



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación *in vitro* de la resistencia a bencimidazoles de la cepa de
Haemonchus Contortus de origen ovino aislada y mantenida en la Facultad
de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.**

TESIS

Que para obtener el título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Sergio Francisco Moreno García

Asesor:

M en C Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz



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.

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	17
Hipotesis.....	18
Materiales y Métodos.....	19
Resultados.....	31
Discusión.....	34
Conclusiones.....	36
Bibliografía.....	37

Índice de Figuras

Figura 1.....2

Figura 2.....4

Figura 3.....20

Figura 4.....21

Figura 5.....22

Figura 6.....23

Figura 7.....23

Figura 8.....24

Figura 9.....25

Figura 10.....26

Figura 11.....27

Figura 12.....28

Figura 13.....30

Índice de Cuadros

Cuadro 1.....	8
Cuadro 2.....	19
Cuadro 3.....	33

Resumen.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la resistencia o susceptibilidad a tres bencimidazoles (albendazol, oxibendazol y fenbendazol) de la cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán, por medio de una técnica *in vitro*. Se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana de la FES Cuautitlán, UNAM. La técnica *in vitro* empleada fue la de eclosión de huevos y se efectuó basándose en las propiedades ovicidas de estos antihelmínticos y en la capacidad de los huevos de las cepas resistentes para embrionar y eclosionar a concentraciones más altas que los de las cepas susceptibles. Los principios activos evaluados fueron albendazol, fenbendazol y oxibendazol. Se realizaron 20 repeticiones con cada fármaco a evaluar. Se obtuvieron heces de un cordero donador donde es mantenida la cepa. Se corroboró la presencia del parásito con la técnica Mc Master. Para determinar las dosis letales, DL₁₀, DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ de los antihelmínticos se realizó el análisis Probit, para saber que concentraciones de los fármacos son necesarias para matar al 10, 50, 90 y 99% de los huevos de *H. contortus* expuestos. La resistencia a los antiparasitarios fue expresado como el índice de resistencia (IR), que se calcula en función a la DL₅₀ de la cepa sospechosa a ser resistente y la susceptible. La cepa de *H. contortus* de la FES Cuautitlán UNAM tuvo una alta susceptibilidad al albendazol su DL₉₉ se logró con una concentración de 0.051 µg/ml. El oxibendazol y el fenbendazol también tuvieron una buena acción antiparasitaria, la máxima eficacia para el primero (99%) ocurrió entre los 37.5 y 300 µg/ml, para el fenbendazol su mejor efecto (72%) se logró con 300 µg/ml. Se indica que la cepa de *H. contortus* de la FES es resistente al oxibendazol y fenbendazol pues el índice de resistencia (IR), resultó en los siguientes valores de 856.8 para el oxibendazol y 1,873.7 para el fenbendazol.

Introducción.

La verminosis o nematodiasis gastroentérica es uno de los principales problemas sanitarios de los pequeños rumiantes en pastoreo (fig. 1) que repercuten en la salud de los animales, ya que afecta en la producción, ocasionando pérdidas económicas significativas. El mayor impacto económico se observa en países con un clima tropical y templado, especialmente en donde se presentan lluvia en el verano.

La enfermedad es causada por diversos nematodos que poseen una localización diferente en el aparato gastrointestinal de los rumiantes, así por ejemplo en el abomaso se encuentran *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Mecistocirrus*; en el intestino delgado el *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Strongyloides* y *Bunostomum*; en el ciego están *Skrjabinema* y *Trichuris* y por ultimo en el colon *Chabertia* y *Oesophagostomum* (Cuéllar, 2002). Debido a su efecto patógeno y distribución geográfica, el *Haemonchus contortus* es el nematodo gastroentérico (NGE) más importante en los ovinos de México (Cuéllar, 2008). Ese parásito también es conocido como gran gusano del estómago, gusano del cuajar y gusano en forma de poste de barbería (Soulsby, 1988).



Figura 1. Ovinos en pastoreo, donde existe alto riesgo de adquirir la verminosis gastroentérica.

