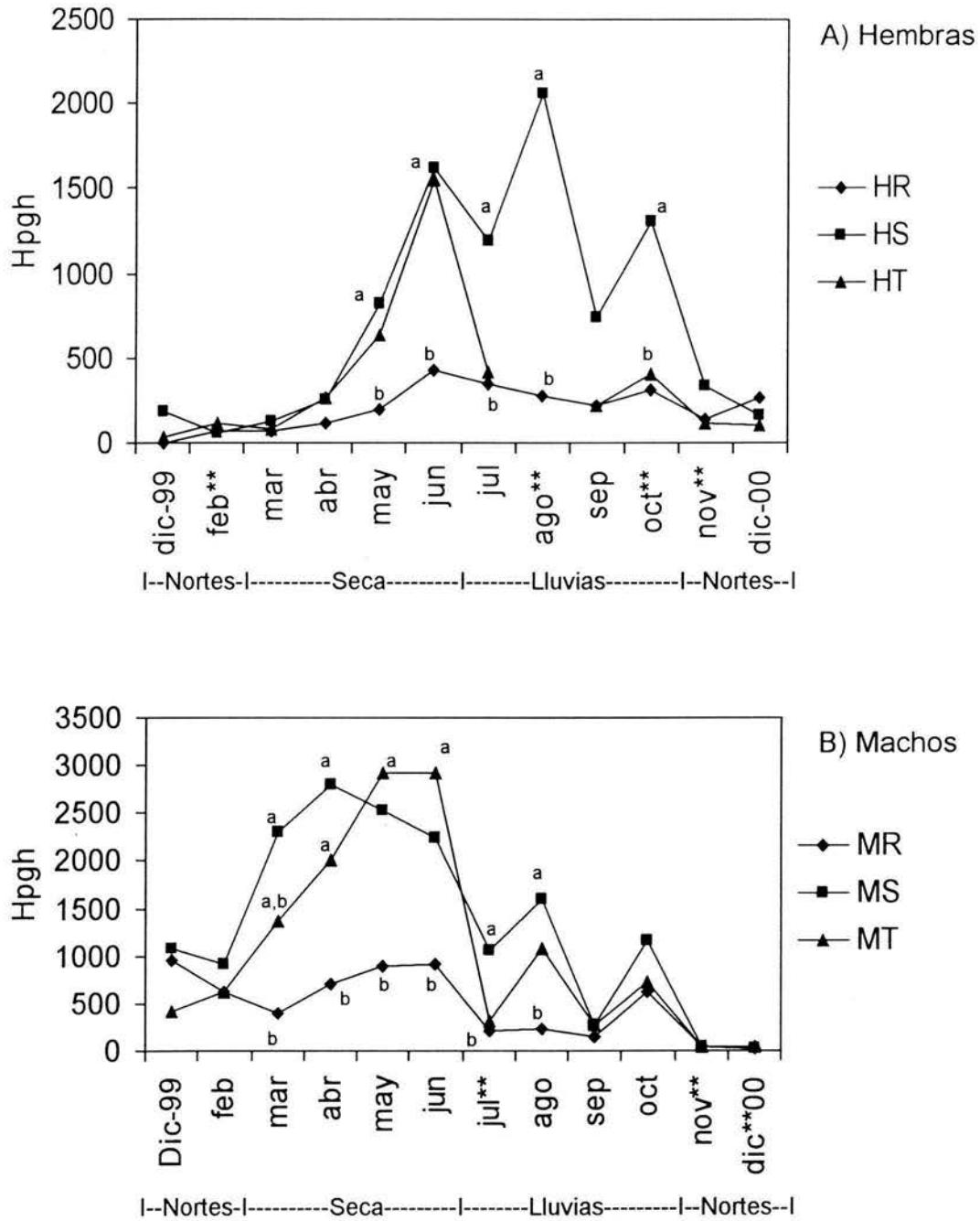


Figura 7. Promedio de eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en ovinos durante la infección natural.

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. Hpgh =Huevos por gramo de heces. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

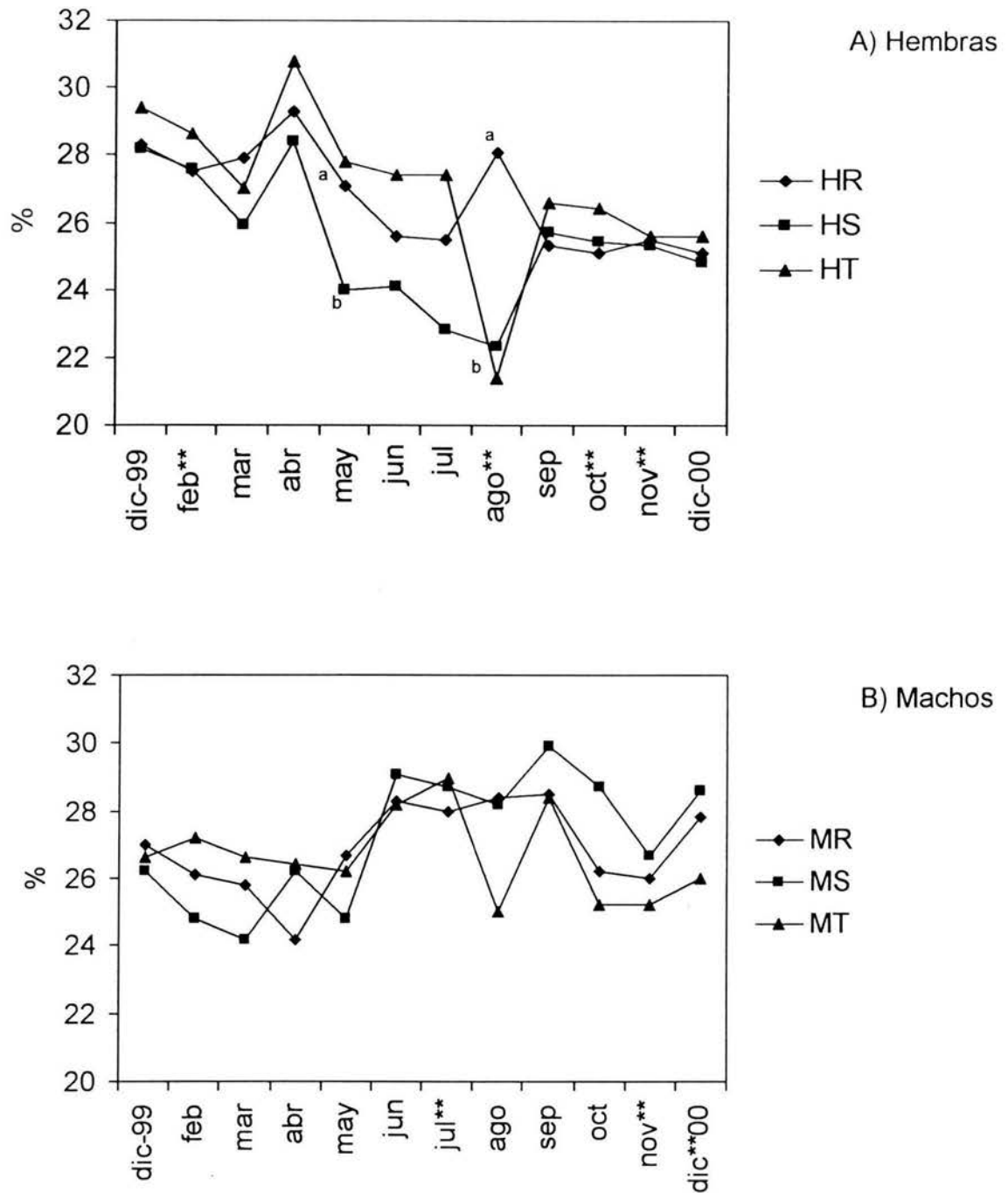


Figura 8. Promedio del volumen celular aglomerado en borregos durante la infección natural con nematodos gastrointestinales

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

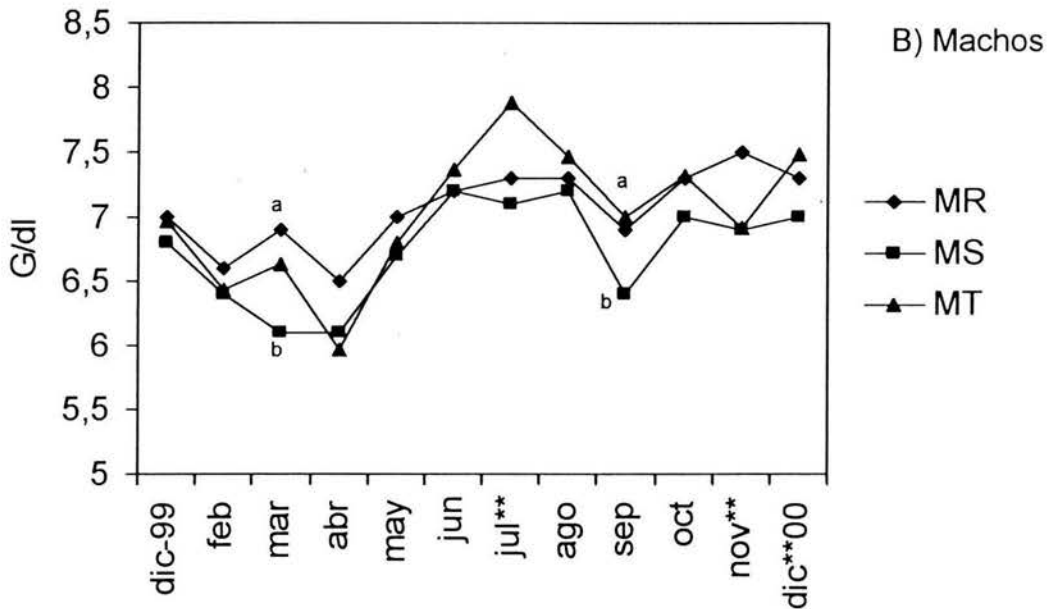
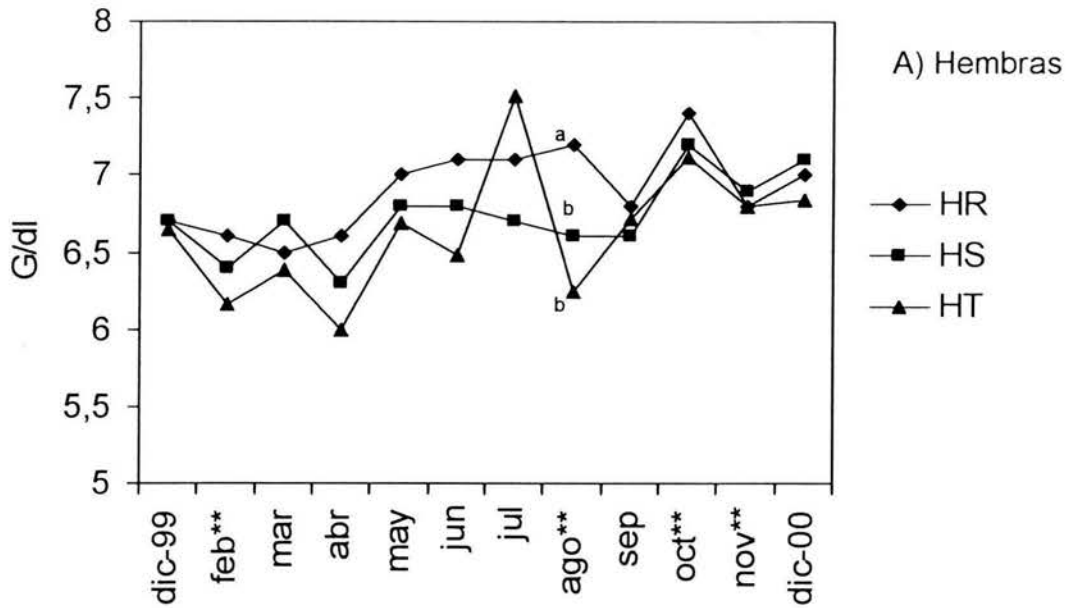


Figura 9. Promedio de la concentración de proteínas plasmáticas en borregos durante la infección natural con nematodos gastrointestinales

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. G/dl =gramos por decilitro. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

