



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA RESISTENCIA HACIA TRES DERIVADOS  
DEL BENCIMIDAZOL DE DOS POBLACIONES DE *Haemonchus*  
*contortus* AISLADAS EN EL ESTADO DE CHIAPAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MERIT GONZÁLEZ OLVERA

Asesores

Biól. PhD Carlos Vásquez Peláez  
MVZ M en C. Enrique Liébano Hernández



MÉXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres todo el apoyo que he recibido y la confianza que han depositado en mí, la cual me ha llevado a concluir mis estudios y alcanzar mis metas.

A mis asesores, el Doctor Carlos Vásquez y el Doctor Enrique Liébanos por la gran ayuda que recibí de su parte en la realización de este trabajo.

Se agradece a los Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN205710-3 e IN207707-3 por su apoyo en la realización de éste estudio y en la Beca otorgada para la realización de la tesis.

Le agradezco a Dios por poner en mi camino a tantas personas que se presentaron en mi vida, justo en el momento indicado.

A mis compañeros en el laboratorio del INIFAP, Lili, Rosi, Rosalia, Ofe, Zaira, David y por supuesto a la Doctora Maru y el Doctor Pedro; aprendí mucho en mi estancia con ustedes y disfrute mucho su compañía.

A los doctores que me recibieron en Chiapas, la Dra. Maricela, la Dra. Erendira, el Dr. Héctor y Adi; así como a mis amigos Alexis, Omar, Yamili y Migue.

Finalmente al Doctor Héctor Quiroz Romero, por haber sido una inspiración, por haberme guiado, y motivado a lo largo de la carrera.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE CUADROS .....	VIII
LISTA DE ANEXOS .....	X
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	4
2.1 Nematodosis .....	4
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> .....	6
2.3 Bencimidazoles .....	11
2.4 Resistencia antihelmíntica .....	13
2.4.1 Diagnóstico de resistencia antihelmíntica .....	17
2.4.1.1 Prueba de Eficacia Antihelmíntica Controlada .....	17
2.4.1.2 Prueba de Reducción del Conteo de Huevos en Heces ....	18
2.4.1.3 Prueba de Eclosión de huevos .....	18
2.4.1.4 Prueba de Motilidad Larval .....	19
2.4.1.5 Prueba de Desarrollo Larval .....	20
2.4.1.6 Prueba de Fijación a la Tubulina .....	20

2.4.1.7 Técnicas moleculares .....	21
2.5 Métodos de control parasitario alternativos .....	21
2.5.1 Pastoreo rotativo .....	21
2.5.2 Selección genética de animales resistentes .....	22
2.5.3 FAMACHA© .....	22
2.5.4 Hongos nematófagos .....	22
2.5.5 Herbolaria .....	23
2.6 Borrego Pelibuey .....	23
2.7 Borrego Chiapas .....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	30
3.1 Lugar de muestreo .....	30
3.1.1 Teopisca, Chiapas .....	30
3.1.2 Tapachula, Chiapas .....	30
3.2 Ubicación del estudio .....	32
3.3 Manejo de los animales .....	32
3.4 Muestreo de animales .....	33
3.5 Procesamiento de muestras .....	34
3.6 Infección artificial .....	34
3.6.1 Inoculación del aislamiento puro de Hc de borrego Chiapas .....	35
3.7 Producción de L <sub>3</sub> .....	35
3.8 Necropsia parasitológica .....	36

3.9 Identificación y aislamiento de L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....	36
3.10 Pruebas <i>in vitro</i> : Afinidad a la tubulina .....	37
3.11 Modelo estadístico .....	38
3.12 Concentración Letal .....	39
4. RESULTADOS .....	40
4.1 Prueba de McMaster .....	40
4.2 Identificación de géneros larvarios .....	41
4.3 Producción de larvas .....	41
4.4 Monitoreo y cuidado de los borregos infectados .....	42
4.5 Pruebas <i>in vitro</i> del aislamiento de borregos Pelibuey (A1) .....	42
4.6 Pruebas <i>in vitro</i> del aislamiento de borregos Chiapas (A2) .....	44
4.7 Evaluación de la efectividad antihelmíntica .....	46
4.7.1 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 2 horas .....	46
4.7.2 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 18 horas .....	49
4.7.3 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 42 horas .....	51
4.8 Determinación de las concentraciones Letales (CL) .....	53
4.9 Predicción de la mortalidad .....	55
5. DISCUSIÓN .....	60
6. CONCLUSIÓN .....	63
7. BIBLIOGRAFÍA .....	64
8. ANEXOS .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> .....	8
2 Estructura química de los bencimidazoles .....	11
3 Borrego Chiapas blanco .....	26
4 Borrego Chiapas negro .....	26
5 Borrego Chiapas café .....	26
6 Mapa de la ubicación de los grupos indígenas en Chiapas .....	28
7 Mapa de los climas de Chiapas señalando la ubicación de Teopisca y Tapachula .....	31
8 Imagen de larvas vivas y muertas expuestas a antihelmínticos, observada con el objetivo 10x .....	38
9 <i>Teladorsagia circumcincta</i> .....	41
10 <i>Haemonchus contortus</i> .....	41
11 Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente .....	48

12	Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente .....	50
13	Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente .....	52
14	Regresión de la mortalidad utilizando febendazol a las 18 horas. a) Aislamiento Resistente. b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas. c) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc .....	56
15	Regresión de la mortalidad utilizando tiabendazol a las 18 horas. a) Aislamiento Resistente. b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas. c) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc .....	58
16	Regresión de la mortalidad utilizando albendazol a las 18 horas. a) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas .....	59



## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Huevos encontrados en la prueba de McMaster realizada a las heces de los borregos Chiapas .....	40
2 Proporción de mortalidad del aislamiento Resistente y del aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc .....	42
3 Proporción de mortalidad de acuerdo a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc ....	43
4 Proporción de mortalidad con respecto a la concentración utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc ....	43
5 Proporción de mortalidad y error estándar con respecto al aislamiento y a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc .....	44
6 Proporción de mortalidad según el aislamiento utilizado .....	44
7 Proporción de mortalidad de acuerdo con la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Chiapas con larvas de Hc .....	45

8	Proporción de mortalidad con respecto a la concentración utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Chiapas con larvas de Hc .....	45
9	Proporción de mortalidad y error estándar con respecto a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Chiapas con larvas de Hc .....	46
10	Concentraciones Letales $_{50, 90, 99}$ , (mg/ml) e Intervalo de confianza 95% con respecto a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente, de borregos Chiapas con larvas de Hc, y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc .....	55
11	Resultados obtenidos utilizando diferentes pruebas de diagnóstico de resistencia antihelmíntica .....	62

## LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
I Técnica de cultivo en frasco .....	73
II Técnica de coprocultivo en tina .....	74
III Criopreservación de larvas .....	75

## RESUMEN

GONZÁLEZ OLVERA MERIT. Evaluación *in vitro* de la resistencia hacia tres derivados del bencimidazol de dos poblaciones de *Haemonchus contortus* aisladas en el Estado de Chiapas (bajo la dirección de: Biól, PhD Carlos Vásquez Peláez y MVZ M. en C. Enrique Liébano Hernández)

*Haemonchus contortus* (**Hc**) es el parásito que más frecuentemente afecta las explotaciones de ovinos alrededor del mundo, y se considera que es el parásito de mayor patogenicidad y él que causa más daños en materia de salud y productividad. Tradicionalmente Hc era controlado usando antihelmínticos; pero cada vez son más frecuentes los reportes de resistencia. En el estado de Chiapas, en la región montañosa de los Altos, existe una población de ovinos de raza Chiapas, los cuales se ven afectados por una gran variedad de parásitos, siendo Hc el parásito que más los afecta; por lo que el objetivo de éste estudio fue aislar una cepa de Hc a partir de muestras de heces de borregos Chiapas para determinar su resistencia o susceptibilidad hacia tres derivados del bencimidazol (albendazol, tiabendazol y febendazol), realizando pruebas *in vitro* y comparando los resultados con un aislamiento Resistente. Se observó para el aislamiento Chiapas que las CL<sub>50</sub> fueron 0.01 mg/ml, 0.18 mg/ml y 0.23 mg/ml para febendazol, tiabendazol y albendazol respectivamente; mientras que en el aislamiento Resistente las CL<sub>50</sub> para los mismos productos fueron 0.074 mg/ml, 1.206 mg/ml y 33.4 mg/ml. Un segundo ensayo se realizó con un heterocultivo (*H. contortus* y *T. circumcincta*) aislado de borregos Pelibuey localizados en Tapachula, Chiapas; las CL<sub>50</sub> en pruebas *in vitro* mostraron: 0.01 mg/ml, 0.14

mg/ml y 0.014 mg/ml, para febendazol, tiabendazol y albendazol respectivamente.

Se concluye que los dos aislamientos de nematodos obtenidos de Chiapas son susceptibles a los tres derivados del Bencimidazol.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un parásito es un organismo con dependencia metabólica hacia otro organismo de una especie diferente, que generalmente es más evolucionado. Esta dependencia es el resultado de una pérdida de información genética por parte del parásito. Un parásito vive sobre o dentro del hospedero y se nutre a expensas del mismo sin destruirlo como el depredador; pero algunas veces afecta tanto su salud que llega a causarle la muerte.<sup>1</sup>

Las enfermedades causadas por parásitos gastrointestinales en los rumiantes, son una de las enfermedades con mayor impacto sobre la salud animal y su productividad a nivel mundial.<sup>2,3</sup> Por tanto existe la necesidad de encontrar estrategias de control alternativas y sustentables frente a una creciente resistencia antihelmíntica.<sup>4</sup>

En México, las nematodosis gastrointestinales son un grave problema y los géneros que con mayor frecuencia afectan al ganado ovino son: *Haemonchus contortus* (**Hc**), *Teladorsagia circumcincta* (**Tc**), *Cooperia spp*, *Trichostrongylus spp*, *Nematodirus spp*, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris ovis*, *Bunostomum spp*, *Oesophagostomum spp*, y *Chabertia ovina*.<sup>1</sup>

*Haemonchus contortus* es considerado como uno de los nematodos más patógenos<sup>1</sup> y que más pérdidas económicas genera;<sup>5</sup> así como uno de los

parásitos que más rápido generan resistencia hacia los desparasitantes;<sup>6</sup> y según estudios, es el nematodo con mayor prevalencia en México.<sup>7</sup>

Los bencimidazoles, son las sustancias más comúnmente empleadas por los productores en México frente a diversas nematodosis;<sup>6</sup> sin embargo se ha detectado que Hc ha desarrollado resistencia a éste fármaco.<sup>6, 8, 9, 10, 11</sup>

## 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Nematodosis

De acuerdo con sus características morfológicas, fisiológicas y filogenéticas se ha dividido a los parásitos para su estudio en varios grupos. Los parásitos de importancia en medicina veterinaria están considerados en los siguientes grupos: *Phylum Protozoa*, *Phylum Ciliophora*, *Phylum Platyhelminthes*, *Phylum Acantocephala*, *Phylum Nematoda*, *Phylum Arthropoda*, *Phylum Pentastomida*.<sup>1</sup>

Los nematodos corresponden al *Phylum Nematoda* y son gusanos con cuerpo cilindroide, no segmentado con un tracto intestinal y una cavidad general, con extremos terminados en punta. Son de forma redonda en sección transversa y están cubiertos por una cutícula más o menos resistente a la digestión intestinal.<sup>1</sup>

El *Phylum Nematoda* comprende varias familias, una de ellas, la familia *Trichostrongylidae*; cuyas características son una cápsula bucal muy pequeña o ausente y papilas cervicales más o menos desarrolladas.<sup>1</sup> El macho tiene como característica morfológica la bolsa copulatríz, la cual es relativamente grande y generalmente simétrica; también poseen espículas cuya forma es variable y depende del género. Las hembras son de gran tamaño y poseen una vulva, cuya forma y tamaño dependen del género. Esta familia comprende varios géneros, algunos de ellos son: *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp, *Ostertagia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Teladorsagia* spp.<sup>1</sup>

Los nematodos parásitos son el mayor problema de salud en la producción de ovinos en pastizales actualmente.<sup>12</sup> Los nematodos gastrointestinales económicamente importantes en los borregos pertenecen al orden *Strongylida* y la familia *Trichostrongyloidea* e incluyen a los géneros *Teladorsagia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Nematodirus* spp y *Haemonchus* spp.<sup>13</sup>

Las pérdidas económicas generadas por nematodos gastroentéricos ascienden hasta 41.8 millones de dólares (**mdd**) en Uruguay y a 26 mdd en Kenia; en éste último, las pérdidas fueron causadas únicamente por el nematodo Hc.<sup>9</sup>

Los efectos patogénicos de una infestación por nematodos pueden variar desde una depresión en la tasa de crecimiento, diarrea, y/o anemia; hasta la muerte, dependiendo de la severidad de la infección y de las especies de parásitos predominantes.<sup>14</sup>



Los nematodos también afectan el crecimiento de los corderos y causan problemas reproductivos en las hembras que cursan con el estrés de una gestación tardía o una lactación temprana.<sup>15</sup>

Los nematodos parásitos de los animales domésticos tienen gran importancia económica, debido a la frecuencia y elevada morbilidad con que se presentan en las diferentes especies. Se localizan en la mayoría de los órganos; sin embargo, es el tracto digestivo en donde se encuentra la mayoría.<sup>1</sup>

## **2.2 *Haemonchus contortus***

*Haemonchus contortus* es considerado uno de los nematodos más dañinos del estómago de ovinos en zonas tropicales y subtropicales;<sup>1</sup> así como el parásito más importante en términos económicos en muchas partes del mundo.<sup>5</sup> La razón por la cual Hc es tan importante es debido a su patogenicidad, a su rápido nivel de reproducción, a su adaptación al clima cálido y a su capacidad de sobrevivencia en climas inhóspitos por la hipobiosis.<sup>7</sup>

Hc presenta un ciclo evolutivo directo con dos fases; una exógena y una endógena. En la fase exógena, los huevos de los nematodos salen junto con las heces del animal al ambiente y dependiendo de una óptima temperatura (20-30°C) y humedad relativa (80%) eclosiona la L<sub>1</sub> entre 24 y 30 horas, para posteriormente

evolucionar a L<sub>2</sub> en aproximadamente 2 o 3 días; éstas larvas sufren una segunda ecdisis o muda para transformarse en L<sub>3</sub> (estadio infectante) en 4 a 7 días, según las condiciones ambientales.<sup>7</sup>

La L<sub>3</sub> es activa y sube a los tallos y hojas de los pastos que sirven como alimento a los rumiantes, para de ese modo infectarlos. En la fase endógena, la larva infectante muda en el rumen, al haber un incremento del pH ruminal, causado por la secreción de la enzima leucoaminopeptidasa a través de las células neurosecretoras de la larva.<sup>7</sup> La larva penetra al abomaso entre 10 y 20 minutos después de haber sido ingerida, en donde se transforma en L<sub>4</sub> y penetra a las criptas de las glándulas gástricas (durante este proceso puede inhibir temporalmente su desarrollo cuando la temperatura es extremadamente baja), posteriormente las L<sub>4</sub> dejan la mucosa y se alojan en el lumen abomasal para transformarse en L<sub>5</sub> y después en parásitos adultos, machos y hembras (Fig. 1).<sup>7</sup>

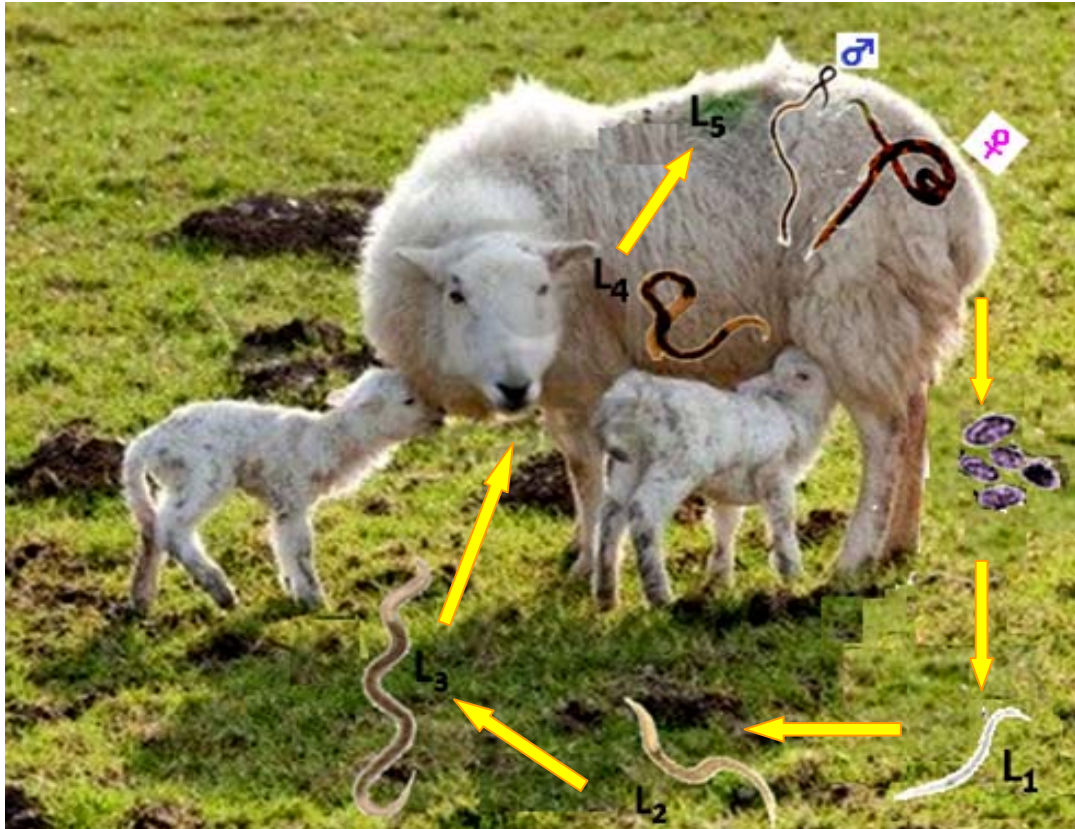


Figura 1. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*. Imagen amablemente proporcionada por el M. en C. Enrique Liébano Hernández.