La clasificación taxonómica de *H. contortus* es (Urquhart y col., 2001):

Reino: Animal

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Strongylida

Suborden: Strongylina

Superfamilia: Trichostrongyloidea

Familia: Trichostrongyloidea

Subfamilia: Haemonchinae

Género: *Haemonchus*

Especie: *contortus*

Los adultos de *H. contortus* se localizan en el abomaso de sus hospedadores, el extremo anterior es muy delgado, posee una pequeña cápsula bucal, con un fino diente o lanceta ubicada en el lado dorsal. Tiene papilas cervicales prominentes, en forma de espinas. Las hembras miden de 18 a 30 mm. La vulva está en el tercio posterior del cuerpo y está cubierta por una protuberancia, solapa o proceso lingüiforme, los ovarios son de color blanco enrollados en espiral alrededor del intestino que es de color rojo. Los machos miden de 10 a 20 mm y son de color rojizo uniforme. La bolsa copuladora del macho es grande, tiene dos grandes rayos laterales y uno dorsal pequeño y asimétrico en forma de “y” invertida. Las papilas son relativamente cortas, las cuales son prebursales y posee un gobernáculo. Las espículas miden de 0.46 a 0.56 mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo (Quiroz, 2003).

Los huevos son de forma ovoide incoloros y de cascara fina, miden de 70 a 100 μm de largo por 40 a 60 μm de ancho y presentan de 16 a 32 blastómeros, los animales parasitados los excretan en sus heces que son prácticamente indiferenciables a los de otras especies excepto los de *Nematodirus* y *Marshallagia* que miden más de 130 μm de longitud (Quiroz, 2003).

Los huevos de *H. contortus* son ovopositados en fase de blástula (fig. 2). La excreción de huevos es variable y dependen del hospedador y el tipo de NGE, por ejemplo, las hembras de *H. contortus* producen de 5,000 a 10,000 huevos al día por lo que se considera un parásito prolífico. Se calcula que la longevidad de los adultos es de 6 a 12 meses y el tiempo de la máxima eliminación es huevos es de los 4 a 6 meses (Quiroz, 2003).

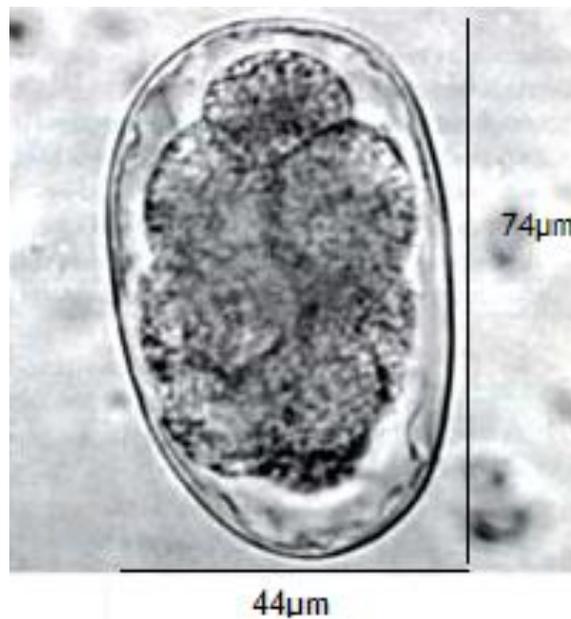


Figura 2. Huevo de *Haemonchus contortus*.

El ciclo biológico del *H. contortus* es directo, se divide en una fase parásita (endógena) dentro del hospedador y otra fase no parasita en su exterior (exógena). Este ciclo completo, tiene una duración de 28 a 35 días comprendiendo las dos fases, lo que indica que se pueden llevar a cabo de 10 a 12 ciclos anuales del parásito (Soulsby, 1988). Este ciclo se puede llevar a cabo más veces siempre y cuando las condiciones sean favorables para el parásito.