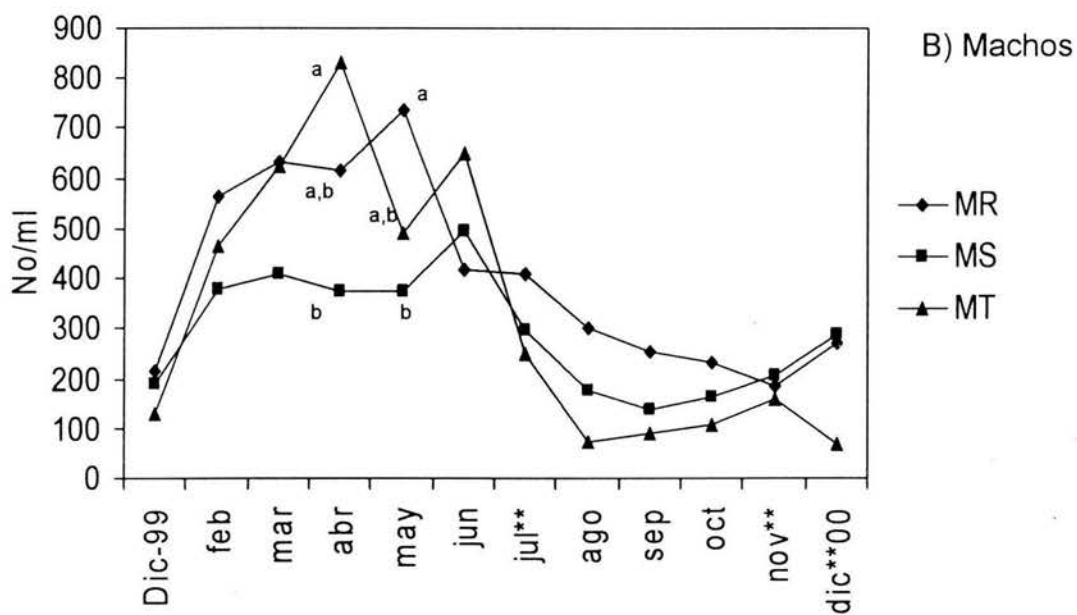
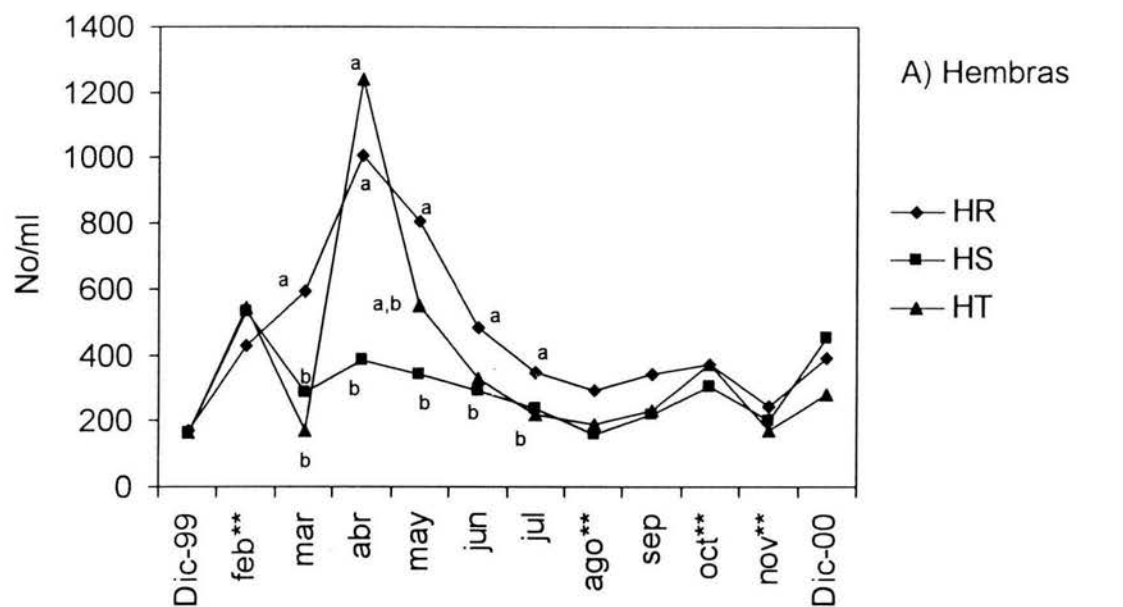


Figura 10. Promedio del número de eosinófilos en borregos durante la infección natural con nematodos gastrointestinales

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

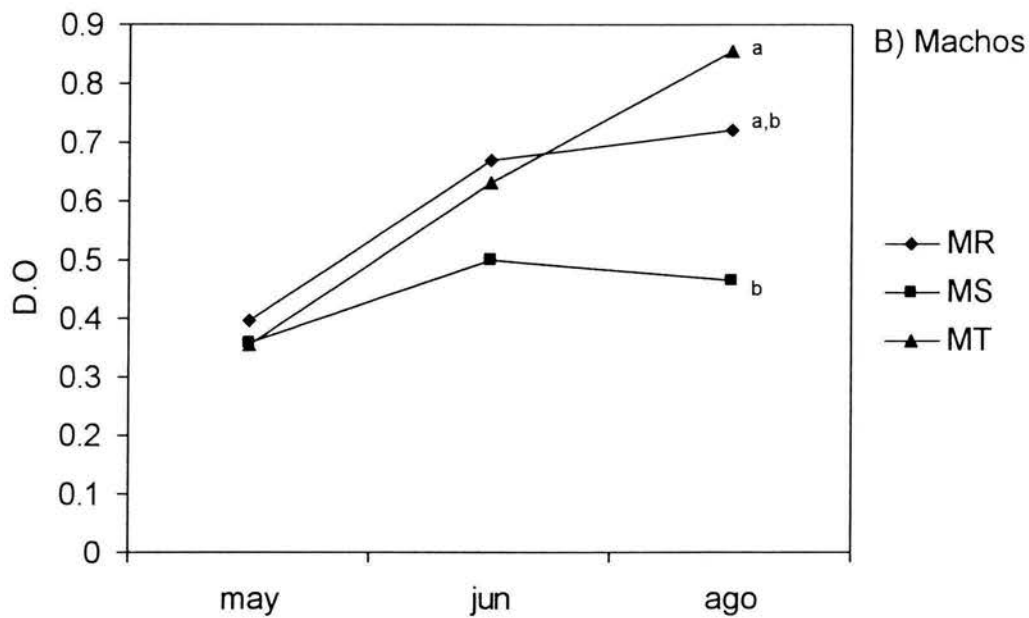
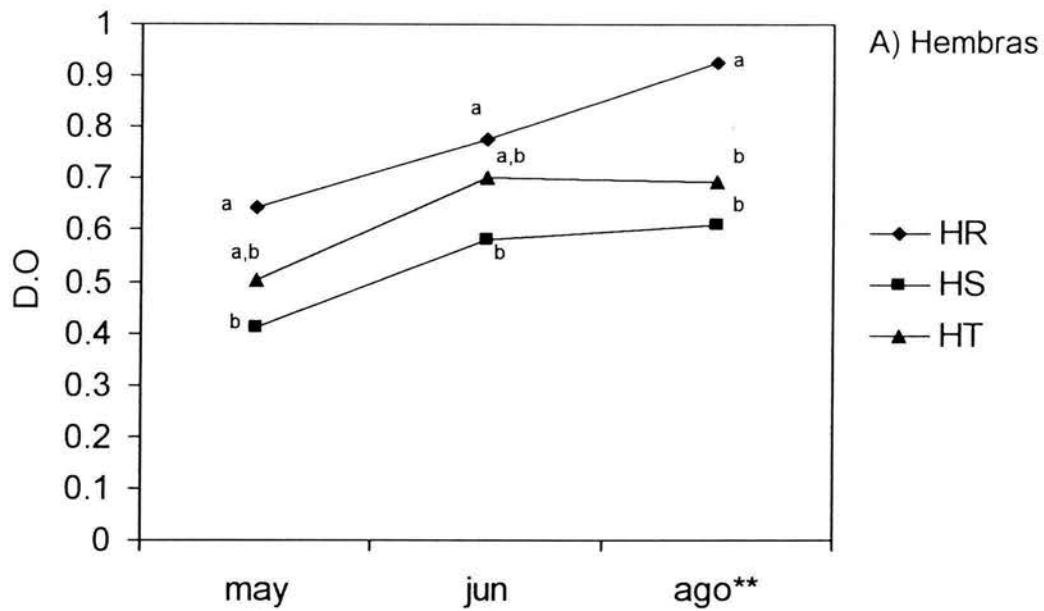


Figura 11. Promedio del nivel de anticuerpos en borregos durante la infección natural con nematodos gastrointestinales

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. D.O =Densidad óptica. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

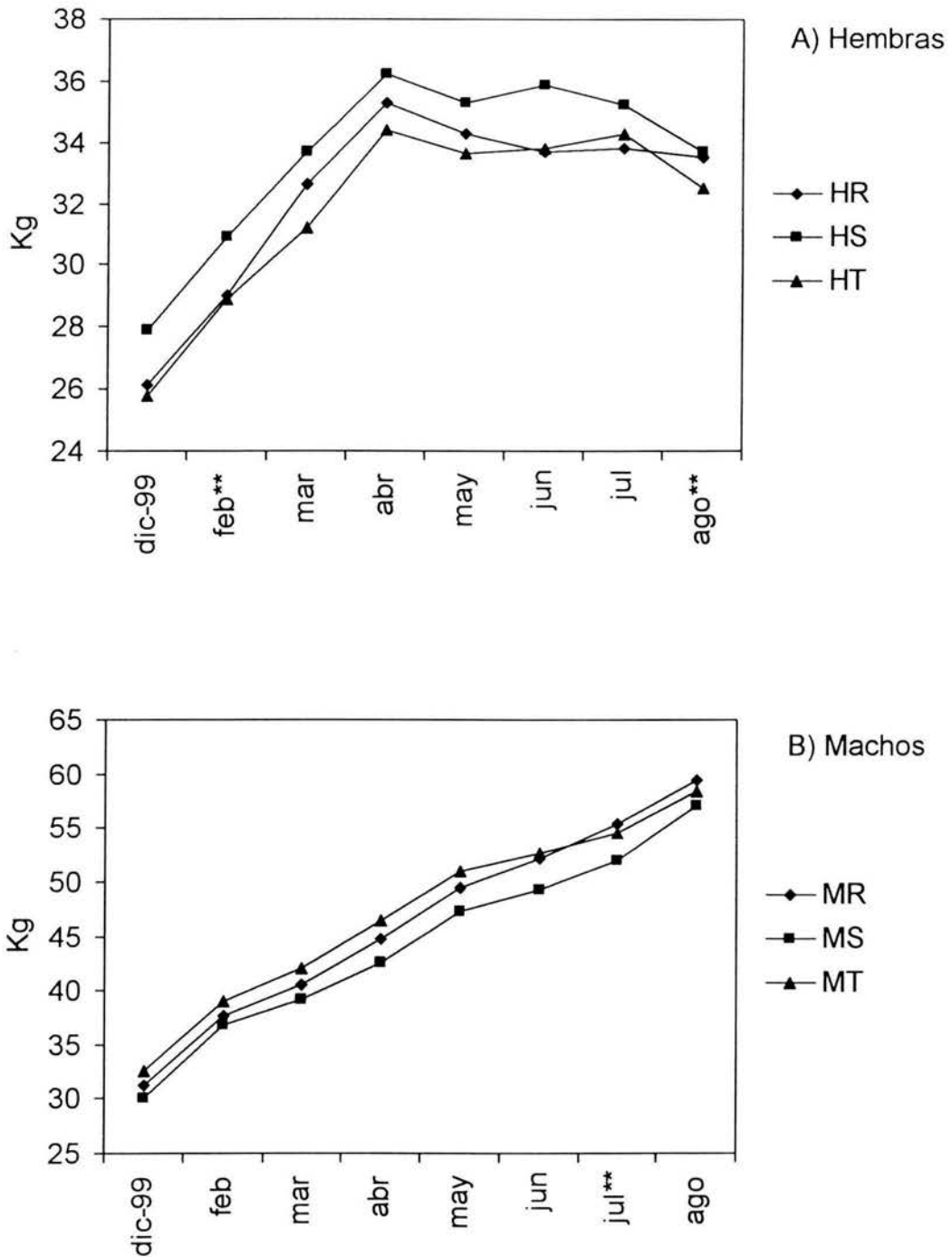


Figura 12. Promedio de peso corporal en borregos durante la infección natural con nematodos gastrointestinales

HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo, MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo. ** Desparasitación. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Promedios generales de los parámetros evaluados en ovejas infectadas naturalmente con nematodos gastrointestinales

