



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE COMPRIMIDOS NUTRICIONALES
COMO VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN
DE CLAMIDOSPORAS DE
Duddingtonia flagrans EN OVINOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

JOSÉ ANTONIO FITZ ARANDA

**TUTOR
PEDRO MENDOZA DE GIVES**

**COMITÉ TUTORAL
HÉCTOR QUIROZ ROMERO
JUAN FELIPE DE JESÚS TORRES ACOSTA**

MÉXICO, D.F.

2010



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.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se realizó en dos fases: Primer fase; Jiutepec Morelos en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias en el laboratorio de Helmintología, lugar bajo la dirección del Dr. Pedro Mendoza de Gives, con apoyo de: CONACYT-SAGARPA-11990. Segunda fase; se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la Dirección del Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta, en el departamento de pequeños rumiantes.

Parte de estos resultados fueron presentados en los siguientes congresos bajo los siguientes títulos:

1. *EVALUACIÓN in vitro DE LA VIDA DE ANAQUEL DE CLAMIDOSPORAS DE Duddingtonia flagrans CONTENIDAS EN COMPRIMIDOS NUTRICIONALES.* José Antonio Fitz-Aranda¹, Pedro Mendoza-de gives¹, Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta², Héctor Quiroz-Romero³. 1INIFAP, Laboratorio de Helmintología Jiutepec Morelos, 2 UAdY, Departamento de Pequeñas Especies Mérida Yucatán, 3UNAM-FMVyZ Departamento de Parasitología Veterinaria México DF. XVIII Congreso Nacional de Parasitología (CONAPAR 2009) del 21 al 26 de Septiembre Aguascalientes, Aguascalientes México.
2. *COMPRIMIDOS NUTRICIONALES COMO VEHÍCULO DE CLAMIDOSPORAS DE Duddingtonia flagrans EN OVINOS INFECTADOS CON Haemonchus contortus.* Fitz-Aranda J.A., Mendoza de Gives P., Quiroz Romero H. Torres Acosta J.F.J., Sandoval-Castro. VIII congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. 26 al 28 de Octubre del 2009, Mérida Yucatán México.

DEDICATORIA

Familia: ustedes que siempre me apoyan bajo cualquier circunstancia

Amigos: pocos pero, son aquellos que no los cambio ni por mil puñados de oro

Hermanas: las quiero

Y muy en especial

A mis padres gracias por todo y por creer en su retoño.

AGRADECIMIENTOS

Se Agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por la facilitación del laboratorio de Helmintología donde se realizó gran parte de este proceso de investigación.

Se agradece a CONACYT por el apoyo otorgado del proyecto: CONACYT-SAGARPA-11990.

Se agradece a la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) por las instalaciones del departamento de pequeños rumiantes, donde se realizó la segunda fase experimental. Con ayuda de los integrantes del departamento.

Se agradece el apoyo económico por parte de CONACYT para la realización de mis estudios de posgrado.

Se Agradecen infinitamente todas las facilidades brindadas por el Dr. Pedro Mendoza de Gives quien fue un gran eslabón para la realización de esta tesis.

Se agradece infinitamente el apoyo incondicional del Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta, por todo su valioso apoyo. (Gracias...).

Se reconoce el apoyo profesional del Dr. Héctor Quiroz Romero por la participación en la elaboración del presente documento.

Se agradece al apoyo brindado de los investigadores del CENID-PAVET, INIFAP y de la UADY: en especial al M.C Enrique Liébano, Dra. María Eugenia López, Carlos Sandoval, Armando Aguilar.

Se agradece el apoyo técnico y profesional, dentro del maravilloso mundo del hongo *Duddingtonia Flagrans* a la M. en C. Rosa Ofelia Valero Coss.

Se reconoce el apoyo profesional brindado por el M. en C. Daniel Díaz Espinosa de los Monteros para el análisis estadístico de los datos y el diseño de las figuras.

Se agradece a la Dra. Nadia Ojeda Robertos por el apoyo brindado para la contabilización de las clamidosporas.

Amig@s y compañer@s, ustedes que siempre me han apoyado para desarrollar mi mundo: Díaz Espinosa de los Monteros, Valero Coss, Vichido, Xolalpa, Torres, Tony Castillo, Pakin, Beto, y disculpas por los que faltaron.

RESUMEN

Se evaluó el uso de comprimidos nutricionales (CN) como medio para administrar clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* a ovinos. En la primera fase experimental, se evaluó la viabilidad de clamidosporas de *D. flagrans* incorporadas en CN bajo cuatro condiciones de almacenamiento durante 54 días. Los CN (conteniendo 4×10^6 clamidosporas) fueron distribuidos en 4 grupos ($n = 48$) con sus respectivos controles (sin clamidosporas). Los CN se almacenaron en anaquel (interior), en refrigeración, intemperie con techo, intemperie-100%. La viabilidad de las clamidosporas en los CN se evaluó durante 8 semanas. Semanalmente se seleccionaron 6 CN de cada tratamiento, se maceraron individualmente y se agregó 1 g a cajas Petri (agar-agua 2%). En cada caja Petri se adicionaron 200 L₃ de *Haemonchus contortus* y se incubó por 8 días. El contenido de cada caja fue trasferido a aparatos de Baermann (12 h) para recuperar larvas no capturadas por el hongo. La recuperación de larvas en los grupos con clamidosporas mostró una reducción significativa (67 al 82%; $P < 0.005$) comparado con sus respectivos controles. Se detectaron clamidosporas viables durante 8 semanas. En la segunda fase experimental se elaboraron CN con clamidosporas de *D. flagrans* (4×10^6 clamidosporas) a diferentes tiempos antes de iniciar los tratamientos: diez días (T1), 5 días (T2) y 1 día (T3). Además se prepararon dosis en suspensión para administración oral (T4) y CN sin clamidosporas (T5 ó controles). Los CN fueron ofrecidos diario durante 5 días. La cantidad de CN por ovino dependió de la dosis de clamidosporas (2×10^6 por kg PV). Los CN fueron un buen vehículo de dosificación. Los ovinos los consumieron bien, por lo tanto las dosis fueron alcanzadas fácilmente. Las clamidosporas de los CN fueron detectadas 24 h post-tratamiento. Los animales mantuvieron la eliminación hasta 3 días después de la última dosis de *D. flagrans*. Las esporas en las heces mantuvieron su viabilidad para atrapar L₃ de *H. contortus*. Las clamidosporas de los CN presentaron menor tendencia a ser digeridas por los ovinos que las de suspensión oral. La eficacia de las clamidosporas en los días 1, 5 y 7 del estudio mostraron reducciones variables del número de larvas en heces (0 hasta 56.4 %), sin diferencias estadísticas entre grupos ó días. Se concluye que los CN pueden ser usados como medio de administración de clamidosporas de *D. flagrans* ya que pueden ser almacenados en distintas condiciones ambientales manteniendo la integridad y viabilidad de las clamidosporas de *D. flagrans* incluso después de su paso por el tracto gastrointestinal de ovinos.

Palabras clave: Control Biológico Hongos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, clamidosporas, *Haemonchus contortus*, comprimidos nutricionales.

ABSTRACT

The use of nutritional pellets (NP) as means for the supply of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep was evaluated. During the first experimental phase, the viability of the chlamydospores incorporated into NP was evaluated under four different storage conditions during 54 days. The NP (containing 4×10^6 chlamydospores) were distributed into four groups ($n = 48$) with their respective controls (without chlamydospores). The NP were stored on a shelf (in-doors), in the fridge, out-doors with roof, outdoors-100%. Viability of chlamydospores contained in the NP was evaluated during 8 weeks. Six NP from each treatment group were selected on a weekly basis, crushed individually and an aliquot (1 g) was added to respective Petri dishes (agar-water 2%). Each Petri dish was added with 200 L₃ of *Haemonchus contortus* and was incubated for 8 days. The content of each dish was then transferred to Baermann apparatus (12 h) to recover larvae not captured by the fungi. The number of larvae recovered from the chlamydospores treated groups showed a significant reduction (67 to 82%; $P < 0.005$) compared to their respective controls. Viable chlamydospores were detected for 8 weeks. In the second experimental stage, NP containing *D. flagrans* chlamydospores (4×10^6 chlamydospores) were produced on different times before the start of the trial: Ten days (T1), 5 days (T2) and 1 day (T3). A further treatment (T4) dosed the spores in an oral suspension and some NP were made without spores (T5 controls). The NP were offered daily for 5 days. The quantity of NP per sheep was based on the chlamydospore dose (2×10^6 per kg BW). The NP were a good dosage vehicle. NP were well consumed by sheep, thus the spore doses were easy to achieve. The chlamydospores from the NP were detected in faeces 24 h post-treatment. Animals kept eliminating them until 3 days after the last fungal dosage. The spores in faeces kept their viability to trap L₃ of *H. contortus*. The spores from the NP showed fewer tendencies to be digested by the sheep than those from the oral suspension. Efficacy of chlamydospores on days 1, 5 and 7 of the study showed variability in the reduction of larvae in the faeces (0 to 56.4 %), without statistical differences due to group or date. It was concluded that the NP could be used as a mean to administer *D. flagrans* chlamydospores because they can be stored under different environmental conditions maintaining the integrity and viability of the *D. flagrans* chlamydospores even after they pass through the gastrointestinal tract of sheep.

Keywords: Biological Control, Nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*, chlamydospores, *Haemonchus contortus*, nutritional tablets.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVO GENERAL	4
A. Objetivos Específicos	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
A. Generalidades de los Nematodos Gastrointestinales	5
1. <i>Haemonchus contortus</i> : patogenia y morfología	8
B. Control de Parásitos	9
C. Resistencia Antihelmíntica	10
D. Métodos Alternos para el Control de Nematodos	11
1. <i>Control de nematodos en fases parasitarias</i>	11
2. <i>Control de fases libres no parasitarias</i>	12
3. <i>Hongos nematófagos</i>	14
4. <i>Características generales de Duddingtonia flagrans</i>	16
5. <i>Duddingtonia flagrans utilizado como una herramienta en contra de los NGI</i>	20
6. <i>Efecto del ambiente sobre las clamidosporas de D. flagrans</i>	23
7. <i>Dosis de clamidosporas</i>	23
8. <i>Vehículo de administración de las clamidosporas</i>	24
V. MATERIAL Y MÉTODOS	26
A. Localización	26
B. Producción de Material Biológico (clamidosporas y larvas L3)	26
C. Primera Fase Experimental	28
1. <i>Elaboración de comprimidos nutricionales</i>	28
2. <i>Condiciones de almacenamiento</i>	29
3. <i>Evaluación de la viabilidad de los comprimidos nutricionales</i>	29
4. <i>Determinación de la reducción de larvas</i>	30
D. Segunda Fase Experimental	30
1. <i>Animales experimentales</i>	30
2. <i>Elaboración de comprimidos nutricionales</i>	31
3. <i>Diseño del estudio</i>	31
4. <i>Cuantificación de huevos y de clamidosporas por gramo de heces</i>	33
5. <i>Conteo total de huevos y clamisporas eliminados en heces</i>	33
6. <i>Viabilidad de las clamidosporas en las heces</i>	35
7. <i>Análisis de la digestibilidad del alimento y de las clamisporas</i>	35
8. <i>Relación de clamidosporas por gramo de heces: huevos por gramo de heces</i>	36
9. <i>Coprocultivos</i>	36
10. <i>Eficacia de la captura de larvas de los tratamientos</i>	37
E. Análisis de Datos	38
1. <i>Fase experimental uno</i>	38
2. <i>Fase experimental dos</i>	38

VI. RESULTADOS	40
A. Fase Experimental Uno	40
1. <i>Sobrevivencia in vitro de clamidosporas de D. flagrans en CN bajo diferentes condiciones de almacenamiento.....</i>	<i>40</i>
B. Fase Experimental Dos	45
1. <i>Evaluación de los CN como vehículos para administrar clamidosporas de D. flagrans en ovinos infectados artificialmente con H. contortus.....</i>	<i>45</i>
2. <i>Análisis de la digestibilidad del alimento y de las clamidosporas</i>	<i>49</i>
VII. DISCUSIÓN	54
A. <i>Evaluación in vitro de la sobrevivencia de clamidosporas de D. flagrans en CN bajo diferentes Condiciones de almacenamiento.....</i>	<i>54</i>
B. <i>Evaluación de los CN como vehículos para administrar clamidosporas de D. flagrans en ovinos infectados artificialmente con H. contortus.</i>	<i>56</i>
VIII. CONCLUSIONES.....	59
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Géneros de nematodos gastrointestinales importantes en México.....	7
Cuadro 2. Antihelmínticos de origen químico utilizados para combatir las parasitosis gastroentéricas de rumiantes.....	10
Cuadro 3. Porcentaje de inclusión de los ingredientes utilizados para la elaboración de los comprimidos nutricionales con o sin clamidosporas de <i>D. flagrans</i>	28
Cuadro 4. Cantidades de clamidosporas de <i>Duddingtonia flagrans</i> (suplementadas o administradas) a cada animal por día y en correlación a su peso.....	47
Cuadro 5. Viabilidad de las esporas de <i>D. flagrans</i> después de su paso a través del tracto digestivo de las ovejas tratadas.....	48
Cuadro 6. Cantidad de clamidosporas ofrecidas a los ovinos y ajustadas por kg de peso corporal.....	49
Cuadro 7. Proporción de clamidosporas por cada huevo de <i>H. contortus</i> obtenida mediante la técnica de McMaster (CPG:HPG) y expresada como promedio de clamidosporas s y error estándar.....	52
Cuadro 8. Proporción de clamidosporas por cada huevo de <i>H. contortus</i> obtenida mediante la técnica de McMaster (CPG:HPG) y expresada como promedio de clamidosporas s y error estándar.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clamidosporas <i>Duddingtonia flagrans</i> (40x).....	17
Figura 2. Anillos y redes tridimensionales de D.	19
Figura 3. Larva infectante de <i>Haemonchus contortus</i> atrapada por redes tridimensionales del hongo nematófago <i>D. flagrans</i>	19
Figura 4. Larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> atrapadas por redes tridimensionales de <i>D. flagrans in vitro</i>	20
Figura 5. Ciclo de vida de <i>H. contortus</i> y del hongo nematófago <i>D. flagrans</i>	22
Figura 6. Cámara de McMaster a 10x. Se muestra huevo de <i>Haemonchus contortus</i> rodeado de clamidosporas de <i>D. flagrans</i>	34
Figura 7. Fotografía de la cámara de McMaster a 40x. se aprecian 3 clamidosporas de <i>D. flagrans</i> y un huevo de <i>Haemonchus contortus</i>	34
Figura 8. Temperatura máxima y mínima registrada durante 54 días en las condiciones de almacenamiento de los CN.	42
Figura 9. Humedad máxima y mínima registrada durante 54 días en las condiciones de almacenamiento de los CN.	43
Figura 10. Conteos semanales de larvas L ₃ de <i>H. contortus</i> recuperadas en cultivos in vitro para los tratamientos.	44
Figura 11. Promedio de clamidosporas ofrecidas en la dieta y recuperadas en las heces de los distintos tratamientos.	46
Figura 12. Porcentaje de digestibilidad aparente de clamidosporas de <i>Duddingtonia flagrans</i> ofrecidas en su alimento a ovinos.	50
Figura 13. Conteos de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> (HPG) eliminados en heces de los diferentes tratamientos.	50

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

Nematodos Gastrointestinales	NGI
<i>Haemonchus contortus</i>	Hc
<i>Duddingtonia flagrans</i>	<i>D. flagrans</i>
Tracto Gastrointestinal	TGI
Larvas por gramo de heces	LPG
Clamidosporas por gramo de heces	CPG
Relación clamidosporas:huevos por gramo de heces	CPG:HPG
Ganancia diaria de peso	GDP
Kilogramos por kilos de peso vivo	Kg/PV
Antihelmínticos	AH
Resistencia antihelmíntica	RA
Hongos Nematófagos	HN
Larva 1	L ₁
Larva 2	L ₂
Larva 3	L ₃
Larva 4	L ₄
Larva 5	L ₅

I. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis del ganado son enfermedades causadas por la presencia y acción patógena de diversos parásitos que se establecen en los animales. Los nematodos gastrointestinales (NGI) representan un grave problema económico en la producción de ganadería nacional e internacional (FAO, 2001). El control de estas parasitosis se basa en el uso de antihelmínticos (AH) convencionales. El uso indiscriminado de estos productos ha provocando que se manifiesten problemas de resistencia contra los AH en los parásitos (Mc Kellar *et al.*, 2004). Este problema ha generado la necesidad de encontrar métodos alternativos para el control parasitario. Estos métodos alternativos, combinados con un uso racional de AH, pueden permitir el control sustentable de los parásitos de acuerdo a las condiciones parasitarias de una región. Uno de los métodos alternos que pueden reducir la dependencia del uso de productos AH es el uso de hongos nematófagos que pueden ser una herramienta de control biológico (Kreeck & Waller, 2005).