Las larvas poseen un geotropismo negativo, un hidrotropismo positivo y un fototropismo positivo a la luz tenue, estos tropismos provocan una migración vertical hacia los pastos que favorecen la infección de los rumiantes, además que

requieren de una humedad relativa que oscila entre el 70 y 100%. Dicha migración les permite subir a las gotas del rocío que se encuentran en las puntas de los pastos en las mañanas o en los días nublados (Soulsby, 1988).

Las larvas se dispersan de forma horizontal por diversos factores como la lluvia, el mismo ganado con las patas, los insectos, ácaros coprófagos, así como las esporas de los hongos del género *Pilobulus* (Meana y Rojo, 1999).

Como ya se mencionó, las hembras de *H. contortus* pueden producir de 5,000 a 10,000 huevos al día y son eliminados en la materia fecal. Si las condiciones son favorables para el parásito, en 1 ó 2 días puede desarrollarse la larva 1 (L₁) en el excremento que se alimenta de bacterias del medio; al completar su crecimiento muda de epidermis y se transforma en larva 2 (L₂) que igualmente se alimenta de bacterias, al terminar su desarrollo dicha larva muda de epidermis pero no la pierde y queda como una envoltura suelta alrededor de la larva 3 (L₃) y por lo tanto no se alimenta, manteniéndose de los gránulos de material alimenticio que se han almacenado dentro de las células que recubren su intestino (Meana y Rojo, 1999).

La infección de los animales se da por la ingestión de las L₃ con el forraje, alrededor de 30 minutos después de la ingesta, las larvas pierden la cutícula que conservaban de la muda anterior por estímulos del hospedador como el bicarbonato y el CO₂ gaseoso. Estos estímulos activan a la L₃ para que produzca un fluido de muda que actúa sobre la cutícula provocando su ruptura y la salida de la larva (Cuéllar, 1992).

Estas larvas libres en abomaso penetran la mucosa por las fosas de las glándulas gástricas, en este caso de *H. contortus* tiene afinidad por la mucosa de la región fúndica (Carballo, 1987). En las glándulas abomasales, las L₃ se alimentan de sangre, crecen y mudan a L₄, ésta también es hematófaga, muda a L₅ o preadulto fuera de la mucosa. Estas L₅ maduran y se transforman en adultos; que tras la

cópula, las hembras comienzan a producir huevos cerrando el ciclo (Soulsby, 1988).

En ocasiones las larvas L₄ detienen su desarrollo dentro del hospedador quedando en hipobiosis. Este mecanismo se considera que está mediado por factores genéticos, inmunológicos o ambientales. Este fenómeno coincide con épocas donde las condiciones ambientales son adversas, como el frío y la desecación, entre otros (Carballo, 1987).

Los efectos en los animales parasitados con *H. contortus* se deben a la anemia causada por sus hábitos hematófagos y hemorragias que ocasionan. Por cada verme se pierden unos 0.05 ml de sangre al día, tanto por la que ingiere el parásito, como por la que se pierde al sangrar la herida, de modo que una oveja con 5,000 ejemplares de *H. contortus* puede perder alrededor de 250 ml de sangre al día (Jennings, 1976).

La hemoncosis puede tener tres presentaciones (Urquhart, 2001):

1. Crónica, es la más común, ésta se desarrolla durante una estación seca prolongada, en la que la reinfección no tiene importancia, pero el pasto es muy deficiente de nutrientes. La presencia permanente de varios centenares de parásitos ocasiona pérdidas de sangre suficientes para provocar disminución de peso, debilidad, inapetencia y ligera anemia.
2. Aguda, la anemia se hace aparente a las dos semanas pos infección y se caracteriza por la progresividad y marcada caída del valor del hematocrito. Durante la siguiente semana el hematocrito se suele estabilizar en un valor bajo, pero a costas de doblar o triplicar la hematopoyesis. Sin embargo, debido a la continua pérdida de hierro y de proteínas en el interior del tracto gastrointestinal y a la anorexia, la

médula llega a agotarse y se producen nuevos descensos del hematocrito antes de la muerte.