Dentro del ciclo evolutivo de *Haemonchus* spp se encuentra un proceso denominado hipobiosis, que altera el ciclo normal de este parásito, y consiste en que las larvas cuatro que se encuentran dentro del hospedero permanecen en forma aletargada en la mucosa abomasal y continúan su desarrollo hasta que llega una estación apropiada, dando como resultado un gran número de adultos.<sup>7</sup>

La hipobiosis se ha descrito principalmente en regiones con inviernos fríos y prolongados; ya que al ser particularmente vulnerable a condiciones ambientales adversas, Hc, recurre a esta estrategia para colonizar, dispersarse y progresar incluso en regiones tan al norte como el círculo polar ártico.<sup>16</sup>

*Haemonchus* spp. es uno de los nematodos de mayor diseminación en los potreros debido a su gran prolificidad; ya que una hembra adulta y madura sexualmente llega a ovopositar de 5,000 a 10,000 huevos por día.<sup>7</sup> Al ser un endoparásito, Hc carece de pigmentación; sin embargo al alimentarse de sangre, su intestino se torna de color rojo; y en el caso de las hembras esto da una apariencia característica de palo de barbería pues su útero y su intestino se encuentran entrelazados.<sup>1</sup>

El estado adulto de Hc, localizado en el abomaso, produce una reacción inflamatoria progresiva con hiperemia y aumento en la producción de moco,<sup>15</sup> éste parásito presenta hábitos hematófagos,<sup>7</sup> por lo que es considerado altamente patógeno; un adulto suele alimentarse varias veces hasta 12 minutos por vez y es capaz de producir una pérdida de 0.05 ml diarios de sangre; tras la succión, la hemorragia puede continuar por hasta siete minutos, por lo que se presentan coágulos y erosión de la mucosa por descamación de las células epiteliales.<sup>17</sup>

Microscópicamente comienza una infiltración con células mononucleares y eosinófilos, con úlceras poco profundas en los bordes de los pliegues abomasales, lo que altera el pH abomasal y consecuentemente la digestión, el flujo de alimento

y el aprovechamiento de proteínas. Una contribución importante a la pérdida de proteína es la salida de plasma al tracto alimentario, donde encontramos principalmente pérdida de albúmina.<sup>17</sup>

Otra fuente endógena de pérdida de proteína es el aumento en la producción de moco y la proliferación de células caliciformes como respuesta a la irritación causada por el parásito.<sup>17</sup>

Los animales infectados muestran una menor tasa de crecimiento,<sup>5</sup> diarrea, gastritis aguda y edema generalizados,<sup>1</sup> presentan una anemia de tipo normocítica normocrómica, hipoproteinemia e hipoalbuminemia,<sup>17</sup> disminución en la producción de carne y lana, un pobre desempeño reproductivo<sup>5</sup> y finalmente la muerte, en caso de una infección aguda.<sup>17</sup>

En México, se han desarrollado estudios para detectar la presencia de los nematodos gastrointestinales en los rumiantes, y se ha concluido que el nematodo abomasal Hc es el que mayor prevalencia presenta.<sup>7</sup>

## 2.3 Bencimidazoles

En la actualidad existen varios grupos de sustancias antihelmínticas, uno de ellos es el de los bencimidazoles (Fig. 2), este grupo de desparasitantes presenta subdivisiones como son: Tiazólicos (tiabendazol, cambendazol), Metilcarbamatos (parbendazol, mebendazol, flubendazol, ciclo bendazol, oxibendazol, luxabendazol, albendazol, riconbendazol, febendazol, oxibendazol, oxbendazol), Halogenados (triclabendazol) y Pro-bencimidazoles (tiofanato, febantel, netobimin).<sup>18</sup>

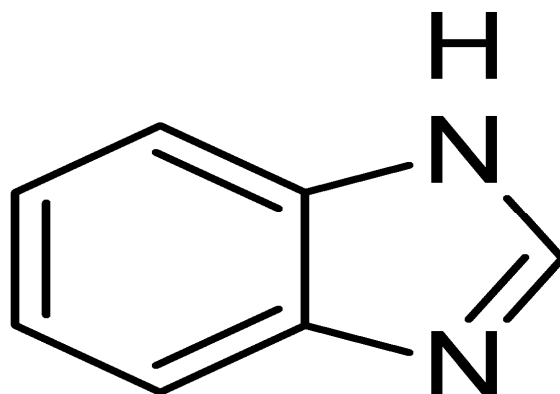


Figura 2. Fuente: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzimidazole\\_simple\\_structure.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzimidazole_simple_structure.png)

Los bencimidazoles alteran la estructura microtubular al unirse a la tubulina del nematodo favoreciendo la despolimerización y alterando la estructura de los microtúbulos. Un microtúbulo es un organelo con aproximadamente 15 nm de diámetro y con una longitud variable, este organelo está formado por dímeros compuestos por  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, y está involucrado en los procesos vitales para la función celular como el transporte de nutrientes, mitosis, y arquitectura celular;

además actúan modificando el transporte de glucosa hacia el citosol del parásito y la actividad de enzimas mitocondriales como la fumarato reductasa, lo que implica una depresión del parásito y la inhibición en la producción de ATP.<sup>17</sup>

Los microtúbulos se encuentran en otros organelos tales como las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas, los ribosomas, la membrana celular y el núcleo. Los microtúbulos están presentes en todas las células eucarióticas y su alteración bioquímica o fisiológica resulta en cambios que conllevan a la pérdida de la homeostasis celular, la cual causa muerte celular.<sup>17</sup>

El mecanismo de resistencia al bencimidazol parece ser común en muchas especies e incluye alteraciones en los genes que codifican  $\beta$ -Tubulina;<sup>19</sup> la alteración más común involucra una mutación de fenilalanina a tirosina localizada en el residuo 200 del isotipo 1 del gen  $\beta$ -Tubulina.<sup>20</sup> La resistencia a bencimidazoles generalmente es mediada por un decremento en la afinidad del bencimidazol para ligar a la  $\beta$ -Tubulina;<sup>21</sup> esto fue comprobado con varios fármacos de esta familia, contra poblaciones de Hc caracterizadas como resistentes y susceptibles a estos fármacos.<sup>18</sup>

En México se detectó por primera vez la resistencia a los bencimidazoles en una cepa de campo de Hc en el estado de Puebla en 1990,<sup>8</sup> posteriormente surgieron reportes en el Estado de México (1998), Veracruz (2000),<sup>6</sup> Morelos (2003),<sup>10</sup> Yucatán (2003)<sup>11</sup> y Tlaxcala (2006)<sup>9</sup>.

## 2.4 Resistencia antihelmíntica

En la producción animal alrededor del mundo, el uso de antihelmínticos para controlar parásitos internos y externos es una práctica muy común. El número de antihelmínticos de amplio espectro disponibles ha aumentado desde la introducción de los bencimidazoles a principios de los 60's; sin embargo, el uso intensivo e indiscriminado de los fármacos para suprimir las infecciones ha causado una rápida selección hacia la resistencia<sup>22</sup> y el aumento de reportes de nematodos insensibles a la mayoría; si no es que a todas las clases de antihelmínticos disponibles.<sup>23</sup>

La resistencia antihelmíntica puede definirse como la pérdida de la sensibilidad hacia un fármaco, transmitida genéticamente, en poblaciones de helmintos que previamente eran sensibles al mismo fármaco.<sup>20</sup>

En una población de helmintos, los alelos que codifican la resistencia estarán presentes, como el resultado de mutaciones; incluso en poblaciones que no han sido expuestas a los fármacos. La resistencia se desarrollará si los alelos que confieren resistencia representan una ventaja para la sobrevivencia de los parásitos que los poseen.<sup>20</sup>



Exponer a los helmintos que poseen los alelos de resistencia a los fármacos, le dará a estos helmintos una ventaja, lo cual provocará que la cantidad de helmintos resistentes en la población se incremente. La frecuencia de los alelos que codifican la resistencia, en el momento de la exposición a un fármaco será importante para la tasa de desarrollo de una población resistente.<sup>20</sup>

Otro factor importante para el desarrollo de la resistencia es la duración de la fase endógena del parásito; ya que las especies cuya fase endógena es corta tendrán más generaciones expuestas a un tratamiento antihelmíntico, que los parásitos con intervalos generacionales más largos. Los tricostrongilidos en los rumiantes (fase endógena de aproximadamente 3 semanas) son ejemplos de especies con intervalos generacionales cortos.<sup>20</sup>

Otro factor a considerar son los parásitos en refugio, los cuales representan la fracción de la población de helmintos que no son expuestos al fármaco cuando los animales son tratados; ej. huevos y larvas en el pasto. Los estadios de vida libre de los parásitos son la parte más importante del refugio. Mientras mayor sea la proporción de parásitos en refugio, más lento será el desarrollo de la resistencia, pues la presión de selección de toda la población es menor.<sup>20</sup>

Además de los factores antes mencionados, una forma común de desarrollo de la resistencia es la supervivencia de parásitos que tienen contacto con dosis subletales de algún compuesto, o cuando estos son aplicados en periodos cortos de tiempo.<sup>17</sup>

En términos generales la frecuencia en la selección de alelos asociados a la resistencia que se presenta en una población está influenciada por los siguientes factores: antropogénicos (frecuencia de aplicación de los desparasitantes, rotación de principios activos, rotación de potreros, y movimiento de animales), genéticos (frecuencia alélica y tipo de dominancia presente en una población) y biológicos o ecológicos (intervalo generacional y descendientes por generación).<sup>17</sup>

Sin embargo, en los sistemas modernos de pastoreo el mayor énfasis en el control de nematodos es limitar el número de larvas infectantes en la pastura, mediante el uso regular de antihelmínticos;<sup>24</sup> y es precisamente éste enfoque de control de parásitos el que favorece el surgimiento de la resistencia.

La resistencia antihelmíntica puede ser de 3 tipos; la resistencia lateral, se observa en todos los antihelmínticos que poseen estructura química y modo de acción similar, y es el resultado del desarrollo de resistencia hacia uno de ellos. La resistencia cruzada involucra a grupos de antihelmínticos con diferencias en la estructura química y en el mecanismo de acción. La resistencia múltiple, ocurre cuando los parásitos son resistentes a dos o más grupos de antihelmínticos, por resultado de una selección independiente a cada uno de ellos.<sup>17</sup>

La resistencia a los distintos grupos de antihelmínticos ha sido asociada a diferentes componentes estructurales del parásito, ya sean proteínas estructurales, o enzimas que facilitan el transporte del desparasitante a través de las membranas.<sup>17</sup>

La resistencia de los nematodos a los principales grupos de antihelmínticos ha sido documentada alrededor del mundo para las tres principales especies de nematodos en el borrego (*H. contortus*, *T. circumcincta* y *T. colubriformis*).<sup>12, 6, 8, 9, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 10, 11</sup>

De las muchas clases de helmintos reportados como resistentes a varios antihelmínticos hasta ahora, Hc es el más común y frecuentemente reportado en muchas partes del mundo.<sup>22</sup>

En México, los bencimidazoles son las sustancias, más comúnmente empleadas por los productores debido a su bajo costo y acción de amplio espectro.<sup>6</sup> La eficacia de este compuesto ha sido evaluada en diversas nematodosis en ovinos; pero se ha detectado que Hc ha desarrollado resistencia a este fármaco.<sup>6, 8, 9, 10, 11</sup>

## 2.4.1 Diagnóstico de resistencia antihelmíntica

Existen varias pruebas enfocadas al diagnóstico de nematodos resistentes a desparasitantes, las cuales se dividen en dos grandes grupos: 1.- Pruebas *in vivo* y 2.- Pruebas *in vitro*.<sup>31</sup>

Entre las pruebas *in vivo* están: La Prueba de Eficacia Antihelmíntica Controlada y la Prueba de Reducción del Conteo de Huevos en Heces. Las pruebas *in vitro* incluyen: Prueba de Eclosión de Huevos, Prueba de Motilidad Larval, Prueba de Desarrollo Larval, Prueba de Fijación a la Tubulina y Pruebas moleculares.<sup>31</sup>

### 2.4.1.1 Pruebas de Eficacia Antihelmíntica Controlada

Para estas pruebas se requiere un previo aislamiento de la población parasitaria sospechosa de ser resistente, con ella se inoculan algunos animales, estos animales se dividen en un grupo testigo y en un grupo a evaluar con el antiparasitario, se permite que las larvas alcancen la madurez (de 25 a 30 días), posteriormente los animales de ambos grupos se sacrifican, se aíslan los parásitos encontrados y se comparan los datos obtenidos, determinándose así la efectividad del producto.<sup>32</sup> Este método es el más confiable; aunque rara vez se usa debido a los altos costos que representa.<sup>20</sup>

#### 2.4.1.2 Prueba de Reducción del Conteo de Huevos en Heces

Esta prueba se basa en el conteo de huevos en la materia fecal pre y pos tratamiento, utilizando las vías y dosis recomendadas por el fabricante. En ésta prueba se monitorean los cambios en la eliminación de huevos durante el estudio, tomando en cuenta el porcentaje de efectividad, el cual debe ser superior a 95%, en esta técnica es necesario realizar un cultivo fecal pre y pos tratamiento para conocer los géneros presentes en ambas situaciones; así como mantener un grupo control sin desparasitación.<sup>33</sup> La precisión de éste método depende de la correlación entre la cuenta de los huevos y la carga parasitaria, la cual no siempre está presente. Los nematodos *T. colubriformis* y *O. circumcincta* muestran una baja correlación; mientras que *H. contortus* muestra una correlación alta.<sup>20</sup>