Grupo	Hpgh	VCA (%)	Proteínas plasmáticas (g/dl)	Eosinófilos (No./ml)	Anticuerpos (D.O)	Peso (kg)	Ganancia de peso (kg)
HR (n 10)	236 ^a ±79	26.5 ^a ±1.5	6.9 ^a ±0.3	489 ^a ±153	0.782 ^a ±0.111	32.3 ^a ±3.6	7.7 ^a ±2.2
HS (n 20)	863 ^b ±414	24.8 ^a ±1.7	6.8 ^a ±0.3	288 ^b ±74	0.534 ^b ±0.097	33.6 ^a ±3.4	7.2 ^a ±3.3
HT (n 5)	1,088 ^b ±1127	26.8 ^a ±0.9	6.6 ^a ±0.4	392 ^{a,b} ±115	0.632 ^a ±0.100	31.3 ^a ±1.0	8.3 ^a ±2.0

Promedio general ±desviación estándar. Hpgh =huevos por gramo de heces. VCA =Volumen celular aglomerado. D.O =Densidad óptica
 HR =Hembras resistentes, HS =Hembras susceptibles, HT =Hembras testigo.
 Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Cuadro 8. Promedios generales de los parámetros evaluados en borregos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales

Grupo	Hpgh	VCA (%)	Proteínas plasmáticas (g/dl)	Eosinófilos (No./ml)	Anticuerpos (D.O)	Peso (kg)	Ganancia de peso (kg)
MR (n 13)	558 ^a ±198	26.9 ^a ±1.6	7.0 ^a ±0.3	438 ^a ±167	0.595 ^a ±0.155	46.3 ^a ±4.0	28.7 ^a ±4.2
MS (n 9)	1,602 ^b ±557	27.1 ^a ±2.0	6.7 ^a ±0.2	300 ^b ±120	0.442 ^b ±0.025	44.3 ^a ±4.2	27.8 ^a ±3.8
MT (n 5)	1,150 ^b ±796	26.6 ^a ±0.5	6.9 ^a ±0.3	371 ^{a,b} ±186	0.613 ^a ±0.105	42.6 ^a ±3.1	26.6 ^a ±6.9

Promedio general ±desviación estándar. Hpgh =huevos por gramo de heces. VCA =Volumen celular aglomerado. D.O =Densidad óptica
 MR =Machos resistentes, MS =Machos susceptibles, MT =Machos testigo.
 Distintas literales denotan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Capitulo 5. Dinámica mensual de nematodos gastrointestinales adultos en borregos rastreadores

5.1. Introducción

Existe una estrecha relación entre el clima y la incidencia de nematodosis gastrointestinales, debido a que el desarrollo y supervivencia de las larvas en los pastos depende en gran medida de la temperatura y humedad (Vázquez, 1985).

En la región donde se realizó el presente estudio, se distinguen 3 épocas climáticas: la de "nortes" (fría y húmeda) de noviembre a febrero; periodo de seca o menor precipitación (cálida y seca) de marzo a junio; y una temporada de lluvias o de mayor precipitación (cálida y húmeda) de julio a octubre. Dado que estas variaciones ambientales influyen en la supervivencia de los nematodos en el pasto, se consideró conveniente conocer los géneros y dinámica mensual de los nematodos que infectarían a los corderos durante la infección natural

El objetivo fue determinar el grado de infectividad de los potreros, así como la diversidad de nematodos adultos, durante el año que duró la observación de la respuesta a la infección natural.

5.2. Material y métodos

Cada 28 días durante un año se eligieron de 2 a 4 animales del rebaño, se desparasitaron* (día 0) y alojaron en corrales con piso de rejilla, se alimentaron con forraje seco para evitar que se reinfectaran con nematodos. El día 14 después del tratamiento se verificó que no eliminaran huevos de nematodos en las heces y se sacaron a pastar junto con el rebaño de hembras durante 28 días, posteriormente se regresaron a los corrales con piso de rejilla durante otros 28 días, al término de los cuales se sacrificaron.

Antes de sacrificarlos, se les colectaron muestras de heces y sangre. De cada muestra se determinó el número de huevos eliminados en las heces por la técnica de

* Levamisol 7.5 mg/k

McMaster (MAFF, 1986), el volumen celular aglomerado mediante la técnica de microhematocrito (Jain, 1986); la concentración de proteínas plasmáticas mediante la técnica de refractómetro y cuenta directa de eosinófilos mediante la técnica de Hinkleman (Benjamín, 1988). También, se determinó la producción de anticuerpos contra *H. contortus* mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) estandarizado con este objetivo (Anexo 2).

Posteriormente se les extrajo el tracto gastrointestinal. Los parásitos del abomaso e intestino grueso se colectaron directamente, mientras que los del intestino delgado se concentraron mediante sedimentación del contenido intestinal y bajo el microscopio estereoscópico se separaron de *detritus*. Se contaron machos y hembras de cada género observado.

Mediante la correlación de Spearman (Gill, 1978) se midió la asociación entre el número de nematodos adultos alojados en el tracto gastrointestinal y la eliminación de huevos en las heces, VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos y anticuerpos.

Los registros de temperatura y precipitación pluvial se obtuvieron de la estación meteorológica ubicada en el CEIEGT.

5.3. Resultados y discusión

Del 100% de nematodos adultos colectados, *Haemonchus contortus* fue el más abundante (80%), seguido por *Cooperia* spp. (18%) y en menor proporción *Oesophagostomum* spp. (0.77%), *Trichuris* spp. (0.29%) y *Strongyloides papillosus* (0.01%) (Cuadro 7).

Excepto *Trichuris* spp., los otros géneros ya habían sido reportados por Badillo e Islas (1994) en el mismo predio, quienes además encontraron *Teladorsagia (Ostertagia)* spp. y *Bunostomum* sp. La diferencia en cuanto a la diversidad de nematodos observada, radica en que los mencionados autores trabajaron con larvas obtenidas del pasto en vez de nematodos adultos como se hizo en este trabajo.

H. contortus fue el nematodo más frecuente en todos los meses excepto en julio (191 ejemplares), donde *Cooperia* spp. fue más abundante (970 ejemplares). Los picos de *H. contortus*, ocurrieron en abril (1,381), junio (1,473) y agosto (3,328). De

Oesophagostomum spp. se colectaron más ejemplares en marzo (30), julio (39) y octubre (21), el resto de los meses fue escaso (Cuadro 9).

Estos resultados coinciden con los de Vázquez (1985); Badillo e Islas (1994) y Cuj (1995), al señalar a *H. contortus* como el nematodo más frecuente en los borregos de regiones tropicales de México.

Las mayores colectas de nematodos en general, se realizaron en abril (1,625), junio (1,937) y agosto (3,385), excepto en junio, coincidieron con los picos de eliminación de huevos (Figura 13). Al respecto, la correlación de Spearman para el número de hembras y eliminación de huevos fue de 0.76 para *H. contortus*, mientras que para el total de hembras fue de 0.78, lo que hace de la eliminación de huevos un buen indicador de la carga parasitaria de *H. contortus*.

La correlación de Spearman del total de nematodos fue positiva con proteínas plasmáticas y anticuerpos, con un valor de 0.47 y 0.52 ($P < 0.05$) respectivamente. Mientras que con eosinófilos y hematocrito no fueron diferentes de cero ($P > 0.05$).

Las temperaturas más bajas (inferiores a 20 °C), se registraron en diciembre de 1999, enero y en diciembre del 2000. Las temperaturas más altas (superiores a 27 °C) se presentaron de mayo a septiembre. La precipitación pluvial más baja se registró en julio (25 mm), también fueron inferiores a 100 mm; enero (54 mm), febrero (72.8 mm) y junio (91.7 mm). Mientras que, las precipitaciones más altas fueron en abril (283 mm), agosto (287 mm) y septiembre (281 mm) (Cuadro 10).

La distribución de la precipitación observada en el año de estudio fue atípica, ya que difiere de la precipitación promedio de 10 años (1981-1991) registrado en el mismo lugar. Hubo mayor precipitación en abril y menor en junio, julio y octubre. En cuanto a la temperatura promedio las curvas de ambos registros son similares (Figura 14).

De acuerdo con Grant (1981), las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de los nematodos gastrointestinales son más de 50 mm de precipitación pluvial y temperaturas superiores a 11.6 °C, circunstancias presentes durante la mayor parte del año en el lugar de estudio. Lo que permite que haya infección todo el año, con mayor transmisión en abril y agosto, meses con elevada precipitación pluvial y con

temperaturas superiores a 25 °C, lo que acorta el periodo de vida libre de las larvas y se pueden desarrollar 3 a 4 generaciones de *H. contortus* en estos periodos.

Se concluye que en el lugar de estudio, las condiciones de temperatura y precipitación para la transmisión de *H. contortus* se presentaron todo el año, aunque en mayor proporción en abril y agosto. Sin embargo, debido a que la precipitación pluvial tuvo una distribución atípica estas observaciones se limitan al año de estudio.

Por otra parte, la eliminación de huevos en las heces resultó un buen indicador del número de *H. contortus* adultos.

5.4. Cuadros y Figuras

Cuadro 9. Variación mensual de los principales nematodos gastrointestinales adultos colectados en borregos rastreadores de diciembre de 1999 a diciembre del 2000 en el "Cenzontle"

Mes/año	No. Adultos <i>H. contortus</i>	No. Adultos <i>Oesophagostomum</i>	No. Adultos <i>Cooperia</i>	No. Total adultos*	No. Total huevos*
Dic-99	254	2	13	269 ±13	4,800 ±1,556
Ene-00	277	0	85	362 ±84	3,500 ±939
Feb-00	491	0	103	594 ±74	2,050 ±35
Mar-00	218	30	2	250 ±36	2,400 ±402
Abr-00	1,381	0	244	1,625 ±78	9,050 ±413
May-00	509	1	43	553 ±103	2,550 ±427
Jun-00	1,473	2	462	1,937 ±722	4,800 ±1,256
Jul-00	191	39	970	1,200 ±409	7,450 ±2,254
Ago-00	3,328	8	49	3,385 ±628	13,850 ±3,171
Sep-00	570	0	282	852 ±265	6,200 ±2,220
Oct-00	159	21	213	393 ±53	2,250 ±671
Nov-00	771	0	19	790 ±192	5,800 ±3,465
Dic-00	1,061	0	58	1,119 ±791	5,350 ±3,783
% total	80	0.7	18	-	-

Promedio ± desviación estándar

Cuadro 10. Variación de la temperatura y precipitación pluvial de diciembre de 1999 a diciembre del 2000 en el “Cenzontle”

MES	Temporada	Temperatura promedio (°C) (1999 – 2000)	Precipitación pluvial (mm) (1999 – 2000)	Temperatura promedio (°C) (1981 – 1991)	Precipitación pluvial (mm) (1981 – 1991)
Dic	Nortes	14.4	100.5	19.3	150
Ene	Nortes	20.1	54.0	18.2	80
Feb	Nortes	22.1	72.8	18.8	100
Mar	Seca	25.7	137.6	22.7	60
Abr	Seca	25.9	283.0	24.0	160
May	Seca	28.8	128.3	26.7	130
Jun	Seca	28.2	91.7	27.4	160
Jul	Lluvia	28.6	25.7	26.7	220
Ago	Lluvia	27.9	287.0	26.8	200
Sep	Lluvia	27.5	281.3	26.2	290
Oct	Lluvia	24.8	121.5	24.1	220
Nov	Nortes	22.9	115.4	22.2	160
Dic	Nortes	18.8	172.7	19.3	150

Datos obtenidos de la estación meteorológica del CEIEGT

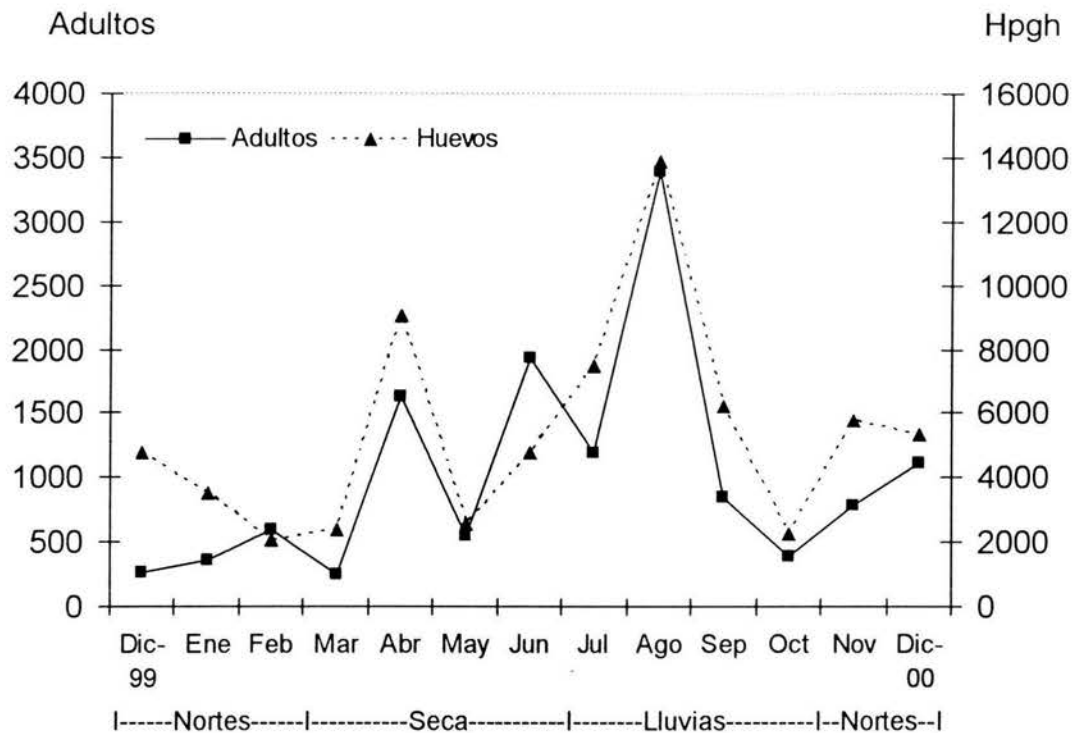


Figura 13. Dinámica mensual del número total de nematodos gastrointestinales y eliminación de huevos en borregos rastreadores