3. Sobreaguda, es menos frecuente y se produce en infecciones masivas de más de 30,000 individuos; los animales aparentemente sanos pueden morir súbitamente por una gastritis hemorrágica grave.

Cabe mencionar que muchos animales del rebaño poseen parásitos y no manifiestan signos clínicos de la enfermedad no afectando su desempeño productivo, esto se conoce como parasitosis subclínica o resiliencia (Van-Houtert y Sykes, 1996).

El diagnóstico clínico a través de los signos que presenta el animal es dificultoso y poco preciso pues existen otras enfermedades que tienen una manifestación similar a la nematodiasis intestinal (Cuéllar, 2002).

Por lo anterior, el diagnóstico de laboratorio será una herramienta útil para la detección de NGE. Después de coleccionar muestras de materia fecal se recomienda efectuar exámenes de laboratorio como las técnicas de flotación y Mc Master (donde se conoce el número de huevos eliminados por gramo de heces) y de cultivo larvario (se identifican los tipos de NGE presentes). Es conveniente efectuar los muestreos de heces y pruebas de laboratorio en forma rutinaria cada mes o dos meses para conocer la dinámica de eliminación de huevos de NGE y elegir el mejor momento y el producto antiparasitario a utilizar (Cuéllar, 2008).

El tratamiento de los NGE debe contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de control que limiten los riesgos de la infección, en el cuadro 1 se presentan los principales grupos de antihelmínticos que existen en el mercado utilizados en el tratamiento de los NGE, así como su dosis y vía de administración. Existen diversos criterios para repetir los tratamientos contra los parásitos. Por ejemplo, puede hacerse

por algún periodo determinado, cada 2, 4 ó 6 meses. Muchas veces esto se hace independientemente si se efectuó el diagnóstico de laboratorio. Otro criterio que se sigue es en función a las estaciones del año, aplicando los medicamentos alrededor de la época de lluvias, momento en que se incrementa el riesgo de adquirir las parasitosis. También la aplicación de los medicamentos se hace de acuerdo de la etapa fisiológica de los animales, el ejemplo en este sentido es la desparasitación alrededor del parto, para contrarrestar el fenómeno de alza posparto (incremento de la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos en las ovejas antes y después del parto) (Cuéllar, 2008).

Cuadro 1. Principales grupos de antihelmínticos existentes en el mercado.

Grupo	Principio activo	Dosis (mg/kg)	Vía de administración
Bencimidazoles	Tiabendazol	44.0	Oral
	Albendazol	5.0	Oral
	Fenbendazol	5.0	Oral
	Oxfendazol	5.0	Oral
Probencimidazoles	Febantel	6.0	Oral
	Tiofanato	50.0	Oral
	Netobimína	7.5	Oral
Imidazotiazoles	Levamisol	7.5	Subcutánea
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	0.2	Subcutánea y oral
	Moxidectina	0.2	Subcutánea
	Doramectina	0.2	Subcutánea
Nitrofenoles	Nitroxinil	10	Subcutánea
Salicilanilidas	Closantel	10	Subcutánea y oral

Los bencimidazoles son compuestos heterocíclicos nitrogenados que presentan intensa actividad farmacológica y que actúan como antifungales, antihelmínticos, antineoplásicos, cardiotónicos y analgésicos, entre otros efectos. Son usados principalmente por su amplio espectro en su acción antiparasitaria, alto grado de eficacia y un elevado margen de seguridad y versatilidad en la vía de administración (Booth y Mc Donald, 1991).

El epitelio de la mucosa gástrica y el epitelio intestinal actúan como una barrera lipófila a la absorción de estas drogas desde el lumen, la solubilidad de éstas se da con base en la acidificación del estómago, siguiendo su paso hasta el sistema circulatorio. La absorción limitada por la acidez está probablemente relacionada con la pobre solubilidad de los fármacos en el agua, existiendo diferentes vías de biotransformación y excreción, lo cual depende del tipo de radicales que contenga el núcleo de cada producto en particular (Sumano y Ocampo, 1997). Generalmente en los bencimidazoles los niveles plasmáticos nunca son mayores al 1% de la dosis administrada, excluyendo a los fármacos de formulación oral (Booth y Mc Donald, 1991).