#### 2.4.1.3 Prueba de Eclosión de Huevos

Se fundamenta en el hecho de que los bencimidazoles impiden la embriogénesis y eclosión de los huevos y, consecuentemente, la producción de los estadíos de vida libre de los helmintos; cuando los nematodos son resistentes son refractarios al efecto ovicida de los bencimidazoles.<sup>31</sup> Básicamente, la prueba consiste en la separación de los huevos de las heces y posterior incubación de los mismos en una serie de diluciones de productos a base de bencimidazoles, para posteriormente determinar el porcentaje de huevos que embrionan y eclosionan mediante el cálculo de la Concentración Letal 50% (**CL<sub>50</sub>**)<sup>31</sup> que es la concentración media mínima para provocar la muerte en el 50% de los huevos, y

se compara con la CL<sub>50</sub> de una cepa susceptible (previamente aislada), obteniéndose así el índice de resistencia, que nos indica el número de veces que tiene que aumentarse la CL<sub>50</sub> de la cepa susceptible para producir los mismos efectos en la cepa en estudio.<sup>34</sup>

#### 2.4.1.4 Prueba de Motilidad Larval

Esta prueba se basa en que algunas drogas como el levamisol, el pirantel y el morantel actúan produciendo parálisis de los parásitos; ésta prueba se ha desarrollado especialmente para medir la motilidad de *Ostertagia spp.* y *Haemonchus spp.* Las larvas de los parásitos son expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de un fármaco, posteriormente se mide el grado de motilidad de éstas en un medidor de micromotilidad. Dicha prueba tiene la desventaja de su subjetividad en la medición para definir si una larva está paralizada o no. Igualmente, se informa que muchas veces se obtienen curvas atípicas de dosis-respuesta.<sup>31</sup>

#### 2.1.4.5 Prueba de Desarrollo Larval

En esta prueba se agregan aproximadamente 100 huevos por pozo en una placa de microaglutinación, posteriormente se incorpora a esta una dilución del antihelmíntico en cuestión, se incuba durante 7 días a 26°C, al pasar los 7 días se adiciona yodo a cada pozo y se contabilizan los huevos y larvas presentes además del estadio alcanzado por las últimas (primero, segundo o tercer estadio), obteniéndose la CL<sub>50</sub>.<sup>35</sup>

#### 2.4.1.6 Prueba de Fijación a la Tubulina

Esta prueba se ha desarrollado para evaluar la fijación de los bencimidazoles a la tubulina en sobrenadantes de suspensiones de larvas de tercer estadio. Ésta prueba se basa en la reducida capacidad de los bencimidazoles para fijarse a la tubulina de los parásitos resistentes.<sup>31</sup>

#### 2.4.1.7 Técnicas moleculares

Estas pruebas, hasta el momento sólo se utilizan para medir la resistencia hacia los bencimidazoles, dado que los mecanismos moleculares para levamisol, pirantel y lactonas macrocíclicas no están lo suficientemente claros. La prueba que se realiza es un PCR específico de múltiples alelos, en el cual se utilizan larvas de tercer estadio desenvainadas para extraer ADN; la prueba amplifica el isotipo 1 del gen  $\beta$ -Tubulina, buscando una de las mutaciones que confieren resistencia; ya que si la resistencia está dada por varias mutaciones, la prueba no funcionará.<sup>24</sup>

### 2.5 Métodos de control parasitario alternativos

#### 2.5.1 Pastoreo rotativo

En este sistema de pastoreo, los animales no ocupan siempre toda el área de pastoreo (pastoreo continuo) sino que en momentos determinados, existen áreas que se mantienen libres de animales. A pesar de que los tiempos de pastoreo y descanso son variables y en general ajustados a la calidad y disponibilidad de forraje, los períodos de descanso son lo suficientemente largos, para hacer declinar dramáticamente los niveles de contaminación de la pastura. Se ha visto que en climas templados 90 días de descanso son suficientes para reducir considerablemente las larvas en la pastura y en regiones más cálidas basta con 30 días.<sup>36</sup>



### 2.5.2 Selección genética de animales resistentes

Dentro de los programas de selección genética, la resistencia a infecciones parasitarias es uno de los caracteres más útiles ya que al reducir el número de parásitos, se limitan las consecuencias sobre la producción y disminuye la contaminación de los potreros; además de que cuenta con valores medios de heredabilidad (0.25-0.35). Los animales resistentes tienen la habilidad de resistir al establecimiento y posterior desarrollo de la infección parasitaria, mediante procesos inmunitarios; los individuos resistentes controlan el número de parásitos que se multiplican en ellos y disminuyen el nivel de postura de las hembras.<sup>36</sup>

### 2.5.3 FAMACHA©

Se trata de una técnica de desparasitación selectiva; donde se evalúa el grado de anemia que presentan los animales observado la coloración de la mucosa ocular y sólo los animales más afectados son desparasitados. Con ésta técnica se disminuye la presión de selección de nematodos resistentes y se permite que la población en refugio diluya la resistencia.<sup>36</sup>

### 2.5.4 Hongos nematófagos

Existen más de 200 especies de hongos que pueden utilizar a los nematodos como fuente de energía, estos hongos, son llamados nematófagos<sup>36</sup> y se clasifican en cuatro grupos: endoparasíticos, oportunistas, tóxicos y predadores.<sup>37</sup>

Se pretende utilizar estos hongos como control biológico, administrando sus esporas en el alimento para que destruyan a las larvas de nematodos en las heces; para que esto funcione, los hongos deben poder atravesar el tracto gastrointestinal de los rumiantes sin ser destruidos, algunas especies que han mostrado ésta característica y con las que más se trabaja actualmente son: *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys oligospora* y *Monacrosporium* spp,<sup>37</sup> se han realizado numerosas investigaciones con estas especies; sin embargo aún no se ha logrado desarrollar un producto estandar.<sup>36</sup>

### 2.5.5 Herbolaria

Esta estrategia promueve el uso de plantas que poseen actividad antiparasitaria con base a los conocimientos etnobotánicos acumulados por las comunidades indígenas de América Latina; y exige que su efectividad sea comprobada mediante el método científico; pero no para la creación de fármacos; sino para plantarlas en los ranchos y hacer uso de ellas en forma sustentable.<sup>36</sup>

## 2.6 Borrego Pelibuey

En México la producción ovina es una de las principales actividades del sector agropecuario. El auge de esta actividad en las regiones tropicales se ve reflejado, por un lado en el incremento del inventario de animales y por otro, en

una mayor producción debido a la aplicación de programas de manejo reproductivo, nutricional, sanitario y de mejoramiento genético, principalmente de la raza Pelibuey.<sup>38</sup>

En la década de los 80's los borregos Pelibuey se encontraban marginados en las regiones tropicales principalmente; pero a principios de los 90's, cuando el mercado nacional comenzó a demandar carne y no lana, esta raza se popularizó por todo el país mostrando gran capacidad de adaptación a cualquier clima y rusticidad. Inicialmente se extendió a las regiones templadas, y posteriormente, a las regiones áridas y semiáridas, lugares donde tradicionalmente se encontraban razas de lana.<sup>39</sup> En general, la raza Pelibuey se caracteriza por presentar un anestro estacional poco profundo y corto (Febrero a Abril), capacidad de adaptación a cualquier clima y sistema de producción, alta rusticidad, y poca demanda de manejo para subsistir y producir. Adicionalmente, se considera una raza altamente fértil y prolífica.<sup>39</sup>

## **2.7 Borrego Chiapas**

En México, específicamente en la región montañosa de los Altos, en el estado de Chiapas, existe un ganado de borregos criollos característico de la región. Este ganado descende de los borregos españoles introducidos en el siglo

XVI (Churra, Lacha y Manchega)<sup>40</sup> y debido al aislamiento geográfico y comercial que sufrió el Estado de Chiapas desde entonces hasta fechas recientes, podemos concluir que no se introdujo sangre de algunas otras razas ovinas; además esto no está documentado en las crónicas coloniales y no se hace aparente en las características fenotípicas del borrego Chiapas.<sup>41</sup>

Los borregos Chiapas son animales pequeños, que poseen gran rusticidad y están muy adaptados a su ambiente;<sup>41</sup> y está demostrado que poseen una gran diversidad genética.<sup>42</sup> Su manejo consiste en llevarlos a pastorear y alimentarlos con rastrojo de maíz; generalmente no reciben medicamentos comerciales, sino que se les proporcionan remedios caseros a base de plantas medicinales.<sup>41</sup>

Existen tres variedades o biotipos importantes del borrego Chiapas, que por sus nombres en tzotzil se denominan: ICSAT (ojos negros) que parece descender de la raza Churra, y se observa en la figura 3, SACJOL (mancha blanca en la cabeza), de la variedad negra de la Manchega, que se muestra en la figura 4, y MESHHA (cafecita) de la raza Lacha, en la figura 5.<sup>40</sup>



Figura 3. Borrego Chiapas blanco



Figura 4. Borrego Chiapas negro



Figura 5. Borrego Chiapas café

El borrego Chiapas muestra un peso corporal medio de 28 kg, una producción de 1.2 kg de lana burda por año, un rendimiento lechero de 400 ml/día en lactaciones de 110 días, pariendo un cordero por año<sup>40</sup> y se destetan de forma natural cuando cumplen seis meses de edad.<sup>41</sup>

El borrego Chiapas se formó a partir de troncos étnicos autóctonos españoles, puesto que sus fenotipos y sus características de producción así lo indican; así mismo que demuestran la ausencia de genes del tipo Merino.<sup>40</sup>

En otras regiones borregueras del centro de México, existen ovinos criollos que tienen cierta semejanza con los fenotipos descritos; sin embargo, aquellos poseen una lana muy corta por la influencia de la raza Merino así como una conformación más cárnica, por los cruzamientos que han sufrido con razas introducidas.<sup>40</sup>

Hoy día, los borregos Chiapas pertenecen exclusivamente a los indígenas<sup>40</sup> tzotziles, uno de los nueve grupos indígenas de origen maya, que habitan en la región montañosa de los Altos de Chiapas (Figura 6). Entre los tzotziles, la cría de ganado lanar constituye una importante estrategia de subsistencia, principalmente porque con los vellones de sus animales las mujeres elaboran la ropa tradicional para toda la familia así como artesanías que venden a los turistas. De igual forma los borregos generan ingresos adicionales a través del estiércol, el cual se utiliza como abono natural.<sup>41</sup>

En casos de urgencia económica, pueden vender alguno de sus borregos, los cuales se destinan para consumo entre la población no indígena; ya que los tzotziles no consumen la carne de los borregos por sus creencias religiosas, según las cuales toda persona tiene una esencia vital localizada en el corazón, además de un alma animal que está íntimamente ligada al hombre, al que acompaña

desde el nacimiento hasta la muerte; por tanto comerlo equivaldría a comer carne humana. Curiosamente los borregos son los únicos animales domésticos que entran en esta categoría.<sup>41</sup>

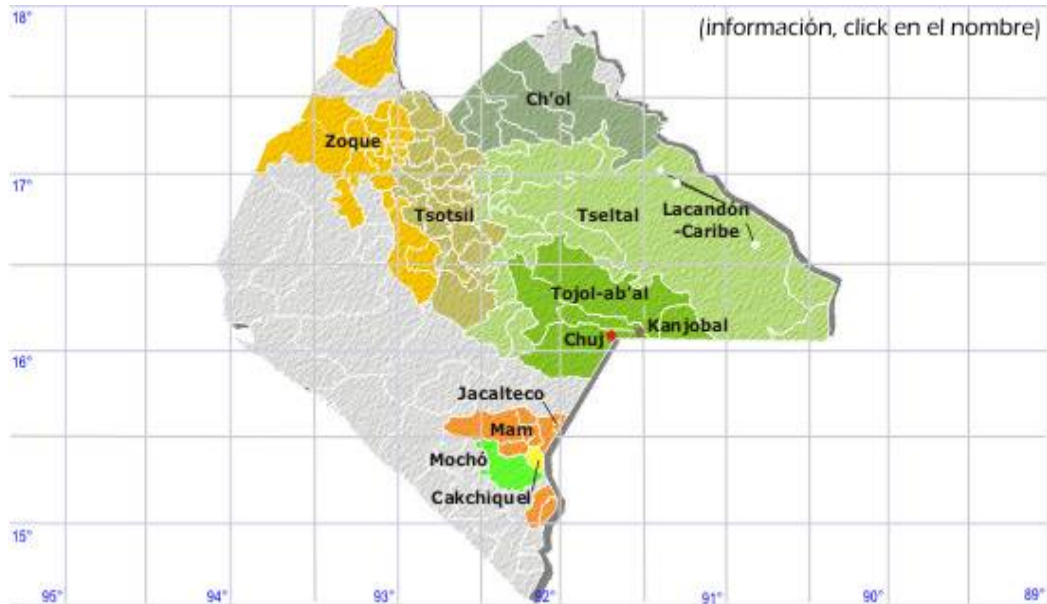


Figura 6. Mapa de la ubicación de los grupos indígenas en Chiapas.  
Fuente: [http://www.sepi.chiapas.gob.mx/Pueblos\\_indios/Pueblos.html](http://www.sepi.chiapas.gob.mx/Pueblos_indios/Pueblos.html)

Para mejorar los parámetros productivos del borrego Chiapas, en distintos momentos se han introducido diversas razas ovinas especializadas en la producción de lana, (Rambouillet, Columbia, Romney Marsh). Sin excepción, estos animales mostraron falta de adaptación al clima y a los recursos alimenticios disponibles y murieron en pocas semanas; y aun cuando hubieran sobrevivido, las características de su lana corta y fina no hubieran permitido a las artesanas trabajarlas.<sup>41</sup>

En el borrego Chiapas se presentan frecuentemente enfermedades digestivas causadas por parásitos,<sup>43</sup> y ocasionan importantes pérdidas económicas debidas a la reducción en la productividad de los mismos.<sup>44</sup>

Existe una alta incidencia de parasitosis, donde destacan las causadas por helmintos planos (*Moniezia* spp) y redondos (gastroentéricos y pulmonares), por protozoarios (*Eimeria* spp) y por *Fasciola hepatica*. Los borregos no son vacunados y ocasionalmente se presenta una mortalidad elevada.<sup>41</sup>

En un estudio epidemiológico se encontró que el porcentaje de borregos infectados con nematodos gastrointestinales a lo largo del año es de aproximadamente 77%. También se encontró una correlación negativa de 0.99 entre el peso y la infección con nematodos gastrointestinales, lo cual indica que la alta incidencia de parásitos lleva a los animales a perder peso. Al realizar los coprocultivos en invierno se observó que el 80% era *Haemonchus contortus*, 20% *Trichostrongylus* spp, 8% *Oesophagostomum* spp y 2% *Chabertia ovina*.<sup>44</sup>

## **OBJETIVO**

Determinar la Concentración Letal 50 y la resistencia o susceptibilidad hacia tres derivados del bencimidazol (albendazol, tiabendazol y febendazol) en dos poblaciones de *Haemonchus contortus* aisladas en el estado de Chiapas; una proveniente de borregos Chiapas y otra de borregos Pelibuey.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de muestreo

##### 3.1.1 Teopisca, Chiapas

Con el objeto de obtener y aislar *Haemonchus contortus* (**Hc**), se realizó un muestreo en 20 borregos de la raza Chiapas en el Centro Universitario de Investigación y Transferencia de Tecnología (**CUIT**) UACH, ubicado en la Región de los Altos en el municipio de Teopisca, Chiapas (Fig. 7) con una latitud norte de 16°32'24", una longitud oeste de 92°28'19" y 1780 msnm. El clima que prevalece en la región es C(w"2)(w), que corresponde a un clima semifrío, con un verano corto y frío; la temperatura media anual es de 13°C y la precipitación pluvial anual promedio 1059.2 mm.<sup>45</sup>

##### 3.1.2 Tapachula, Chiapas

Se realizó otro muestreo en 20 borregos de la raza Pelibuey en una explotación comercial en el municipio de Tapachula, Chiapas (Fig. 7), el cual presenta las siguientes coordenadas geográficas extremas: latitud norte 15° 14', latitud sur 14° 37', longitud oeste 92° 28', longitud este 92° 10' y una altitud de 160msnm. El clima es Am, cálido húmedo con abundantes lluvias en verano; la temperatura media anual es de 26.2°C y la precipitación pluvial anual promedio es de 2370 mm.<sup>46</sup>



Figura 7. Mapa de los climas de Chiapas señalando la ubicación de Teopisca y Tapachula.  
 Fuente: <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/chis/climas.cfm?c=444&e=22>

### 3.2 Ubicación del estudio

El aislamiento de Hc; así como las pruebas *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del INIFAP ubicado en Jiutepec, Morelos, en la carretera Cuautla-Cuernavaca, col. Progreso.