El hongo *Duddingtonia flagrans* es un organismo del suelo que tiene la capacidad de desarrollar órganos especializados de captura de larvas infectantes de NGI para nutrirse de sus tejidos (Duddington, 1950) permitiendo así el control de dichos parásitos. En condiciones *in vitro* y en campo se ha demostrado la capacidad de captura de larvas de vida libre de NGI por parte del hongo (Waller, 1999). El uso de *D. flagrans* para el control biológico de larvas de NGI se basa en su capacidad de formar clamidosporas. Estas formas presentan la habilidad de soportar el paso a través del tracto digestivo y llegar a las heces donde formarán su micelio y posteriormente las estructuras para atrapar NGI (Waller, 1999). En México se cuenta con una cepa de *D. flagrans* que ha demostrado su potencial como herramienta de control biológico de NGI (Ojeda-Robertos *et al.*, 2005, 2008b). A pesar de existir un avance en el conocimiento de la eficacia de las clamidosporas de *D. flagrans* para el control de NGI su aplicación masiva en campo todavía no es posible. Uno de los factores que ha dificultado el uso de los hongos en el campo es que no se cuenta con una forma práctica de dosificar clamidosporas a los animales. Las clamidosporas tienen que ser consumidas en cantidad

suficiente por los animales infectados y con regularidad para que exista eficacia (Chandrawathani *et al.*, 2002). Se ha propuesto mezclar las clamidosporas con el alimento, pero esta estrategia es poco viable en los sistemas donde no se tiene suplementación diaria ó donde se ha propuesto el uso de bloques multinutricionales como una forma práctica de ofrecer las clamidosporas en el alimento, como los estudios realizados en Malasia que utilizaron bloques de melaza-urea sin éxito (Chandrawathani *et al.*, 2003). Aunque estos autores desconocen la razón de la falta de eficacia de las clamidosporas en los bloques, sugieren que la humedad de los bloques y las altas temperaturas ambientales de los trópicos pudieron afectar su eficacia. Estos autores incluso sugirieron que los bloques requerirían de refrigeración para poder ser utilizados. Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar un método de compactación de bloques en seco al que se le llamaron comprimidos nutricionales (CN). Estudios previos demostraron que este tipo de comprimidos funcionó en el atrapamiento *in vitro* de larvas de *Haemonchus contortus* (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008). El presente trabajo se presenta en dos fases experimentales. Así el siguiente objetivo consistió en evaluar la vida de anaquel de los CN en diferentes condiciones microambientales. Y el segundo determinar la viabilidad de los CN como vehículos de administración de clamidosporas de *D. flagrans* a las heces de ovinos infectados con *H. contortus*.

I. HIPÓTESIS

1.-Las clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* contenidas en los comprimidos nutricionales permanecen viables por un periodo de hasta 60 días expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento.

2.-Los comprimidos nutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* son consumidos por ovinos y sirven como un vehículo de administración de las clamidosporas que son eliminadas en las heces de los animales.

3.-Las clamidosporas del hongo *D. flagrans* germinan en las heces, desarrollando trampas para capturar nematodos y reducen la población de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* “*in situ*”.

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de comprimidos nutricionales como vehículo para la administración de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* en ovinos.

A. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de cuatro diferentes condiciones de almacenamiento de comprimidos nutricionales conteniendo *D. flagrans* sobre la viabilidad de las clamidosporas y la conservación de su actividad depredadora de larvas infectantes de *H. contortus* “*in vitro*”.
2. Determinar la viabilidad de consumo de comprimidos nutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* por ovinos.
3. Determinar si las clamidosporas ofrecidas en este vehículo emergen en las heces de los ovinos que las consumen de la misma manera que las clamidosporas administradas en suspensión acuosa.
4. Determinar la viabilidad de las clamidosporas consumidas por ovinos en los comprimidos nutricionales, una vez que son eliminadas junto con las heces, con base en la capacidad para germinar y desarrollar sus trampas en placas de agar para capturar y destruir larvas de *H. contortus*.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Generalidades de los Nematodos Gastrointestinales

Las enfermedades parasitarias causadas principalmente por nematodos gastrointestinales (NGI) representan un problema que afecta considerablemente a la producción ganadera, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales de México y del mundo. (Vázquez y López, 1994; Waller, 1997).

Los NGI más importantes que afectan a la industria ovina en las zonas tropicales son *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Mecistocirrus digitatus* y *Oesophagostomum columbianum*. Estos presentan un ciclo de vida directo y reproducción sexual (Quiroz, 2002). Los NGI se desarrollan en dos fases: endógena y exógena. La fase exógena o también conocida como libre se lleva a cabo en el medio externo (el suelo y la vegetación). Un animal infectado excreta huevos junto con las heces, los cuales se encuentran en una fase temprana conocida como mórula o segmentación. Para garantizar la formación de la siguiente fase evolutiva se necesitan distintos factores, tres de los cuales son necesarios para que el embrión pueda desarrollarse: una alta humedad (85 a 100%), presencia de oxígeno y una temperatura de 20 a 35 °C (Santamaría *et al.*, 1995). Esta fase da origen a cuatro estadios larvarios de los cuales L₁ y L₂ no son de vida parásita. Un elemento de particular importancia en la epidemiología de las nematodosis es la cantidad de larvas infectantes (L₃) que se desarrollen en la pradera puesto que de esto depende que se establezca la parasitosis en el rebaño (Lapage, 1971).

Los animales durante el pastoreo pueden llegar a infectarse con L₃ que se encuentran presentes en la vegetación. Las L₃ se nutren únicamente de reservas que logró obtener en sus dos estadios anteriores (Liébano *et al.*, 1998; Arroyo *et al.*, 2008). Las L₃ que son ingeridas por algún rumiante pierden su vaina protectora al entrar al tracto gastrointestinal. Las larvas desenvainadas de *H. contortus*, por ejemplo, penetran en las criptas de las glándulas gástricas, en donde pueden permanecer un tiempo indeterminado para posteriormente abandonar la mucosa como larvas del cuarto

estadio (L₄), y se alojan en el lumen abomasal para transformarse en L₅ o jóvenes y después en parásitos adultos, machos y hembras. Estos parásitos adultos sexualmente maduros son los que producirán los huevos repitiéndose así el ciclo (Vázquez, 2004). El proceso de evolución de la larva dentro del hospedero ocurre en un periodo de entre 19 y 21 días (desde el momento en que la L₃ es ingerida por el hospedero hasta desarrollarse como parásito adulto). Los machos y las hembras copulan y, a partir de los 21 días se puede iniciar la producción de huevos fértiles que son eliminados junto con las heces del hospedador. Estas heces caen en las áreas de pastoreo donde los huevos encuentran las condiciones favorables para convertirse en larvas infectantes (Bowman & Lynn, 1999).

El medio ambiente (externo ó interno) y las interacciones entre sus componentes son elementos fundamentales para el ciclo biológico de los NGI. Para el desarrollo de huevo a larva, garantizando la sobrevivencia de la L₃ y también para que los parásitos adultos se desarrollen e inicien su actividad reproductiva y la eliminación de huevos fértiles (O'Connor *et al.*, 2006).

La presencia de NGI ocasiona trastornos en el consumo de alimento, mala absorción, mala digestión y secreción de metabolitos (Parkins & Holmes, 1989; Hoste, 2001). La reducción del consumo de alimento depende de las especies de parásitos involucrados y de la magnitud de la infección (Holmes & Coop, 1994). Existen diferentes teorías de las causas de la disminución en el consumo, sin embargo, el fenómeno no ha sido completamente comprendido (Symons, 1985; Fox, 1997).

En especial los caprinos son una especie con una mayor susceptibilidad a las infestaciones causadas por NGI, en comparación con los ovinos (Hoste *et al.*, 2008). Sin embargo las razas presentan diferentes susceptibilidades (Vanimisetti *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las razas tropicales de pelo son más resistentes a los NGI que las razas de regiones templadas, aunque existen variaciones individuales (Burke & Miller, 2004).

A continuación en el cuadro 1 se presentan los géneros y especies de nematodos más importantes en México, junto con sus hospederos y los órganos donde regularmente se encuentran, así como su efecto patógeno (Vázquez, 2004).

Cuadro 1. Géneros de nematodos gastrointestinales importantes en México.

Sitio	Hospederos	Parásito	Efecto
Abomaso	Ovinos y	<i>Haemonchus contortus</i>	Hematófago
	Caprinos	<i>Teladorsagia spp</i>	
		<i>Mecistocirrus digitatus</i>	
		<i>Trichostrongylus axei</i>	
Intestino delgado	Ovinos y	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Daño en mucosa
	Caprinos	<i>Strongyloides papillosus</i>	
		<i>Bunostomum spp</i>	
		<i>Gaigeria pachyscelis</i>	
		<i>Cooperia curticei</i>	
		<i>Nematodirus spp</i>	
Intestino grueso	Ovinos y	<i>Chabertia ovina</i>	Nódulos, daño en mucosa
	Caprinos	<i>Oesophagostomum spp</i>	
		<i>Trichuris ovis</i>	
		<i>Skrjabinema ovis</i>	

Tomado de Vázquez et al., (2004).

1. *Haemonchus contortus*: patogenia y morfología

Haemonchus spp. Es considerado uno de los nematodos de mayor patogenicidad. Una hembra sexualmente madura llegar a producir de 5,000 a 10,000 huevos por día. La parasitosis causada por *H. contortus* se caracteriza por la producción de un cuadro anémico ya que cada parásito adulto es capaz de succionar hasta 0.05 ml de sangre diaria en el hospedero (Rodríguez et al., 2003). Además provoca cambios en el pH abomasal afectando la digestibilidad de la proteína dietética y en el caso de una infección aguda severa puede producir la muerte del animal en 3 a 10 días (Cordero, 1999).

El parásito adulto macho llega medir de 10 a 20 mm de longitud es de color rojizo y presenta una bolsa copuladora con dos lóbulos laterales grandes y un lóbulo dorsal pequeño asimétrico (Vázquez & López 1994). La hembra mide de 18 a 30 mm de largo. El aspecto del cuerpo es conocido como “palo de barbería”, originado por la disposición de los ovarios de color blanco enrollados en espiral alrededor del intestino de color rojo, por la sangre ingerida almacenada del hospedero (Liébano, 2004). La hembra puede presentar una lengüeta supravulvar. Los machos adultos presentan un par de espículas asimétricas gruesas, formando un pequeño gancho en su terminación (Cordero, 1999).

La larva infectante o L₃, es delgada, provista de vaina de tamaño medio y de cola mediana. En una observación más detallada, la extremidad anterior es redondeada su cavidad bucal es de forma globular y el esófago es filariforme. En la extremidad posterior, la punta de la cola de la larva acaba en forma cónica y la cola de la vaina se va adelgazando hasta finalizar en punta fina, además presenta una torcedura o fractura inmediatamente después de la terminación de la punta de la larva (Liébano, 2004).

B. *Control de Parásitos*

El control de los NGI se lleva en forma rutinaria en las explotaciones ovinas. Este consiste en la administración regular de productos químicos o AH. Estos actúan ya sea inmovilizando a los parásitos o ejerciendo un efecto letal en los mismos. Sin embargo, no son efectivos para prevenir a los animales de futuras exposiciones ó

infecciones (Mendoza de Gives & Herrera, 2004). A pesar de que algunos productos AH han demostrado a lo largo de muchos años ser efectivos en contra de diferentes NGI tanto en bovinos como en ovinos (Mendoza de Gives et al., 1987) el problema de los NGI no puede ser eliminado. Por el contrario, en ciertas áreas el problema se ha incrementado. En el mercado se cuenta con diversos compuestos AH de amplio espectro. Estos pertenecen a diferentes grupos químicos y están disponibles para el tratamiento de las parasitosis gastroentéricas. Los compuestos químicos antihelmínticos usados en rumiantes en contra de los NGI han sido clasificados en cuatro grandes grupos como se citan en el cuadro 2 (Vázquez et al., 2004).

Recientemente se ha lanzado al mercado mundial una nueva familia de AH químicos: el monepantel (Kaminsky et al., 2008). Este producto se está introduciendo al mercado de manera gradual iniciando por ovinos en Oceanía y Europa. Posteriormente se lanzará en bovinos. No se sabe cuándo llegará a México para su comercialización.

Cuadro 2. Antihelmínticos de origen químico utilizados para combatir las parasitosis gastroentéricas de rumiantes.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Bencimidazoles y Probencimidazoles	Imidazotiazoles	Organofosforados	Lactonas macrocíclicas.
Mebendazol	Tetramisol	Haloxón	Invermetina

Oxibendazol	Levamisol	Cumafós	Moxidectin
Fenbendazol	Morantel	Triclorfón	Abamectin
Aldendazol		Naftalofós.	Doramectin
Oxfendazol			
Tiofanato			
Febantel			
Netobimin			

Tomado de Vázquez et al., (2004).

C. *Resistencia Antihelmíntica*

La resistencia antihelmíntica (RA) es la disminución en la efectividad de los desparasitantes en algunas cepas de parásitos. Este fenómeno se encuentra ampliamente difundido en NGI de distintas especies animales (González-Garduño et al., 2003). En la actualidad existen cepas de NGI resistentes a los tres grupos de AH químicos: imidotiasoles, bencimidazoles y lactonas macrocíclicas. Este problema se ha reportado en países como Sudáfrica (Wan Wyk & Malan, 1998), Francia (Silvestre et al., 2002) y Nueva Zelanda (Leathwick et al., 2001). En Latinoamérica, es creciente el problema en Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay, se reportó la presencia de NGI resistentes a las ivermectinas (FAO, 2003). En el caso de México se han reportado la existencia de NGI resistentes a AH (Torres-Acosta et al., 2003; Torres-Acosta et al., 2004). La resistencia AH es un problema particular de los nematodos de ovinos, cabras, bovinos, y caballos (Kaplan, 2004; McKellar, et al., 2004). El manejo irracional de medicamentos, sumado a la mala práctica de los tratamientos (subdosificación, mala estimación de peso en los animales o la calidad de los productos), han conducido a la selección de cepas con resistencia a los AH. La velocidad de la aparición de las cepas resistentes supera a la velocidad del desarrollo de nuevos productos eficaces en contra de cepas resistentes, una vez que se presenta la resistencia ante los AH es irreversible de forma natural (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al., 2004).

A consecuencia del problema de resistencia AH, se ha incrementado la necesidad de recurrir al uso de métodos alternativos de control. Se busca que éstos sean efectivos para minimizar el uso de productos químicos. Con la aplicación de nuevas alternativas de control se podrá alargar la vida útil de los AH existentes.

D. Métodos Alternos para el Control de Nematodos

Durante muchos años se han tratado de implementar medidas tendientes a controlar las nematodosis gastrointestinales. La situación de resistencia a los AH en los NGI es una preocupación a nivel mundial por lo cual al pasar de los años se han desarrollado nuevas alternativas de control. Estas tienen la finalidad de reducir el uso de productos químicos, ayudando a disminuir la cantidad de infecciones parasitarias o permitiendo una mejor viabilidad económica en los sistemas de producción que combinan distintos métodos de control (Krecek & Waller., 2005).

A nivel mundial existe la preocupación del consumo de productos libres de residuos químicos, tanto de origen animal como vegetal (Waller, 2003). La producción de alimentos de origen animal libres de residuos químicos ha incrementado el interés por utilizar métodos alternativos contra los parásitos debido a que son considerados como sistemas sustentables (Waller, 2006). Los métodos de control alternativo son un grupo de estrategias que se dividen en aquellos que ayudan a controlar los parásitos dentro del animal y los que funcionan fuera del animal (Torres-Acosta & Hoste, 2008).

1. Control de nematodos en fases parasitarias

Suplementación alimenticia: Especialmente de nitrógeno proteico (Wallace et al., 1998; Datta et al., 1998) o no proteico (Knox & Steel, 1999), puede producir una disminución en la severidad de la parasitosis causada por NGI, así como un incremento en el desarrollo de inmunidad contra los parásitos y mejores niveles de producción en los animales (Datta et al., 1998). Trabajos realizados en agostadero nativo rico en leguminosas forrajeras ha demostrado que la suplementación con sustratos energéticos como el maíz puede mejorar también la capacidad de tolerar los parásitos (resiliencia) y posiblemente de establecer una mejor respuesta inmune a la

resistencia (Torres-acosta et al., 2003) En general se ha recomendado que la suplementación debe estar dirigida a resolver el o los nutrientes que limitan la salud de los animales (Knox et al., 2002).

Agujas de cobre: Las agujas de cobre son alambres delgados de óxido de cobre de una longitud aproximada de 1 a 2 mm que se administran a los animales en cápsulas de gelatina. Estas llegan al abomaso y se oxidan en el medio ácido, eliminando iones de cobre cuyo efecto puede ser letal sobre *H. contortus* (Aguilar-Caballero & Torres-Acosta, 2006; Alexandre et al., 2005). Su persistencia de eficacia puede llegar a superar los 35 días.

Vacunación: Desde antes del año 2005 se han realizado publicaciones de vacunas referentes a antígenos derivados de las células intestinales de parásitos adultos, de estos el H11 y H-gal-GP han sido los más extensamente caracterizados. Sin embargo no ha sido eficaz al 100% el uso de vacunas en ovinos estabulados, se plantea que el sinergismo de una vacuna combinado con el uso de antihelmínticos pueda ser más eficiente. (Smith., 1999).

Plantas: Diversos estudios han explorado la utilización de plantas con propiedades antihelmínticas. Entre los compuestos estudiados se encuentran los taninos (Athanasiadou et al., 2003; Alonso-Díaz et al., 2008). Estudios recientes han explorado los mecanismos de acción de estas sustancias e incluso se han propuesto normas para la exploración de estos productos (Hoste et al., 2008).

2. *Control de fases libres no parasitarias*

Manejo del pastoreo: Este manejo consiste en efectuar modificaciones en los sistemas de uso del recurso forrajero y que es aprovechado para afectar el ciclo biológico de los parásitos en la pradera (Krecek & Waller, 2005). Un ejemplo de estos sistemas es el uso del pastoreo mixto de bovinos con ovinos, de tal manera que los primeros, que son más tolerantes a los NGI permitan disminuir la infectividad de la pradera y así disminuir el riesgo de parasitosis en los ovinos (Amarante et al., 1997).

Otra posibilidad es el uso de la rotación de praderas en la que se busca que las larvas mueran antes de volver a pastorear en la misma zona.

Uso de hongos nematófagos: El objetivo de utilizar hongos nematófagos como una forma de control biológico es reducir las poblaciones de larvas infectantes de parásitos en praderas o pastoreo, manteniendo los niveles de parásitos en bajas concentraciones sin afectar a los animales (Waller, 1999; Jackson & Miller, 2006).

Control Integrado: Actualmente para enfrentar las parasitosis por NGI en rumiantes se ha propuesto utilizar diferentes tipos de estrategias de control incluyendo los AH convencionales y los métodos alternativos de control. Sin importar el avance en el conocimiento de los diferentes métodos de control como herramientas individuales (Stear et al., 2007), se espera obtener un beneficio potencial en conjunto con la integración de estos métodos. De esta manera se pretende lograr disminuir del uso de productos AH comerciales para disminuir el problema de resistencia (Waller, 2006; Torres-Acosta & Hoste, 2008). Existe el consenso de que ningún método por sí solo será suficiente para realizar el control sustentable de los NGI e incluso se sugiere que cada productor disponga de una gama de opciones de control para hacer un manejo sustentable de los parásitos (Jackson & Miller, 2006).