Entre los bencimidazoles está el fenbendazol, un producto sintético cuya fórmula es metil-5 (fenil)-2-bencimidazol carbamato. Es un antihelmíntico de amplio espectro, eficaz contra distintos nematodos de los animales domésticos. Se absorbe en vías gastrointestinales, una baja porción alcanza valores máximos en sangre entre 6 a 30 horas. Sólo pequeñas cantidades pasan por el hígado, donde se biotransforma por oxidación y conjugación. Se elimina por heces, orina y leche.

Este fármaco interviene con la asimilación de la glucosa evitando su integración en forma de glucógeno en el parásito, alterando la producción de energía, sin embargo se cree que tiene efectos neurotóxicos para los parásitos. El efecto ovicida se basa en la alteración de la morfología de los huevos ya que bloquea la

eclosión de la larva, en caso de *Fasciola hepatica* también son afectados los huevos producidos por el parásito, impidiendo la formación del miracidio.

La dosis que se emplea de fenbendazol en ovinos es 5 a 7 mg/kg y se emplea como antihelmíntico de amplio espectro. Se recomienda usarse con precaución en individuos con insuficiencia renal.

Por su parte, el albendazol, es un probencimidazole. Es un polvo blanco amarillento e insoluble en agua y ácido acético. Tiene efecto sobre larvas y las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares, además sobre las formas adultas de cestodos y trematodos. Actúa inhibiendo los mecanismos de asimilación de la glucosa de los parásitos.

Se le considera trematocida, cestocida, nematocida, ataca a *F. hepatica* en todas sus fases, al igual que los nematodos en sus formas adultas y larvarias. Es eficaz contra verminosis pulmonar y contra las infecciones por *Moniezia* sp, *Thysanosoma actinioides*, además de ser eficaz contra los vermes gastroentéricos más comunes de los bovinos.

No debe emplearse durante la gestación. Es un medicamento poco tóxico, pero en humanos puede producir en 12% de los casos astenia y en 22% cefalea, estos efectos son de baja intensidad y corta duración. A dosis de 300 mg/kg se ha observado anorexia, letargo, breve pérdida de peso y en algunos casos la muerte sin signos nerviosos previos como incoordinación del tren posterior, además de ser embriotóxico.

El oxibendazol es un polvo blanco insoluble en agua, inodoro. Se absorbe por el tracto intestinal y se le llega a encontrar hasta en la leche. Su excreción es por vía renal y fecal. Es usado como aditivo alimenticio con buenos resultados. En bovinos y ovinos se usa en razón de 2.5 a 5 mg/kg con lo que se controlan nematodos gastroentéricos y pulmonares así como cestodos. En los equinos se

prefieren dosis de 10 mg/kg para el tratamiento de infecciones por *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus*, *S. equinum* y *Strongyloides*. En los cerdos las dosis de 1.5 mg/kg son eficaces contra nematodos en forma variable. En el perro, el oxibendazol es eficaz contra cestodos y nematodos en dosis de 15 a 20 mg/kg. No se ha informado de efectos adversos en perros causados por el oxibendazol. En las demás especies solo se observaron diarreas y vómitos ocasionales (Sumano, 1997).

Para el empleo de los productos antihelmínticos, algunos productores toman la decisión de desparasitar cuando los animales manifiestan algún signo clínico de parasitosis (baja de peso, edema submandibular, mucosas pálidas, diarrea). En ocasiones sólo estos animales son los que reciben el medicamento, los que no muestran signos se mantienen sin tratamiento (Cuéllar, 2008).

Uno de los problemas que se han generado por el uso masivo e indiscriminado de los antihelmínticos, es la resistencia hacia los mismos, situación que ya es un problema de grandes dimensiones en aquellos países donde la producción ovina es una de las principales actividades económicas (Prichard y col., 1980; Chartier y col., 1998; Van Wyk y col., 1999).