### 3.3 Manejo de los animales

En el CUIIT se mantienen únicamente borregos de la raza Chiapas que fueron en un inicio adquiridos en las comunidades indígenas y que ahora son mantenidos en condiciones de explotación semiintensiva.<sup>40</sup> El CUIIT consta de 54 ha. y alberga 530 borregos Chiapas, los animales son desparasitados mensualmente, haciendo rotación de principios activos; existe una alta incidencia de parasitosis en el rancho y se han observado los siguientes géneros: *Moniezia* spp, *Trichuris ovis*, *Fasciola hepatica*, *Nematodirus* spp, *Trichostrongylus* spp, *Oesophagostomum* spp, *Chabertia ovina*, *Oestrus ovis*, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* (**Tc**); y en algunas ocasiones se ha encontrado *Toxocara vitulorum*. A causa de las parasitosis los animales presentan anemia, diarrea, falta de crecimiento, emaciación y algunas veces mueren.

La explotación en Tapachula cuenta con 40 ha., de las cuales ocho se utilizan para pastorear a los borregos. La explotación alberga 150 borregos Pelibuey conjuntamente con bovinos. Los borregos se alimentan con pasto

Pangola y maíz molido, son desparasitados cada seis meses rotando los fármacos, ivermectina y albendazol; los animales no son pesados para aplicar los fármacos y se les dosifica de acuerdo al criterio de los vaqueros. No se introducen animales nuevos en la explotación y los principales problemas causados por parásitos son diarrea, falta de crecimiento y emaciación.

### **3.4 Muestreo de animales**

Con objeto de conocer la presencia de Hc en la población, se realizó un muestreo al azar de 19 borregos Chiapas (12 hembras y 7 machos) de diferentes edades, a los que se les tomaron muestras de heces directamente del recto,<sup>47</sup> para evaluar los géneros parasitarios presentes, así como su cantidad.

Una vez conocida la presencia de Hc en la población, se tomaron muestras de heces<sup>47</sup> de 20 borregos Chiapas (11 hembras y 9 machos) de diferentes edades, los cuales presentaban sintomatología de haemoncosis severa; para obtener larvas de Hc a partir de las heces.

Adicionalmente se tomaron muestras de heces<sup>47</sup> de 20 borregos Pelibuey (12 hembras y 8 machos) de diferentes edades para la obtención de larvas de Hc.

### 3.5 Procesamiento de muestras

Con dichas muestras se realizaron pruebas de McMaster<sup>47</sup> para determinar el número de huevos por gramo de heces (**hpg**), las muestras que resultaron positivas a huevos de nematodos gastroentéricos, se utilizaron para hacer Coprocultivos en frasco (Anexo I), y así obtener L<sub>3</sub> (larvas infectantes), las cuales fueron recuperadas con la técnica de Baermann; las larvas que se obtuvieron con esta técnica fueron filtradas con papel Optical Lens Paper, Thomas Scientific®, y luego fueron identificadas con base a sus características morfométricas.<sup>48</sup>

### 3.6 Infección artificial

Se seleccionaron dos borregos Pelibuey machos para ser infectados con las larvas obtenidas en los coprocultivos. Se tomaron muestras de heces<sup>47</sup> de los borregos seleccionados dos veces con un intervalo de diez días; con dichas heces se realizaron las pruebas de McMaster<sup>47</sup> y de flotación<sup>47</sup> para verificar que los borregos no estuvieran parasitados.

Para las larvas del borrego Chiapas se seleccionó un cordero macho de dos meses de edad y 10 kg de al que se le inocularon 2,300 larvas (total de larvas recuperadas del coprocultivo) vía oral.

Para las larvas del borrego Pelibuey se seleccionó un borrego Pelibuey macho de seis meses de edad de 30 kg de peso, que fue infectado vía oral a razón de 350 larvas/kg de peso.<sup>49</sup>

### 3.6.1 Inoculación del aislamiento puro de Hc de borrego Chiapas

Para el aislamiento puro de Hc de borrego Chiapas se seleccionó un borrego Pelibuey macho de seis meses de edad de 28 kg de peso, al que se le inocularon 350 larvas/kg de peso<sup>49</sup> de Hc vía oral.

## 3.7 Producción de L<sub>3</sub>

Transcurridos veintiún días de la fecha de infección de los borregos, se tomaron muestras de heces<sup>47</sup> de los borregos y se les hizo la prueba de McMaster<sup>47</sup> para confirmar que estuvieran positivos, entonces se colocaron a los borregos en jaulas metabólicas durante 45 días; durante ese periodo los animales fueron alimentados con concentrado para evitar que se reinfectaran con nematodos; también se recolectaron sus heces diariamente y se hicieron coprocultivos en tina (Anexo II), se tomaron muestras de sangre cada 15 días para evaluar el hematocrito<sup>50</sup>, se hicieron pruebas de McMaster<sup>47</sup> cada 15 días y se evaluó la condición corporal y las mucosas diariamente. Las larvas recuperadas fueron criopreservadas (Anexo III).

### **3.8 Necropsia parasitológica**

Se sacrificaron dos borregos a los dos meses de ser infectados, los borregos se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico administrado vía EV; según lo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) en el oficio emitido para el protocolo no. 353. Una vez sacrificados los borregos, fueron colocados en posición decúbito dorsal y se incidió a lo largo de la línea alba. Se expuso el aparato digestivo e inmediatamente se realizaron ligaduras dobles, con hilo cáñamo en las uniones omaso-abomasal, abomaso-duodenal e íleo-cecal, con la finalidad de evitar la migración parasitaria de un compartimiento a otro. Posteriormente se corto entre las dobles ligaduras y se retiró el abomaso a los borregos y su contenido se colocó en una charola de fondo oscuro donde se colectaron los adultos de Hc,<sup>51</sup> los cuales fueron separados en machos y hembras; las hembras se utilizaron para hacer un cultivo puro.<sup>52</sup>

### **3.9 Identificación y aislamiento de L<sub>3</sub> de *H. contortus***

Las larvas recuperadas de los coprocultivos del aislamiento del borrego Chiapas se colocaron en una caja de petri, para observarlas en el microscopio estereoscópico y tomar una pequeña muestra con una micropipeta de 20µl, la muestra se colocó en un portaobjetos y se observó con el aumento de 4x en el microscopio óptico, así se identificaron las L<sub>3</sub> de Hc y se retiraron de la muestra

usando la micropipeta, depositándolas en otra caja de petri. Se aislaron las L<sub>3</sub> de Hc una por una durante cuatro semanas hasta que se obtuvo la cantidad suficiente para un inóculo.

### **3.10 Pruebas *in vitro*: Afinidad a la tubulina**

Se utilizaron larvas frescas desenvainadas (Anexo III) y se realizaron 6 ensayos *in vitro*, uno con L<sub>3</sub> de Hc de borrego Chiapas, dos con L<sub>3</sub> de Hc y Tc de borrego Pelibuey y tres con L<sub>3</sub> del aislamiento de referencia de Hc del INIFAP.<sup>49</sup> Se utilizaron cajas de cultivo celular de 96 pozos, donde se prepararon diferentes concentraciones de febendazol, tiabendazol y albendazol (1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.250 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.062 mg/ml, 0.03 mg/ml). Los productos utilizados fueron sales activas de febendazol de laboratorios Intervet México, S.A. de C.V.; Pestanal® de SIGMA (2- 4-Thiazolyl benzimidazole) con sales activas de tiabendazol y Valvasen® 10% de Bayer; con albendazol como sustancia activa. Se realizaron dos repeticiones más un control con agua, en cada repetición se colocaron en promedio sesenta larvas<sup>53</sup> y se hicieron tres lecturas a las 2, 18 y 42 horas, donde se cuantificaron las larvas vivas y muertas en cada una de las concentraciones ensayadas. Las larvas vivas y muertas fueron cuantificadas mediante su observación en el microscopio compuesto en un portaobjetos con diez alícuotas de 5 µl. Los resultados fueron considerados con base a la motilidad de las larvas, como se muestra en la Figura 8.



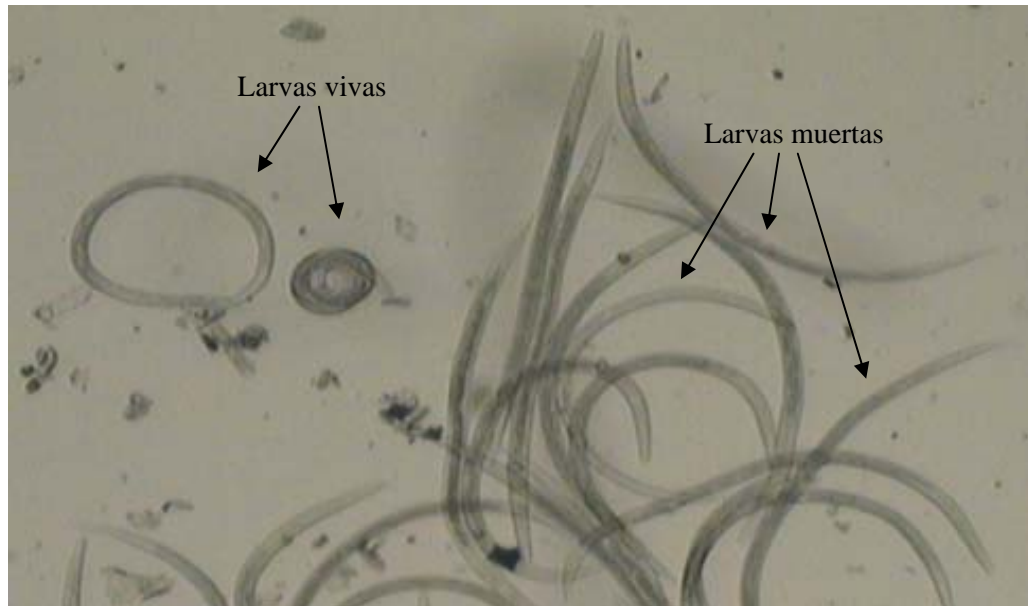


Figura 8. Imagen de larvas vivas y muertas expuestas a antihelmínticos, observada con el objetivo 10x. Las larvas vivas se encuentran en movimiento o “enrolladas”; mientras que las larvas muertas se observan inmóviles con rigidez muscular y usualmente en forma de letra “C”.

### 3.11 Modelo estadístico

Los datos de las pruebas *in vitro* fueron transformados a  $\arcseno\sqrt{p}$  para cumplir con los supuestos de normalidad, se utilizó un modelo lineal siendo los efectos explicativos Grupo (Aislamiento obtenido de borregos Pelibuey, Aislamiento de borregos Chiapas y Aislamiento Resistente Presionado de Referencia del INIFAP), cuando fue necesario se realizó una prueba de comparaciones múltiples a través de la prueba SNK. Se realizaron dos análisis, en el primero (**A1**) se incluyó la información de las pruebas *in vitro* realizadas con las larvas de borrego Pelibuey (Hc, Tc) y la información de las pruebas *in vitro*

realizadas con el aislamiento de referencia; en el segundo análisis (**A2**) se incluyó la información de las pruebas *in vitro* realizadas con las larvas de borrego Chiapas (Hc) y la información de las pruebas *in vitro* realizadas con el aislamiento de referencia; con el propósito de realizar comparaciones.

Se calculo el porcentaje de efectividad (PE) de cada fármaco para cada aislamiento de la siguiente manera:

$$PE = \frac{Gc - GT}{Gc} \times 100$$

Donde:

$Gc$  = Media del grupo control

$GT$  = Media del grupo tratado

### 3.12 Concentración Letal

Se calcularon diferentes concentraciones letales ( $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$ ,  $CL_{99}$ ) para cada aislamiento, mediante un análisis Probit incluido en el Programa Polo Plus, LeOra Software, 2002-2011. Se utilizaron los datos obtenidos en la segunda lectura (18 horas); ya que en la primera lectura no se pudieron obtener las CL para la cepa de Referencia, al tener mortalidades menores al 50%; y en la tercera lectura no se pudieron obtener las CL para la cepa de borregos Chiapas, pues las mortalidades eran del 100%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pruebas de McMaster

Se aprecia en el cuadro 1 que a excepción del borrego 5, todos los borregos estaban infectados con parásitos y todos presentaron huevos de tricostrongilidos, seis borregos presentaron huevos de *Trichuris ovis*, en tres borregos se observaron huevos de *Toxocara vitulorum* y solamente un borrego presento huevos de *Nematodirus* spp.

Cuadro 1. Huevos encontrados en la prueba de McMaster realizada a las heces de los borregos Chiapas.

Identificación	Sexo	Edad (años)	Huevos Por Gramo de heces			
			Tricostrongilidos	<i>Trichuris ovis</i>	<i>Nematodirus</i> spp	<i>Toxocara vitulorum</i>
11-5	M	5	1000			
42-3	M	7	900			
514-7	H	3	<50			
29-5	H	5	100	350		
53-8	H	2	3700			
17-4	H	6	1400			
20-7	H	3	100	100		
5	M	0.4				
14	H	0.4	100			
13	M	0.4	4900		50	
26	M	0.36	200			<50
74-2	H	8	<50			
25-7	H	3	<50			
1	H	0.41	900	400		
21	H	0.4	<50	450		<50
11	H	0.4	<50	<50		
19	M	0.4	1700	600		
24	M	0.39	150			
12-5	H	5	50			<50

## 4.2 Identificación de géneros larvarios

De acuerdo a sus características morfométricas<sup>48</sup> se identificaron los géneros *Haemonchus contortus* (Fig. 10) y *Teladorsagia circumcincta* (Fig. 9) en los cultivos de ambos borregos. Predominando Hc en el cultivo de borregos Chiapas; mientras que en el cultivo de borregos Pelibuey predominó Tc.

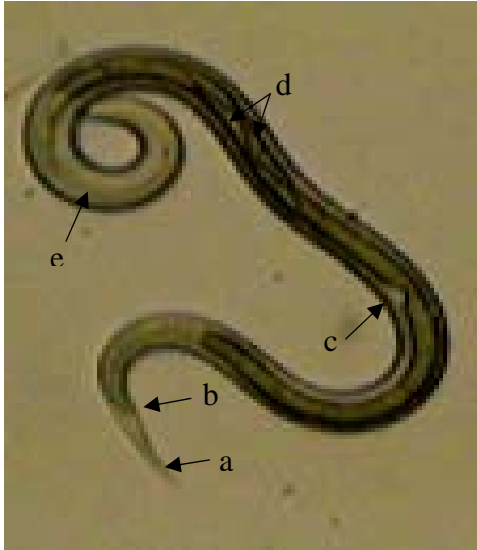


Figura 9. *Teladorsagia circumcincta*. Longitud total 729  $\mu$  a) Punta de la cola de la vaina, b) Punta de la cola de la larva, c) *Primordium genital*, d) 16 células intestinales, e) Esófago rabaditiforme. Obj. 10x.

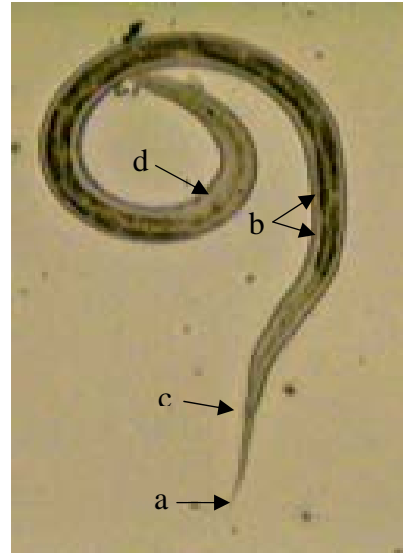


Figura 10. *Haemonchus contortus*. Longitud total 573  $\mu$  a. Punta de la cola de la vaina. b. 16 células intestinales c. Punta de la cola de la larva, d. Esófago rabaditiforme Obj. 10x.