Control Biológico: Se define como un método ecológico diseñado por el hombre utilizando enemigos naturales de las poblaciones blanco. Según Thamsborg et al. (1999) el principal objetivo del control biológico es mantener la densidad de poblaciones o especies problemas, a un menor nivel del que ocurría en ausencia del enemigo natural. En las últimas décadas el control biológico de nematodos ha despertado un gran interés. El control biológico no intenta eliminar a los organismos “blanco” por lo cual no puede ser utilizado como un sustituto de los productos químicos. Los NGI tienen enemigos que participan en el equilibrio de la población en forma natural. Existen sucesos que funcionan como métodos de control biológico naturales entre los que se encuentran el efecto de los pájaros sobre la desintegración de las heces con la consecuente exposición de los huevos de nematodos a los rayos solares, así como el efecto de los escarabajos y gusanos en la tierra (Bryan & Kerr, 1989). El método

anteriormente descrito no representa un papel importante en el control de los NGI en fase libre (Waller 2006). Para que un organismo sea considerado como potencial candidato para el objetivo de control biológico, éste debe reunir ciertas características como capacidad de crecimiento, sobrevivencia, actividad en el lugar a actuar, bajos costos de producción y fácil manipulación (Larsen, 2006).

3. Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos (HN), como su nombre lo indica, pueden alimentarse de nematodos. Los HN presentan una distribución cosmopolita, y se encuentran en diversos hábitats terrestres incluyendo suelo, material de plantas en descomposición, (Duddington, 1950) ó heces. Estos son particularmente comunes en suelos donde hay gran cantidad de materia orgánica (Persmark, 1997).

Los HN son microorganismos que tienen la capacidad de cambiar su morfología (morfogénesis) en respuesta al medio ambiente. Esto con el objeto de incrementar sus oportunidades de sobrevivencia. Aunque varios HN pueden sobrevivir en el suelo como saprófitos, su habilidad para utilizar a los nematodos como fuente de alimento es una transición de una fase saprofítica a una depredadora, con cambios morfológicos, en los cuales pueden formar estructuras capaces de capturar nematodos. Esta transición puede ser influenciada por factores medioambientales, tanto bióticos como abióticos (Nordbring-Hertz, 1988; Gronvold et al., 1999), los HN se dividen en tres grupos:

Hongos endoparasíticos: Los HN endoparasíticos producen conidios adhesivos que se pegan a la cutícula de las larvas o son ingeridos por los nematodos. Estos hongos son parásitos obligados, a este grupo pertenecen las especies *Drechmeria coniospora* y *Harposporium anguillulae* (Barron, 1977).

Hongos ovicidas: Estos HN se adhieren e invaden los huevos de nematodos con sus esporas, la especie más conocida es *Rhopalomyces elegans* (Barron, 1977).

Hongos depredadores o atrapadores de nematodos: Se dividen en dos grandes grupos: los que forman redes en forma espontánea y son débiles en su vida saprobica como: *Dactylaria candida*, *Monascrosporium cionopagum* y *Dactylaria gracilis* y aquellos que requieren de la

presencia de los nematodos para formar sus redes y además que han logrado adaptarse a la vida saprobia, como *Arthrobotrys oligospora* y *Duddingtonia flagrans* (Nordbring-Hertz et al., 2002).

Órganos de captura: Los órganos de captura desarrollados por los hongos atrapadores son estructuras miceliales especializadas que se desarrollan a partir de las hifas fungales, que actúan como trampas para capturar a los nematodos.

Se han descrito seis tipos de órganos de captura (Barron, 1977):

A). Botones adhesivos: los nematodos son capturados por adhesión a los botones sésiles.

B). Ramas adhesivas: los nematodos son capturados por adhesión a la rama. Una capa de material adhesivo es secretado en la superficie de la misma.

C). Anillos no constrictores: estos son pasivos en su acción: los nematodos son capturados por el deslizamiento a través del anillo, el cual entra a presión alrededor de su cuerpo.

D) Redes adhesivas escalariformes: los nematodos son capturados por adhesión.

E) Redes adhesivas: los nematodos son capturados en redes formadas por anillos tridimensionales. Estos órganos de captura son los más comunes, secretando una capa de sustancia adhesiva en su superficie.

F) Anillos constrictores: cuando los nematodos entran en el anillo, hay una rápida expansión de las células que lo forman y lo aprisionan.

4. *Características generales de Duddingtonia flagrans*

Estos HN depredadores son cosmopolitas por lo que se pueden encontrar en todas las latitudes (Peloille, 1981). Por mucho tiempo se han aislado cepas de hongos depredadores. Estos han sido aislados de heces (frescas o secas), diversas especies de animales y diversos tipos de suelos (Sanyal, 2000; Saumell & Padilha, 2000; Manuelli et al., 1999; Chandrawathani et al., 2002; Skipp et al., 2002). En México se ha reportado el aislamiento de cepas de *D. flagrans*: (Mendoza de Gives et al., 2006).

D. flagrans pertenece a la subclase *Hyphomycetes*, orden *Moniliales* y familia *Moniliaceae*, es del grupo de los hongos depredadores que tienen la capacidad de usar a nematodos como fuente alterna de nutrientes en su vida saprobia (Barron, 1977). Se caracterizan por tener un sistema de estructuras especializadas para atrapar a sus presas (Dijksterhuis et al., 1994).

El ciclo de vida de *D. flagrans* inicia con la formación de conidióforos que son estructuras especializadas de soporte y conidios que son estructuras reproductivas de origen asexual. Los conidios son estructuras de diseminación. Estas contienen suficientes reservas para germinar, después de caer en el sustrato o medio de cultivo. Es favorable un medio de cultivo rico en carbohidratos. También se forman estructuras de latencia de origen asexual denominadas clamidosporas. Estas se forman a partir de hifas vegetativas y juegan un papel muy importante durante las condiciones adversas medioambientales. La formación y su cantidad dependen de la especie del hongo nematófago (Barron, 1977; Gronvold et al., 1996).

Las clamidosporas dan origen a un nuevo individuo teniendo en cuenta que las condiciones nutricionales sean adecuadas, comenzando con la formación de hifas septadas, las cuales originan micelio y a partir del micelio pueden ocurrir dos vías alternas: a) en condiciones nutricionales pobres, forman estructuras de latencia (origen asexual) denominadas clamidosporas (Herrera & Ulloa, 1990) y b) en caso de la presencia de nematodos el micelio forma estructuras de captura denominadas redes, en las redes el hongo puede llegar a capturar nematodos, puede nutrirse y dar origen a nuevas redes o la formación de conidióforos, con conidios que caerán en el sustrato para germinar (Barron, 1977; Dijksterhuis et al., 1994).

Las clamidosporas de *D. flagrans* Se caracterizan por estar recubiertas por una pared doble, gruesa y contienen una gran cantidad de reservas (Figura 1). Estas miden de 27.0-37.0 x 14.0-16.0 μ (Barron, 1977; Durand et al., 2005) y comienzan a formarse cuando el micelio se segmenta y posteriormente el protoplasma se vuelve denso. Una vez que esto ocurre se cubre por una pared gruesa y adquiere un color café (Barron, 1977) una de las características más importantes de *D. flagrans* es producir una gran

cantidad de clamidosporas (Duddington, 1950; Gronvold et al., 1996). La producción de clamidosporas bajo condiciones de laboratorio ha sido reportada por Gardner et al., (2000). Estas cuando se encuentran en un medio favorable germinan y forman hifas que posteriormente se convierten en micelio que da lugar a las redes, este proceso ocurre en un periodo de 24 h bajo condiciones de laboratorio (Herrera & Ulloa, 1990).



Figura 1. Clamidosporas *Duddingtonia flagrans* (40x).

Los anillos o redes tridimensionales (Figura 2) formados por *D. flagrans* son estructuras complejas, la forma de estas redes es constituida por tres o más lazos hifales cubiertos por una sustancia adhesiva (Barron, 1977; Larsen, 2000). La formación de las redes se lleva a cabo por el estímulo de la nemina, ejerciendo un efecto sobre las hifas del hongo. La nemina es un producto de descamación de los nematodos, que tiene como componente principal aminoácidos como es: Valina, Leucina, Isoleucina y otros tipos de péptidos que son los causantes de la inducción de la formación de los anillos (Nordbring-Hertz et al., 2002). El diámetro exterior de cada anillo es de 30 μm y el interior de 20 μm pudiendo variar de uno a otro (Barron, 1977). Las condiciones óptimas de temperatura, humedad y pH para producir la germinación y la formación de redes es de 25 a 33 $^{\circ}\text{C}$, a 90% de humedad, pH de 7.0 y baja disponibilidad de nutrientes en el medio (Alam et al., 1990; Fernández et al., 1999; González et al., 2005).

Debido al papel que juegan los hongos en el control biológico de los NGI de los rumiantes, en los últimos años los hongos han acaparado la atención, en particular lo que respecta a diversos aspectos ecológicos, bioquímicos y fisiológicos, así como su relación estructura-función (Dijksterhuis et al., 1994). La interacción entre el hongo y el nematodo es un proceso regulado por diferentes mecanismos como: atracción, adhesión, invasión, digestión y almacenamiento de nutrientes (Nordbring-Hertz et al., 2002).

Las larvas de NGI son atraídas por una sustancia, hacia las trampas que ellos mismos indujeron (Figuras 3 y 4). Este paso involucra la interacción entre un carbohidrato unido por una proteína (lectina) de hongo que se conjuga con un carbohidrato receptor del nematodo. La sustancia pegajosa se segrega únicamente en los anillos de las redes, la cual no es conocida en detalle pero se sabe que contiene proteínas y carbohidratos-poliméricos (Tunlid et al., 1992). La penetración del hongo en la cutícula del parásito posiblemente involucre enzimas con actividad hidrolítica. Después de la penetración, el nematodo es digerido por el bulbo infectante, que es una estructura de invasión intermedia entre las células atrapadoras altamente diferenciadas y las hifas tróficas desarrolladas del bulbo (Dijksterhuis et al., 1994; Nordbring-Hertz et al., 2002).



Figura 2. Anillos y redes tridimensionales de *D. flagrans* 10x en agar-agua.



Figura 3. Larva infectante de *Haemonchus contortus* atrapada por redes tridimensionales del hongo nematófago *D. flagrans*.

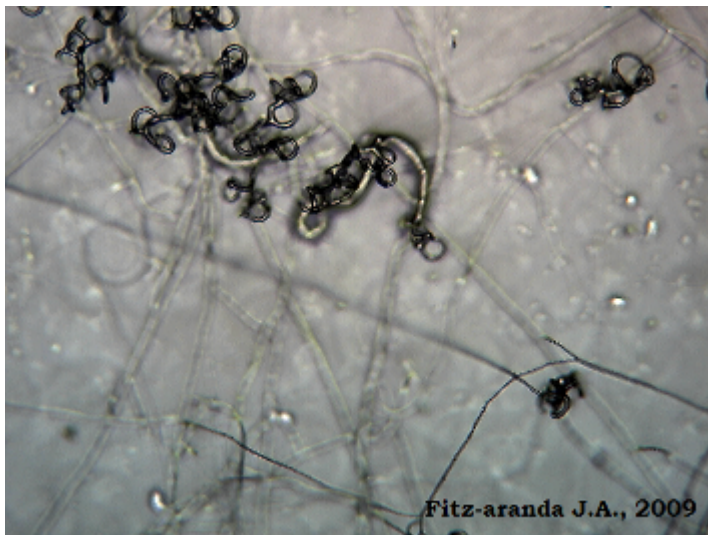


Figura 4. Larvas infectantes de *Haemonchus contortus* atrapadas por redes tridimensionales de *D. flagrans in vitro*.

Cuando la larva del nematodo es atrapada por las redes tridimensionales, el hongo comienza su invasión mediante la formación del bulbo infectante, que rompe la vaina protectora y penetra el cuerpo del nematodo. El proceso de invasión dura de 12 a 24 horas (Herrera & Ulloa, 1990). Después el micelio de invasión consume los componentes del cuerpo del nematodo como fuente de nutrientes (Barron, 1977) los cuales se acumulan en gotas de lípidos en las hifas tróficas, al nematodo lo convierten en compuestos de polímeros de reserva que proveen de nutrientes apropiados al micelio vegetativo o a las clamidosporas (Dijksterhuis et al., 1994).

5. *Duddingtonia flagrans* utilizado como una herramienta en contra de los NGI

Desde hace casi un siglo se han reportado estudios de la capacidad de los hongos de atrapar nematodos (Duddington, 1950; Barron, 1977). Después de unos años algunos investigadores retoman los estudios utilizando nuevamente hongos nematófagos en especial *Arthrobotrys oligospora* (Gronvold, 1985; 1989) con el cual realiza estudios *in vitro* e *in vivo* con resultados alentadores (Waller & Faedo, 1993; Mendoza de Gives et al., 1994). En el año de 1991 se dio a conocer al mundo el nombre de una especie la cual producía clamidosporas en grandes cantidades además de poder soportar el paso del tracto digestivo de los animales (Larsen et al., 1991; Larsen et al., 1992) fue a partir de ese momento que inició el interés por la especie (Gronvold et al., 1993a; Gronvold et al., 1993b).

Cuando observaron que las clamidosporas de *D. flagrans* eran capaces de soportar el paso del tracto digestivo se propuso la idea de suministrar clamidosporas

de forma oral para que estas pudieran ser eliminadas en las heces de los animales durante el pastoreo (Waller, 1997). Esto favorecería el contacto directo entre las clamidosporas y los huevos de los parásitos. La finalidad de la administración de las esporas consiste en que éstas caigan junto con las heces en las cuales se encuentran junto con los huevos de los parásitos. Así las clamidosporas tendrían la posibilidad de poder desarrollarse, crecer, capturar y destruir a las futuras larvas que se encuentren en el excremento (Gronvold et al., 1993a) (Figura 5).

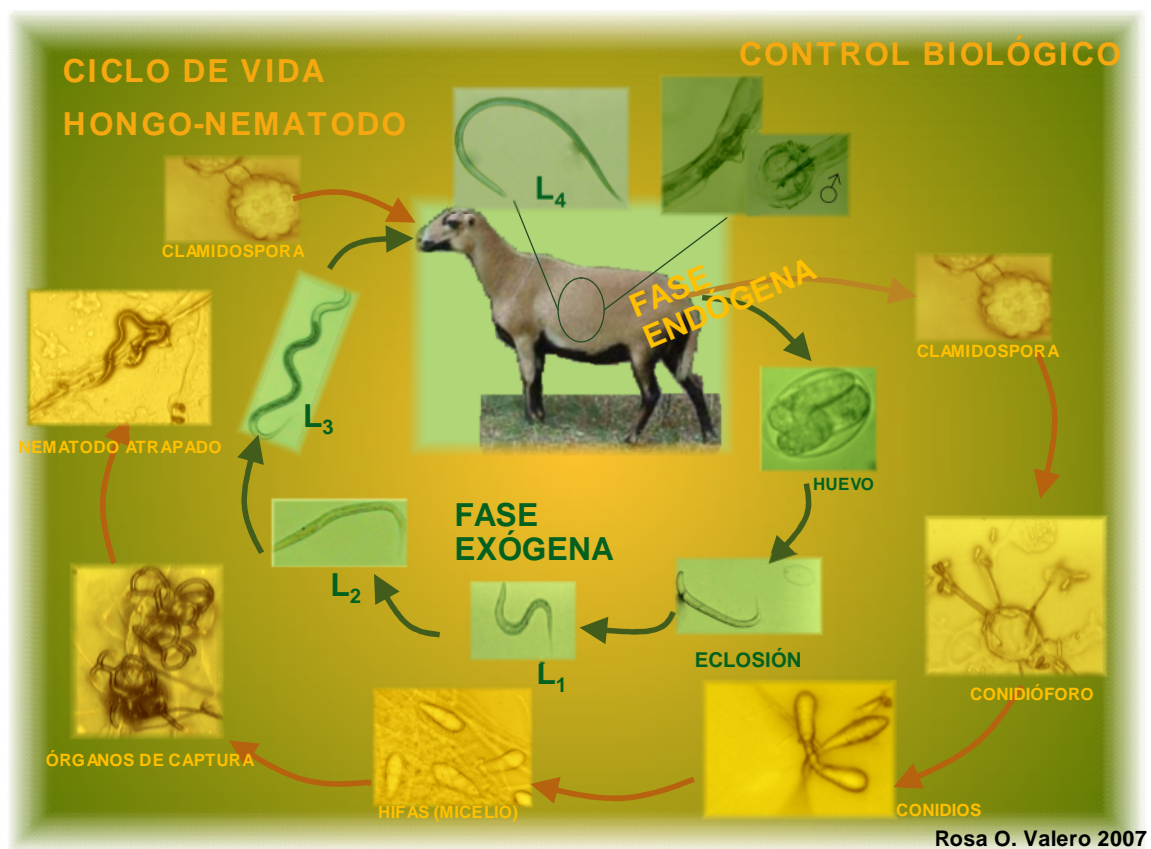


Figura 5. Ciclo de vida de *H. contortus* y del hongo nematófago *D. flagrans*.

El ciclo inicia con un animal infectado con (L₃) el cual es tratado con clamidosporas administradas por vía oral, éstas pasan a través del tracto digestivo del ovino (fase endógena) después se encuentran en las heces de los ovinos (exógena). Conforme el desarrollo del huevo pasa a larva infectante las esporas también germinan desarrollando conidióforos, conidios y órganos de captura para capturar las larvas. Gracias a la

sincronía de los ciclos tanto de las NGI y las clamidosporas de *D. flagrans* (Larsen, 1999), pudo planificar que en las heces del animal pudieran formarse redes tridimensionales, pero en la actualidad la sincronía de los ciclos es más delicada de lo que parece haciendo difícil la explicación de los resultados (Jackson et al., 2005). Cabe aclarar que el hongo actúa en contra de los nematodos fuera del animal, específicamente en las heces. De esta manera se busca que los animales en pastoreo se enfrenten a una menor carga de parásitos y por consecuencia, se reduzcan los efectos clínicos y subclínicos en los animales (Waller, 1997; Larsen, 2002).