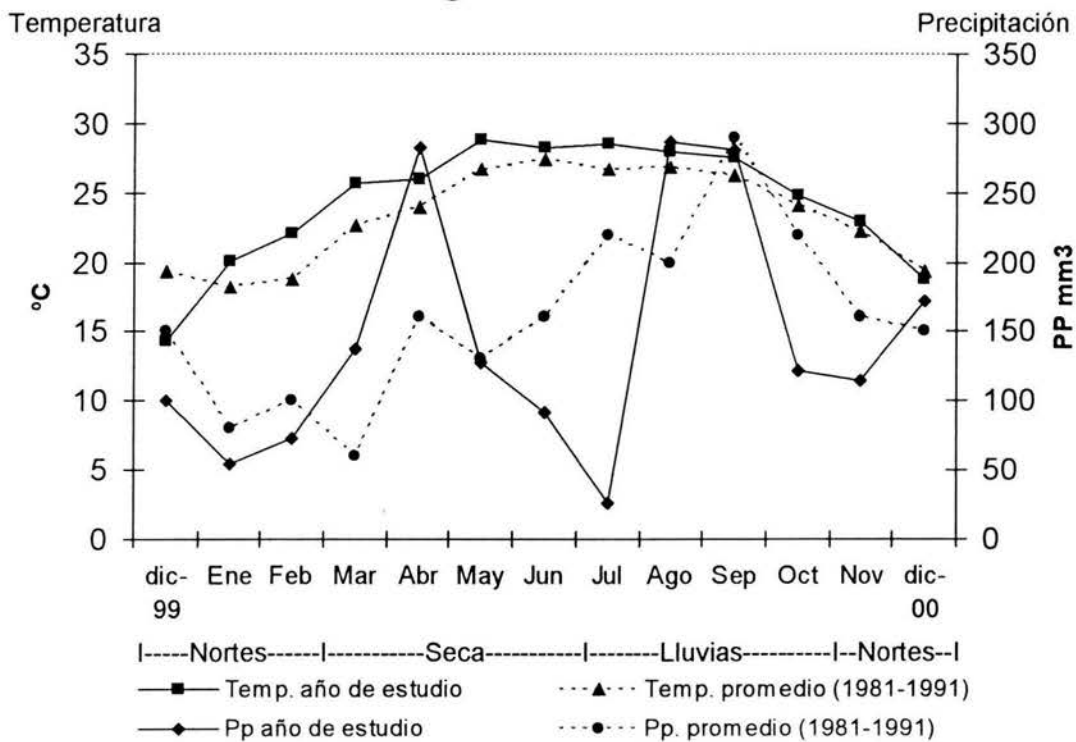


Figura 14. Comparación de la variación de la temperatura y precipitación pluvial durante el año de estudio y 10 años (1981-1991)

Capítulo 6. Participación del complejo principal de histocompatibilidad ovino en la resistencia o susceptibilidad a *Haemonchus contortus*

6.1. Introducción

Para establecer las estrategias de cruzamiento en los rebaños resistentes, es indispensable determinar con precisión el *estatus* de resistencia de los animales (Albers *et al.*, 1987), por lo que existe un considerable interés en la búsqueda y evaluación de marcadores fenotípicos o genotípicos del grado de resistencia (Douch *et al.*, 1996).

Los marcadores fenotípicos tienen una base funcional y generalmente se expresan durante la infección parasitaria, como la eliminación de huevos, eosinófilos circulantes y el nivel de anticuerpos específicos, mientras que los marcadores genotípicos están basados en genes o secuencias de ADN que podrían diferenciar animales resistentes independientemente de una infección parasitaria (Windon, 1996).

El número de huevos eliminados en las heces es el indicador de resistencia más utilizado, debido a que es fácil de medir, por si mismo indica parasitismo, y además, en corderos, correlaciona muy bien con el número de nematodos adultos albergados (Douch *et al.*, 1996; Baker, 1999). Sin embargo, se ve afectada por factores como la fecundidad de los parásitos, patrones de ovoposición, variabilidad en la distribución de los huevos en las heces, composición de la dieta y tránsito intestinal, entre otros (Douch *et al.*, 1996).

Por lo anterior se requieren indicadores alternativos o complementarios del grado de resistencia, la búsqueda se ha realizado con especial atención en genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) debido a que es necesaria la expresión de productos del MHC sobre la membrana de las células para que un antígeno sea presentado por los macrófagos a los linfocitos T, los cuales también deben expresar estas mismas moléculas, pues en ausencia de ellas no hay inducción de la respuesta inmunológica. En términos generales el MHC interviene para hacer más eficiente este

proceso guiando a los linfocitos a las células blanco (Schwaiger *et al.*, 1995; Weir y Stewart, 1996).

El objetivo de este estudio fue genotipificar 3 microsatélites del MHC y medir su asociación con niveles de VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos, ganancia de peso y la eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en borregos Pelibuey infectados artificial y naturalmente.

6.2. Material y métodos

Se utilizaron los mismos 52 corderos que en la infección artificial y natural, así como sus valores de eliminación de huevos, hematocrito, proteínas plasmáticas, eosinófilos, anticuerpos y peso registrados. A cada uno, se le colectó sangre de la vena yugular en tubos estériles con EDTA a partir de la cual se obtuvo el ADN (Anexo 3).

A partir del ADN de los corderos se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 3 microsatélites que mapean en el MHC ovino (Crawford *et al.*, 1995).

Los iniciadores empleados para amplificar los microsatélites fueron:

OMHC1 5' ATCTGGTGGGCTACAGTCCATG 3'
 3' GCAATGCTTTCTAAATTCTGAGGAA 5'

OLADRB2 5' CTGCCAATGCAGAGACACAAGA 3'
 3' GTCTGTCTCCTGTCTTGTCATC 5'

OLADRB1 5' TCTCTGCAGCACATTTCTGG 3'
 3' CGTACCCAGAGAG/TTGAGTGAAGTATC 5'

El OMHC1 se encuentra dentro de clase I y los DRB 1 y DRB2 en la clase II del complejo principal de histocompatibilidad.

Las reacciones de PCR, fueron desarrolladas en 20 μ l que contenían: el amortiguador de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris Cl, 1% Tritón X-100), 1.5 mM MgCl₂, 2.0 mM dNTPs, 1.25U/ μ l Taq polimerasa, 100 ng ADN genómico, iniciador (1 μ M DRB1 y DRB2, 0.5 μ M OMHC1).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 59°C y 30 seg a 72°C para DRB2 y OMHCI. Para el DRB1 la temperatura de reasociación fue de 56 °C y el tiempo de extensión de 60 seg. Los tres microsátélites tuvieron una extensión final de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (Figura 15).

El tamaño de los alelos se determinó en un secuenciador automatizado utilizando el programa GeneScan 3.1 (Figura 16).

La relación entre el número de huevos, VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos y anticuerpos se midió mediante la correlación de Spearman (Gill, 1978)

Con el propósito de evaluar la existencia de asociación entre un determinado alelo y las características fenotípicas, se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante análisis de varianza (ANOVA), regresión y la prueba de U de Mann-Whitney.

Se descartó el ANOVA, debido a que la baja frecuencia de homocigotos para un determinado alelo en los tres loci, arrojaba un error estándar muy grande y en la mayoría de los casos indicaba "dominancia completa".

Con la prueba de U de Mann-Whitney. Se formaron dos grupos: el grupo I formado por individuos heterocigotos del alelo estudiado con cualquier otro; y el grupo II constituido por animales con cualquier otro genotipo. Se encontró una concordancia entre los resultados de este análisis con los de regresión.

Se optó por el análisis de regresión con el fin de incluir la mayor información posible y por que el coeficiente de regresión constituye una estimación del efecto de sustitución de un posible gen ligado. Se calcularon las regresiones simples de la eliminación de huevos, VCA, proteínas plasmáticas, eosinófilos y anticuerpos sobre el genotipo de cada alelo en los tres loci. El genotipo fue recodificado, se asignaron valores de 0, 1 ó 2 de acuerdo al número de copias de cada alelo.

6.3. Resultados y discusión

Se identificaron 9 alelos del locus OMHCI; 12 del DRB2 y 20 del DRB1, sin embargo, el número efectivo de alelos fue de 7, 7 y 11 respectivamente. Dentro de cada locus los alelos más frecuentes fueron; OMHC 188 (28.7%), DRB2 282 (23.9%), DRB1 488 (15.6%) (Cuadro 11).

En la infección artificial, los alelos OMHCI 188, OMHCI 194, DRB2 282 y el DRB1 482, se asociaron con reducción de huevos (-330, -538, -396 y -848 hpgh, por cada copia del alelo correspondiente), aunque el OMHCI 194 y el DRB1 482 tuvieron una significancia estadística de $P = 0.06$ y $P = 0.09$, respectivamente. Por el contrario, el OMHCI 200 y el OMHCI 206 se encontraron asociados con incremento en la eliminación de huevos (696 y 576 hpgh, por copia del alelo respectivamente) (Cuadro 12).

Algunos alelos, como el OMHCI 194 y el DRB2 482 se asociaron con reducción de huevos e incremento de eosinófilos, aunque no fueron estadísticamente significativos para la eliminación de huevos ($P = 0.06$ y 0.09 respectivamente), sí lo fueron para el número de eosinófilos ($P = 0.01$). Con el DRB2 282 sucedió al contrario; fue significativo para disminución de huevos pero no para incremento de eosinófilos. Sólo el OMHC1 200 se relacionó significativamente con incremento en la eliminación de huevos y disminución de eosinófilos.

En la infección natural, el OMHC 194 se relacionó significativamente con incremento de eosinófilos (21 /ml) y anticuerpos (0.111 D.O), pero no con la reducción de huevos (-223 hpgh). El DRB 200 se asoció estadísticamente con disminución de eosinófilos (-130 /ml), pero no con eliminación de huevos (362 hpgh) y anticuerpos (-0.100 D.O). El resto de los alelos no se asociaron significativamente con las variables (Cuadro 13).

Se encontraron asociaciones medianas (mayores a 0.5) y significativas ($P < 0.05$) entre; eosinófilos- huevos; anticuerpos- huevos y anticuerpos- eosinófilos en ambas infecciones. Sólo en la infección natural, entre; proteínas plasmáticas- huevos y p. plasmáticas- eosinófilos, el resto de las asociaciones fueron bajas o no significativas (Cuadro 14).

El complejo principal de histocompatibilidad ovino se ha involucrado con diferentes grados de resistencia a *Trichostrongylus colubriformis* (Douch y Outteridge, 1989), *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* (Buitkamp *et al.*, 1994; Schwaiger *et al.*, 1995; Patterson *et al.* 1998) y *Haemonchus contortus* (Luffau *et al.*, 1990; Outteridge *et al.*, 1996). En contraparte, Cooper *et al.* (1989); Blattman *et al.* (1993) y Hulme *et al.* (1993) no encontraron evidencia de que algún alelo del MHC ovino estuviera asociado con resistencia o susceptibilidad a nematodos gastrointestinales.

En el presente estudio, algunos alelos del MHC ovino se asociaron con resistencia o susceptibilidad a nematodos gastrointestinales pero sólo durante la infección artificial. El OMHCI 188 y DRB2 282 se asocian con reducción de huevos en las heces y los alelos OMHCI 200 y OMHCI 206 con incremento en la eliminación de huevos.