## 4.3 Producción de larvas

A partir de los coprocultivos que se realizaron a las heces de los borregos infectados artificialmente, se obtuvieron 62,300 larvas de *Haemonchus contortus* (Hc) y *Teladorsagia circumcincta* (Tc) del borrego Chiapas, 74,600 larvas de Hc y Tc del borrego Pelibuey, y 60,000 larvas de Hc del borrego Chiapas. Todas las larvas obtenidas fueron criopreservadas (Anexo III).

#### 4.4 Monitoreo y cuidado de los borregos infectados

Los tres borregos infectados con las larvas obtenidas de los coprocultivos quedaron positivos; y durante los 45 días que se mantuvieron en las jaulas metabólicas, su hematocrito<sup>50</sup> se mantuvo entre 27 y 31, su condición corporal en 4, con mucosas rosas y cuentas de McMaster<sup>47</sup> menores a 5,000 hpg.

#### 4.5 Pruebas *in vitro* del aislamiento de borregos Pelibuey (A1)

En el cuadro 2 se observa que el aislamiento de borregos Pelibuey fue más susceptible a los principios activos que se utilizaron como desparasitantes, con respecto al aislamiento Resistente. Se observa que el aislamiento de borregos Pelibuey tuvo 68% de mortalidad y el aislamiento Resistente tuvo 36%.

Cuadro 2. Proporción de mortalidad de los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

AISLAMIENTO	N	MORTALIDAD ± ERROR ESTANDAR
Pelibuey	224	0.686 ± 0.007 <sup>a</sup>
Resistente	339	0.365 ± 0.009 <sup>b</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

Se aprecia en el cuadro 3 que en ambos aislamientos, el febendazol fue la sustancia activa que produjo mayor mortalidad, siendo esta de 79.2%, y en segundo lugar están el albendazol y el tiabendazol ya que no presentan una diferencia estadística, con mortalidades de 38.3% y 36.7% respectivamente.

Cuadro 3. Proporción de mortalidad de acuerdo a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

SUSTANCIA ACTIVA	N	MORTALIDAD $\pm$ ERROR ESTANDAR
Febendazol	180	0.792 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
Albendazol	179	0.383 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
Tiabendazol	180	0.367 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Control	24	0.012 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

En el cuadro 4 se observa que conforme mayor fue la concentración, mayor fue la mortalidad para ambos aislamientos. En la concentración inicial de 1 mg/ml la mortalidad alcanzó un 70.9%, en las concentraciones siguientes: 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.03 mg/ml; la mortalidad fue de 65.6%, 58.6%, 48.1%, 37% y 28.1%, respectivamente.

Cuadro 4. Proporción de mortalidad con respecto a la concentración utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

CONCENTRACIÓN	N	MORTALIDAD $\pm$ ERROR ESTANDAR
1 mg/ml	90	0.709 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
0.5 mg/ml	90	0.656 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
0.25 mg/ml	90	0.586 $\pm$ 0.012 <sup>c</sup>
0.125 mg/ml	90	0.481 $\pm$ 0.014 <sup>d</sup>
0.062 mg/ml	89	0.370 $\pm$ 0.015 <sup>e</sup>
0.03 mg/ml	90	0.281 $\pm$ 0.013 <sup>f</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

Se observa en el cuadro 5 que en el aislamiento de borrego Pelibuey hubo mayor mortalidad que en el aislamiento resistente; también se observa que en ambos aislamientos el febendazol provocó mayor mortalidad, seguido por el

albendazol y finalmente por el tiabendazol. El febendazol causó 93.8% de mortalidad en el aislamiento de borregos Pelibuey y 69.4% en el aislamiento Resistente; el albendazol causó 61.7% de mortalidad en el aislamiento de borregos Pelibuey y 23% en el aislamiento Resistente; y el tiabendazol causó 58.5% de mortalidad en el aislamiento de borregos Pelibuey y 22.2% en el aislamiento Resistente.

Cuadro 5. Proporción de mortalidad y error estándar con respecto al aislamiento y a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

AISLAMIENTO	Febendazol	Albendazol	Tiabendazol	Control
Pelibuey	0.938 ± 0.005	0.617 ± 0.011	0.585 ± 0.013	0.029 ± 0.004
Resistente	0.694 ± 0.013	0.230 ± 0.007	0.222 ± 0.013	0.001 ± 0

#### 4.6 Pruebas *in vitro* del aislamiento de borregos Chiapas (A2)

Se observa en el cuadro 6 que en el aislamiento de borregos Chiapas hubo mayor mortalidad que en el aislamiento Resistente, incluso la mortalidad aumentó casi al doble, pues en el aislamiento de borregos Chiapas fue del 60.6%, mientras que en el aislamiento Resistente fue de 36.5%.

Cuadro 6. Proporción de mortalidad según el aislamiento utilizado. Ambos aislamientos contenían únicamente larvas de Hc.

AISLAMIENTO	N	MORTALIDAD ± ERROR ESTANDAR
Chiapas	103	0.606 ± 0.011 <sup>a</sup>
Resistente	339	0.365 ± 0.006 <sup>b</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

Se aprecia en el cuadro 7 que el producto que causó mayor mortalidad en ambos aislamientos fue el febendazol con una mortalidad de 76.2%, seguido por el tiabendazol y por el albendazol que no mostraron diferencia estadísticamente con mortalidades de 28.8% y 27.8% respectivamente.

Cuadro 7. Proporción de mortalidad de acuerdo con la sustancia activa utilizada en el aislamiento Resistente y en el aislamiento de borrego Chiapas con larvas de Hc.

SUSTANCIA ACTIVA	N	MORTALIDAD ± ERROR ESTANDAR
Febendazol	140	0.762 ± 0.009 <sup>a</sup>
Tiabendazol	140	0.288 ± 0.007 <sup>b</sup>
Albendazol	141	0.278 ± 0.008 <sup>b</sup>
Control	21	0.001 ± 0.000 <sup>c</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

Se observa en el cuadro 8 que conforme aumentó la concentración, mayor fue la mortalidad para el aislamiento Resistente y para el aislamiento de borregos Chiapas. La concentración inicial fue de 1 mg/ml, y produjo una mortalidad del 65.8%, en las concentraciones siguientes de 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.03 mg/ml; la mortalidad fue de 58.7%, 50.8%, 38.8%, 28.1% y 19.4% respectivamente.

Cuadro 8. Proporción de mortalidad con respecto a la concentración utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Chiapas con larvas de Hc.

CONCENTRACIÓN	N	MORTALIDAD ± ERROR ESTANDAR
1	72	0.658 ± 0.015 <sup>a</sup>
0.5	72	0.587 ± 0.016 <sup>b</sup>
0.25	72	0.508 ± 0.015 <sup>c</sup>
0.125	72	0.388 ± 0.013 <sup>d</sup>
0.062	70	0.281 ± 0.012 <sup>e</sup>
0.03	63	0.194 ± 0.011 <sup>f</sup>

Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$



Se aprecia en el cuadro 9 que el aislamiento que tuvo mayor mortalidad de nematodos fue el de los borregos Chiapas y que la sustancia activa que causó mayor mortalidad fue el febendazol, seguido por el tiabendazol y por el albendazol, respectivamente. En el aislamiento de borregos Chiapas el febendazol produjo una mortalidad de 99% y en el aislamiento Resistente la mortalidad fue de 69.4%; el tiabendazol produjo una mortalidad de 51.1% en el aislamiento de borregos Chiapas y 22.2% en el aislamiento Resistente; y el albendazol causó una mortalidad de 43.5% en el aislamiento de borregos Chiapas y 23% en el aislamiento Resistente.

Cuadro 9. Proporción de mortalidad y error estándar con respecto a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente y de borregos Chiapas con larvas de Hc.

Aislamiento	Febendazol	Tiabendazol	Albendazol	Control
Chiapas	0.990 ± 0.001	0.511 ± 0.014	0.435 ± 0.018	0.000 ± 0
Resistente	0.694 ± 0.012	0.222 ± 0.005	0.230 ± 0.005	0.001 ± 0.000

## 4.7 Evaluación de la efectividad antihelmíntica

### 4.7.1 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 2 horas

En la figura 11 se aprecia la diferencia del porcentaje de efectividad entre los tres aislamientos en estudio; ya que en el aislamiento de borregos Chiapas el febendazol alcanzó el 100% de efectividad en casi todas las concentraciones ensayadas (Fig. 11a); mientras que en el aislamiento de borregos Pelibuey sólo

alcanzó el 100% de efectividad en las últimas tres concentraciones (Fig. 11b) y el aislamiento Resistente, con el mismo producto sólo alcanzó el 100% de efectividad en la concentración más alta (Fig. 11c). En el caso del tiabendazol, en el aislamiento de borregos Chiapas, la efectividad de éste antihelmíntico aumentó hasta alcanzar 70% de efectividad (Fig. 11a), en el aislamiento de borregos Pelibuey aumentó hasta alcanzar 89% de efectividad (Fig. 11b) y en el aislamiento Resistente únicamente alcanzó 30% de efectividad (Fig. 11c). Finalmente con el albendazol podemos ver que en el aislamiento de borregos Chiapas este antihelmíntico comenzó a presentar efectividad hasta la concentración de 0.25 mg/ml y alcanzó una efectividad de 30% en la concentración más alta (Fig. 11a); mientras que en el aislamiento de borregos Pelibuey inició su actividad en la concentración más baja y llegó hasta casi un 40% de efectividad (Fig. 11b) y en el aislamiento Resistente éste antihelmíntico sólo obtuvo 1% de efectividad en la concentración de 1 mg/ml (Fig. 11c).

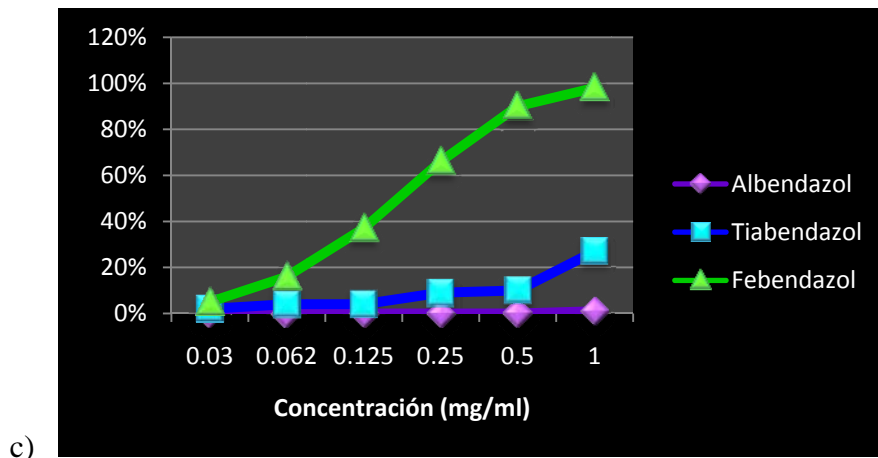
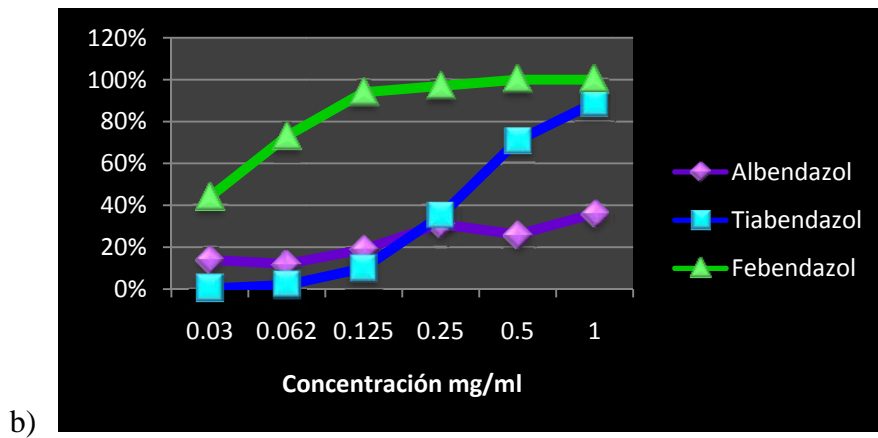
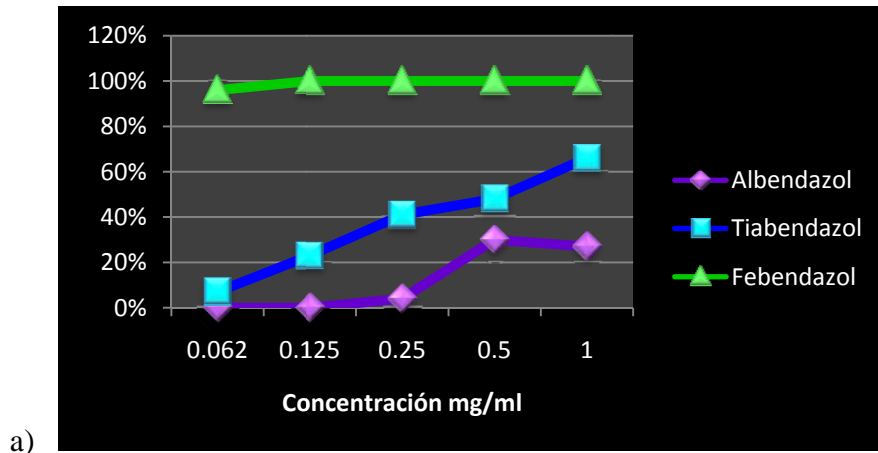


Figura 11. Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente.

#### 4.7.2 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 18 horas

Se observa en la Figura 12 que el comportamiento entre los tres aislamientos sigue siendo diferente; en el aislamiento de borregos Chiapas el febendazol alcanzó el 100% de efectividad en casi todas las concentraciones ensayadas (Fig. 12a) y en el aislamiento de borregos Pelibuey pasó casi lo mismo (Fig. 12b); mientras que en el aislamiento Resistente, el mismo producto sólo alcanzó el 100% de efectividad en la concentración de 0.5 mg/ml y de 1 mg/ml (Fig. 12c). En el caso del tiabendazol, en el aislamiento de borregos Chiapas la efectividad de éste antihelmíntico aumentó hasta alcanzar 85% de efectividad (Fig. 12a), en el aislamiento de borregos Pelibuey alcanzó el 100% (Fig. 12b) y en el aislamiento Resistente alcanzó un 54% de efectividad (Fig. 12c). Finalmente con el albendazol podemos ver que en el aislamiento de borregos Chiapas este antihelmíntico alcanzó una efectividad de 91% (Fig. 12a) y en el aislamiento de borrego Pelibuey 78% (Fig. 12b); mientras que en el aislamiento Resistente éste antihelmíntico sólo alcanzó 28% de efectividad (Fig. 12c).