6. *Efecto del ambiente sobre las clamidosporas de D. flagrans*

La administración de *D. flagrans* es inocua para los animales y para el medio ambiente. Se ha evaluado la influencia de las clamidosporas sobre los componentes bióticos del ambiente donde se depositan las heces de animales tratados (Paraud et al., 2006). Por ejemplo, la población del escarabajo *Apoderus constans* no es afectada. Gronvold et al., (2000) demostraron que no existen signos de daño en los gusanos de tierra *Aporrectodea longa*. Por su parte, Knox et al., (2002) descartaron el efecto negativo sobre la población de mesofauna de la tierra (Collembola, acarina y nematodos del suelo) y sobre su diversidad (Yates et al., 2002). Knox et al., (2002) y Faedo et al., (2002) comentan que su capacidad de crecimiento está limitada al área donde es depositado, por lo que el efecto está delimitado al área donde caen las heces de los animales tratados.

7. *Dosis de clamidosporas*

Anteriormente se han realizado varios experimentos con la finalidad de poder calcular la dosis necesaria de esporas para suministrar a los animales, específicamente en ovinos. Se probaron varias dosis de esporas y posteriormente se demostró que la dosis de 2.5×10^5 / kg pv se relacionaba con reducciones del 80 a 90% en la cantidad de larvas cosechadas de heces comparadas con el control sin hongos en estudios de laboratorio (Chandrawathani et al., 2002). Sin embargo, cuando esta dosis se proporcionó a animales en pastoreo no se obtuvieron los resultados esperados por lo

cual se duplicó la dosis a 5×10^5 / kg pv. Sin importar el incremento de la dosis de esporas no se obtuvieron resultados alentadores (Chandrawathani et al., 2003; Ojeda-Robertos et al., 2008a). Con respecto a la frecuencia de administración y la eliminación de las esporas, se diseñaron varios trabajos que demostraron que la eliminación de las esporas depende de la velocidad de pasaje (tiempo de tránsito) de la ingesta en el TGI (Chandrawathani et al., 2003). En un estudio realizado en cabras, una sola dosis de clamidosporas se eliminó durante 3 a 4 días (Ojeda-Robertos et al., 2005). Por su parte Paraud et al., (2005) administraron clamidosporas durante un periodo de 5 días y encontraron que la eliminación inicia en las heces desde el segundo día y hasta dos días después de interrumpir la administración. En ovinos, el periodo de eliminación varía de 4 a 7 días (Larsen et al., 1998; Waller et al., 2001b; Chandrawathani et al., 2003). El tiempo de tránsito de las esporas a través del TGI está relacionado con el tipo de dieta que determina el flujo de la ingesta. Entre los factores que influyen sobre la velocidad de tránsito están: la cantidad total de alimento consumido (dieta más el vehículo de las esporas), tamaño de la partícula de alimento, digestibilidad de la dieta, contenido de agua e ingestión de agua (Chandrawathani et al., 2003). Además se reconoce que existen factores del animal (especie y estado fisiológico) y del ambiente que influye en el consumo y tránsito del alimento en el TGI (McDonald et al., 2002).

8. *Vehículo de administración de las clamidosporas*

Con el propósito de poder encontrar un flujo constante de clamidosporas en las heces de forma experimental y para garantizar el consumo de las esporas, se han administrado suspensiones mediante el uso de jeringas (Larsen et al., 1998), encapsuladas en gelatina (Faedo et al., 1997) y en infusiones en cánulas ruminales (Larsen et al., 1998; Faedo et al., 1998). Otro método de administración, es mezclar alimento con una suspensión que contenga clamidosporas. Preparaciones de avena y melaza para dosificar de manera individual a borregos (Ojeda-Robertos et al., 2005, 2008a; Mendoza de Gives et al., 2006). Para uso comercial se han incluido en bloques de melaza-urea (Waller y Faedo, 1993; Waller et al., 2001b; Chandrawathani et al., 2003). Casillas-Aguilar et al., (2008) diseñaron unos biopellets que contenían

clamidosporas de *D. flagrans* de la cepa mexicana (FTHO-8). Los biopellets sirvieron para dosificar a cada animal con la finalidad de que cada uno obtuviera su dosis adecuada de esporas por kg de peso vivo.

Los estudios efectuados han puesto de manifiesto algunas limitantes para el uso de *D. flagrans* en el campo. El incluir las esporas en los bloques de melaza-urea, se han encontrado problemas con el consumo del bloque (Waller et al., 2001a; Chandrawathani et al., 2002). Los animales no consumieron las cantidades suficientes para lograr la dosificación adecuada. Larsen (2006), especuló que el tiempo de vida de las clamidosporas es muy corto ya que un alto nivel de humedad ocasiona que las clamidosporas germinen, lo que podría afectar el nivel de sobrevivencia al paso del TGI. Sin embargo, este es un punto que no ha sido evaluado de forma definitiva.

I. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Localización

El presente experimento se dividió en dos fases: La primera fase de los experimentos se realizó en el laboratorio de helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del INIFAP, el cual se ubica en Jiutepec, Morelos, México. La segunda fase experimental se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) en Mérida, Yucatán, México.

B. Producción de Material Biológico (clamidosporas y larvas L₃)

Se utilizó una cepa mexicana de *D. flagrans* (FTHO-8). Se procedió a la producción del hongo, para lo cual se utilizó un medio de cultivo conteniendo agua-agar (20 g) + cema de trigo (50 g) cbp un litro. Se esterilizó el material durante 20 minutos y se vació en cajas Petri estériles. Posteriormente el material fungal fue transferido a las cajas con el medio y se dejó incubar durante 4 semanas a temperatura ambiente. El medio de cultivo fue adicionado con un antibiótico de amplio espectro para inhibir el desarrollo de bacterias (Cloranfenicol a dosis de 500 mg/l; Clorafén, laboratorio Merck). Pasado este tiempo, el hongo se cosechó bajo condiciones estériles, agregando sobre la superficie de las cajas aproximadamente de 2-5 ml de agua destilada estéril y con la ayuda de una espátula de plástico estéril, raspando sobre el agar para separar el material fungal. Éste fue colocado finalmente en un matraz Erlen-Mayer, previamente esterilizado, para su almacenamiento hasta su uso.

La estimación del número de clamidosporas en una suspensión fue realizado como se describe a continuación: de un matraz Erlen-Mayer conteniendo clamidosporas del hongo en suspensión acuosa en un volumen conocido se tomaron diez alícuotas de 1 ml y se depositaron en diez tubos de ensaye de 50 ml y se aforaron con un relación de 1:10 o dependiendo de la concentración de las clamidosporas.

Posteriormente se llenaba la cámara de recuento celular (Nuebauer) para cuenta celular y se cuantifica usando el microscopio (10 x).

La estimación del número de clamidosporas por ml se calculó de la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned}\text{No. de Clamidosporas} &= Ca \times 10,000 * = R1 \\ &= R1 \times 10 \text{ ml} ** = R2 \\ &= R2 \times Vc.\end{aligned}$$

Donde:

Ca = Suma de Clamidosporas de los tubos / 10 (cantidad de tubos)

* = Es una constante.

** = Cantidad en la que se afora los tubos

Vc = Volumen conocido del Matraz

Para la obtención de larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* se utilizó un aislado susceptible a bencimidazoles obtenido originalmente a partir de un ovino infectado en forma natural en Jonacatepec, Morelos México. Mantenido por pases sucesivos en ovinos en el CENID-PAVET. Para este experimento se infectó un borrego que sirvió como donador, del cual se obtuvo el material biológico (larvas de L₃ de *H. contortus*) a través de de coprocultivos. Las heces colectadas del ovino donador durante un día se mezclaban con hule espuma limpio en un recipiente y se homogenizaba con agua. Esta mezcla, se tapaba con papel aluminio dejándole una ventana recubierta con una tela de manta de cielo para permitir la oxigenación. Posteriormente, se dejó incubando durante 6-7 días a temperatura ambiente. Diariamente se revisaron los coprocultivos removiéndolos y evitando que se deshidrataran por la parte de abajo evitando la muerte larvaria. La materia fecal fue incubada por 7 días y se colocaron varios comprimidos fecales envueltos en un pedazo de manta de cielo y finalmente colocadas en el aparato de Baermann en donde permanecieron durante 24 horas para finalmente obtener las larvas del sedimento de los tubos de ensaye. Después de obtener las larvas, se filtraron, para evitar impurezas. Finalmente se estimó el número de L₃ de *H. contortus*.

C. Primera Fase Experimental

1. *Elaboración de comprimidos nutricionales*

Se elaboraron comprimidos nutricionales (CN) utilizando ingredientes disponibles en la región. La selección de los ingredientes se basó de distintas formulaciones, y estas se basaron a las necesidades de ovinos con la finalidad de poder dar un aporte de energía (2.59 Mcal) y proteína (27% P.C). El diseño de los CN se propuso para ovinos de dos a tres meses con un peso promedio de 20-25 Kg. (cuadro 3). El tamaño del comprimido se seleccionó después de varias pruebas de aceptabilidad, dejando un CN de 3 x 1 cm y un peso de 12 g cada uno.

La preparación de CN se basó en principio en la misma tecnología empleada para la elaboración de bloques multinutricionales (BMN) (Rubio & Vidal 2000), a partir de los ingredientes anteriormente mencionados en el cuadro 3. Se elaboraron CN con y sin clamidosporas de *D. flagrans* (4×10^6 clamidosporas en cada CN). Los CN se dejaron secar por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente para posteriormente someterlos a sus distintos métodos de almacenamientos: anaquel, refrigeración, intemperie-sombra, e intemperie-100%.

Cuadro 1. Porcentaje de inclusión de los ingredientes utilizados para la elaboración de los comprimidos nutricionales con o sin clamidosporas de *D. flagrans*, con su respectivo porcentaje de inclusión.

Ingredientes	% de inclusión
Sorgo	7
Pasta de soya	51
Salvado de trigo	20
Melaza	18
Sales minerales	2
Cal	2

2. *Condiciones de almacenamiento*

Se elaboró un lote de 192 CN conteniendo clamidosporas de *D. flagrans* y un lote de la misma cantidad de CN sin clamidosporas (lote control). Cada lote fue dividido en 4 tratamientos integrados por 48 CN. Se tomaron 6 CN cada semana de cada tratamiento de forma individual durante 8 semanas. Los 4 tratamientos se describen a continuación:

Anaquel: Los CN se colocaron en una charola y se mantuvieron empacados dentro de una bolsa de plástico sobre un anaquel en un cuarto a temperatura ambiente.

Intemperie-sombra: Los CN se colocaron en una charola la cual se encontraba dentro de una jaula metálica, para protegerlos de animales silvestres. La jaula estaba expuesta a condiciones ambientales de exterior bajo techo para evitar lluvia y sol pero sin protección de bolsa.

Refrigeración: Los CN se colocaron en charolas dentro de bolsa plásticas y se expusieron a una temperatura 4 °C y una humedad de 50%.

Intemperie-100%: Los CN se colocaron en una charola que se encontraba dentro de una jaula metálica, para protegerlos de animales silvestres. La jaula estaba expuesta a condiciones ambientales de exterior, sin protección de techo, expuestos a los rayos solares y lluvia.

3. *Evaluación de la viabilidad de los comprimidos nutricionales*

Se tomaron 6 CN de cada lote (con y sin clamidosporas) de cada tratamiento (anaquel, intemperie, refrigeración e intemperie-100%) cada semana durante 8 semanas. Se evaluó la viabilidad de las clamidosporas contenidas en los CN. Cada CN fue considerado como una repetición de su tratamiento y su lote respectivo. Cada CN fue macerado de forma individual y el contenido total del CN se homogenizó en el interior de una bolsa plástica.

Se tomaron 2 g del CN molido y homogenizado para esparcirlo en el interior de cajas Petri (un CN por caja Petri). Las cajas Petri contenían agar bacteriológico (2%).

Después de agregar el macerado del CN en las respectivas cajas Petri, se adicionaron en promedio 200 L₃ de *H. contortus* a cada caja para evaluar la germinación de las clamidosporas contenidas en los CN y el porcentaje de larvas atrapadas. Las cajas Petri que contenían agar bacteriológico, el macerado del CN y las larvas L₃ de *H. contortus*, se almacenaron a temperatura ambiente durante 8 días con la finalidad de que las clamidosporas contenidas en los CN pudieran germinar, formar redes tridimensionales y atrapar larvas de *H. contortus*. Después de este periodo, el contenido total de cada caja Petri se vertió en un aparato de Baermann con la finalidad de poder obtener las larvas que no fueron capturadas por las redes de *D. flagrans*. Las larvas que fueron recuperadas con el aparato de Baermann fueron contabilizadas para comparar las cantidades obtenidas en los CN con clamidosporas y los controles sin clamidosporas.

4. *Determinación de la reducción de larvas*

El porcentaje de reducción de larvas fue determinado mediante la comparación del promedio de larvas del grupo control menos el promedio de larvas encontradas en el grupo tratado respectivo de cada tratamiento. Para esto se utilizó la siguiente fórmula (Casillas-Aguilar et al., 2008).

$$\text{Porcentaje de reducción larvaria} = \frac{LT - LC}{LT} \times (100)$$

LT= Media de larvas recuperadas del grupo tratado

LC= Media de larvas recuperadas del grupo control

D. Segunda Fase Experimental

1. *Animales experimentales*

Se utilizaron 15 ovejas de pelo de una edad 3 a 4 meses mantenidos libres de infección por NGI. Para confirmar la ausencia de infección previo al estudio se tomaron muestras de heces directamente del recto de cada animal para análisis coprológicos. Independientemente de confirmar el status de libre de infección, todos

los animales fueron desparasitados con una dosis oral de albendazol (10%) de a razón de 1 ml por 20 kg/pv). Después de transcurridos 4 días se verificó que todas las ovejas se encontraran libres de NGI. Posterior a dicha comprobación, las ovejas fueron infectadas artificialmente con larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* (350 L₃ / kg pv). Se dejó transcurrir un tiempo de 21 días en los cuales se estableció la infección. La infección patente se comprobó mediante exámenes coprológicos (flotación y McMaster). Las ovejas se mantuvieron bajo condiciones de confinamiento (piso de concreto, techo, alimento y agua *ad libitum*). Después de haber comprobado la positividad las borregas se alojaron individualmente en jaulas metabólicas elevadas hasta el final de la prueba.

Cinco días antes de comenzar esta fase experimental los animales fueron pesados. En estas jaulas recibieron alimento de forma individual otorgando el 3.5% del alimento comercial y agua *ad libitum*. Al mismo tiempo los animales fueron adaptados a consumir CN. Para esto se les otorgaron pequeñas cantidades de CN sin clamidosporas comprobando la palatabilidad de los mismos. En este tiempo los animales se adaptaron a consumir CN. Esto se realizó únicamente a los grupos que serían tratados con CN. Los CN fueron ofertados por la mañana antes de suministrar el alimento convencional. Éste último consistió en ofrecer 3.5 % de su peso corporal en materia seca de un alimento con 14% P.C y 2.4 E.M (alimento comercial peletizado) además de agua *ad libitum*.

2. *Elaboración de comprimidos nutricionales*

En esta etapa del experimento se utilizaron CN elaborados con la misma metodología y características de la primera fase experimental. Posteriormente se dejaron secar a una temperatura ambiente promedio de 28 °C. Se elaboraron CN a distintas fechas: 10, 5 y 1 día previo al inicio del experimento. Esto se hizo con la finalidad de observar si las clamidosporas de CN de diferentes edades mantenían su misma capacidad de llegar a las heces y germinar cuando se exponían a larvas de *H. contortus*. Asimismo, la eficacia en la captura de larvas de NGI por el hongo fue evaluada.

3. *Diseño del estudio*

Posterior al periodo de adaptación, los animales entraron al periodo experimental que consistió de 5 días consecutivos en que cada animal recibió los tratamientos experimentales (días 1 a 5). Posteriormente se mantuvieron los animales durante 4 días más en que ya no recibieron los tratamientos experimentales pero se siguió con el monitoreo de algunas variables (días 6 a 9).

Las ovejas infectadas con *H. contortus* se dividieron en cinco grupos con pesos vivos semejantes así como excreción semejante de huevos de *H. contortus*. Cada tratamiento fue integrado por 3 hembras infectadas con *H. contortus*. Cada animal recibió en promedio 2×10^6 clamidosporas /Kg pv. Los grupos experimentales se describen a continuación:

(T1) Ovejas suplementadas con CN de 4×10^6 clamidosporas C/U con una edad de 10 días de elaboración. La cantidad de comprimidos otorgados dependió del peso de cada animal que a su vez determinó la dosis de clamidosporas ofrecidas a cada individuo.

(T2) Ovejas suplementadas con CN de 4×10^6 , clamidosporas C/U con una edad de 5 días de elaboración. La cantidad de CN recibida se determinó también por el peso del animal.

(T3) Ovejas suplementadas con CN de 4×10^6 , clamidosporas C/U frescos (al día siguiente de elaborados). La cantidad también dependió del peso como en los casos anteriores.

(T4) Ovejas tratadas oralmente con clamidosporas en suspensión acuosa diariamente a una dosis de 2×10^6 clamidosporas / Kg pv.

(T5) Grupo control que consumió CN sin clamidosporas.

A todos y cada uno de los animales de los grupos T1, T2, T3 y T4 se les aplicó el tratamiento de clamidosporas a partir del día 1 y hasta el 5 a la misma hora (8: 00 am) y en una sola suplementación o dosis al día. Para verificar que consumieran el total de las clamidosporas a otorgar se suministraron primero los CN conteniendo las

clamidosporas y posteriormente la cantidad de alimento comercial total a consumir, en una sola dosis al día. Se suministró aproximadamente el 3.5% del peso vivo de cada animal de forma individual.