También se observó una relación inversamente proporcional entre el número de eosinófilos y la eliminación de huevos (-0.507), lo que es frecuente en respuesta a la infección por nematodos gastrointestinales, particularmente a *H. contortus* o *T. colubriformis* (Douch y Outteridge, 1989; Gill, 1991; Outteridge *et al.*, 1996; Wanyangu *et al.*, 1997), aunque es un parámetro inconsistente (Douch *et al.*, 1996; Woolaston *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha descrito una posible relación entre anticuerpos (IgA e IgG) y resistencia a *H. contortus* (Smith, 1977; Duncan *et al.*, 1978; Gill, 1991; Gill *et al.*, 1993). En el presente trabajo se observó una relación inversamente proporcional entre el nivel de anticuerpos y la eliminación de huevos (-0.570) y una asociación directamente proporcional entre anticuerpos y eosinófilos (0.506); no obstante, el nivel de anticuerpos sólo se asoció significativamente al alelo OMHCI 194 en la infección natural.

Aunque los resultados obtenidos no se pueden comparar totalmente con los de otros autores, debido a que se utilizaron diferentes métodos para genotipificar el MHC (serología, RFLPs, sondas, microsátélites), refuerzan la evidencia de que alelos del complejo principal de histocompatibilidad podrían utilizarse como marcadores genéticos de resistencia a *H. contortus*.

6.4. Cuadros y figuras

Cuadro 11. Frecuencia de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad ovino

OMHC1	Frecuencia	DRB2	Frecuencia	DRB1	Frecuencia
Alelos	(%)	Alelos	(%)	Alelos	(%)
188*	28.7	262	2.1	368*	3.1
192*	8.5	268*	10.8	400*	3.1
194*	13.8	270*	5.4	420	1.5
196*	8.5	272	1.0	422	1.5
198*	11.7	274*	11.9	430	1.5
200*	11.7	276*	16.3	446	1.5
202	3.1	280	2.1	448*	4.6
204	3.1	282*	23.9	454	1.5
206*	10.6	284*	7.6	458	1.5
		286	3.2	460	1.5
		292*	14.1	462*	10.0
		296	1.0	464*	9.3
				468*	3.1
				482*	4.6
				486	3.1
				488*	15.6
				490*	6.5
				492	1.5
				498*	14.0
				500*	9.3

* Alelos efectivos

Cuadro 12. Asociación entre alelos del MHC, eliminación de huevos y número de eosinófilos en corderos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*

Alelo	Hpgh	Eosinófilos No./ml	Anticuerpos D.O
OMHC1 188	-330* ±162	26 ^{ns} ±20	0.072 ^{ns} ±0.039
OMHC1 194	-538 [‡] ±284	84* ±35	0.051 ^{ns} ±0.040
OMHC1 200	696* ±294	-87* ±36	-0.058 ^{ns} ±0.043
OMHC1 206	576* ±235	-40 ^{ns} ±29	-0.040 ^{ns} ±0.033
DRB2 282	-396* ±194	43 [‡] ±23	0.002 ^{ns} ±0.027
DRB1 482	-848 [‡] ±500	163* ±57	0.118 [‡] ±0.068

*P < 0.05 ‡P = 0.06 -0.09 ns = no significativo

Hpgh = Huevos por gramo de heces. D.O =Densidad óptica a 492nm

Los números en las celdas indican la variación promedio (± error estándar) por cada copia del alelo correspondiente

Cuadro 13. Asociación entre alelos del MHC, eliminación de huevos y número de eosinófilos en corderos infectados naturalmente con *Haemonchus contortus* y otros nematodos intestinales

Alelo	Hpgh	Eosinófilos No./ml	Anticuerpos D.O
OMHC1 188	9 ^{ns} ±112	32 ^{ns} ±29	0.024 ^{ns} ±0.030
OMHC1 194	-223 ^{ns} ±197	21 ^{ns} ±53	0.111* ±0.052
OMHC1 200	362 [‡] ±208	-130* ±53	-0.100 [‡] ±0.056
OMHC1 206	264 ^{ns} ±162	-15 ^{ns} ±44	-0.069 ^{ns} ±0.044
DRB2 282	-94 ^{ns} ±134	6.8 ^{ns} ±36	0.036 ^{ns} ±0.036
DRB1 482	-190 ^{ns} ±342	49 ^{ns} ±91	0.027 ^{ns} ±0.094

*P < 0.05 ‡P = 0.06 -0.09 ns = no significativo

Hpgh = Huevos por gramo de heces. D.O =Densidad óptica a 492nm

Los números en las celdas indican la variación promedio (± error estándar) por cada copia del alelo correspondiente

Cuadro 14. Correlaciones de Spearman para la eliminación de huevos, volumen celular aglomerado, eosinófilos y anticuerpos, en ovinos infectados artificial y naturalmente con nematodos gastrointestinales

		Infección artificial					
		Artificial	Hpgh	VCA %	P. plasmáticas (g/dl)	Eosinófilos No./ml	Anticuerpos (D.O)
Infección natural	Natural						
	Hpgh		----	-0.355**	-0.300 *	-0.507**	-0.570 **
	VCA %		-0.109	----	0.149	0.065	0.184
	P. plasmáticas (g/dl)		-0.596 **	0.178	----	0.308 *	0.350 **
	Eosinófilos No./ml		-0.624 **	0.261	0.538 **	----	0.506 **
Anticuerpos (D.O)		-0.754 **	0.026	0.427 **	0.590 **	----	

*P<0.05 **P≤0.01. Hpgh = Huevos por gramo de heces. VCA = Volumen celular aglomerado. D.O =Densidad óptica a 492nm

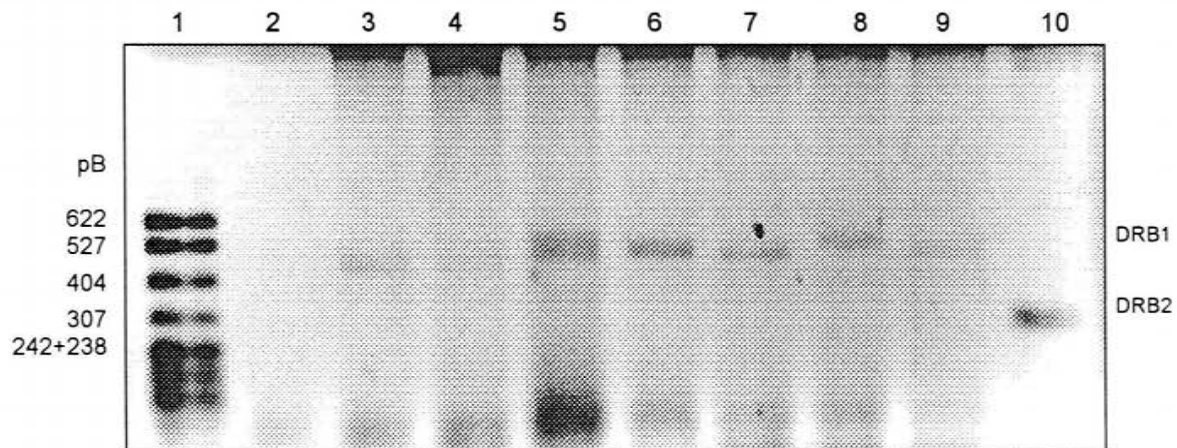
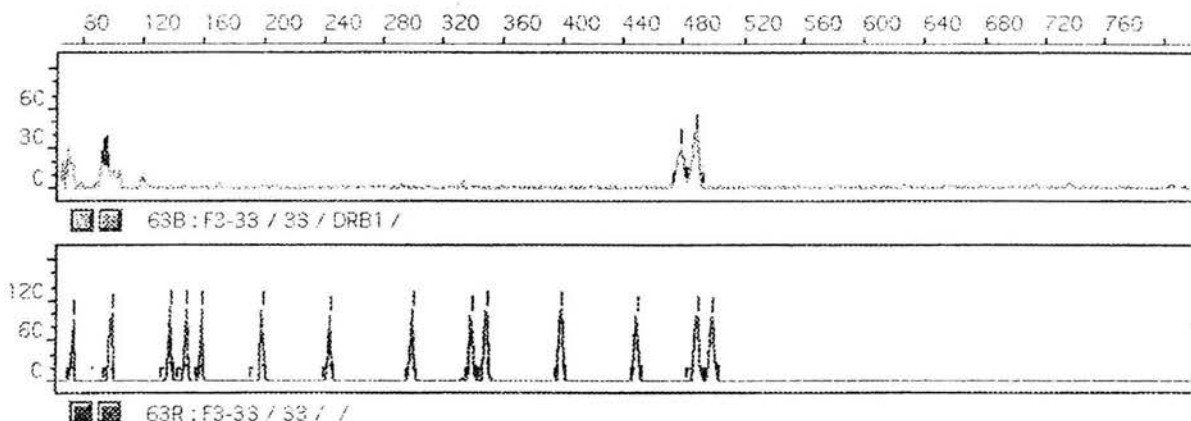


Figura 15. Corrimiento electroforético en agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (0.5µg/ml).

Carril 1, marcador de peso molecular pBR322/Mspl. Carril 2, Testigo. Carriles 3 al 9, productos de PCR del microsatélite DRB1. Carril 10, Producto de amplificación del microsatélite DRB2



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
63B, 1	11.87	93.94	24	173	3235
63B, 2	11.90	95.01	26	201	3244
63B, 3	11.93	95.96	22	156	3252
63B, 4	22.27	479.10	31	874	6073
63B, 5	22.50	489.17	42	1089	6135
63R, 1	11.28	75.00	95	690	2076
63R, 2	12.05	100.00	103	800	3286
63R, 3	13.26	139.00	111	840	3615
63R, 4	13.56	150.00	110	778	3696
63R, 5	13.83	160.00	108	815	3770
63R, 6	15.00	200.00	107	959	4090
63R, 7	16.28	245.00	100	975	4440
63R, 8	17.76	300.00	107	1072	4843
63R, 9	18.76	340.00	100	1162	5114
63R, 10	19.05	350.00	107	1246	5195
63R, 11	20.37	400.00	108	1295	5555
63R, 12	21.57	450.00	100	1313	5883
63R, 13	22.52	490.00	100	1387	6140
63R, 14	22.72	500.00	96	1403	6196

Figura 16. Electroferograma

De los alelos DRB1 480 y DRB1 490

Capítulo 7. Discusión general

En el presente estudio, los corderos resistentes a la infección artificial tuvieron menor eliminación de huevos, mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos que los susceptibles. Sin embargo, cuando se sometieron al periodo de infección natural en pastoreo, sólo se detectaron diferencias en algunos meses, pero en promedio general no se encontraron diferencias entre resistentes y susceptibles.

Estos resultados se contraponen a los de Windon *et al.* (1987); Woolaston *et al.* (1990^a) y Gray *et al.* (1992) quienes notificaron que los animales seleccionados como resistentes en una infección artificial con un nematodo en particular, también lo son ante una infección natural. En Australia, Nueva Zelanda y Francia, se ha estimado esta correlación en 0.90 (Baker, 1999).

Este hecho motivó que se analizaran nuevamente los datos, pero ahora considerando la clasificación de los ovinos en ambos tipos de infección, con este criterio, hubo animales que mantuvieron su condición de resistentes (19%)* o susceptibles (33%) en ambas infecciones. El 48% de los animales cambiaron de categoría de una infección a otra, 23% lo hicieron de resistente a susceptible y 25% lo hicieron al contrario.

Los animales resistentes en la infección artificial o en la natural, tuvieron significativamente más eosinófilos y anticuerpos, cuando ambos indicadores disminuyeron, se elevó su eliminación de huevos en las heces. Lo que indica un posible efecto de los eosinófilos y anticuerpos en la reducción de huevos.

Los cambios climáticos extremos ("Nortes", sequías), así como el manejo imprevisto, competencia jerárquica dentro del rebaño, el periodo de pastoreo y la presencia de otros parásitos (nematodos y cestodos), son algunos de los factores a los que estuvieron sometidos los animales durante la infección natural y que pudieron influir en la resistencia, contribuyendo al cambio de condición, de resistente a susceptible.

* Este porcentaje es similar al reportado por Barger (1989); Anderson y May (1985).

Al respecto, Gruner *et al.* (1992) y Hohenhaus *et al.*, (1995), señalan que las grandes eliminaciones de huevos que suelen observarse en las ovejas, al final de la gestación y durante la lactación, son ocasionadas por una atenuación del sistema inmune influenciada por el estrés de estos estados reproductivos.

Hohenhaus *et al.* (1998) sugieren que el mantener niveles normales de eosinófilos durante una infección parasitaria puede estar asociado con la habilidad de la oveja para resistir al estrés aditivo ocasionado por los parásitos, la lactación o el manejo. Cuando el número de eosinófilos circulantes decrece, los corderos no desarrollan resistencia a *T. colubriformis* (Budle *et al.*, 1992).