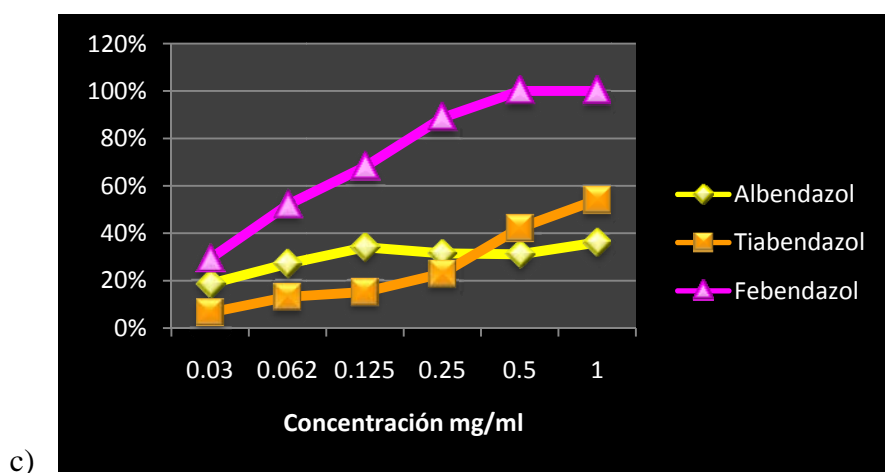
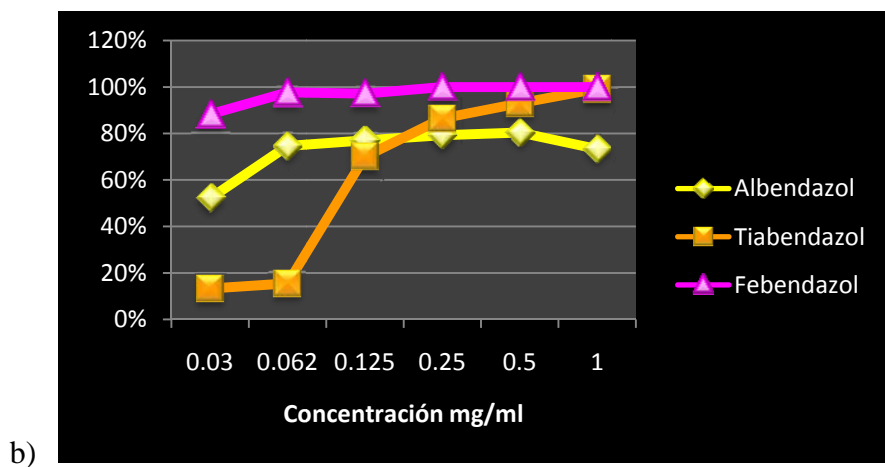
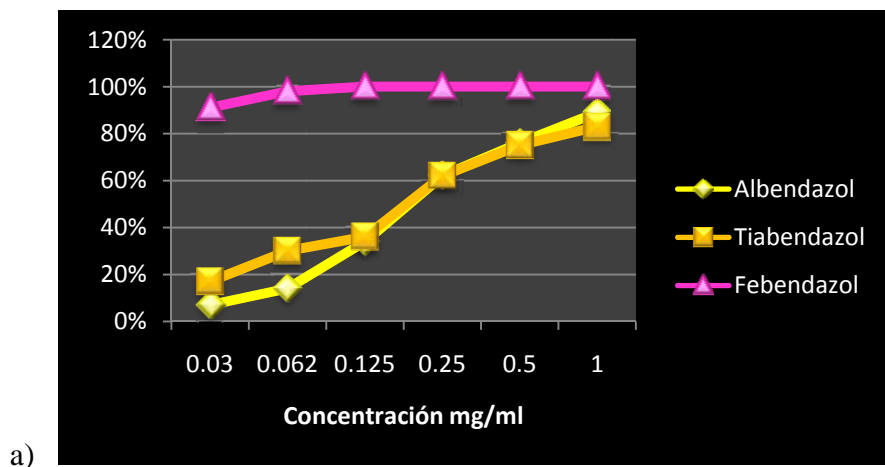


Figura 12. Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente.

#### 4.7.3 Porcentaje de efectividad de los bencimidazoles a las 42 horas

En las gráficas de la Figura 13 se aprecia la diferencia con la que los aislamientos responden a las mismas sustancias activas; se observa que en el aislamiento de borregos Chiapas el febendazol alcanzó el 100% de efectividad en todas las concentraciones ensayadas (Fig. 13a); en el aislamiento de borregos Pelibuey también alcanzó el 100% de efectividad en todas las concentraciones a excepción de la primera (Fig. 13b); mientras que en el aislamiento Resistente, el mismo producto sólo alcanzó el 100% de efectividad en la concentración de 0.5 mg/ml y de 1 mg/ml (Fig. 13c). En el caso del tiabendazol, en el aislamiento de borregos Chiapas la efectividad de éste antihelmíntico inició en 50% y terminó en 100% (Fig. 13a), para el aislamiento de borregos Pelibuey inició en 45% y alcanzó el 100% en las dos últimas concentraciones (Fig. 13b) y en el aislamiento Resistente únicamente alcanzó 56% de efectividad (Fig. 13c). Por último con el albendazol se puede observar que en el aislamiento de borregos Chiapas este antihelmíntico alcanzó una efectividad de 94% (Fig. 13a) y en el aislamiento de borregos Pelibuey 91% (Fig. 13b); mientras que en el aislamiento Resistente éste antihelmíntico alcanzó 42% de efectividad (Fig. 13c).

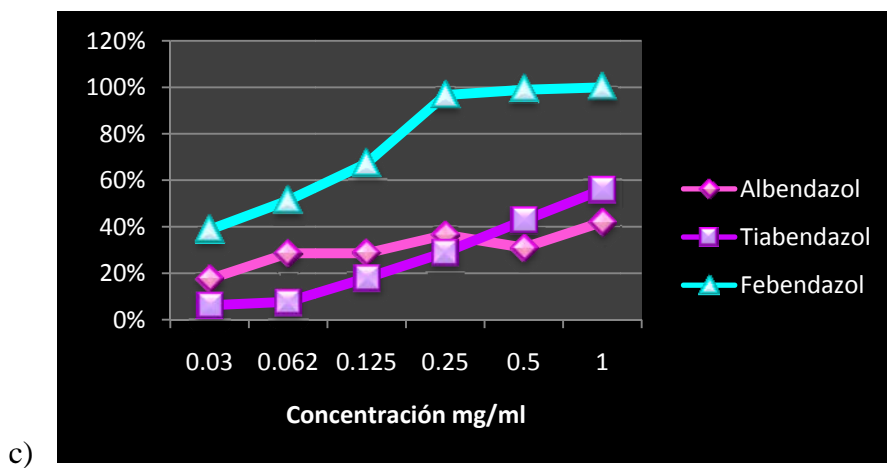
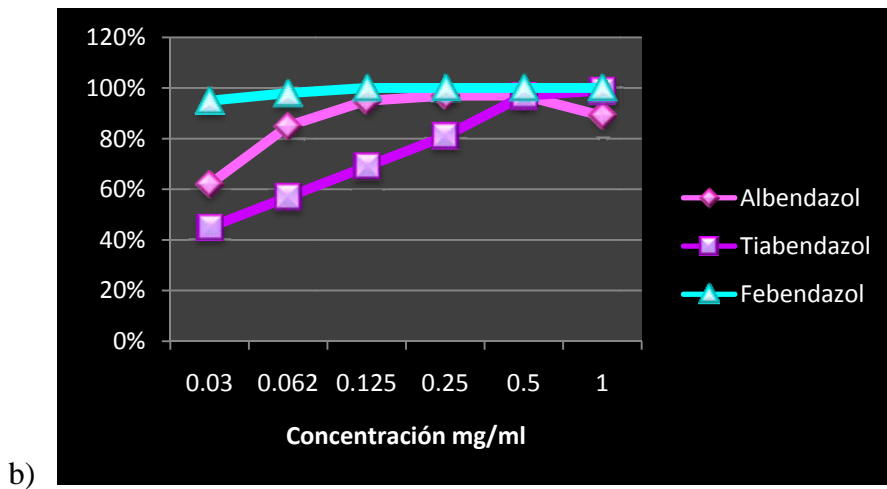
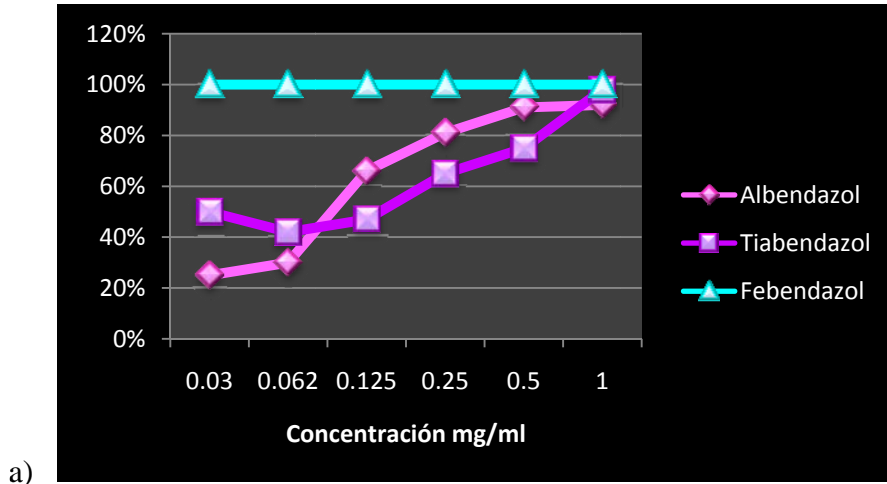


Figura 13. Porcentaje de efectividad de acuerdo a la concentración y a las sustancias activas utilizadas. a) Aislamiento de borregos Chiapas con larvas de Hc. b) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. c) Aislamiento Resistente.

## 5.8 Determinación de las Concentraciones Letales (CL)

En el cuadro 10 se observa que utilizando febendazol en el aislamiento de borregos Chiapas se requirieron 0.010 mg/ml para matar al 50% de las larvas, para el aislamiento de borregos Pelibuey la cantidad es casi la misma; sin embargo su intervalo de confianza es mayor al intervalo de la cepa Chiapas; y en el Resistente se requirieron 0.074 mg/ml para matar al 50% de las larvas. Con respecto al tiabendazol, en el aislamiento de borregos Pelibuey se necesitaron 0.139 mg/ml para matar al 50% de las larvas y en el aislamiento de borregos Chiapas se requirieron 0.178 mg/ml para producir el mismo efecto; en tanto que con el aislamiento Resistente la cantidad de producto requerida aumentó hasta 1.206 mg/ml. Para el albendazol existe una diferencia más marcada entre el comportamiento de cada aislamiento pues en el aislamiento de borregos Pelibuey el 50% de las larvas se murió utilizando 0.014 mg/ml, y esta cantidad aumentó a 0.23 mg/ml en el aislamiento de borregos Chiapas y finalmente el aislamiento Resistente requirió 33.39 mg/ml para obtener el mismo resultado. Para la  $CL_{90}$ , se observa que el uso del febendazol mata al 90% de las larvas a menores concentraciones con respecto a los otros productos; en el aislamiento de borregos Chiapas se requirieron 0.031 mg/ml, para el aislamiento de borrego Pelibuey se requirieron 0.039 mg/ml y para el aislamiento Resistente se requirieron 0.353 mg/ml. Al observar el tiabendazol, se requirieron 0.342 mg/ml para matar al 90% de las larvas del aislamiento de borregos Pelibuey, para el aislamiento borregos Chiapas se requirieron 1.57 mg/ml y para el aislamiento Resistente se requirieron 41.99 mg/ml. Por último para el albendazol, en el aislamiento de borregos Chiapas



se requirieron 0.970 mg/ml para matar al 90% de la población y 2.761 mg/ml para matar al 90% de las larvas en el aislamiento de borregos Pelibuey; sin embargo este último tiene un intervalo bastante amplio, pues su límite superior de confianza es de 246 mg/ml, y en el caso del aislamiento Resistente, la cantidad necesaria para matar al 90% de la población es tan alto que no se obtuvo el valor; pero rebasa los 2,177 mg/ml, ya que ese es su límite inferior de confianza. Matar al 99% de las larvas resulta más difícil, por lo tanto se observa para la  $CL_{99}$  que en algunos casos se requirieron grandes cantidades de producto como en el caso del albendazol, donde se requirieron 3.47 mg/ml en el aislamiento de borregos Chiapas y 200 mg/ml en el aislamiento de borregos Pelibuey; mientras que para el aislamiento Resistente éste valor excedió los mil millones de mg/ml; ya que el programa ni siquiera proporcionó el límite inferior que puede expresarse hasta  $10^8$ . Con el tiabendazol se requirió menos cantidad de producto para matar al 99% de las larvas; en el aislamiento de borregos Pelibuey se requirieron 0.714 mg/ml, en el aislamiento de borregos Chiapas se requirieron 9.277 mg/ml y el aislamiento Resistente requirió 759 mg/ml. Por último, cuando se utilizó febendazol, el 99% de las larvas del aislamiento de borregos Chiapas se murió con 0.075 mg/ml, las larvas del aislamiento de borregos Pelibuey se murieron con 0.106 mg/ml y las larvas del aislamiento Resistente con 1.269 mg/ml.

Cuadro 10. Concentraciones Letales<sub>50, 90, 99</sub> (mg/ml) e Intervalo de confianza 95% con respecto a la sustancia activa utilizada en los aislamientos Resistente, de borregos Chiapas con larvas de Hc, y de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

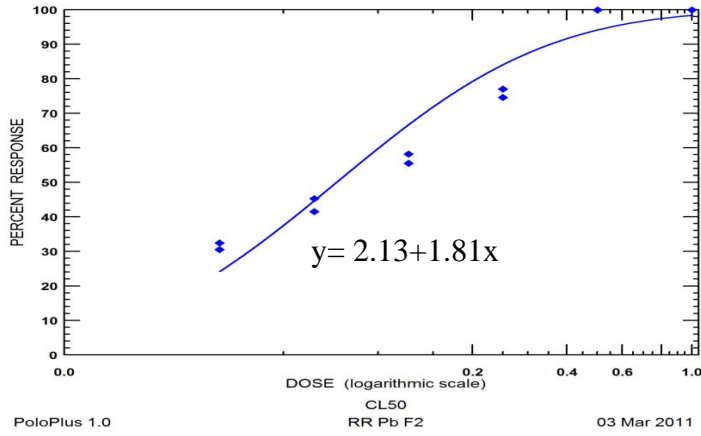
CL <sub>50</sub>	Aislamiento	Febendazol		Tiabendazol		Albendazol	
		Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza
CL <sub>50</sub>	Chiapas	0.010	0.002-0.016 <sup>a</sup>	0.178	0.149-0.211 <sup>a</sup>	0.230	0.177-0.233 <sup>a</sup>
	Pelibuey	0.011	0.004-0.018 <sup>a</sup>	0.139	0.105-0.180 <sup>a</sup>	0.014	0.000-0.043 <sup>b</sup>
	Resistente	0.074	0.054-0.095 <sup>b</sup>	1.206	0.772-2.406 <sup>b</sup>	33.39	4.31- 82,161 <sup>c</sup>
CL <sub>90</sub>	Aislamiento	Febendazol		Tiabendazol		Albendazol	
		Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza
CL <sub>90</sub>	Chiapas	0.031	0.021-0.037 <sup>a</sup>	1.570	1.137-2.392 <sup>a</sup>	0.970	0.776-1.278 <sup>a</sup>
	Pelibuey	0.039	0.030-0.048 <sup>a</sup>	0.342	0.253-0.563 <sup>b</sup>	2.761	0.833-246 <sup>a</sup>
	Resistente	0.353	0.253-0.582 <sup>b</sup>	41.99	13.73-274.2 <sup>c</sup>	*****	2,177- ***** <sup>b</sup>
CL <sub>99</sub>	Aislamiento	Febendazol		Tiabendazol		Albendazol	
		Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza	Media	Intervalo de Confianza
CL <sub>99</sub>	Chiapas	0.075	0.058-0.154 <sup>a</sup>	9.277	5.43-18.972 <sup>a</sup>	3.476	2.450-5.419 <sup>a</sup>
	Pelibuey	0.106	0.076-0.235 <sup>a</sup>	0.714	0.460-1.615 <sup>b</sup>	200	13-13,036,000 <sup>b</sup>
	Resistente	1.269	0.732-3.104 <sup>b</sup>	759	138-13,566 <sup>c</sup>	*****	*****

\*\*\*\*\* (No se pudo obtener el valor correspondiente).