4. *Cuantificación de huevos y de clamidosporas por gramo de heces*

Para la cuantificación de huevos por gramo de heces (HPG) y de clamidosporas por gramo de heces (CPG) se tomaron 2 g de heces homogenizadas de cada animal diariamente durante todo el periodo en que se ofrecieron los CN (días 1 a 5) y los cuatro días posteriores para hacer un total de 9 días consecutivos de muestreo. La contabilización se hizo mediante la técnica de McMaster descrita por Ojeda-Robertos et al. (2008). Los huevos y clamidosporas se muestran en la Figura 6.

El conteo de CPG de *D. flagrans* y de HPG de *H. contortus* se realizó en la misma cámara para evitar confusiones de planos visuales, contabilizando primero los huevos y posteriormente las clamidosporas. Las esporas se clasificaban y se consideraron como viables cuando se observaban con una capa uniforme y que no estuviera rota ó deforme. Aquellas esporas muy pequeñas, deformes o rotas eran contabilizadas como esporas no viables.

5. *Conteo total de huevos y clamidosporas eliminados en heces de los ovinos*

Se colectaron las heces de 24 horas de cada animal en recipientes de plástico. Esto se realizó por 8 días consecutivos por cada animal para determinar la cantidad total de heces frescas de cada uno. Las heces fueron colectadas, pesadas y homogenizadas. Posteriormente fueron colocadas en bolsas de papel para secarlas en una estufa por un periodo de 24 h. Una vez que las heces estuvieron a peso constante se pesaron nuevamente para calcular la cantidad total de heces en materia seca. Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para poder calcular el total de huevos en base seca.

$$HTH = (A)(B) * 50$$

(A): Total de gramos de heces en base seca.

(B): Huevos por gramo de heces (HPG).

(HTH): Huevos totales eliminados en 24Hrs.

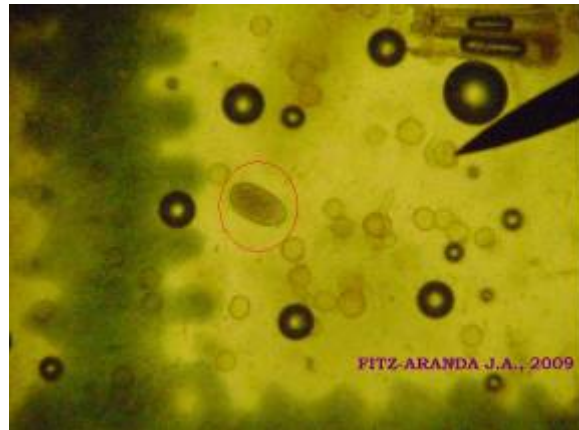


Figura 1. Cámara de McMaster a 10x. Se muestra huevo de *Haemonchus contortus* rodeado de clamidosporas de *D. flagrans* además de la presencia de burbujas de aire y restos de material fecal.



Figura 2. Fotografía de la cámara de McMaster a 40x. se aprecian 3 clamidosporas de *D. flagrans* y un huevo de *Haemonchus contortus*. La clamidospora que se encuentra en el círculo es un ejemplo de las consideradas como viables.

6. *Viabilidad de las clamidosporas en las heces*

Para determinar la existencia de clamidosporas viables antes de la primera dosis el día 1 (control negativo) se realizó una prueba de germinación *in vitro* para el día 0. Durante todo el periodo experimental (días 1 a 9) se verificó la presencia de clamidosporas viables en las heces mediante la técnica descrita por Ojeda-Robertos et al. (2008). Esta consistió en tomar 1 g de heces de cada animal todos los días (del 0 al 9). La muestra de heces se colocaba en cajas Petri conteniendo agar bacteriológico al 2%. Las cajas Petri con agar bacteriológico se colocó un pellet fecal. Se dejaron incubar por diez días y posteriormente se observó la presencia o ausencia de larvas libres, larvas atrapadas, redes tridimensionales con ayuda de un estereoscopio, o la ausencia de larvas y redes. Aquellas cajas en las que se apreciaron estructuras atrapadoras ó nematodos atrapados fueron consideradas como positivas y aquellas que no presentaran estas evidencias se consideraron como negativas.

7. *Análisis de la digestibilidad del alimento y de las clamidosporas*

La digestibilidad de la materia seca del alimento y de las clamidosporas fue determinada de acuerdo a lo reportado por Ojeda-Robertos et al., (2009). Del consumo total de alimento por animal en materia seca se descontó la parte proporcional al peso de los CN ingeridos. Se pesó la cantidad de alimento consumido y la cantidad en g de CN consumido por parte de los animales que fueron tratados con CN. Además se determinó el % de materia seca de los mismos (CN) y del alimento peletizado. Se utilizó además la materia seca de las heces recuperadas. La fórmula utilizada para poder calcular la digestibilidad de la materia seca del alimento:

$$\text{Digest} = (\text{CA} - \text{MSH}) / \text{C.A} * 100$$

CA= Consumo de alimento+ CN

MSH= Materia seca en heces (g)

Para la evaluación de la digestibilidad de las clamidosporas se consideró la cantidad de clamidosporas consumidas por cada animal utilizando la dosis de 2×10^6 clamidosporas / Kg de PV y la cantidad de clamidosporas eliminadas en las heces. Para realizar la estimación de la digestión de las clamidosporas se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Digest} = (\text{TL}-\text{TB})/\text{TL} \times 100$$

TL= Total de Clamidosporas eliminadas en cada día

TB=Dosis de Clamidosporas otorgadas por día

Para esta fórmula solo se utilizaron las cantidades de esporas calificadas como “viables” (*ver fig. 7*), es decir completas y con gránulos internos y superficiales.

8. *Relación de clamidosporas por gramo de heces: huevos por gramo de heces*

La relación de clamidosporas por gramo de heces:huevos por gramo de heces (CPG:HPG) se determinó por medio de la técnica propuesta por Ojeda-Robertos et al., (2008). El procedimiento consistió en la cuantificación de la cantidad de esporas eliminadas desde el 1 hasta el día 8, posteriores a la ingestión de los CN durante el día 0 a 4. Durante el periodo de administración del conteo total de CPG fue comparado contra el conteo de HPG, tomando en cuenta una relación CPG:HPG utilizando la siguiente fórmula: (CPG/HPG) donde se podría calcular la relación clamidosporas: huevos.

9. *Coprocultivos*

De las muestras de heces colectadas todos los días se realizaron coprocultivos en los días 1, 5 y 7 de tratamiento. Los coprocultivos consistieron en 3 repeticiones por animal (7 g de excremento en cada caja de Petri y 2 g de heces de esa caja que se destinó a McMaster). Para realizar los coprocultivos se utilizaron cajas Petri de 9 cm. de diámetro. Las tres repeticiones realizadas fueron consideradas cada una como una

repetición. Para cada coprocultivo se contabilizó la cantidad total de HPG y CPG colocados en cada una de las cajas Petri como sugiere Ojeda-Robertos et al., (2008). Los coprocultivos se mantuvieron a temperatura de laboratorio con un promedio de temperatura de 25 °C y una humedad del 80%. Se vigiló que permanecieran con humedad óptima. Los coprocultivos permanecieron un tiempo de 10 días y posteriormente se colocaron las heces de cada cultivo en aparatos de Baermann individuales con la finalidad de poder recuperar las larvas que no fueron capturadas por las redes tridimensionales del hongo nematófago *D. flagrans*. Después de 24 hrs. de haber permanecido en aparato de de Baermann las larvas fueron recuperadas, estas permanecieron en refrigeración a 4 °C por un tiempo máximo de 12 hrs.

10. *Eficacia de la captura de larvas de los tratamientos*

La eficacia de los diferentes tratamientos se determinó contabilizando las larvas de cada cultivo elaborado de acuerdo a la técnica descrita por Fontenot et al., (2003). El conteo consistió en tener un volumen conocido, de allí tomar 10 alícuotas de 5 µl y contabilizar el total de larvas contenidas en cada gota. La suma total de las 10 alícuotas se usó para obtener un promedio de larvas de cada cultivo. El promedio de las larvas recuperadas fue multiplicado por el volumen total de líquido de donde se tomaron las alícuotas. El resultado fue dividido entre el volumen de cada alícuota para obtener la cantidad de larvas totales.

La eficacia se evaluó a través de la reducción de larvas en los coprocultivos donde los grupos tratados (T1, T2, T3 y T4) fueron comparados con el grupo T5 (control). La cantidad de HPG y el número de larvas por gramo de heces (LPG) encontradas en los coprocultivos fueron determinados a los días 1, 5 y 7 días.

El porcentaje de desarrollo larvario fue determinado mediante la siguiente formula $(LPG/HPG) \times 100$ (Paraud et al., 2005). El porcentaje de reducción larvaria fue determinada mediante la siguiente formula sustituyendo la media de los distintos grupos control (Terril et al., 2004).

$$=100 - \text{PDL del grupo Tratado (1,2,3,4)} \times 100 / \text{PDL del grupo control (T5)}$$

Donde:

PDL: El porcentaje de desarrollo larvario

T1, T2, T3, T4: Tratamientos

T5: Control

Tanto el porcentaje de desarrollo larvario como el porcentaje de reducción larvaria fueron estimados en distintos periodos del experimento (días 1, 5 y 7).

E. Análisis de Datos

El análisis inició con la transformación de los datos a Log_{10} y Arcoseno, para el caso de porcentajes, de acuerdo a los resultados de las pruebas de distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Para los datos que no superaron las pruebas anteriores se utilizó estadística no paramétrica. En todos los casos las figuras y cuadros muestran los datos sin transformar.

1. *Fase experimental uno*

Para comparar los registros semanales del promedio máximo y mínimo de temperatura y humedad de la condición intemperie y anaquel se aplicó una t de Student y la prueba U de Mann-Whitney para los datos no paramétricos. El mismo análisis se utilizó para comparar la concordancia entre los valores experimentales y los datos obtenidos de la red pluviométrica del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar los conteos semanales de larvas L_3 entre las diferentes condiciones experimentales. En caso de existir diferencias significativas, se utilizó la prueba de Tukey-Kramer. Adicionalmente, para la comparación de los conteos de larvas L_3 de cada uno de los tratamientos contra el control se utilizó la prueba de comparación múltiple de Dunnet.

2. *Fase experimental dos*

Para analizar las diferencias en la recuperación de clamidosporas se utilizó el procedimiento GLM del programa estadístico SAS 9.2. Dentro de los factores principales se incluyeron el tratamiento y el día únicamente, ya que la interacción resultó no significativa ($P < 0.05$). En caso de encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de Tukey-Kramer.

La digestibilidad del alimento y de las clamidosporas se analizó mediante ANOVA de una vía.

Los promedios de larvas por gramo de heces de los coprocultivos se analizaron mediante el procedimiento GLM. Las diferencias entre los factores principales (días y tratamiento) se determinaron por medio de la prueba de Tukey-Kramer. En contraste, la cantidad de huevos totales y de clamidosporas totales se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre tratamientos y días se obtuvieron con la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar la relación existente entre los porcentajes de reducción de larvas L₃ y los días en los cuales se aplicó el tratamiento.

I. RESULTADOS

A. Fase Experimental Uno

1. *Sobrevivencia in vitro de clamidosporas de D. flagrans en CN bajo diferentes condiciones de almacenamiento*

En la Figura 8 se presentan los valores registrados (máximos y mínimos) de temperatura y en la Figura 9 los datos de humedad durante el tiempo que duró el experimento. En la Figura 8 se incluye además del valor de precipitación pluvial registrada semanalmente. Los valores de temperatura máxima para las condiciones intemperie y anaquel no presentaron diferencias significativas (28.3 ± 0.17 y 28.6 ± 0.09 °C, respectivamente; $P > 0.05$). En contraste, los valores mínimos de temperatura fueron diferentes ($P < 0.0001$) entre las condiciones intemperie (19.8 ± 0.1 °C) y anaquel (26.5 ± 0.09 °C). Con respecto al registro de humedad máxima y mínima, los promedios registrados para intemperie (81.9 ± 0.9 y 50.5 ± 0.9 °C, respectivamente) y anaquel (56.8 ± 0.1 y 54.02 ± 0.1 °C, respectivamente) fueron distintos entre ellos ($p < 0.001$). Cabe mencionar, que la condición refrigeración presentó valores constantes de temperatura y humedad, que por razones obvias son diferentes a las otras formas de almacenamiento y por tal razón no se consideró para las comparaciones de estas variables ambientales entre condiciones anaquel e intemperie. Para corroborar las mediciones obtenidas en el experimento, se comparó el total de los datos de temperatura, humedad y precipitación con los valores registrados por la red pluviométrica del IMTA que se ubica en las instalaciones del municipio de Jiutepec, Morelos en donde se realizó la fase experimental uno. Los resultados indicaron que ambos valores fueron similares a lo largo del tiempo de estudio ($p < 0.05$).

Los CN de intemperie-sombra e intemperie-100% se encontraron bajo condiciones de humedad elevadas con días lluviosos donde se presentó una humedad ambiental superior al 90%. La temperatura y humedad registrada en las condiciones de almacenamiento de anaquel y refrigeración fueron más constantes y estables. En anaquel se encontró un promedio general de temperatura máxima y

mínima de 28.2 y 26.6 °C, respectivamente con una humedad de 56.8 y 54.4 %. En refrigeración se manejo una temperatura constante de 4 °C y una humedad de 54% durante toda la fase experimental.

El análisis de las pruebas de viabilidad *in vitro* se presenta en la Figura 10. En general la figura muestra la tendencia que se presentó en los conteos semanales de larvas para las condiciones experimentales. Intemperie 100% (panel B) e intemperie-sombra (panel C) presentaron los conteos más bajos de larvas ($P < 0.05$) con respecto a las condiciones anaquel (panel A) y refrigeración (panel D). Además, cada condición de almacenamiento presentó diferencias significativas con respecto a su grupo control que no tuvo clamidosporas ($P < 0.005$). La información anterior se presenta dentro de los insertos de la Figura 10. Adicionalmente, se cuantificó el porcentaje de reducción larvaria para cada tratamiento, los resultados demuestran que todas las condiciones de almacenamiento producen porcentajes de reducción similares ($P > 0.05$) que van del 67 al 82 %.

Finalmente, los resultados del análisis de regresión lineal realizado, nos indican la ausencia de una relación funcional entre el tiempo de muestreo y los porcentajes de reducción de larvas L3. En todas las condiciones experimentales los coeficientes de determinación obtenidos fueron muy bajos ($R^2 < 0.2$) y con pendientes muy similares a cero ($P > 0.05$). Por tal razón, es posible pensar que la reducción de larvas es independiente del tiempo de tratamiento con las clamidosporas y asimismo con la eficiencia de las mismas.

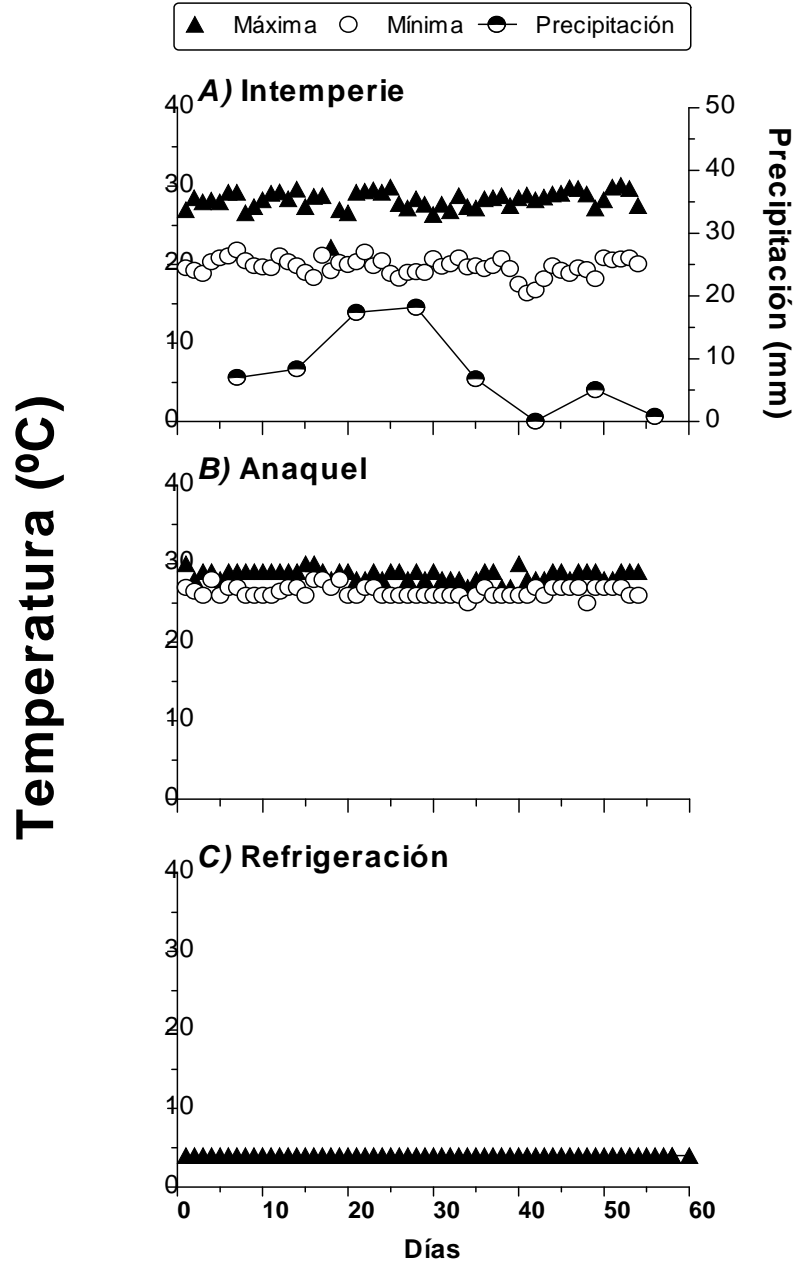


Figura 1. Temperatura máxima y mínima registrada durante 54 días en las condiciones de almacenamiento de los CN. Intemperie (A), Anaquel (B) y Refrigeración (C). Adicionalmente para el panel A se agregó el promedio semanal durante ocho períodos de registro de la precipitación pluvial.