El término resistencia a antihelmínticos (RA) se refiere a la capacidad heredable de algunos parásitos a sobrevivir a las dosis letales para la mayoría de los individuos de su misma especie (Nari, 1987).

De acuerdo con su origen la RA se puede clasificar en:

- a) Resistencia colateral: Esta se presenta cuando un grupo de parásitos es resistente a un compuesto de acción similar, al que son resistentes.
- b) Resistencia cruzada: Se presenta como resultado a la resistencia a una droga de acción diferente.

c) Resistencia múltiple: Se da en dos o tres grupos de antihelmínticos (Nari, 1987).

Hay factores que influyen para que se presente la RA, entre otros está el tratamiento con el mismo antihelmíntico, uso de antihelmínticos con el mismo modo de acción durante varios años, una mala dosificación y errores en la administración de los medicamentos (Torres, 2001).

Debido a la magnitud de este problema es necesario el empleo racional de los antihelmínticos y el uso de opciones no farmacológicas para controlar la parasitosis. Las estrategias actuales de control se enfocan a evitar o retrasar la resistencia a antihelmínticos y disminuir sustancialmente el uso de fármacos. Algunas de ellas son (Cuéllar, 2007):

- El manejo del pastoreo.
- Desparasitación selectiva por medio del Sistema FAMACHA. El término FAMACHA es un acrónimo de su autor Sudafricano, el Doctor Faffa Malan. FAffa MAlan y CHArt, tarjeta.
- La vacunación contra NGE.
- La suplementación alimenticia para favorecer la resiliencia.
- Control biológico, mediante el uso de depredadores naturales (hongos nematófagos) de las larvas exógenas de los NGE.
- Uso de partículas o agujas de cobre.
- El empleo de animales resistentes.
- La herbolaria.

En cuanto a la detección de RA, una primera evidencia de que existe el problema es el escaso o nulo efecto que el técnico o productor detecta en los animales, medido esto por una mejora en el estado de salud del animal o más objetivamente, apoyándose con exámenes de laboratorio. Para diagnosticar y

controlar la prevalencia de RA e identificar a los animales que albergan las cepas resistentes, se requieren técnicas rápidas y confiables para su diagnóstico y de esta manera, restringir la diseminación de parásitos resistentes y conocer los factores que conducen a la presencia de ese problema (Cuéllar, 2009).

Johansen (1989) revisó diversas técnicas *in vitro* e *in vivo* utilizadas para la detección de RA desde el punto de vista de su versatilidad, confiabilidad, exactitud, costo y simplicidad, sin embargo, en la actualidad existen nuevas opciones para ese propósito.

Es importante enfatizar que el diagnóstico de la RA debe estar en manos de profesionales entrenados para realizar las pruebas diagnósticas y/o interpretar los resultados enviados por el laboratorio, lo que hace necesario crear una estrecha relación entre el trabajo de campo y el laboratorio, ya que es necesario el desarrollo de estudios especializados para determinar el tipo de RA de la cepa problema (Nari, 1987).

Se puede diagnosticar la RA con técnicas que se llevan a cabo directamente en los animales (*in vivo*), ya sea infectados en forma natural o experimentalmente, y las que se desarrollan en laboratorios (*in vitro*), empleando fases evolutivas de los parásitos (Cuéllar, 2009).

A continuación se describen algunas de las técnicas *in vitro* utilizadas para el diagnóstico de RA:

Parálisis de la eclosión de huevos (*egg hatch paralysis assay*):

Esta técnica se utiliza para la diferenciación entre las cepas resistentes y susceptibles evaluando la proporción de recuperación de la parálisis utilizando diferentes concentraciones de levamisol en larvas no eclosionadas (Cutullé y col., 2003).

Al igual que la técnica de eclosión de huevos para bencimidazoles se requieren huevos de nematodos gastroentéricos cultivados bajo condiciones estrictamente controladas, para que el desarrollo larval sólo llegue hasta el primer estadio larval (L₁) (Dobson y col., 1986).