El estrés actúa disminuyendo los niveles de eosinófilos y anticuerpos, la aplicación de corticosteroides provoca un efecto similar. En corderos resistentes a *H. contortus* tratados con dexametasona se reducen los niveles de mastocitos y eosinófilos en la submucosa gastrointestinal (Presson *et al.*, 1988; Douch *et al.*, 1996), linfopenia y reducción en los niveles de anticuerpos (Miller *et al.*, 2004), liberando a los nematodos del control inmunológico del huésped y ocasionando un incremento en la eliminación de huevos. En contraparte, Gill (1991) precisa que en borregos resistentes, la dexametasona no reduce significativamente los niveles de eosinófilos.

Por otra parte, el cambio de susceptible a resistente en 13 animales podría ser explicado en parte por un efecto sensibilizador que tuvo la infección artificial con *H. contortus* hacia las subsecuentes reinfecciones naturales, debido a que los corderos que fueron infectados artificialmente tuvieron menor eliminación de huevos en los primeros 6 meses de pastoreo, que los testigos que no fueron desafiados.

El cambio de susceptible a resistente observado, también puede ser producto de la resistencia que se desarrolla con la edad o debido a las constantes reinfecciones, algunos animales se hacen resistentes después de la primera infección y otros hasta la tercera (Manton, 1962; Gill *et al.*, 1993).

Benitez-Usher *et al.* (1977) y Schallig (2000) señalan, como el responsable de la resistencia al fenómeno de autocuración, asociado con incremento en los anticuerpos y eosinófilos circulantes.

La autocuración se hace evidente a partir de los 10 ó 12 meses de edad y es más intensa después de los 14 meses, sin embargo, existen animales que lo hacen más rápido. Para Gruner (1991) la resistencia a los nematodos se desarrolla entre las 8 semanas y 8 meses de edad, aunque hay animales que nunca lo hacen. En particular la resistencia a *H. contortus*, debe ser reforzada constantemente por estímulos antigénicos, sin este refuerzo decae después de 84 días.

En el presente estudio los animales iniciaron con 4.5 meses de edad y finalizaron con 20 meses, posiblemente los susceptibles que cambiaron a resistente en la infección natural (25%), lo hicieron debido al fenómeno de autocuración, reaccionando en forma tardía a la infección artificial, mientras que los resistentes en la infección artificial responden en forma temprana; sin embargo, entre ellos se pueden encontrar animales muy sensibles al estrés que durante la infección natural se pueden convertir en susceptibles (12%).

Al seleccionar animales por su respuesta a la infección artificial no se garantiza una reducción en la eliminación de huevos durante el pastoreo y al seleccionar por su respuesta a la infección natural se incluyen animales que no desarrollan resistencia temprana; esto último es tal vez más grave debido que los corderos son más sensibles a la infección por nematodos gastrointestinales mientras más jóvenes son, por lo que se recomienda (en la medida de lo posible) seleccionar para fines reproductivos, a los resistentes por su respuesta a dos tipos de infección (artificial y natural), incluyendo además de la eliminación de huevos el nivel de eosinófilos y anticuerpos como criterios de selección.

Del mismo modo, es recomendable medir la heredabilidad de estos indicadores, determinar las frecuencias alélicas del MHC y el grado de parentesco dentro de todo el rebaño para descartar un posible efecto fundador, así como incrementar el número de animales genotificados para definir algunos alelos que tuvieron una $P \approx 0.1$.

Se concluye que dentro de la raza Pelibuey existen individuos con mayor grado de resistencia a la infección por *Haemonchus contortus* y que dicha resistencia se asocia con mayores niveles de eosinófilos y anticuerpos, y en infecciones artificiales, con alelos del complejo principal de histocompatibilidad.

Literatura citada

- Abbott EM, Holmes PH. Influence of dietary protein on the immune responsiveness of sheep to *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci 1990; 48:103-107.
- Abbott EM, Parkins JJ and Holmes PH. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a moderate infection of *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci 1985;38:6-13.
- Abbott EM, Parkins JJ, Holmes PH. The effect of dietary protein on the pathophysiology of acute ovine haemonchosis. Vet Parasitol 1986; 20: 291-306.
- Abbott EM, Parkins JJ and Holmes PH. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. Res Vet Sci 1988;45:41-49.
- Albers GAA and Gray GD. Breeding for worm resistance: a perspective. Int J Parasitol 1987;17:559-566.
- Albers GAA, Gray GD, Piper LR, Baker JSF, Le Jambre LF, Barger IA. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in young Merino sheep. Int J Parasitol. 1987;17:1355-1363.
- Altaif KI, Dargie JD. Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to re-infection with *Haemonchus contortus*. Parasitol 1978;77:177-187.
- Ambrosio HJR, Bautista GCR. Respuesta inmune de los ovinos a la infección por *Haemonchus contortus*. En: Parasitología. 25 aniversario de la Sociedad Mexicana de Parasitología A.C., Vol. I, Editores Quiroz, R, H. y García, Y. Y., pp. 307-326, México, D.F., 1985.
- Anderson RM, May RM. Herd immunity to helminth infection and implications for parasite control. Nature. 1985;315:493-496.
- Badillo ME, Islas LI. Determinación de la carga parasitaria de nematodos gastroentéricos en pasto y animal en un pastizal bajo pastoreo de alta densidad con ovinos pelibuey en los meses de diciembre-abril en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical en el Municipio de Tlapacoyan, Veracruz. Tesis de licenciatura. Escuela de Medicina veterinaria y Zootecnia. Universidad Xicotepetl, A.C. Xicotepec de Juárez, Puebla, 1994
- Baker RL, Watson TG, Bisset SA, Vlassoff A, Douch PGC. Breeding sheep in New Zealand for resistance to internal parasites: research results and commercial application. En: Breeding for Disease Resistance in Sheep. Gray GD, Woolaston RR ed. Australian Wool Corporation, Melbourne, pp 19-32 1991.
- Baker RL. Genetics of resistance to endoparasites and ectoparasites. Int J Parasitol. 1999;29:73-75.
- Barger IA. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. Vet Parasitol. 1989;32:21-35.
- Barger IA, Dash KM. Repeatability of ovine faecal egg counts and blood packed cell volumes in *Haemonchus contortus* infections. Int J Parasitol 1987;17:977-980.
- Beck A, Moir B, Meppem. The cost of parasites to the Australian sheep industry. Quaterly Review of the Rural Economy. 1985;7:336-343.

- Benitez-Usher C, Armour J, Duncan JL, Urquhart GM and Gettinby G. A study of some factors influencing the immunization of sheep against *Haemonchus contortus* using attenuated larvae. *Vet Parasitol* 1977;3:327-342.
- Benjamin MM. Manual de patología clínica en veterinaria. Limusa, México, D.F. 1988.
- Bisset SA, Morris CA. Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *Int J Parasitol*. 1996;26:857-868.
- Bissett SA, Vlassoff A, Morris CA, Southey BR, Baker RL, Parker AGH. Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. *New Zealand J Agricultural Research*. 1992;35:51-58.
- Bissett SA, Vlassoff A, Douch PGC, Jónas WE, West CJ, Green RS. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet Parasitol.*, 1996;61:249-263.
- Blattman AN, Hulme DJ, Kinghorn BP, Woolaston RR, Gray GD, Beh KJ. A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Anim Genet*. 1993;24:277-282.
- Bottjer KP, Klesius PH, Bone LW. Effects of host serum on feeding by *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). *Parasite Immunol* 1985;7:1-9.
- Buitkamp J, Gostomoski D, Schwaiger FW, Stear MJ, Epplen JT. Association between the ovine Major Histocompatibility Complex DRB1 gene and resistance to *Ostertagia circumcincta* infestation. *Animal Genetics*. 1994;25:59-60.
- Buddle BM, Jowett G, Green RS, Douch PGC and Risdon PL. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. *Int J Parasitol* 1992;22:955-960.
- Campos RR. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Téc Pec Méx* 1990;28:30-34.
- Campos RR, Herrera RD, Quiroz RH. Diagnóstico *in vitro* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños de ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet Méx* 1992;23:51-56.
- Castillo RH, Valencia ZM, Berruecos VJM. Comportamiento reproductivo del borrego Tabasco mantenido en clima tropical y subtropical. I. Indices de fertilidad. *Tec. Pec Méx*. 1973;20:54-55.
- Charon KM, Moskwa B, Cabaj W, Olech W. Genetic resistance of sheep to natural infection with gastrointestinal nematode. *Memorias del 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*; 1998. Australia.
- Colditz IG, Watson DL, Gray GD and Eady SJ. Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. *Int J Parasitol* 1996;26:869-877.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992;44:35-44.
- Coop RL, Holmes PH. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol* 1996;26:951-962.

- Cooper DW, Van Oorschot RAH, Piper LR, Le Jambre LF. No association between the ovine leucocyte antigen (OLA) system in the Australian Merino and susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Int J Parasitol*. 1989;19:695-697.
- Courtney CH, Parker CF, McClure, KE, Herd RP. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1985;15:101-1109.
- Crawford AM. Dodds KG. Ede AJ. Pierson CA. Montgomery GW. Garmonsway HG. Beattie AE. Davies K. Maddox JF. Kappes SW. Stone RT. Nguyen TC. Penty JM. Lord EA. Broom JE. Buitkamp J. Schwaiger W. Epplen JT. Matthew P. Matthews ME. Hulme DJ. Beh KJ. McGraw RA. Beattie CW. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*. 1995;140:703-724.
- Cruz LC. La producción de ovinos pelibuey y sus perspectivas para el trópico con base en las experiencias del Centro de Investigación Enseñanza y Extensión en Ganadería Tropical. *Memorias, Experiencias del CIEEGT en producción de leche y carne en el trópico*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1992 pp 163-165.
- Cuj RJC. Evaluación de la resistencia de ovinos Florida y Pelibuey a nematodos gastrointestinales en el trópico húmedo. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz, 1995.
- Datta FU, Nolan JV, Rowe JB, Gray GD, Crok BJ. Long-term effects of short-term provision of protein enriched diets on resistance to nematode infection, and live-weight gain and wool growth in sheep. *Int J Parasitol* 1999;29:479-488.
- Díaz-Rivera P, Torres-Hernández G, Osorio-Arce MM, Pérez-Hernández P, Pulido-Albores AR, Becerril-Pérez CM, Herrera-Haro JG. Resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, Pelibuey y sus cruzas en el trópico mexicano. *Agrociencia* 2000;34:13-20.
- Donald AD. Parasites, animal production and sustainable development. *Vet Parasitol* 1994;54:27-47.
- Doligalska M, Moskwa B, Stear MJ. Relationships among peripheral eosinophilia, eosinophil peroxidase activity, interleukin-5 concentration and faecal nematode egg count during natural, mixed gastrointestinal nematode infection. *Vet Imm Immunopathol*. 1999;70:299-308.
- Douch PGC, Green RS, Morris CA, McEwan JC, Windon RG. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol*. 1996;26:899-911.
- Douch PGC, Outteridge PM. The relationship between ovine lymphocyte antigens and parasitological and production parameters in Romney sheep. *Int J Parasitol*. 1989;19:35-41.
- Duncan JL, Smith WD, Dargie JD. Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to immune unresponsiveness of lambs to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 1978;4:21-27.
- Eady SJ. Phenotypic traits associated with resistance to internal parasites. En: *Breeding for resistance to infectious diseases in small ruminants*. Gray GD, Woolaston RR, Eaton BT. Eds. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia 1995 pp. 219-236

- Eady SJ, Woolaston RR, Mortimer SI. Internal parasite resistance of Merino flocks selected for production. *Wool Tech Sheep Breed* 1994;42:237-242.
- Eady SJ, Woolaston RR, Mortimer SI, Lewer RP, Raadsma HW, Swan AA, Ponzoni RW. Resistance to nematode parasites in Merino sheep: sources of genetic variation. *Aust. J Agric Res.* 1996;47: 895-915.
- Evans JV, Whitlock JH. Genetic relationship between maximum hematocrit values and haemoglobin type in sheep. *Science.* 1964;145:1318.
- Familton AS. Re-examination of gastrointestinal parasite control – the contribution of the ewe. In: *Practical aspects of internal parasite control. Proceedings of the 21 st Seminar, Sheep and Beef Cattle Society of the New Zealand Veterinary Association.* Pp 25-35, 1991.
- Figueroa CJA. Frecuencia de Nematodos Gastroentéricos en Ovinos Rambouillet del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Ovina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1993.
- Figueroa CJA, Méndez MRD, Berruecos VJM, Alvarez LJA. Eficacia del sulfóxido de albendazol y el levamisol contra una población de *Haemonchus contortus* en ganado ovino. *Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología;* 1999 octubre 11-16. Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Federación Latinoamericana de Parasitología, 1999:131.
- Figueroa CJA Méndez MRD, Berruecos VJM, Quiroz RH, Alonso MR. Resistencia genética a nematodos gastrointestinales en el ganado ovino. En: *Temas selectos de Parasitología, Vol I.* Editado por Quiroz RH e Ibarra VF. México, D.F, 2000:166-174
- Fitzhugh H. Review of research on parasite resistance in small ruminants. En: *Resistance to endoparasites in small ruminants. Proceedings of the Research Planning Workshop held at ILCA Addis Ababa, Ethiopia.* 5-7 february 1991 p 3-4.
- García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1981
- Gasbarre LC, Miller JE. Genetics of helminth resistance. En: *Breeding for disease resistance in farm animals, 2nd ed.* Editado por Axford RFE, *et al.* CABI Publishing. Wallingford UK 2000 pp 129-151.
- Gill HS. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunol.* 1991;13:617-628.
- Gill HS, Gray GD, Watson DL, Husband AJ. Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol.* 1993;15:61-67.
- Gill JL. Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Vol I. Iowa State University Press. Iowa, USA, 1978.
- Grant JL. The epizootiology of nematode parasites of sheep in high-rainfall area of Zimbabwe. *JS Afr Vet Med Ass* 1981;52:33-37.
- Gray GD. Genetic variation in resistance to parasites. En: *Breeding for resistance to infectious diseases in small ruminants.* Ed. Gray-Woolaston-Eaton. P 43-52. ACIAR, Canberra, 1995.