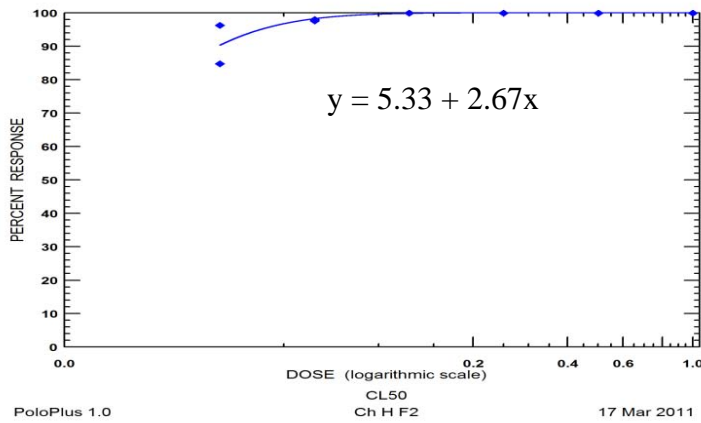
Valores con literales diferentes presentaron significancia estadística  $P < (0.05)$

#### 4.9 Predicción de la mortalidad

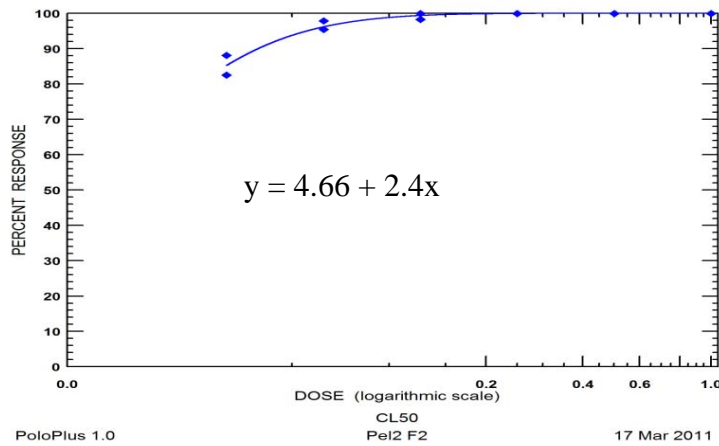
En la Figura 14 se observa la ecuación de regresión que predice la mortalidad de los aislamientos Resistente, Chiapas, y Pelibuey; según la dosis de febendazol aplicada en las pruebas *in vitro*. La mortalidad del aislamiento Resistente aumenta 1.81% por cada unidad que se aumente la dosis y alcanzó el 100% de mortalidad con la dosis de 1 mg/ml (Fig. 14a). El aislamiento de borregos Chiapas tiene una mortalidad de 2.67% por cada unidad que se aumente la dosis y alcanzó el 100% de mortalidad con la dosis de 0.125 mg/ml (Fig. 14b). El aislamiento de borregos Pelibuey presenta una mortalidad de 2.4% por cada unidad que se aumente la dosis y alcanzó el 100% de mortalidad con la dosis de 0.125 mg/ml (Fig. 14c)



a)



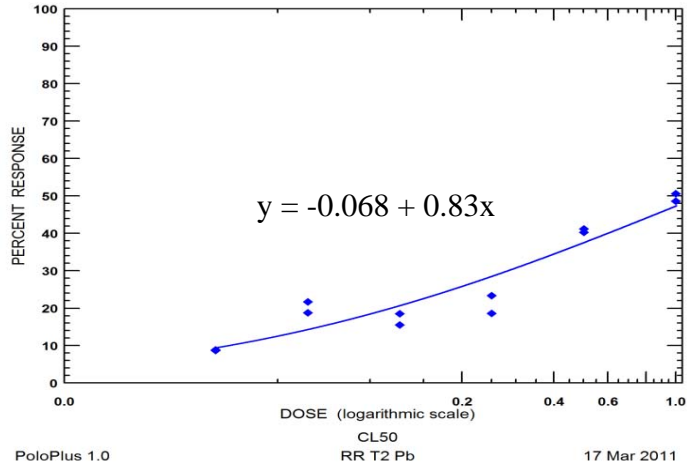
b)



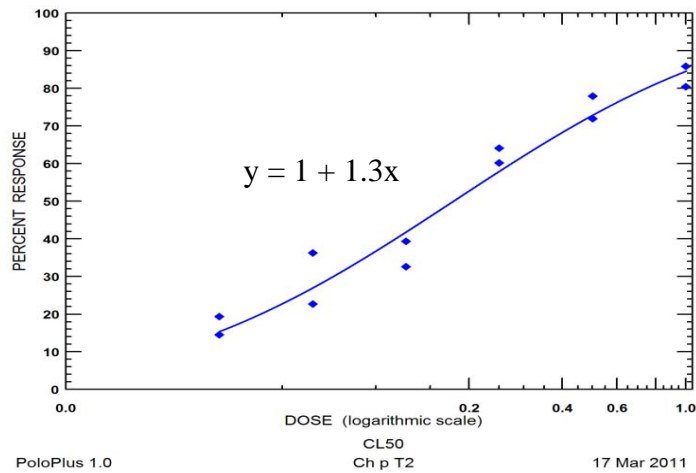
c)

Figura 14. Regresión de la mortalidad utilizando febendazol a las 18 horas. a) Aislamiento Resistente. b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas, c) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

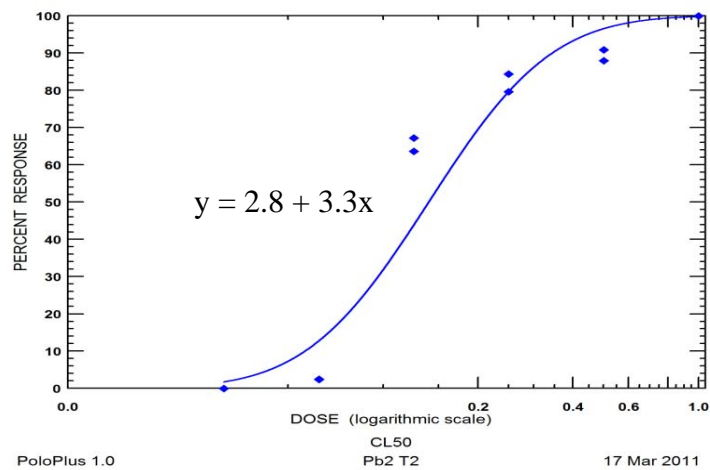
En la figura 15 se observa la ecuación de regresión que predice el comportamiento de la mortalidad de los aislamientos Resistente, Chiapas y Pelibuey; donde la mortalidad en el aislamiento Chiapas y en el aislamiento de borregos Pelibuey es mayor que en el aislamiento Resistente. La mortalidad aumentó 1.3%, 3.3% y 0.83% por cada unidad que se aumentó la dosis, para los aislamientos Chiapas, Pelibuey y Resistente respectivamente (Fig 15b, 15c y 15a respectivamente). También se observa que el aislamiento Pelibuey alcanzó el 100% de mortalidad con la dosis de 1 mg/ml (Fig. 15c); mientras que el aislamiento Chiapas alcanzó el 80% de mortalidad (Fig. 15b) y el aislamiento Resistente alcanzó el 48% de mortalidad con la misma dosis (Fig. 15a).



a)



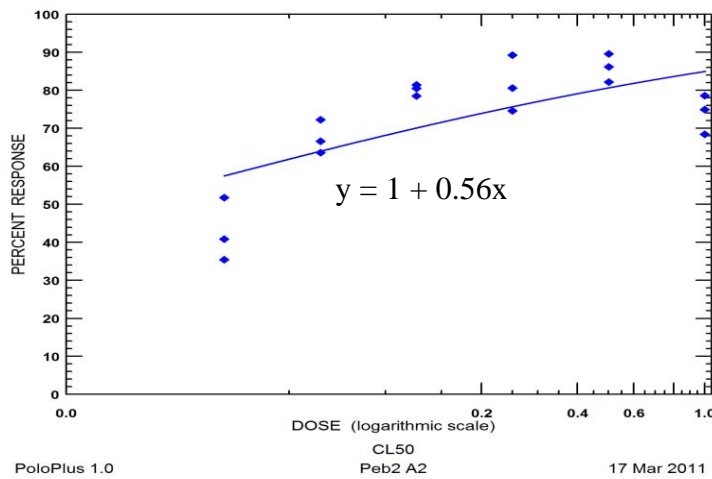
b)



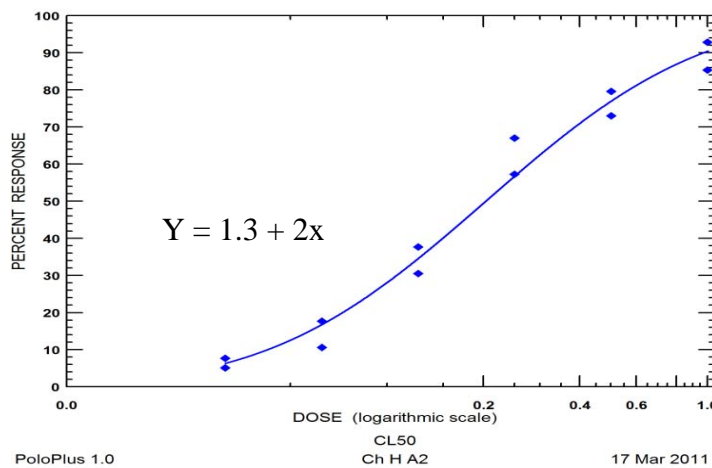
c)

Figura 15. Regresión de la mortalidad utilizando tiabendazol a las 18 horas. a) Aislamiento Resistente, b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas, c) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc.

En la Figura 16 se observa la ecuación de regresión que predice el comportamiento de la mortalidad de los aislamientos Chiapas y Pelibuey utilizando albendazol, donde la mortalidad en el aislamiento Chiapas aumenta 2% por cada unidad que se aumente la dosis (Fig. 16a); mientras que en el aislamiento de borregos Pelibuey aumenta 0.56% (Fig. 16b); y a la dosis de 1 mg/ml el aislamiento Chiapas tuvo una mortalidad de 90% (Fig. 16a) y el aislamiento de borregos Pelibuey tuvo una mortalidad de 85% (Fig. 16b).



a)



b)

Figura 16. Regresión de la mortalidad utilizando albendazol a las 18 horas. a) Aislamiento de borregos Pelibuey con larvas de Hc y Tc. b) Aislamiento de Hc de borregos Chiapas.

## 5. DISCUSIÓN

La generación de la resistencia ha ido creciendo desde sus primeros reportes en 1957,<sup>8</sup> y se ha ido esparciendo por el mundo, al punto en que ahora se encuentran reportes de resistencia a fármacos en diversos géneros parasitarios;<sup>36</sup> incluso en *Dictyocaulus viviparus*<sup>54</sup> y en *Fasciola hepatica*.<sup>55</sup>

El parásito *Haemonchus contortus* (**Hc**), es uno de los parásitos con mayor prevalencia en las explotaciones ovinas y con más notificaciones de resistencia en México<sup>8, 6, 10, 11, 9</sup> y en otros países.<sup>25, 26, 27, 28</sup>

Encontrar un aislamiento en campo que presente susceptibilidad hacia los antihelmínticos, particularmente hacia los bencimidazoles, que son los que más tiempo llevan en el mercado,<sup>56</sup> es inusual; sin embargo, en éste estudio se obtuvo un aislamiento puro de Hc y un aislamiento mixto con *H. contortus* y *T. circumcincta* susceptibles a tres derivados del bencimidazol (albendazol, febendazol, tiabendazol).

Los resultados de este estudio, con base a la prueba *in vitro* de afinidad a la tubulina, concuerdan con los trabajos de Kumsa<sup>22</sup> y Shefaraw<sup>29</sup> en Etiopia.

La Prueba de Fijación a la Tubulina (**PFT**) no es muy usada, y no se encontraron estudios donde se haya empleado la misma prueba; las pruebas que más se reportan en los artículos son la Prueba de Reducción del Conteo de

Huevos en Heces (**PRCHH**) y la Prueba de Eclosión de Huevos (**PEH**); ya que estas han sido estandarizadas, y recomendadas por la WAAVP (World Association for Advancements in Veterinary Parasitology 1992, 1999, 2006)<sup>57, 58, 24</sup> en sus tres publicaciones de lineamientos sobre resistencia antihelmíntica; sin embargo la WAAVP también señaló que las pruebas que utilizan larvas tienen potencial; pero que se requiere más trabajo para que sean de utilidad; esta publicación fue emitida en 2006 y es probable que desde entonces se haya desarrollado más investigación sobre las pruebas con larvas, que aún no han sido evaluadas por la WAAVP.<sup>24</sup>

Aunque no se encontraron estudios que utilizarán la misma prueba, ni las mismas concentraciones de bencimidazol que en éste trabajo; y por tanto no se pudieron comparar las Concentraciones Letales obtenidas; el aislamiento de referencia del INIFAP contra el que se compararon los resultados; presentó una  $CL_{50}$  de 0.499 ppm al momento de ser aislado en 1990.<sup>8</sup>

En cuanto a las pruebas de diagnóstico de resistencia antihelmíntica, la utilización de una u otra prueba está en función de varios factores como son: el grupo de fármacos a evaluar, la cantidad de animales disponibles para realizar las pruebas, el presupuesto, él o los géneros parasitarios a evaluar; las ventajas o desventajas que la prueba representa; así como el estadio de vida que evalúa la prueba elegida.



En el cuadro 11 se observan los resultados que se obtuvieron usando diferentes pruebas de diagnóstico de resistencia antihelmíntica hacia los bencimidazoles; se observa que los únicos aislamientos susceptibles son los de Etiopia<sup>22, 29</sup> y los del presente estudio, se observa que existen diferencias en cuanto a las dosis para la PRCHH (mg/kg), a las Concentraciones Letales para la PEH ( $\mu\text{g/ml}$ ) y a las Concentraciones Letales para la PFT (mg/ml), lo cual puede atribuirse a que en la PRCHH sólo se observa la capacidad adulticida;<sup>25</sup> pero no se mide el grado de resistencia;<sup>6</sup> además de que la sensibilidad a los bencimidazoles disminuye conforme avanza el proceso de desarrollo embrionario.<sup>29</sup>

Cuadro 11. Resultados obtenidos utilizando diferentes pruebas de diagnóstico de resistencia antihelmíntica.

**Prueba	Estadio evaluado	*Sustancia activa	Susceptible	Resistente	País
PEH	Huevo	Abz	0.06 $\mu\text{g/ml}$		Etiopia <sup>22</sup>
PEH	Huevo	Tbz		0.499 ppm	México <sup>8</sup>
PEH	Huevo	Tbz		0.678 $\mu\text{g/ml}$	India <sup>26</sup>
PRCHH	Adultos	Abz	7.5 mg/kg		Etiopia <sup>29</sup>
PRCHH	Adultos	Sulfóxido de Abz		5 mg/kg	México <sup>6</sup>
PRCHH	Adultos	Abz		10 mg/kg	Iraq <sup>27</sup>
PRCHH	Adultos	Fbz		5 mg/kg	República Checa <sup>25</sup>
PFT	L <sub>3</sub>	Abz	0.230 mg/ml		México
PFT	L <sub>3</sub>	Tbz	0.178mg/ml		México
PFT	L <sub>3</sub>	Fbz	0.01mg/ml		México

\*Abz (albendazol), Tbz (tiabendazol), Fbz (febendazol)

\*\* PEH (Prueba de Eclosión de Huevos), PRCHH (Prueba de Reducción en el Conteo de Huevos), PFT (Prueba de Fijación a la Tubulina)

## 6. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que el aislamiento de *H. contortus* de borregos Chiapas, y el aislamiento de *H. contortus* y *T. circumcincta* obtenido de borregos Pelibuey, son susceptibles al tiabendazol, febendazol y albendazol, razón por la cual se sugiere su aplicación como nematodos de referencia en la estandarización, validación y uso en las pruebas de diagnóstico que involucren bencimidazoles.

Frente a una creciente y alarmante presencia de resistencia a los antihelmínticos, es necesario estandarizar las pruebas de diagnóstico de resistencia, así como contar con laboratorios de referencia que realicen diagnósticos precisos de resistencia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Quiroz-Romero H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México, D.F., Editorial Limusa, S.A. de C.V. 2005.
2. Perry BD, McDermott JJ, Randolph TF, Sones KR, Thornton PK. Investing in animal health research to alleviate poverty. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya. 2002.
3. Vázquez-Prats VM. Características Epidemiológicas de los Nematodos Gastroentéricos de los Rumiantes: Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. INIFAP, México, D.F. 2004.
4. Bishop SC, Jackson F, Coop RL, Stear MJ. Genetic parameters for resistance to nematode infections in Texel lambs and their utility in breeding programmes. *Animal Science* 2004; 78: 185-194.
5. Gill HS, Watson DL, Brandon MR. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* 1993; 78: 43-49.
6. Figueroa-Castillo JA, Méndez-Medina RD, Berruecos-Villalobos JM, Álvarez-León JA. Detección de Resistencia en *Haemonchus contortus* al Sulfóxido de Albendazol inyectado Mediante la Prueba de Campo de Reducción de Huevos en Ganado ovino. *Vet Mex* 2000; 31(4): 309-313.
7. Vázquez-Prats VM. Epidemiología de las principales nematodosis gastrointestinales de los rumiantes. Curso-Taller regional en epidemiología, diagnóstico y control de infecciones por helmintos en ganado. UNAM, FMVZ, FAO; México, D.F., del 17 al 29 de junio de 1996.