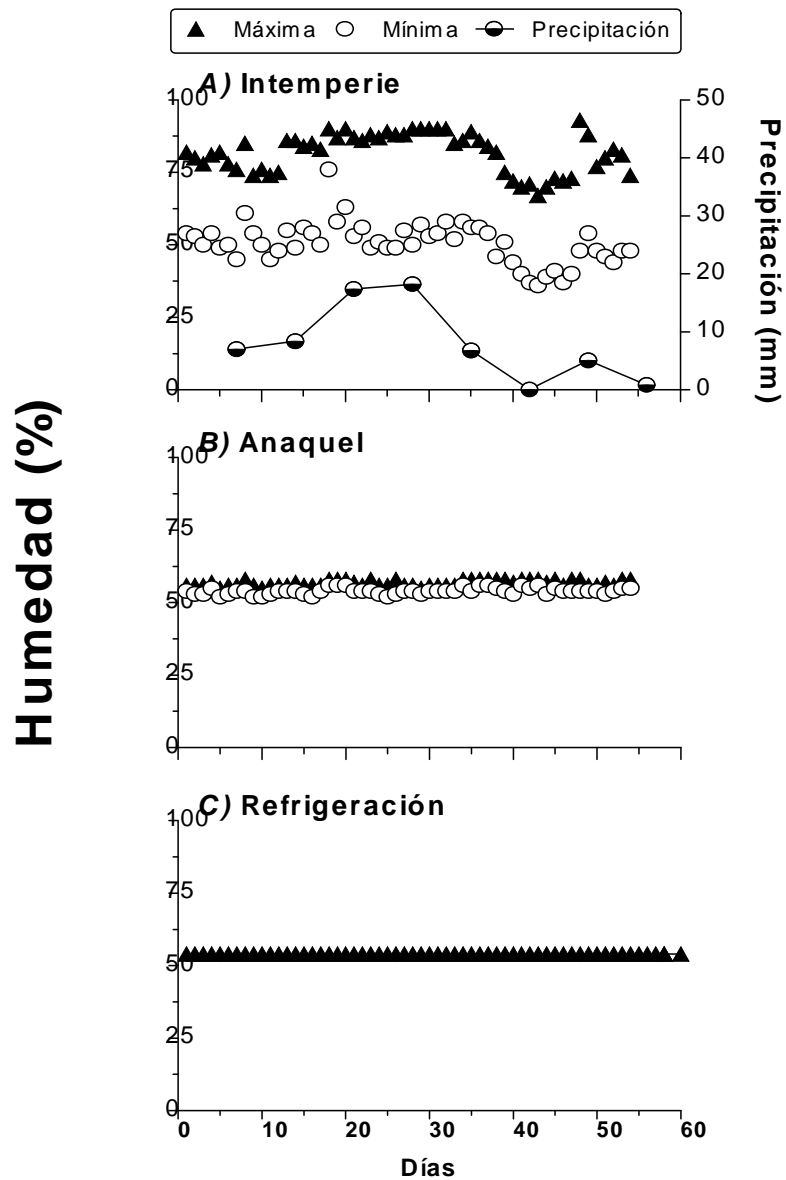


Figura 2. Humedad máxima y mínima registrada durante 54 días en las condiciones de almacenamiento de los CN. Intemperie (A), Anaquel (B) y Refrigeración (C). Adicionalmente para el panel A se agregó el promedio semanal durante ocho períodos de registro de la precipitación pluvial.

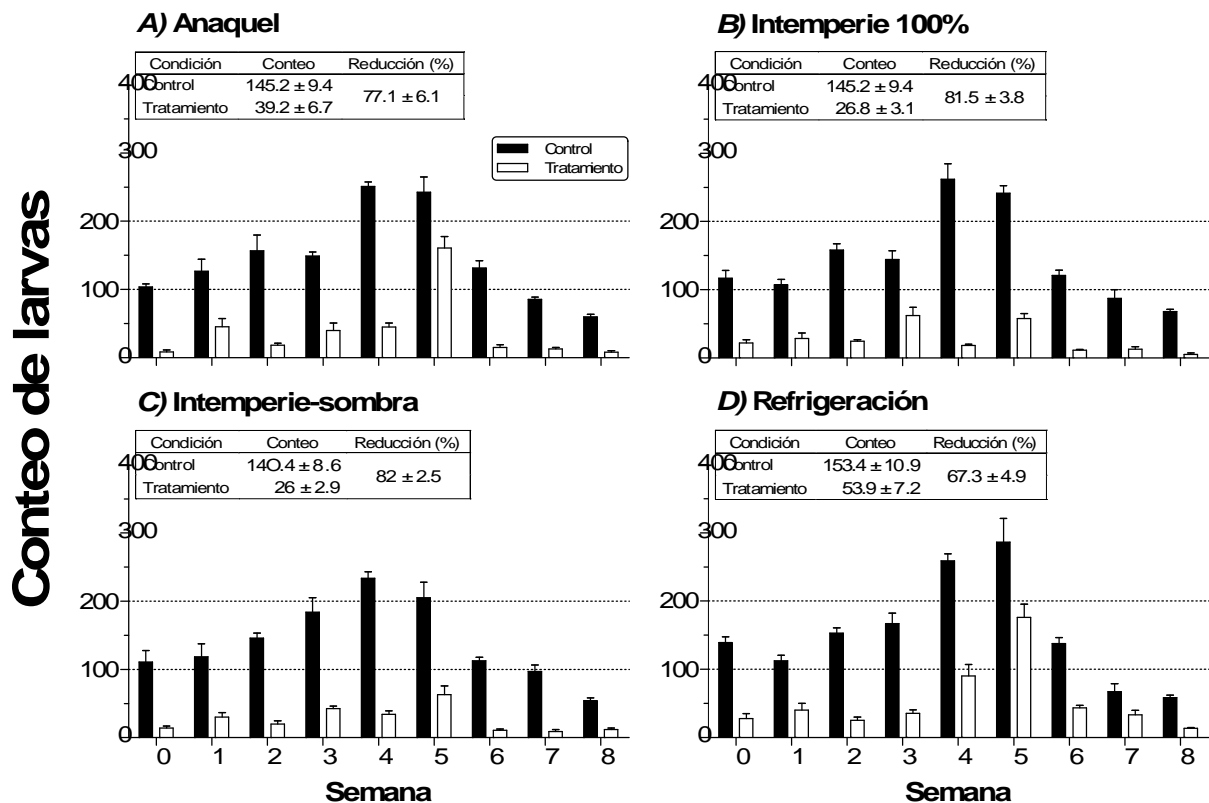


Figura 3. Conteos semanales de larvas L₃ de *H. contortus* recuperadas en cultivos *in vitro* para los tratamientos.

Grupos control y anaquel (A), intemperie 100% (B), intemperie-sombra (C) y refrigeración (D). Los insertos muestran el promedio ± EEM del conteo total de larvas recuperadas durante el experimento para el grupo control y tratamiento, y el porcentaje de reducción (larvas de tratamiento – larvas control / larvas de tratamiento x 100). Para cada semana $n = 6$ y para el total $n = 54$, en cada tratamiento. No se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de reducción entre tratamientos ($p > 0.05$).

B. Fase Experimental Dos

1. *Evaluación de los CN como vehículos para administrar clamidosporas de D. flagrans en ovinos infectados artificialmente con H. contortus.*

En la Figura 11 se resumen los resultados de clamidosporas ofrecidas a los animales y clamidosporas recuperadas en las heces. Se puede observar que los diferentes tratamientos (T1, T2, T3 y T4) ofrecieron dosis similares de clamidosporas. Esto debido a que se ajustaron las dosis ofrecidas a cada animal de acuerdo a su peso en kilogramos. Con respecto a las clamidosporas cuantificadas en heces, no se detectó una interacción significativa entre los factores tratamiento y día ($P > 0.05$). Por tal razón, se eliminó la interacción del modelo estadístico y se incluyeron únicamente los niveles de los factores principales; es decir, tratamiento y día (1, 5 y 7). Los resultados mostrados en la Figura 11 sugieren que la cantidad de clamidosporas recuperadas para los tratamientos T1 (panel A), T2 (panel B) y T3 (panel C) son similares a través de los días del experimento ($P > 0.05$). En contraste, las clamidosporas administradas en T5 presentan los valores más bajos de recuperación a lo largo del experimento en comparación a los demás tratamientos ($P < 0.05$). El análisis muestra que la cantidad de clamidosporas recuperadas al día 8 es significativa menor al resto de los días ($P < 0.05$).

Las cantidades de clamidosporas ingeridas por los diferentes animales con los tratamientos experimentales se presentan en el cuadro 4.

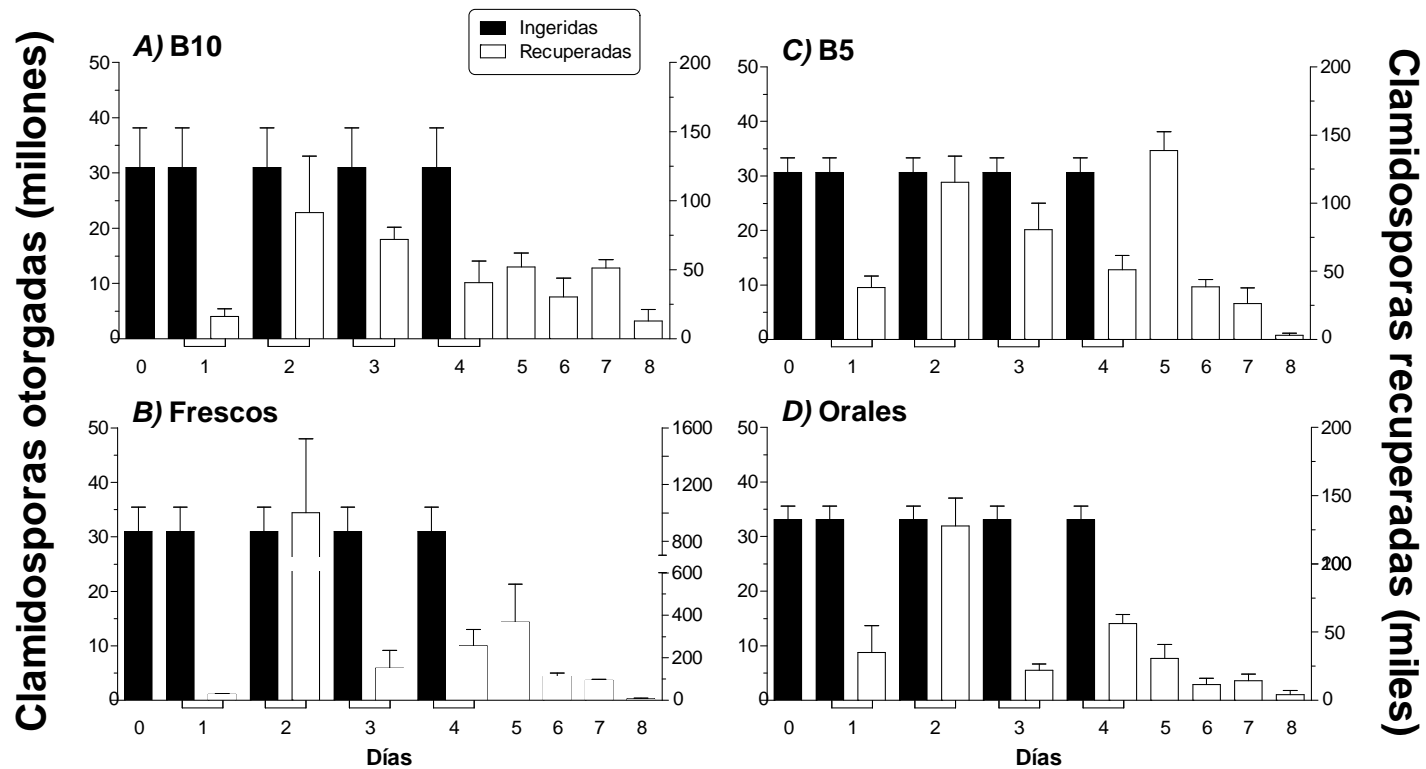


Figura 4. Promedio de clamidosporas ofrecidas en la dieta y recuperadas en las heces de ovinos en los distintos tratamientos.

Cuadro 1. Cantidades de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* suplementadas (o administradas) a cada animal por día y en correlación a su peso.

Tratamiento	No. de Animal	Clamidosporas administradas por día
	1	0
Controles (T5)	2	0
	3	0
	4	24,276,924
Bloques de 10 días (T1)	5	23,236,484
	6	45,432,529
	7	32,826,811
Bloques de 5 días (T2)	8	25,177,845
	9	33,782,931
	10	36,868,205
Bloques frescos (T3)	11	33,854,456
	12	22,141,015
	13	37,400,000
Dosis orales (T4)	14	33,000,000
	15	28,920,000

Las dosis de clamidosporas fueron otorgadas durante 5 días con los distintos tratamientos.

El cuadro 5 demuestra que las clamidosporas ofrecidas a los animales experimentales en CN llegan a las heces y mantienen su viabilidad. Para evaluar la viabilidad de las clamidosporas, éstas se sometieron a pruebas de germinación *in vitro*. Los resultados de estos ensayos demuestran que se detectaron clamidosporas capaces de germinar en las heces. Se observaron larvas L₃ de *H. contortus* capturadas en las redes tridimensionales. Estas estructuras se observaron en las placas sembradas con las heces colectadas desde el día 1 hasta el día 7 para todos los tratamientos. Es decir, hay clamidosporas viables 3 días después del último día de administración de clamidosporas. También se encontraron clamidosporas viables el día 8 para tres de los tratamientos y hasta el día 9 para una repetición del tratamiento T5. En ningún tratamiento se encontraron clamidosporas viables después del día 9.

Cuadro 2. Viabilidad de las esporas de *D. flagrans* después de su paso a través del tracto digestivo de las ovejas tratadas.

Tratamiento	Animal	Día										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1	4	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
T2	7	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
	8	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	9	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
T3	10	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	11	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
	12	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
T4	13	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	14	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	15	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-

(-) ausencia de redes o formación de micelio, (+) presencia de redes tridimensionales y/o larvas de *H. contortus* atrapadas.

2. *Análisis de la digestibilidad del alimento y de las clamidosporas*

Para realizar la evaluación *in vivo* de la digestibilidad de las clamidosporas, se determinó primeramente la digestibilidad del alimento. Los resultados muestran valores de digestibilidad de entre 86 y 89 % en la dieta utilizada durante el estudio. No existieron diferencias significativas entre los grupos de animales ($P > 0.05$). A partir de los datos obtenidos de la digestibilidad del alimento se calculó la cantidad de clamidosporas digeridas a través de su paso por el tracto digestivo. En la Figura 12 se muestra el promedio de los porcentajes de clamidosporas contadas en las heces de los diferentes grupos por día. El análisis de la figura nos indica que del total de clamidosporas ofrecidas o administradas, únicamente se recuperaron cantidades menores al 6 %, ya que se obtuvieron promedios de digestibilidad de entre 94 y 100 %. Estos resultados fueron similares entre los grupos ($P > 0.05$).

Los valores de HPG totales eliminados por día se presentan en la Figura 13. El análisis de los datos indica que se presentaron cantidades similares de HPG entre los tratamientos y el grupo control durante los días que duró el experimento ($P > 0.05$).

Cuadro 6. Cantidad de clamidosporas ofrecidas a los ovinos y ajustadas por kg de peso corporal.

Tratamiento	Cantidad de clamidosporas ofrecidas por kg de peso
T1	1,732,720
T2	1,596,462
T3	2,980,940
T4	2,000,000

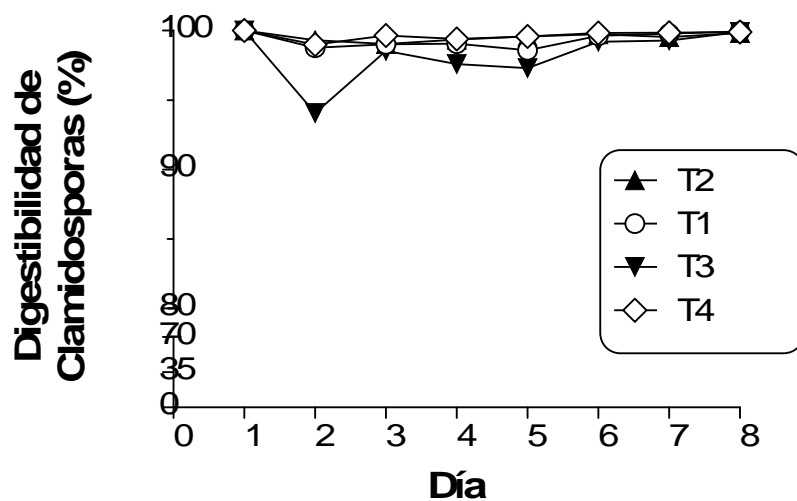


Figura 5. Porcentaje de digestibilidad aparente de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* ofrecidas en el alimento a ovinos.

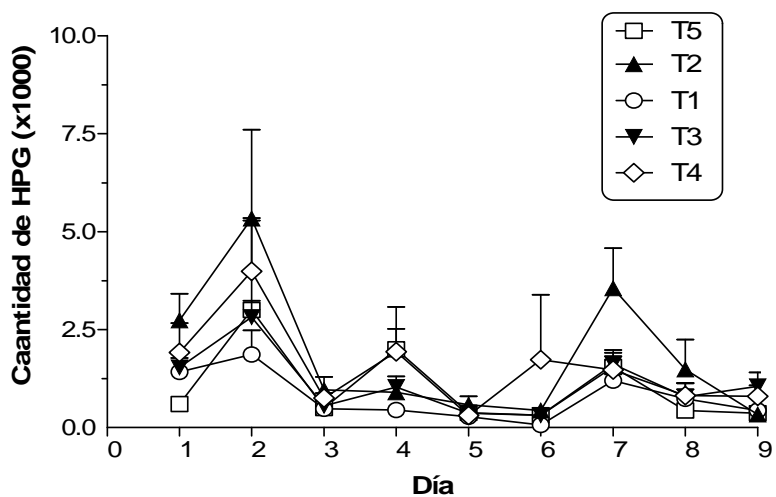


Figura 6. Conteos de huevos de *Haemonchus contortus* (HPG) eliminados en heces de los ovinos en los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P > 0.05$).