- Gray GD. Genetic resistance to haemonchosis in sheep. *Parasitol Today*. 1987; 3: 253-255.
- Gray GD, Barger IA, LeJambre LF, Douch PGC. Parasitological and immunological responses of genetically resistant Merino sheep on pastures contaminated with parasitic nematodes. *Int J Parasitol*. 1992;22:417-425.
- Gruner L. Overview of genetics basis of resistance to endoparasites in small ruminants. En: Resistance to endoparasites in small ruminants. Proceedings of research planning workshop held at ILCA. P 5-10. Addis Ababa, Ethiopia, 1991.
- Gruner L, Bouix J, Cabaret J, Boulard C, Cortet J, Sauve C, Molenat G, Calamel M. Effect of genetic type, lactation and management on helminth infection of ewes in an intensive grazing system on irrigated pasture. *Int J Parasitol*. 1992;22:919-925.
- Gruner L, Cortet J, Sauvé C, Limouzin C, Brunel JC. Evolution of nematode community in grazing sheep selected for resistance and susceptibility to *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*: a 4-year experiment. *Vet Parasitol* 2002;109:227-291.
- Hohenhaus MA, Outteridge PM. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *Br Vet J* 1995;151:119-140.
- Hohenhaus MA, Josey MJ, Dobson C, Outteridge PM. The eosinophil leucocyte, a phenotypic marker of resistance to nematode parasites, is associated with calm behaviour in sheep. *Immunol cell biol* 1998;76:153-158.
- Hulme DJ, Nicholas FW, Windon RG, Brown SC, Beh KJ. The MHC class II region and resistance to an intestinal parasite in sheep. *J An Breeding Genetics* 1993;110:459-472.
- Jain NC. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed. Philadelphia: Lea and Fabiger, 1986.
- Kassai T, Fésüs L, Hendrikx WML, Takáts Cs, Fok É, Redl P, Takács E, Nilsson PhR, Leeuwen MAW, Jansen, Bernardina WE, Frankena K. Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs?. *Vet Parasitol* 1990;37:61-77.
- Kaufmann, J. Parasitic infections of domestic animals. A diagnostic manual. Birkhäuser. Berlin, 1995.
- Kelly JD, Hall CA. Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Adv Pharmacol Chemother* 1983 16; 89-127.
- Klein SL. Hormones and mating system affect sex and species differences in immune function among vertebrates. *Behav Processes* 2000;5:149-166
- Larios GF, Cora MPF, Trigo TFJ. Fisiología del ovino Tabasco o Pelibuey en clima tropical: hematología y niveles séricos de calcio. *Tec Pec Méx.*, 1976 ;30 :84-90.
- Luffau G, Péry P, Charley J. Réponse immunitaire chez les ovins infestés expérimentalement par *Haemonchus contortus*. Étude comparative chez le mâle et chez la femelle. *Ann Rech Vét* 1981 ;12 :173-181.
- Luffau G, Vu Tien Khang J, Bouix J, Nguyen TC, Cullen P, Ricordeau G. Resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Romanov sheep. *Genet Sel Evol*. 1990; 22 :205-229.

- MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. Reference Book 418. 3rd. Ed. London: Her Majesty's Stationery Office, London, 1986.
- Manton VJA, Peacock R, Poynter D, Silverman PH, Terry RJ. The influence of age on naturally acquired resistance to *Haemonchus contortus* in lambs. *Res Vet Sci* 1962;3:308-314.
- Mason IL. Ovinos prolíficos tropicales. Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal 17. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma 1980 pp 47-60.
- Meeusen ENT, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today*. 2000;16:95-101.
- Miller SA, Dykes D, Polesky HF. A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Ac Res*. 1989;16:1216.
- Miller HRP. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? *Int J Parasitol*. 1996;26:801-811.
- Negrete TP, Méndez MD, Figueroa CJA, Quiroz RH, Dávalos NE. Efecto extensión e intensidad de moxidectina, ivermectina y fenbendazol contra nematodos gastrointestinales en ganado ovino en pastoreo en bosque. *Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología*; 1998 octubre 8-10; Zacatecas (Zacatecas) México. México (DF): Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C. 1998:60.
- Nieuwoudt SW, Theron HE, Kruger LP. Genetic parameters for resistance to *Haemonchus contortus* in Merino sheep in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2002;73:4-7.
- Outteridge PM, Anderson L, Douch PGC, Green RS, Gwakisa PS, Hohenhaus MA, Mikko S. The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: Application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol*. 1996;74:330-336.
- Outteridge PM, Windon RG, Dineen JK: An ovine lymphocyte antigen marker for acquired resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 1988;18:853-858.
- Parker AGH. Selection for resistance to parasites in sheep. *Proc New Zealand Soc An Production* 1991;51:291-294.
- Patterson DM, Jackson F, Huntley JF, Stevenson IM, Jones DG, Jackson E, Russel AJF. The response of breeding does to nematodiasis: segregation into "responders" and "non-responders". *Int J Parasitol* 1996;26:1295-1303.
- Patterson S, Wilson K, Pemberton JM. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proc.Natl. Acad. Sci*. 1998;95:3714-3719.
- Peña MT, Miller JE, Horovov DW. Effect of dexamethasone treatment on the immune response of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol*. 2004;119:223-235.
- Presson BL, Gray GD, Burgess SK. The effect of immunosuppression with dexamethasone on *Haemonchus contortus* infections in genetically resistant Merino sheep. *Parasite Immunol* 1988;10:675-680.

- Preston JM, Allonby EW. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* in Kenya. *Res. Vet Sci* 1979;26:134-139.
- Quiroz RH. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos*. México D.F., Limusa, 1984.
- Raadsma HW, Gray GD, Woolaston RR. Genetics of disease resistance and vaccine response in. *The genetics of sheep*. Piper L. Ruvinsky CCAB international 1997 Cambridge, UK pp199-224.
- Rainbird MA, MacMillan D, Meeusen ENY. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite immunol* 1998;20:93-103.
- Riffkin GG, Dobson C. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infections. *Vet Parasitol* 1979;5:365-378.
- Roberts JL, Swan RA. Quantitative studies of ovine haemonchosis. 1.- Relationship between egg counts and total worm counts. *Vet Parasitol* 1981;8:165-171.
- Rowlands DT. Anthelmintic resistance- the right perspective. *Vet Pract* 1989;21:143-147.
- Rowlands DT. Anthelmintic resistance- Can science win? *Br Vet J* 1993 ;149:117-119.
- Salas GB, Méndez MD, Figueroa CJA, Quiroz RH. Eficacia de antihelmínticos en ovinos de la raza Tabasco en trópico húmedo. *Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología*; 1998 octubre 8-10; Zacatecas (Zacatecas) México. México (DF): Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C. 1998:60.
- Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int J Parasitol* 1999;29:115-124.
- SAS. JMP ver 4.0.2. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2000
- Schallig HDFH. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitol.* 2000;120:63-72.
- Schwaiger FW, Gostomski D, Stear MJ, Duncan JL, McKellar QA, Epplen JT, Buitkamp J. An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int J Parasitol.* 1995;25:815-822.
- Shoop WL, Haines HW, Michael BF, Eary CH. Mutual resistance to avermectins and milbemycins: oral activity of ivermectin and moxidectin against ivermectin-resistant and susceptible nematodes. *Vet Rec* 1993;133:445-447.
- Smith WD. Anti-larval antibodies in the serum and abomasal mucus of sheep hyperinfected with *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci* 1977;22:334-338.
- Stear MJ y Murray M. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 1994;54:161-176.
- Stear MJ, Bairden K, Bishop SC, Buitkamp J, Epplen JT, Gostomski D, McKellar QA, Schwaigers FW, Wallace DS. An ovine lymphocyte antigen is associated with reduced faecal egg counts in four-month-old lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int J Parasitol* 1996;26:423-428.
- Stear MJ, Mitchell S, Strain S, Bishop SC, McKellar QA. The influence of age on the variation among sheep in susceptibility to natural nematode infection. *Vet Parasitol.* 2000;89:31-36.

- Valencia MZ, Castillo HR, Berruecos VJM. Reproducción y manejo del borrego Tabasco o Pelibuey. Tec. Pec. Méx. 1975;29:66-72.
- Van Houtert MFJ, Sykes AR. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int J Parasitol* 1996; 26: 1151-1168.
- Vázquez PVM. Aspectos epizootiológicos de las verminosis gastroentéricas en ovinos en clima A (f) .c. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1985.
- Vázquez PVM, Nájera FR. Variación mensual de nematodos gastroentéricos en ovinos en clima tropical húmedo. *Téc Pec Méx.* 1986;51:18-27.
- Vermunt JJ, West DM, Pomroy WE. Inefficacy of moxidectin and doramectin against ivermectin-resistant *Cooperia spp.* Of cattle in New Zealand. *NZ Vet J* 1996;44:188-193.
- Vieira LS, Berne MEA, Cavalcante ACR, Costa CAF. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. *Vet Parasitol* 1992;45:111-116.
- Wakelin D. Immunity and immunogenetics. New approaches to controlling worm infections in sheep. *Br Vet J* 1995;151: 111-113.
- Wakelin D, Farias SE, Bradley JE. Variation and immunity to intestinal worms. *Parasitol* 2002;125:s39-s50.
- Wanyangu SW, Mugambi JM, Bain RK, Duncan JL, Murray M, Ster MJ. Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in Red Maasai and Dorper ewes. *Vet Parasitol* 1997;69:275-282.
- Watson DL, Gill HS. Post natal ontogeny of immunological responsiveness in Merino sheep. *Res Vet Sci* 1991; 51: 88-93.
- Weir DM Stewart J. Inmunología. 2ed. El manual moderno México, D.F. 1996.
- Whitlock JH. The inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep. I. Demonstration of the validity of the phenomena. *Cornell Vet* 1958;48:127-133.
- Winton RG. Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Vet Imm Immunophatol.* 1996;54:245-254.
- Winton RG, Dineen JK, Kelly JD. The segregation of lambs into "responders" and "non responders": response to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae before weaning. *Int J Parasitol* 1980;10:65-73.
- Winton RG, Dineen JK, Wagland BM. Genetic control of immunological responsiveness against the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* in lambs En: Merino Improvement Programs in Australia (Edited by McGuirk, B.J.), pp. 371-375. Australian Wool Corporation, Melbourne, 1987.
- Woolaston RR. Resistance to endoparasites in small ruminants: Genetic considerations. En: Resistance to endoparasites in small ruminants. Proceedings of the Research Planning Workshop held at ILCA Addis Ababa, Ethiopia. 5-7 february 1991 p11-14.
- Woolaston RR, Eady SJ. Australian research on genetic resistance to nematode parasites. En: Breeding for resistance to infectious diseases in small ruminants. Gray GD, Woolaston RR, Eaton BT. Eds. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia 1995 pp. 53-75.