Parálisis larval (larval motility assay):

Esta técnica es utilizada para determinar el porcentaje de L₃ que quedan paralizadas cuando se incuban en diluciones seriadas de antihelmíntico. Esta fue la primera técnica desarrollada para detectar resistencia al levamisol y tartrato de morantel, actualmente se ha empleado para detectar la resistencia frente a las lactonas macrocíclicas, bencimidazoles y closantel.

La ventaja de esta técnica es que se utilizan L₃ que son fácilmente obtenidas de cultivos fecales, además de que este estadio se puede almacenar sin problema alguno por largos periodos. (Martin, 1979)

Desarrollo larvario (larval development assay):

Se utiliza para detectar resistencia en los tres grupos de antihelmínticos y una ventaja adicional es la de poder evaluar diferentes grupos de antihelmínticos en forma simultánea como por ejemplo: bencimidazoles, levamisol, la combinación de entre ellos y avermectinas/milbemicinas (Cutullé y col., 2003).

En esta técnica los huevos se desarrollan hasta L₃ en una placa con medio nutritivo y diferentes concentraciones de antihelmíntico además de manejar placas de control que sólo contiene medio nutritivo, los huevos se incuban siete días a 26 °C, tiempo en el que la mayoría de los huevos de los diferentes géneros de nematodos gastroentéricos eclosionan y llegan hasta L₃, pasado este tiempo se adicionan unas gotas de lugol y se procede a la lectura comparando el desarrollo alcanzado de las larvas en las placas control con el resto de las placas con antihelmíntico (Johnstone, 1995).

Inhibición de la ingestión larvaria (*larval feeding inhibition assay*):

Mediante esta técnica se puede detectar resistencia frente a las lactonas macrocíclicas y se basa en la actividad que poseen este grupo de antihelmínticos de inhibir la ingestión de alimentos de las L₁ de NGE, debido a que producen una parálisis de los músculos faríngeos (Álvarez y col., 2002).

Lo anterior se hace con la medición del nivel de ingestión de *Escherichia coli* marcada con un compuesto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) por las L₁ las cuales son incubadas en diferentes concentraciones de antihelmínticos, determinando la dosis que inhibe el 50% de la ingestión de *E. coli* mediante una valoración de la fluorescencia en el intestino de la L₁ (Álvarez y col., 2002).

Unión a tubulina (*tubulin binding assay*):

Esta técnica está basada en la diferente unión de los bencimidazoles a la tubulina obtenida de nematodos gastroentéricos susceptibles y resistentes (Lacey y Prichard, 1986).

Se desarrolla mediante la producción de un extracto crudo de tubulina de parásitos adultos, larvas infectivas o huevos, que es incubado con bencimidazoles marcados con tritio hasta alcanzar un equilibrio. Cuando el antihelmíntico queda libre es removido con carbón vegetal formando el complejo bencimidazol-tritiado-tubulina (BTT) para ser estimado mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido. Los extractos de tubulina de los parásitos resistentes unen menos antihelmíntico que aquellos que son susceptibles por lo que la concentración proteica-tubulina (µg/ensayo) es comparada contra la cantidad de bencimidazol-tritiado-tubulina (Lacey y Prichard, 1986; Cutullé y col., 2003).

Biología molecular:

Actualmente se han desarrollado técnicas moleculares para la detección de RA en NGE, muchas de estas técnicas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction* (PCR), la cual es muy útil porque la

reacción puede diseñarse para que sea altamente específica, fácilmente reproducible y capaz de amplificar pequeñas cantidades de ADN. Se han desarrollado numerosos métodos basados en la PCR, pero los tres más empleados en la detección de resistencias son la PCR alelo-específica, la PCR-RFLP; PCR-*Restriction fragment length polymorphism* y recientemente, la PCR a tiempo real (Elard y col., 1999).