Para obtener una relación entre la cantidad de clamidosporas y los huevos, se cuantificó la proporción CPG:HPG. Se encontró una amplia variabilidad con respecto a la proporción CPG:HPG entre los tratamientos, ya que éstas se ubicaron entre 0.04 y 19 CPG:HPG (Cuadro 7). Para los días 1, 2, 6 y 8 las proporciones CPG:HPG resultaron similares entre sí ($P > 0.05$). A diferencia de los días 3, 4, 5 y 7 que sí presentaron diferencias significativas en las proporciones CPG:HPG entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$). Cuando se obtuvo el promedio del total de los días analizados para cada tratamiento, se encontró que a las hembras que se les administró las clamidosporas en CN Frescos tuvieron una tendencia a mostrar los valores numéricos más altos de la proporción CPG:HPG (3.9 ± 2.2) ($P > 0.05$). En contraste el resto de los grupos presentaron proporciones entre 0.66 ± 0.27 y 1.22 ± 0.62 CPG:HPG. Las diferencias numéricas observadas en el tratamiento consistente en comprimidos (utilizados en frescos) se asocian a una mayor cantidad de clamidosporas otorgadas en los CN, de acuerdo a los valores ajustados por peso en kg que se mostraron en el Cuadro 4.

Con la finalidad de analizar cuantitativamente la eficiencia de *D. flagrans* en la reducción de larvas L₃ de *H. contortus* en heces, se realizaron cultivos fecales de animales de los diferentes tratamientos para recuperar las larvas no capturadas y cuantificar el porcentaje de eclosión larvaria. Mediante éste último valor se estimó el porcentaje de reducción larvaria. En el Cuadro 8 se puede observar que no existió una tendencia clara en el porcentaje de eclosión ó el porcentaje de reducción. Lo anterior sugiere que no hubo ninguna tendencia a favor de la eficacia de algún tratamiento utilizado.

Cuadro 7. Proporción de clamidosporas por cada huevo de *H. contortus* obtenida mediante la técnica de McMaster (CPG:HPG) y expresada como promedio de clamidosporas y \pm E.E.

Tratamiento	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
B10	0.19 \pm 0.06	1.25 \pm 0.9	5.18 \pm 2.1 a	1.07 \pm 0.1 ab	2.46 \pm 0.9 b	0.86 \pm 0.8	0.82 \pm 0.1 a-b	0.32 \pm 0.2
B5	0.39 \pm 0.14	0.67 \pm 0.4	1.62 \pm 0.3 ab	1.05 \pm 0.5 b	4.45 \pm 1.2 b	1.44 \pm 0.4	0.19 \pm 0.07 c	0.04 \pm 0.006
Frescos	0.37 \pm 0.08	4.03 \pm 0.6	5.19 \pm 1.7 a	3.65 \pm 0.8 a	18.9 \pm 2.4 a	9.84 \pm 6.6	1.19 \pm 0.2 a	0.12 \pm 0.06
Oral	0.17 \pm 0.05	1.00 \pm 0.2	1.01 \pm 0.5 b	0.58 \pm 0.3 b	2.44 \pm 1.0 b	1.69 \pm 1.1	0.56 \pm 0.4 b-c	0.0 \pm 0.0

Diferentes literales entre columna (a,b y c) indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Para cada día y tratamiento $n = 3$ de cada animal. Nota: Tres días después de dejar de suministrar las esporas; éstas, siguieron apareciendo en las lecturas de la cámara de McMaster.

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos sobre el promedio por coprocultivo (7 g heces/coprocultivo, $n = 9$) del número total de huevos totales, clamidosporas totales y desarrollo larvario y sobre el porcentaje de eclosión y de reducción larvaria.

Día	Variable	Tratamiento				
		T5	T1	T2	T3	T4
1	Huevos	5094 ± 978 a	10111 ± 3535 a	19133 ± 4751 a	10733 ± 1694 a	20417 ± 6599 a
	Clamidosporas		1594 ± 592 b	3967 ± 586 a	2917 ± 456 a,b	3772 ± 2255 a,b
	Larvas	2240 ± 869 a	1178 ± 420 a	2204 ± 523 a	4213 ± 1385a	4987 ± 1961 a
	Eclosión larvaria (%)	34	21	17	26	25
	Reducción (%)		38.23	50	23.52	26.47
5	Huevos	2722 ± 477 a	1594 ± 405 a	4939 ± 1435 a	2567 ± 657 a	2256 ± 768 a
	Clamidosporas		856 ± 301 b,c	2988 ± 431 b	4100 ± 2717 a	461 ± 345 c
	Larvas	1578 ± 364 b,c	522 ± 157 c	3869 ± 1186 a,b	3678 ± 536 b	1329 ± 351 b,c
	Eclosión larvaria (%)	39	22	23	79	17
	Reducción (%)		43.58	41.02	0	56.41
7	Huevos	10811 ± 3058 a	8400 ± 1913 a	24889 ± 7168 a	11317 ± 1565 a	10306 ± 2445 a
	Clamidosporas		288 ± 56 a,b	56 ± 27 b	350 ± 72 a	205 ± 150 b
	Larvas	4022 ± 2066 a	8656 ± 2236 a	13344 ± 5346 a	4100 ± 1316 a	7344 ± 1548 a
	Eclosión larvaria (%)	23	27	39	18	35
	Reducción (%)		0	0	21	0

Literales diferentes (a, b y c) en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

I. DISCUSIÓN

A. *Evaluación in vitro de la sobrevivencia de clamidosporas de D. flagrans en CN bajo diferentes Condiciones de almacenamiento*

Los resultados obtenidos en esta primera fase del experimento permiten proponer que las clamidosporas contenidas en los CN pueden soportar distintas condiciones ambientales de almacenamiento. Un estudio previo de Fernández (1999) mostró en cajas Petri conteniendo harina de maíz agar, que el hongo *D. flagrans* presentaba un mayor crecimiento radial a una temperatura constante de 15 C°. En el presente estudio los CN con y sin clamidosporas fueron sometidos a diferentes condiciones ambientales estos al momento de realizar las pruebas de germinación fueron colocados a una temperatura promedio de 27 a 28 C° observando reducciones en los distintos tratamientos. También se observó que el material con el que fueron elaborados los CN podía servir como sustrato para el desarrollo del hongo cuando se expusieron a condiciones de intemperie-sombra e intemperie-100%. Es decir, a partir de las clamidosporas que contenía el bloque se pudieron generar más clamidosporas. La generación de las nuevas esporas posiblemente se debió a que parte de los ingredientes contenidos en los CN fueron adecuados para que las clamidosporas pudieran tener los medios para germinar. Es posible que el factor humedad haya participado en el desarrollo de las nuevas esporas, generando las mismas características que en cajas Petri con agar bacteriológico. Este hallazgo fue completamente inesperado. Otros autores veían esta posibilidad de que el hongo germine como algo negativo de los bloques nutricionales (Chandrawathani et al., 2003). Esos autores no percibieron esta ventaja de que el hongo germinado puede producir más clamidosporas.

En el presente estudio se utilizaron clamidosporas incorporadas a los ingredientes al momento de elaborar los bloques. Esto es diferente a lo realizado por Waller (2001a) que elaboró bloques que contenían como ingredientes principales: melaza, urea y granos de cebada y esa cebada fue previamente cultivada por 4-5 semanas con el hongo *D. flagrans*. Evidentemente, los bloques diseñados por dichos

autores no tenían una cantidad definida de clamidosporas que en nuestro estudio si ocurrió. El presente trabajo es una continuación del trabajo realizado por Casillas et al., (2008) quienes trabajaron con Pellets multinutricionales (PMN) evaluados en fresco. Dichos autores realizaron un primer intento de evaluar la capacidad de atrapamiento *in vitro* de las clamidosporas incluidas en dichos PMN. Estos PMN contenían melaza (40%), salvado de trigo (52%), urea (2.6 %) y soya (5.3%) y se les agregó 2×10^6 clamidosporas. Cada uno pesó en promedio 15 g. Sus resultados indican que las clamidosporas agregadas a los PMN generaron redes tridimensionales en placas de agar disminuyendo la población de larvas de *H. contortus* agregadas (reducciones del 42.1 al 97.8 % con un promedio de 81.2%).

Las comparaciones estadísticas entre las diferentes formas y tiempos de almacenamiento demuestran que no existieron diferencias significativas en relación a la efectividad en la reducción de larvas ($P > 0.05$). Se encontraron reducciones *in vitro* que fluctúan entre el 67-82%.

Una ventaja evidente de los CN elaborados es que además de servir de vehículo de clamidosporas pueden complementar los requerimientos nutricionales de los ovinos. Además, los CN elaborados contenían mayor cantidad de clamidosporas (4×10^6) en menos cantidad de sustrato comparado con los PMN diseñados por Casillas (2×10^6).

El almacenar los CN en distintas condiciones tuvo el principal objetivo de determinar el mejor lugar de almacenamiento de las clamidosporas donde pudieran sobrevivir por un mayor tiempo y conservar su capacidad para atrapar larvas. Este trabajo tiene un valor importante, considerando que hasta ahora no se contaba con información acerca de las condiciones adecuadas de almacenamiento de los CN. Por esa razón se eligió comparar la viabilidad de clamidosporas bajo diversas condiciones de almacenamiento. En este trabajo se consideraron diferentes condiciones incluyendo anaquel (en un cuarto) y en refrigeración, como los posibles candidatos ideales de almacenamiento e incluso se ubicaron en condiciones que serían consideradas como extremadamente adversas (intemperie-sombra e intemperie 100% sin techo). El único antecedente que se tenía era el de Bogus et al., (2005), que realizaron cultivos en

diferente medios almacenados a diferentes temperaturas, observando un mejor crecimiento radial a una temperatura de 30 °C. El resultado obtenido fue muy alentador. La forma de almacenar los CN es de poca importancia en la capacidad de las clamidosporas de atrapar larvas de *H. contortus*. Esto sugiere que los CN pueden ser almacenados en condiciones que no requieren infraestructura costosa ó electricidad. Evidentemente es necesario proteger a los CN de la lluvia, el sol y otros elementos adversos debido a que sus componentes (insumos) pueden disminuir su calidad nutricional y sus características organolépticas pueden perderse. Esto ocasionaría que los animales ya no los consumieran.

Por lo tanto, Los CN sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento cumplen la hipótesis de permanecer viables por más de 54 días con una eficacia superior al 76.9%. Las reducciones de larvas oscilaron entre 33 al 93% determinando que los cuatro métodos de almacenamiento proporcionaban que las esporas continuaran activas presentando diferencias significativas con respecto a los controles respectivos ($P < 0.05$) en todas las semanas y todas las repeticiones.

B. Evaluación de los CN como vehículos para administrar clamidosporas de D. flagrans en ovinos infectados artificialmente con H. contortus.

Por otro lado, se observó que el consumo de los CN por los animales sirvió como medio de administración de clamidosporas del hongo nematófago *D. flagrans*, con lo que se espera en futuros trabajos demostrar una importante reducción de la población larvaria en heces y como consecuencia en los potreros.

Los resultados del presente trabajo muestran evidencia de que las clamidosporas del hongo *D. flagrans* contenidas en los CN resisten diversas condiciones de almacenamiento, sin que su viabilidad se vea disminuida. Por otra parte, un estudio que incluyera un análisis bromatológico sería importante para determinar algún posible cambio en la calidad de los nutrientes en los CN.

Esta segunda parte del estudio sirvió para demostrar que los ovinos consumen los CN de diferentes edades de elaboración (frescos, 5 y 10 días de elaborados). Además, se demuestra que las clamidosporas contenidas en los CN son capaces de

pasar el TGI de los ovinos y que las clamidosporas en las heces de estos animales pueden atrapar larvas de *Haemonchus contortus*. Se demuestra también que ofrecer las clamidosporas en CN produce un resultado similar que la forma oral tradicional a rumiantes (Ojeda-Robertos et al., 2005, 2008a, 2008b, 2009). Esto incluye tanto la cantidad de clamidosporas que llegan a las heces, su digestibilidad, su capacidad de germinar y la capacidad de atrapar larvas.

El hecho de que los animales consuman los CN era de esperarse debido a que los ingredientes utilizados son fácilmente aceptados por los ovinos. Al utilizar CN del tamaño diseñado en el presente estudio, cada uno con cantidades conocidas de clamidosporas por cada CN, permitió aplicar la dosis deseada al ofrecer el número de CN con base en el número de clamidosporas deseadas de manera simultánea. Esto a su vez implicó un aumento en los nutrientes ofrecidos a los animales como un suplemento. Entonces, los animales más grandes recibieron más CN y los más pequeños menos CN. Es decir, se pudo ajustar la dosis de clamidosporas ofrecidas de acuerdo a la cantidad de CN consumidos.

Además del beneficio nutricional que reciben los animales al consumir los CN y que sirven para ajustar la dosis estimada de clamidosporas, se confirma que las estas son capaces de pasar el TGI de los ovinos. Por otra parte, se demostró también que las clamidosporas en las heces de los animales que consumieron los CN conservan su habilidad para atrapar larvas de *H. contortus* en las heces. Incluso esta característica de atrapamiento se mantiene aún en las heces de animales 3 días después de haber sido aplicada la dosis. La razón de esta eliminación por tantos días se refiere a las clamidosporas que van saliendo poco a poco del TGI post-tratamiento como se ha reportado en estudios previos (Ojeda-Robertos et al., 2005, 2008b) Este resultado demuestra que el procedimiento de elaboración de los CN no afecta negativamente a las clamidosporas contenidas en los mismos. Tampoco les afecta negativamente el hecho de almacenar los CN por 10 ó 5 días en condiciones de anaquel en una bodega en condiciones de trópico cálido característico de Yucatán, México. Todo esto es

congruente con lo reportado en el estudio de vida de anaquel la primera parte de esta tesis.

Los resultados de eliminación clamidosporas en heces se profundizaron más y se logró determinar la digestibilidad de la clamidosporas. Ojeda-Robertos et al. (2009) evaluaron de forma *in vitro* e *in vivo* la digestión de las clamidosporas. A diferencia de lo reportado por dichos autores (digestibilidad aparente del 89.7%), en el presente trabajo se observó una más alta digestibilidad aparente (arriba del 98%) que es claramente mayor a la reportada previamente. Es posible que la mayor digestibilidad, reportada en el presente estudio, puede deberse a que la dieta utilizada fue también más digestible que la usada por Ojeda-Robertos et al., (2009). La dieta usada por dichos autores era menos digestible y los nutrientes estaban menos concentrados. Por lo tanto, los ovinos utilizados por dichos autores consumían más alimento en cantidad y como consecuencia al tener en este trabajo una dieta de menor cantidad y mayor digestibilidad, las clamidosporas pudieron estar más expuestas a las enzimas digestivas del TGI de los ovinos. Artur (2009), señala que al momento de diseñar dietas la cantidad de fibra puede influir en la digestión de las partículas, causando variaciones en la fisiología digestiva. Este resultado pone de manifiesto la necesidad de conocer la digestibilidad de las dietas como un factor que pudiera afectar la cantidad de clamidosporas que llegarán a las heces y como consecuencia pueden afectar negativamente la eficacia de este sistema de control biológico.

El efecto de las clamidosporas en los diferentes tratamientos sobre las larvas de *H. contortus* bajo condiciones *in vitro*, fueron semejantes en todos los tratamientos. Es evidente que los resultados del porcentaje de eclosión de larvas en los grupos control fueron bajos en el presente trabajo. Por lo tanto, la eficacia de reducción no fue suficientemente baja para mostrar significancia estadística. Esto por lo tanto debe ser considerado en futuros estudios de campo que evalúen la utilización de los CN.

I. CONCLUSIONES

Los CN pueden ser utilizados como vehículos para dosificar clamidosporas de *D. flagrans*. Estos CN pueden ser almacenados en diferentes formas (anaquel en bolsa, refrigerados, intemperie con techo e intemperie 100%) sin afectar la capacidad de germinación de las clamidosporas y de atrapamiento de larvas infectantes hasta por 56 días (más de un 75% de reducción). Por consiguiente, los CN que contienen clamidosporas pueden ser almacenados en diversas condiciones (desde 4 °C hasta temperaturas mayores a 30 °C).

Tanto los CN frescos como los de 5 y 10 días de edad mostraron ser un vehículo apropiado para administrar clamidosporas de *D. flagrans* en ovinos. Cada comprimido contenía una cantidad definida de clamidosporas. Los animales consumieron la cantidad de CN que bastó para alcanzar la dosis deseada por animal sin dificultad. Este sistema permitió dosificar a los animales con una cantidad establecida de clamidosporas por kilogramo de peso vivo, controlando la cantidad de inóculos fungales a administrar. No se encontró ningún efecto negativo al usar los CN comparado con la estrategia de ofrecerlos directamente en la boca de cada animal.

Las clamidosporas ofrecidas a los ovinos pasaron el TGI de los ovinos, y cuando se encontraban en las heces fueron capaces de germinar, formar trampas e incluso atrapar nematodos durante el tiempo en que los hongos fueron administrados e incluso varios días después de la última dosis.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Caballero A.J., Torres-Acosta, J.F. (2006). Agujas de oxido de cobre para el control de NGI. En: 4to. Curso internacional “Epidemiología y control integral de nematodos gastrointestinales de importancia económica en pequeños rumiantes”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Mérida, Yucatán, México 18-21 de Abril. Organizado por la Universidad Autónoma de Yucatán. pp 89 – 94.
- Alam, M.M., Ahmad, I., Jairajpuri, S.A. (1990) Nematode Bio-control. Aspects and prospects.CBS. Publishers. Delhi, India. Pp.450.
- Alexandre, R., Torres-Acosta JFJ., Aguilar-Caballero, A., Hoste, H, Vargas-Magaña, J.J. (2005). Efecto de las partículas de oxido de cobre (POC) sobre la resiliencia contra nematodos gi en ovejas de pelo pastoreando en praderas irrigadas. En: 4to. Seminario internacional sobre métodos alternativos para el control de parásitos helmintos en la ganadería: “Manejo o control de parásitos: nuevos paradigmas en el control integrado”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Mérida, Yucatán, México 10-12 de Enero. Organizado por la Universidad Autónoma de Yucatán. pp 66.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H. (2008). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 153:313-319.
- Amarante, A.F.T., Bangola, J.J., Amarante, M.R., Barbosa, M.A. (1997). Host specificity of sheep and cattle nematodes in Sao Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 73 (1-2): 89-104.
- Arroyo B.F., Mendoza de Gives P., López A. M., Liéban H. E., Vázquez P. V., Miranda M. E., Ortiz de Montellano N. A. (2008) Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas Técnica Pecuaria México 46:217-223.
- Artur K C., Jacsjson V.A., Marcos PG., Anderson S.D. (2009). Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitol res*. 105: 913-919.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. (2003). Can plant secondary metabolites have a role in controlling gastrointestinal nematodes parasitism in small ruminants? VI International Symposium on the nutrition of herbivores. Merida. Yucatan Mexico. 32 p.