- Woolaston RR, Baker RL. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int J Parasitol.* 1996;26:845-855.
- Woolaston RR, Piper LR. Selection of merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus*: genetic variation. *An Science* 1996;62:451-460.
- Woolaston RR, Barger IA, Piper LR. Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1990^a;20:1015-1018.
- Woolaston RR, Elwin RL, Barger IA. No adaptation of *Haemonchus contortus* to genetically resistant sheep. *Int J Parasitol.* 1992;22:377-380.
- Woolaston RR, Gray GD, Albers GAA, Piper LR and Baker JSF. Analysis for a major gene affecting parasite resistance in sheep. *Proc. Of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Edinburgh, XV, pp. 131-34, (1990^b).*
- Woolaston RR, Manuelli P, Eady SJ, Barger IA, Le Jambre LF, Banks DJD, Windon RG. The value of circulating eosinophil count as a selection criterion for resistance of sheep to trichostrongyle parasites. *Int J Parasitol.*, 1996;26:123-126.

Anexos

I. Obtención del aislado de *Haemonchus contortus* presente en el CEIEGT

Para realizar la infección artificial se aisló en forma pura la población de *H. contortus* presente en el CEIEGT en dos corderos libres de nematodos de acuerdo a lo siguiente:

Un animal del rebaño, positivo a huevos de nematodos gastrointestinales en un examen coprológico, se sacrificó y directamente del abomaso se colectaron los nematodos. Las hembras de *H. contortus*, se lavaron con solución salina amortiguada de fosfatos (SSAF pH 7.2) y mediante disección del útero, se les extrajeron los huevos.

Los huevos se incubaron durante 7 días a 30 °C en un substrato de hule espuma y SSAF pH 7.2, diariamente se oxigenaron y se revisó su viabilidad. Las larvas obtenidas se administraron a dos corderos (2,000 larvas c/u) previamente desparasitados* y mantenidos libres† de nematodos.

A partir del día 21 posinfección se verificó mediante la técnica de coprocultivo que los corderos eliminaran únicamente huevos de *H. contortus*. A cada cordero se le colocó un calzón especialmente diseñado‡ para colectar heces, 3 veces al día se vaciaron los calzones y las heces se pusieron en una estufa de cultivo a 30°C durante 5 días para obtener las terceras larvas (L3).

Las larvas se concentraron por centrifugación en un volumen final de 1 ml y se contaron a partir de fracciones de 100 µl, después de contarlas se regresaron a sus respectivos contenedores y se prepararon inóculos de 3,000 larvas cada uno. Se almacenaron en refrigeración (10 °C) y al día siguiente se administraron vía oral 3,000 L3 suspendidas en agua a cada uno de los 52 corderos.

* levamisol 7.5 mg/kg + albendazol 10mg/kg

† Alojados bajo techo, en un corral elevado con piso de rejilla, en donde recibieron agua, forraje seco y alimento concentrado

‡ Adaptación de Becerra L. y Ruiz C., al diseño de la Dra. Cristina Guerrero Molina (comunicación personal)

II. Puesta a punto del ensayo inmunoenzimático para detectar anticuerpos contra un extracto crudo de *Haemonchus contortus*

Obtención del antígeno

Los *H. contortus* adultos colectados durante las necropsias de los borregos rastreadores, se lavaron exhaustivamente con SSAF (pH 7.2) y después con SSAF + antibióticos*. Se mantuvieron vivos durante 2 h para que se limpiara su tracto intestinal y luego se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se fraccionaron en un sonicador (w 10% 1 pulso de 9.5 seg. Y descanso de 1.5 seg. Durante 5 minutos).

A continuación se mezclaron con una combinación de detergentes e inhibidores de proteasas (RIPA†) en un homogenizador de vidrio / vidrio en baño de hielo. Se centrifugó a 4,500 rpm/30 min. Y se obtuvo el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y se almacenó a -20°C en fracciones de 1.5 ml hasta su uso.

ELISA

El antígeno se diluyó (10 µg/ml) en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6. Se forró la placa (Nunc Maxisorp) con 100 µl y se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Se lavó la placa 3 veces, cada lavado con 200 µl/ pozo de SSAF pH 7.2 +Tween 0.1% en agitación lenta durante 5 minutos.

Los sitios reactivos libres se bloquearon con SSAF + Tween 0.1% + Albúmina sérica bovina 1%, durante 30 minutos a 37 °C.

El suero problema se diluyó 1:1,000 en SSAF + Tween 0.1% y se adicionaron 100 µl / pozo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Se lavó 3 veces con SSAF + Tween 0.1%.

*5ml H₂O bidestilada estéril + penicilina G sódica (1,000,000UI) + estreptomina (1g)

† RIPA. 50mM Tris HCL pH 7.4-8.0, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 2mM EDTA, 1% Tritón x-100, 1mM PMSF

El conjugado (anti IgG de ovino marcado con peroxidasa) se diluyó 1:1,000 en SSAF + Tween 0.1% y se adicionaron 100µl/ pozo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Se lavó 3 veces con SSAF + Tween 0.1%.

El substrato (Dicloro orto-Phenylendiamina OPD) se diluyó en solución de citratos (pH 4.5). Cinco mg de OPD en 10 ml de solución de citratos pH 4.5 + 4µl de peróxido de hidrogeno al 30%). La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 2M por pozo.

La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems a 492 nm.

Criterio de positividad

Utilizando 10 corderos sin infectar experimentalmente y al grupo infectado como positivo se estableció el siguiente punto de corte:

PC = promedio de las absorbancias del grupo negativo + 3 desviaciones estándar.

Los animales cuya absorbancia fue igual o mayor al punto de corte se consideraron positivos.

El punto de corte fue de 2.33.

III. Obtención de ADN de los corderos

El ADN de los corderos se obtuvo mediante la técnica propuesta por Miller *et al.* (1989), brevemente se describe a continuación.

A 500 μ l de sangre se le agregaron 2 volúmenes de H₂O dd (destilada desionizada), se agitó y centrifugó (12,000 rpm/ 14 minutos). Se conservó la pastilla y se agregó 1 ml de H₂O dd. Este procedimiento se repitió 3 veces.

La pastilla se resuspendió en 500 μ l de solución de lisis* y ARNasa (20 μ g/ml final). Se incubó a 37 °C durante una hora. Posteriormente se agregó Proteinasa K (100 μ g/ml final) y se incubó a 50 °C por 2 h y después a 65 °C una hora.

Se agregó NaCl (2M final). Se agitó y centrifugó (12,000 rpm/ 14 min). Se recuperó el sobrenadante en tubos estériles y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol frío, se homogenizó lentamente y después se centrifugó (12,000 rpm/ 14 min). Se decantó y la pastilla se lavó con 500 μ l de etanol al 70%.

La pastilla se seco y resuspendió en 200 μ l de H₂O dd. Se verificó la integridad (Figura 17) y se determinó su concentración en un fluorómetro.

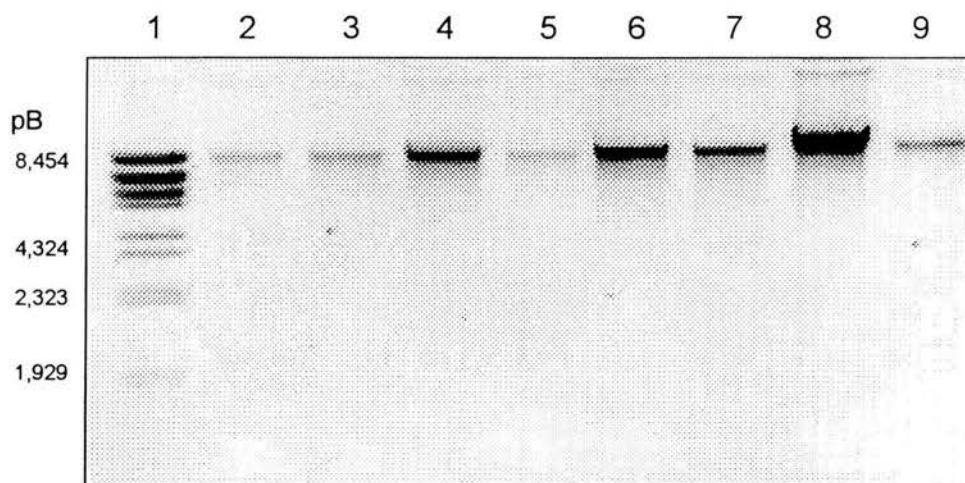


Figura 17. Corrimiento electroforético de ADN de cordero en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml.

Carril 1, marcador de peso molecular λ BstE II. Carriles 2 al 9, ADN de diferentes corderos.

* 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS

IV. Haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en ovejas y promedios de eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en cada tipo de infección

Categoría por tipo de infección			No. de Oveja	Haplotipo						Promedio hpgh	
Artificial	Natural	Ambas		OMHC1	OMHC2	DRB2	DRB2	DRB1	DRB1	Artificial	Natural
S	R	SR	009-9	194	200	276	286	462	464	500	725
S	S	SS	014-9	194	200	270	282	488	488	679	604
S	S	SS	041-9	198	200	276	292	462	462	1,014	2,117
R	R	RR	060-9	192	196	276	285	482	500	257	375
R	R	RR	066-9	204	204	276	284	ND	ND	314	119
R	S	RS	071-9	188	198	282	292	490	490	243	692
S	S	SS	072-9	ND	ND	ND	ND	500	500	557	783
S	R	SR	073-9	188	188	282	282	422	458	857	292
S	S	SS	079-9	188	194	ND	ND	ND	ND	1,114	788
S	R	SR	091-9	188	196	274	286	ND	ND	764	513
R	R	RR	132-9	188	188	274	282	ND	ND	150	204
S	S	SS	135-9	188	188	282	282	ND	ND	443	1,383
R	R	RR	149-9	194	196	268	284	488	488	300	196
S	R	SR	161-9	194	194	268	282	ND	ND	86	458
S	S	SS	162-9	192	192	268	274	488	488	1,071	775
R	R	RR	173-9	188	194	282	284	482	500	143	175
S	R	SR	174-9	188	196	269	282	448	488	386	494
S	R	SR	181-9	200	200	268	276	490	490	1,614	454
S	S	SS	211-9	198	198	276	292	464	464	543	538
S	S	SS	223-9	196	202	268	270	ND	ND	271	592
S	S	SS	248-9	200	206	268	276	448	454	786	975
S	R	SR	256-9	188	188	274	282	ND	ND	314	392
R	R	RR	262-9	188	194	274	274	446	448	800	258
R	R	RR	275-9	194	198	282	282	488	430	314	92
S	R	SR	295-9	192	202	268	262	ND	ND	1,757	275
S	S	SS	297-9	198	206	284	284	468	486	1,029	721
S	R	SR	299-9	196	206	262	268	ND	ND	1,707	163
S	R	SR	307-9	188	198	282	292	500	500	1,914	671

S =susceptible. R =resistente. ND =No determinado. Hpgh =huevos por gramo de heces

V. Haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en corderos y promedios de eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en cada tipo de infección

Categoría por tipo de infección			No. de	Haplotipo						Promedio hpgh	
Artificial	Natural	Ambas	Cordero	OMHCI	OMHCI	DRB2	DRB2	DRB1	DRB1	Artificial	Natural
S	R	SR	010-9	196	196	276	276	462	464	1,200	404
S	R	SR	035-9	198	200	270	282	486	498	800	533
S	R	SR	096-9	194	200	270	276	ND	ND	657	1,079
S	R	SR	150-9	192	192	272	274	ND	ND	1,086	342
R	R	RR	208-9	188	188	276	282	463	498	186	329
S	S	SS	218-9	206	206	276	292	498	498	1,114	1,579
R	R	RR	243-9	188	188	276	293	498	498	329	1,113
R	R	RR	246-9	ND	ND	ND	ND	464	464	529	1,025
S	R	SR	254-9	206	206	284	292	462	498	1,364	275
R	R	RR	258-9	188	204	280	280	ND	ND	743	400
R	R	RR	276-9	188	194	282	292	468	488	243	246
S	S	SS	282-9	188	188	276	282	368	368	286	1,642
R	R	RR	289-9	188	194	274	282	498	498	386	671
R	R	RR	300-9	196	202	270	276	ND	ND	486	433
R	R	RR	301-9	192	206	268	274	ND	ND	357	938
R	R	RR	302-9	188	198	282	292	400	400	250	713
S	S	SS	306-9	188	198	282	292	ND	ND	1,379	1,471
S	R	SR	308-9	188	206	282	292	488	492	1,257	575
S	R	SR	309-9	192	200	274	274	420	460	1,571	404
S	S	SS	311-9	198	206	292	292	ND	ND	1,129	2,271
R	S	RS	316-9	194	198	284	296	462	482	421	1,038

S =susceptible. R =resistente. ND =No determinado. Hpgh =huevos por gramo de heces