8. Campos-Ruelas R, Herrera-Rodríguez D, Quiroz-Romero H, Olarazan JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos en México. *Téc Pe Méx* 1990; 28(1): 30-34.
9. Montalvo-Aguilar X, López-Arellano ME, Vázquez-Prats VM, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Téc Pecu Méx* 2006; 44(1): 81-90.
10. García-Flores A, Vázquez-Prats V, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. *In vitro* and *in vivo* diagnosis of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in México. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México. 2003:194-199.
11. Torres-Acosta JF, Roberts B, Canto-Dorantes J, Martínez-Ortiz C, Rodríguez J, Canul-Ku L, *et al.* Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in Yucatán. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México 2003:48-52.
12. Crawford AM, Paterson KA, Dodds KG, Diez-Tascon C, Williamson PA, Roberts-Thomson M, Bisset SA, *et al.* Discovery of quantitative trait *loci* for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC Genomics* 2006; 7:178.
13. Keane OM, Zadissa A, Wilson T, Hyndman DL, Greer GJ, Baird DB *et al.* Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and

- susceptible to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics* 2006; 7:42-1471-2164-7-42.
14. Bisset SA, Morris CA. Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *International Journal of Parasitology* 1996; 26: 857-868.
  15. Bishop SC, Morris CA. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 2007; 70: 48-59.
  16. Lindqvist A, Ljungstrom BL, Nilson O, Waller PJ. The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta vet Scand* 2001; 42: 377-389.
  17. Quiroz-Romero H, Ibarra-Velarde F. *Temas selectos de parasitología, Vol. I.* UNAM, México D.F. 2000.
  18. Sumano LH, Ocampo CH. *Farmacología veterinaria.* McGraw Hill, México, 1998.
  19. Robin N, Beech R, Prichard K, Scott MA. Genetic variability of the  $\beta$ -Tubulin genes in benzimidazole-susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics* 1994; 138: 103-110.
  20. Ihler CF. Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2010; 52(1):S24.
  21. Lubega GW, Prichard RK. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high affinity bonding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol and Biochem Parasit* 1990; 38: 221-232.

22. Kumsa B, Wossene A. Efficacy of albendazole and tetramisole anthelmintics against *Haemonchus contortus* in experimentally infected lambs. Intern J Appl Res Vet Med 2006; 4(2): 94-99.
23. Rufener L, Mäser P, Roditi I, Kaminsky R. *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. Plos Pathog 2009; 5(4): e1000380.
24. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology 2006; 136: 167-185.
25. Vernerova E, Vondrova R, Kisova H, Svobodova V, Hera A. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematode parasites of sheep in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 2009; 54(10): 467–472.
26. Easwaran C, Harikrishnan TJ, Raman M. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Southern India. Vet arhiv 2009; 79: 611-620.
27. Mohamed EK, Al-Farwachi MI. Evaluation the effect of albendazole against nematodes in sheep in Mosul, Iraq. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 2008; 22(1): 5-7.
28. Thomaz-Soccol V, Pohl de Souza F, Sotomaior C, Alcântara-Castro E, Milczewski V, Mocelin G *et al.* Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). Brazilian Archives of Biology and Technology 2004; 47(1): 41-47.

29. Sheferaw D, Asha A. Efficacy of selected anthelmintics against gastrointestinal nematodes of sheep owned by smallholder farmers in Wolaita, Southern Ethiopia. *Ethiop Vet J* 2010; 14 (2): 31-38.
30. Bauer C, Ullrich D, Fiege N, König D, Luft W, Bürger HJ. Benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in southern Germany. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1987; 94 (4): 205-206.
31. Márquez-Lara D. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista corpoica* 2003; 4(1): 55-71.
32. Coles GC. Strategies for Control of Anthelmintic Resistance Nematodes of Ruminants. *JAVMA* 1988; 3: 330-334.
33. Tarazona VJM. Etiopatogenia y Control de la Gastroenteritis Parasitaria Ovina. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid. Madrid, España 1980.
34. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. In Vitro Field Screening for Anthelmintic Resistance in *Strongyloides* of Sheep and Horses. *Vet Parasitol* 1980; 7: 215-232.
35. Lacey E, Snowdon KL. A Routine Diagnostic Assay for the Detection of Benzimidazole Resistance in Parasitic Nematodes Using Tritiated Benzimidazole Carbamates. *Vet Parasitol* 1988; 27: 309-324.
36. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO producción y sanidad animal, Roma 2003; 157: 1014-1200.

37. Soto-Barrientos N, de-Oliveira J, Vega-Obando R, Montero-Caballero D, Vargas B, Hernández-Gamboa J *et al.* *In-vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Rev. Biol. Trop.* 2011; 59(1):37-52.
38. Duarte-Vera F, Sandoval-Castro C, Sarmiento-Franco L. SRNS model adequacy for body weight gain predicting in growing Pelibuey lamb males. *Arch Zootec* 2009; 58(224): 671-681.
39. Macías-Cruz U, Álvarez-Valenzuela FD, Correa-Calderón A, Molina-Ramírez L, González-Reyna A, Soto-Navarro S, *et al.* Pelibuey ewe productivity under crossbreeding schemes with specialized breeds in mutton production. *Journal of Applied Animal Research* 2009; 36 (2): 255-260.
40. Pedraza P, Peralta M, Perezgrovas-Garza R. 1992. El borrego Chiapas: una raza local mexicana de origen español. *Arch. Zootec.* 41, 355-362.
41. Perezgrovas-Garza R, Castro-Gómez H. El borrego Chiapas y el sistema tradicional de manejo de ovinos entre las pastoras tzotziles. *Arch Zootec* 2000; 49: 391-403.
42. Quiroz J, Martínez A, Landi V, Zaragoza ML, Perezgrovas-Garza R, Vega JL. Relación genética de la raza ovina de Chiapas con algunas razas ovinas españolas. *Arch Zootec* 2007; 56: 441-447.
43. Garza-Caligaris AM, Page-Pliego JT, Perezgrovas-Garza R. Anuario de estudios indígenas VI. Instituto de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas, México, 1996.



44. Nahed-Toral J, López-Tirado Q, Mendoza-Martínez G, Aluja-Schunemann A, Trigo-Tavera FJ. Epidemiology of parasitosis in the Tzotzil sheep production system. *Small Ruminant Research* 2003; 49: 199-206.
45. García EE. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. In., Series Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. México: Instituto de Geografía UNAM; 1981.
46. INEGI. Cuaderno estadístico Municipal, Tapachula Estado de Chiapas. Gobierno del Estado de Chiapas. México, 1998.
47. Besné MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME. Manual de prácticas de laboratorio de parasitología. UNAM, México, D.F. 2006.
48. Liébano-Hernández E. Identificación morfométrica de larvas infectantes de Nematodos gastrointestinales y Pulmonares en Rumiantes Domésticos de México: Diagnóstico y control de las nematodosis gastrointestinales y Pulmonares de los rumiantes. INIFAP, México 2002.
49. González JL, López-Arellano ME, Olazaran-Jenkins S, Liébano-Hernandez E, Mendoza-de-Gives P, Vázquez-Prats V, *et al.* Phenotype characterization of Pelibuey Native Lambs Resistant to *Haemonchus contortus*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases* 2008; 1149: 177–179.
50. Núñez OL, Bouda J. et al. Patología clínica veterinaria. FMVZ-UNAM. 2007.
51. Vázquez-Prats VM, Bautista-Garfias CR. Necropsia e identificación de helmintos del tracto gastroentérico de rumiantes: Diagnostico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Libro Técnico N<sup>o</sup> 2 Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria SAGARPA INIFAP 86-120, 2010.

52. Abdel-Cawad AF. Differential diagnosis of gastrointestinal strongylosis of sheep in Egypt through living third stage larvae. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association* 1974; 34: 212-227.
53. Aguilar-Tipacamu G. *Boophilus micropilus*: Herencia de la Resistencia a los piretroides y la mutación *Kdr* en el gen del canal de sodio. Tesis, UNAM, México, D.F. 2008.
54. Molento MB, Depner RA, Mello MHA. Suppressive treatment of abamectin against *Dictyocaulus viviparus* and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. *Veterinary Parasitology* 2006; 141: 373–376.
55. Álvarez-Sánchez MA, Mainar-Jaime RC, Pérez-García J, Rojo-Vázquez FA. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record* 2006; 159: 424-425.
56. Brown HD, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris SA, Sarett LH, et col. Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, a new anthelmintic. *J Am Chem Soc* 1961; 83(7): 1764–1765.
57. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA et col. 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. *Veterinary Parasitology* 1992; 44: 35-44.
58. Wood IB, Amaral NK, Bairden JL, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, et col. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of

- anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 1995; 58: 181-213.
59. Liébano-Hernández E. Cultivo e identificación larvaria de nematodos del tracto gastroenterico: Diagnostico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Libro Técnico N2, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria SAGARPA INIFAP 43-85; México, D.F. 2010.
60. Liébano-Hernández E, López-Arellano ME, Vázquez-Prats V, Mendoza-de-Gives P. Cryopreservation of Infective Larvae of *Haemonchus contortus*. *Rev Lat Amer Microbio* 1996; 38: 111-114.

## 8. ANEXOS

### **Anexo I. Técnica de cultivo en frasco:**

Tomado de Liébano-Hernández E. (2010)<sup>59</sup>

#### Material

- Mortero y pistilo ascos de vidrio con boca de 1½ pulgadas (3.81cm) y cucharas de plástico o aluminio
- Nistatina (Micostatin) en polvo
- Goteros

#### Procedimiento

Pesar 10g de heces y mezclar las heces con agua destilada. La mezcla se coloca en el fondo del frasco, evitando ensuciar las paredes del mismo. Espolvorear en la superficie una pequeña capa de Micostatin comercial

Las muestras de heces se homogenizan hasta lograr una consistencia de masa fresca, cuidando que no esté seca ni muy líquida, la masa se deposita en un frasco ocupado solo el primer cuarto de su altura para que así haya mayor oxigenación y por lo tanto eclosión. Se coloca la tapa sobre el frasco; pero no se cierra y se deja a temperatura ambiente por un periodo de 7 días, durante este tiempo se tiene que destapar y remover el contenido una vez al día, transcurrido el tiempo se procede a colocar las heces del frasco en un pedazo de gasa que sirva como envoltura y así procesarla bajo la técnica de Baermann.

## **ANEXO II**

### **Técnica de coprocultivo en tina**

La finalidad de esta técnica es obtener miles de larvas y consiste en depositar las muestras de heces en una tina de 14 cm de alto y 35 cm de diámetro, abarcando como máximo un tercio del recipiente, entonces se les agrega agua poco a poco, tratando de incorporarla con las heces hasta que tengan una consistencia acuosa, luego se añaden trozos de hule espuma y se homogenizan con las heces, después se sella la tina con papel aluminio y se le corta un cuadro al centro, el cual se cubrirá con una gasa de 8 cm x 8 cm, la tina se queda así por 7 días y cada dos días se homogeniza. Transcurrido este periodo las muestras se procesan mediante la técnica de Baermann.

## ANEXO III

### **Criopreservación de larvas**

Tomado de Liébano-Hernández E. *et al* (1996)<sup>60</sup>

La criopreservación es un método de laboratorio utilizado para preservar células o sus constituyentes, durante largos periodos de tiempo, empleando temperaturas inferiores a 0°C, deteniendo su reproducción y manteniendo sus características morfológicas, fisiológicas, e inmunológicas; aunque debe considerarse que al descongelarlas existe una mortalidad de hasta 20%. El método de criopreservación ofrece algunas ventajas sobre otros métodos para mantener disponible una población de larvas en forma constante ya que no requiere mantenimiento, ni animales; además de permitir un ahorro considerable en cuanto a tiempo y trabajo y otros gastos relacionados con el mantenimiento continuo del aislamiento monoespecífico. Previo a la criopreservación se debe lavar a las larvas y desenvainarlas, dicha metodología se describe a continuación.

**Lavado de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematodos gastroentéricos con solución de sacarosa al 40%.**

Tomado de Liébano-Hernández E. (2010)<sup>59</sup>

Al hacer el coprocultivo para obtener larvas en la fase infectante estas se encuentran muy sucias por lo que es importante que una vez que se concentren, limpiarlas por medio de la técnica de Baermann. Luego las larvas se filtran a través de un tamiz de malla de 100 con la idea de eliminar detritos. Posteriormente todo el contenido se pasa a unos tubos de plástico de 50 mL los que se meten a

refrigeración a 4°C por dos horas y luego se elimina el sobrenadante y se limpia el sedimento. En tubos de ensaye se colocan nueve ml de sacarosa al 40% y después con mucho cuidado se agrega el sedimento con larvas deslizándolas por las paredes del tubo de ensaye para posteriormente centrifugarlas a 3500 r.p.m. durante cinco minutos con la finalidad de que sedimente la mayor cantidad de contaminantes; posteriormente se colectan las larvas (contenidas en el anillo que se forma) para inmediatamente depositarlas en tubos de 10 mL y lavarlas por centrifugación con agua destilada para eliminar el exceso de sacarosa. Esta operación se realiza por tres ocasiones a 3500 r.p.m. durante tres minutos y así poder utilizarlas en diferentes pruebas experimentales (control biológico e inmunológico, Biología Molecular, Epidemiología y Ecología).

### Eliminación de las vainas de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de nematodos gastroentéricos

Tomado de Liébano-Hernández E. (2010)<sup>59</sup>

La eliminación de la vaina de la larva infectante (L<sub>3</sub>) es de suma importancia para que la larva pueda continuar evolucionando a L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>. En el laboratorio. Una vez que fueron lavadas las larvas infectantes, fue necesario retirar la vaina de ellas de siguiente manera artificial para dar paso al siguiente estadio larval que es el cuarto (L<sub>4</sub>). De una botella de hipoclorito de sodio al 6% se colocan en cuatro tubos de ensaye tres mL de agua y en el primer tubo se le agrega tres mL de hipoclorito de sodio y de este se hacen diluciones hasta llegar al 0.375% de concentración. Antes de la realización de cada desenvaine fue

necesario tomar una muestra (gota) de lavas y confrontarla con la solución con hipoclorito de sodio para verificar el tiempo requerido para el desenvaine, ya que, incluso en ellas cada organismo responde de manera distinta ante este estímulo, el tiempo promedio que se requirió para esta operación fue de 5-10 minutos. Después de este lapso de desenvaine rápidamente se enjuagaron con agua destilada y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante tres minutos por tres ocasiones; en la última se retira el sobrenadante dejando solamente el “botón” de larvas en cada tubo.

#### Técnica de criopreservación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos.

Tomado de Liébano-Hernández E. *et al* (1996)<sup>60</sup>

Las larvas limpias y desenvainadas se concentran y se colocan en un vial, donde se les agrega 1 ml de Dimetil Sulfoxido (**DMSO**) al 10%, el cual es un crioprotector. La introducción de los viales en nitrógeno líquido será mediante el proceso de congelación paulatina, donde se introducen los viales con los estadios infectantes a un refrigerador (4°C) durante dos horas, posteriormente estos viales se colocan en un recipiente nadando en alcohol para introducirlos a congelación (-76°C) por 12 horas y finalmente se introducen al nitrógeno líquido (-196°C). La descongelación se realiza en forma rápida, utilizando baño María a 37°C y lavando los estadios infectantes por tres ocasiones con agua destilada, con el objeto de que el crioprotector salga rápidamente de las células y se aumente la sobrevivencia de las larvas.