- Barron, G.L. (1977). The nematode-destroying fungi. Topics in mycobiology, no.1, Canadian Biological publications, Ltd., Guelph Canada, pp.140.
- Bogus M I., Czygier M., Kedra E., Samborski J. (2005) in vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates their insecticidal properties and ability to impair *beligmosomoides polygyrus* motility. 109: 115-123.
- Bryan, R.P., Kerr, J.D. (1989). Factors affecting the survival and migration of the free-living stages of gastrointestinal nematode parasites of cattle in central Queensland. *Veterinary Parasitology*. 30:315-326.
- Burke, J.M., Miller J.E. (2004). Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper, Katahdin and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United States. *Small Ruminant Research*. 54:43-51.
- Casillas-Aguilar, J.A., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E. & Liébano Hernández. (2008) Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamyospores for the control of ovine haemonchosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149:161-163.
- Chandrawathani, P., Jammah, O., Waller, P.J., Hoglund, J., Larsen, M. & Zahari, W.M. (2003). Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Research*. 33:685-696.
- Chandrawathani P., Jamnah O., Adnan M., Waller P.J., Larsen M. & Gillespie A.T. (2002) Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol*. 120: 177–187.
- Cordero del C. (1999). Parasitología Veterinaria McGraw-Hill Interamericana. España pp. 195 - 259.
- Datta, F.U., Nolan, J.V., Rowe, J.B., & Gray, G.D. (1998). Protein supplementation improves the performance of parasites sheep fed a straw-based diet. *International Journal of Parasitology*. 28 (8): 1269-1278.
- Dijksterhuis J., Veenhuis M., Harder W., & Nordbring-Hertz B. (1994). Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. *Advances in Microbial Physiology* 36: 111-143.

- Duddington C.L. (1950) Further records of British predacious fungi I. Transactions British mycological society 33: 209-215.
- Durand D.T., Boshoff L.M., Michel L.M. & Krecek R.C. (2005). Survey of nematophagous fungi in South Africa. *Journal veterinary research* 72:185-187.
- Faedo M, Larsen M, Waller PJ (1997) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol.* 72(2):149-55.
- Faedo, M., Barnes, E.H., Dobson, R.J. & Waller, P.J. (1998). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary parasitology* 72, 129-135.
- Faedo, M., Larsen, M., Dimander, S.O., Yates, G.W., Høglund, J. & Waller, P. J. (2002). Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding faeces deposited by the cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological Control.* 23:64-70.
- Faessler, H., Torgenson, P.R. Hertzberg, H. (2007) Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. *Veterinary Parasitology.* 147:96-102.
- FAO, (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal. N° 157. Roma.
- FAO, (2001). Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats FAO *Anim. Prod. And Health.* Paper. P1.
- Fernández A.S. (1998) *Duddingtonia flagrans* as biological control agent against parasitic nematodes of cattle and horses. Tesis Ph.D, Danish centre for Experimental Parasitology the Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark. Pp.62.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Wolstrup, J., Gronvold, J., Nansen, P., & Bjorn, H. (1999). Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitology Research.* 85:661-668.
- Fox, M.T. (1997) Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: Recent developments. *Veterinary Parasitology.* 72: 285-308.

- Gardner, K., Wiebe, G.M., & Trici, P.J.A. (2000). Production of chlamydospores of the nematode-trapping *Duddingtonia flagrans* in shake flask culture. *Mycology Research*. 104 (2):205-209.
- González, G.R; Mendoza, G.P; Torres, H.G, Becerril, P.C; Ortega, J.E y Hernández, M.O. (2005). Estudio *in vitro* de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo. *Técnica Pecuaria México*. 2005, 43(3) pp. 405-414.
- González-Garduño R, Torres-Hernández G. y Mendoza-de Gives P (2003). Eficacia de dos antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de ovinos, en la sierra de tabasco. Memorias del segundo seminario sobre producción intensiva de ovinos Villa Hermosa, Tabasco. México.
- Gronvold, J., Nansen, P., Henriksen, S.A., Larsen, M. , Wolstrup, J., Bresciani, J., Rawat, H. & Fribert, L. (1996). Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus. *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Helminthology*. 70:291-297.
- Gronvold, J., Wolstrup, J. Larsen, M., Henriksen, S.A. & Nansen, P. (1993b). Biological control of *Ostertagia ostertagi* by feeding selected nematode-trapping fungi to calves. *Journal of Helminthology*. 67:31-36.
- Gronvold, J., Wolstrup, J., Larsen, M., Nansen, P. & Bjorn, H. (2000). Absence of obvious short term impact of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on survival and growth of the earthworm *Aporrecta longa*. *Acta Veterinary Scandinava*. 41:147-151.
- Grønvoid, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Larsen, M., Henriksen, S.A., Bjørn, H., Kirchheiner, K., Lassen, K., Rawat, H. & Kristiansen H.L. (1999). Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. *Journal of Helminthology* 73, 129-136
- Gronvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., & Henriksen, S.A. (1993a). Nematode-trapping fungi against cattle parasitic nematodes. *Parasitology Today*, 9:137-140.
- Grønvoid, J.; Henriksen, S.A.; Nansen, P.; Wolstrup, J. & Thylin, J. (1989). Attempts to control infection with *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to cow pats. *Journal of Helminthology*, 63: 115-126.
- Grønvoid, J.; Korsholm, H., Wolstrup, J.; Nansen, P. & Henriksen, S.A. (1985). Laboratory experiments to evaluate the ability of *Art* destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to inve

- physical factors on the growth of the fungus. *Journal of Helminthology*. 52:119-125.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Editado por el Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México. 550. P.
- Holmes P.H. & Coop R.L. (1994) Workshop summary: Pathophysiology of gastrointestinal parasites. *Veterinary Parasitology*. 54:299-303.
- Hoste, H. (2001). Adaptative physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal of Parasitology*. 31:231-244.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J. & Aguilar-Caballero A.J. (2008). Nutrition-parasite interactions in goats: in immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes. *Parasite Immunology*. 30:79-88.
- Jackson, F., Gordon, Y., Jackson, E., Bartley, D. J., Sorensen, J. E., & Coop, R. L. (2005). Field studies on the application of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores for nematode control in Scotland. The 20th International Conference of the world Association for the advancement of Veterinary Parasitology. New Zealand. 84 p.
- Jackson, F., & Miller, J. (2006). Alternative approaches to control -Quo vadit?. *Veterinary Parasitology*. 139:371-384.
- Kaminsky R., Gauvry S., Schorderet Weber., Skripsky T., Bouvier J., Wenger A., Schroeder F., Desaulles Y., Hotz R., Goebel T., Hosking B.C., Prarat F., Wieland-Berghausen S. & Ducray P. (2008). Identification of the animo-acetonitrile derivative monapantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol research*. 103:931-939.
- Kaplan, R.M. (2004). Drug resistant in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. 20:477-481.
- Knox, M.R., Josh, P.F., & Anderson, L.J. (2002). Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. *Biological Control*. 24:176-182.
- Knox, M.R., & Steel, J.W. (1999). The effects of urea supplementation on production and parasitological response of sheep infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 83 (2): 123-135.
- Krecek, R.C & Waller, P.J. (2005) "Towards the implementation of the "basket of options" approach to helminth parasite control of livestock

tropics/subtropics. And novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. "worm control or worm control management new paradigms in integrated control" Merida p3.

Lapage, G. (1971) *Parasitologia Veterinaria*. Edit CECOSA. México D.F. pp.70-79.

Larsen, M. (2000) Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*. 120: 121-131.

Larsen M. (2002). Biological control in a global perspective- A review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. En: Biological control of nematode parasites of small ruminant in Asia. Final proceedings of FAO. *Animal Production and health* paper. P. 19-37.

Larsen, M. (1999). Biological control of helminthes. *International Journal of Parasitology*. 29: 139-146.

Larsen, M. (2006). Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal of Animal Science*. 84: E133-E139.

Larsen, M., Faedo, M., Waller, P.J. & Hennessy, D.R. (1998). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*. 76:121-128.

Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J. & Henriksen, S.A. (1992). *In vitro* passage of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *Journal of Helminthology*. 66:137-141.

Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., Dackman, C., Grønvold, J. & Nansen, P. (1991). *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *Journal of Helminthology* 65: 193-200.

Leathwick, D.M., Pomroy, W.E. & Heath, A.C. G. (2001). Anthelmintic resistance in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 49:227-235.

Liébano H. E. (2004) Identificación morfométrica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos de México. En: Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. Libro Técnico No. 1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP Pag. 26-77.

Liébano H. E., Vázquez P.V. y Fernández R. M. (1998). Sobrevivencia de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en un clima subcártico de México. *Veterinaria México*. 29 (3). Pág. 246-249.

- Manueli, P.R., Waller, P.J., Faedo., M. & Mahommed, F. (1999). Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. *Veterinary Parasitology*. 81:39-45.
- McDonald, P., Greenhalgh, J.F.D., Edwards, R.A. & Morgan, C.A. (2002). Evaluation of foods. Digestibility. in: *Animal Nutrition*. Sixth edition. Ashford colour Press. 246-261pp.
- McKellar, Q.A., Jackson, F. & Quintin A. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*. 20: 456-461.
- Mendoza de Gives, P., Nájera Fuentes, R., Herrera-Rodríguez, D, & Roncalli, A.R. (1987). Efficacy of ivermectin against the abomasal nematode *Mecistocirrus digitatus* in naturally infected zebu calves. *American Journal of Veterinary Research* 48: 1611-1612.
- Mendoza de Gives, P. y Herrera-Rodríguez, D. (2004). Terapia antihelmíntica contra las nematodosis gastrointestinales en rumiantes. En: Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales en los rumiantes en México. Libro Técnico No. 1. p. 115-125.
- Mendoza de Gives, P. & Vázquez-Prats, V.M. (1994). Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary Parasitology*. 55: 197-203.
- Mendoza de Gives, P., Zapata-Nieto, C., Liébano Hernández, E., López-Arellano, E., Herrera Rodríguez, D. & González-Garduño, R. (2006). Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1081:355-359.
- Nordbring-Hertz B. (1988). Ecology and Recognition in the nematode-nematophagous fungus System. *Advances in Microbial Ecology*, 10: 81-113.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.B. & Tunlid, A. (2002). Nematophagous fungi. Encyclopedia of life sciences. McMillan Publishers LTD, Nature publishing group. 1-10p.
- O'Connor L., Walkden-Brown S.W. & Kahn P. L. (2006) Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. 142:1-15.

- Ojeda-Robertos N.F., Torres-acosta J.F.J., Aguilar-Caballero A.J., Ayala-Burgos A., Cob-Galera L.A., Sandoval-Castro C.A., Barrientos-Medina R.C. & Mendoza de Gives P. (2008b) Assessing the of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology* 158: 329-335.
- Ojeda-Robertos N.F., Torres-Acosta J.F.J., Ayala-Burgos A., Cob-Galera L.A. & Mendoza de Gives P.,(2008a) A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores in sheep faeces. *Veterinary parasitology* 152 339-343.
- Ojeda-Robertos N.F., Torres-Acosta J.F.J., Ayala-Burgos A., Sandoval-Castro C.A., Valero-Coss. & Mendoza de Gives P. (2009). Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores in ruminants *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary research* 5:46: 1-7.
- Ojeda-Robertos N.F., Mendoza de Gives P., Torres-Acosta J.F.J., Rodríguez-Vivas R.L. & Aguilar-Caballero A.J. (2005) Evaluating the effectiveness of mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as biological control agent gastrointestinal nematodes in goat faeces. *Journal of helminthology*. 79:151-157.
- Paraud, C., Herve, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Paolini, V., Pors, I., & Chartier, C. (2005). Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores to goats to control gastrointestinal nematodes: dose trials. *Veterinary Research*. 36, 157-166.
- Paraud, C., Lumaret, J. P. & Chartier, C. (2006). Lack of effect of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the development of the dung beetle, *Aphodius constans*. *Small Ruminant Research*. 70:276-279.
- Parkins, J.J. & Holmes P.H. (1989) Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition. *Nutrition Research Reviews* 2:227-246.
- Peloille, M. (1981). Les hyphomycètes prédateurs de nématodes: phénomène de prédation; écologie, utilisation en lutte biologique. *Agronomie* 4: 331-337.
- Persmark, L. (1997). Ecology of nematophagous fungi in agricultural soils. Department of Ecology. Lund University, Sweden.
- Quiroz, R.H. (2002). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Edit. LIMUSA, México, D.F. pp 876.
- Rodríguez-N *et al.*, (2003). Mortalidad en ovinos como consecuencia de la infestación por *Haemonchus contortus* y *Moniezia* *exp* 25:(2)143-144.

- Santamaría, C.N., Torres-Acosta J.F. y Rodríguez V. R. I., (1995). Efecto del peso al destete sobre el parasitismo gastrointestinal de cabritos en clima tropical. *Revista Biomédica*. 6: 143-150.
- Sanyal, P.K. (2000). Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological against nematode parasites of ruminants. *Veterinary Research Communications*. 24:55-62.
- Saumell, C.A., & Padilha, T. (2000). Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata region minas Gerais State, Brazil. *Applied Soil Ecology*. 14:63-70.
- Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J. F. , Chartier, & C., Cabaret, J. (2002). Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research*. 33:365-480.
- Skipp, R.A., Yeates, G.W., Chen, L.Y., & Glare, T.R. (2002). Occurrence, morphological characteristics and ribotyping of New Zealand isolates of *Duddingtonia flagrans*, a candidate for biocontrol of animal parasitic nematodes. New Zealand. *Journal of Agricultural Research*. 45:187-196.
- Smith, W.D. (1999). Prospects of vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *Journal for Parasitology*. 29:17-24.
- Smith, W.D. (1998). Prospects for vaccination against helminth parasites. Second Int. Conf. "Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock", Baton Rouge, Louisiana, E.U.A. 22-26 Marzo. Pp 13.
- Stear, M. J., Doligalska, M., & Schmelter, K.D. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*. 134:139-151.
- Symons L.E.A. (1985) Anorexia, occurrence, pathophysiology and possible causes in parasitic infection. *Advances in Parasitology*. 24:103-133.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., & Larsen, M. (1999). Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology*. 84:169-186.
- Torres-Acosta, J.F.J., Cámara, S.R., Cervantes, L.C., y Ruiz, P.C.H. (2004). Prevalencia de rebaños ovinos con nematodos resistentes a antihelmínticos en el estado de Yucatán. En: Memorias I Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria y Forestal. Mérida. Yucatán. México. Pp 81-87.

- Torres-Acosta, J.F.J., Dzul-Canché, U., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., (2003). Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México. *Veterinary Parasitology*. 114: 401-412.
- Torres-Acosta, J.F.J. & Hoste, H. (2008). Alternative of improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminants Research*. 77:159-173.
- Tunlid A., Jansson H.-B. & Nordbring-Hertz B. (1992). Fungal attachment to nematodes. *Mycological Research* 96 (6): 401-412.
- Vanimisetti, H.B., Greiner, S.P., Zajac, A.M. & Notter, D.R. (2004). Performance of hair sheep composite breeds: Resistance of lambs to *Haemonchus contortus*. *Journal Animal Science* 82: 595-604.
- Vázquez, P.V. y López A.M.E. (1994). Hemoncrosis en Bovinos. Folleto divulgativo 2. SARH CENID-Pavet, INIFAP, México. Pág. 3-7.
- Vázquez, P.V. (2004). Características Epidemiológicas de los Nematodos Gastroentéricos de los Rumiantes. *En: Diagnostico y Control de los nematodos gastrointestinales en los rumiantes en México. Libro Técnico No.1 CENID-PAVET-INIFAP, Jiutepec Morelos México.* pp. 1-11.
- Wallace, D.S., Bairden, K., Duncan, J.L., Eckersall, P.D., Fishwick, G., Gill, M., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Murray, M., Parkins, J.J. & Stear, M.J. (1998). The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*.116 (1): 67-72.
- Waller, P.J., Faedo, M. & Ellis, K. (2001b). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Veterinary Parasitology*. 102:299-308.
- Waller, P.J (1997) Sustainable helminth control in developing countries. *Veterinary parasitology* 71: 195-207.
- Waller, P.J. (1999) International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International journal for parasitology* 29:155-164.
- Waller, P.J. (2003) Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis in biological control. *Animal Health Reviews*. 4(1), 35-43.

- Waller, P.J. (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology*. 126:277-289.
- Waller, P.J. & Faedo, M. (1993). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies. *Veterinary Parasitology*. 49:285-297.
- Waller P.J., Knox M.R. & Faedo M. (2001a). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 102: 321–330.
- Wan, Wyk. J. D. & Malan, F.S. (1998). Resistance of field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*. 123: 226-228.
- Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Samnson-Himmellstjerna, G.V. & Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a estatus report. *Trends in Parasitology*. 20:469-476.
- Yates, G.W., Dimander, S.O., Waller, P.J., Hoglund, J. (2002). Environmental impact on soil nematodes following the use of the ivermectin sustained-release bolus of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to control nematode parasites of cattle in Sweden. *Acta Agriculture Scandinavica Section A-Animal Science*. 52:233-242.