Eclosión de huevos (*egg hatch assay*):

La técnica original fue descrita por Le Jambre (1976) y después con pequeñas adecuaciones por Coles y Simpkin (1977) y ha sido desarrollada para la detección de resistencia hacia el grupo de los bencimidazoles, se basa en las propiedades ovicidas de estos antihelmínticos y en la capacidad de los huevos de las cepas resistentes para embrionar y eclosionar a concentraciones más altas que los de las cepas susceptibles (Campos, 1991; Álvarez y col., 2002; Cutullé y col., 2003).

Hoy en día la técnica de eclosión de huevos (*egg hatch assay*) es la más utilizada en el campo para detectar la resistencia antihelmíntica en los rebaños ovinos.

Objetivo general.

- Determinar la resistencia a tres bencimidazoles (albendazol, fenbendazol y oxibendazol) de la cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán, por medio de la técnica *in vitro* de eclosión de huevos.

Objetivos particulares.

- Obtener soluciones concentradas de huevos frescos de *H. contortus*.
- Exponer los huevos de *H. contortus* a diferentes concentraciones de bencimidazoles (300 µg/ml, 150 µg/ml, 75 µg/ml, 37.5 µg/ml, 18.75 µg/ml, 9.37 µg/ml, 4.68 µg/ml).
- Evaluar el efecto de los bencimidazoles sobre el desarrollo embrionario de los huevos de *H. contortus*.

Hipótesis

- La cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán, UNAM es susceptible a los bencimidazoles: albendazol, fenbendazol y oxibendazol.

Materiales y métodos.

Localización.

El trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, ubicado en la carretera Cuautitlán-Teoloyucan km. 2.5 San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Esta zona se orienta geográficamente a 19° 40' 50" latitud oeste, se encuentra a 2,252 metros sobre nivel del mar (msnm), su clima es templado sub-húmedo con lluvias en verano de humedad media (Cwl) y una precipitación pluvial al año promedio de 605 mm³. La temperatura promedio anual es de 16°C, siendo la temperatura mínima 5°C y la máxima de 27.8°C.

Cuadro 2. Material biológico y no biológico

MATERIAL BIOLÓGICO	MATERIAL NO BIOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none">• Ovinos de raza Columbia de un año de edad y aproximadamente de 50 kg.	<ul style="list-style-type: none">• Hielera• Bolsa• Vaso de precipitado• Coladera• Tubos Falcón• Pipetas• Tubos Epenndorf• Gradilla• Centrifuga• Microscopio• Placa multipocillos

Diseño experimental.

Para evaluar la presencia de resistencia o susceptibilidad a los bencimidazoles por medio de la técnica *in vitro* de eclosión de huevos de la cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán, se siguió la estrategia recomendada por Cutullé y col. (2003) que se basa en las propiedades ovicidas de estos antihelmínticos y en la capacidad de los huevos de las cepas resistentes para embrionar y eclosionar a concentraciones más altas que los de las cepas susceptibles. Los principios activos evaluados fueron los bencimidazoles (albendazol, fenbendazol y oxibendazol). Se realizaron 20 repeticiones con cada fármaco evaluado.

Recolección de muestras.

Se obtuvieron heces de un cordero donador donde es mantenida la cepa de *H. contortus* en la FES Cuautitlán (fig. 3). Se corroboró la presencia de huevos del nematodo por medio de la técnica Mc Master.



Figura 3. Cordero inoculado experimentalmente con *Haemonchus contortus*, donador de huevos del nematodo

Se recolectaron aproximadamente 50 g de materia fecal en bolsas de polietileno directamente del recto del cordero donador y durante su traslado al laboratorio

fue colocada en una hielera a 3°C para evitar que los huevos continuaran su desarrollo (fig. 4).



Figura 4. El traslado de las muestras se hizo en una hielera con refrigerantes.

Preparación de suspensión concentrada de huevos.

El examen coproparasitológico de Mc Master previo para contabilizar la eliminación de huevos, mostró que era de 7,500 huevos por g de heces (fig. 5).

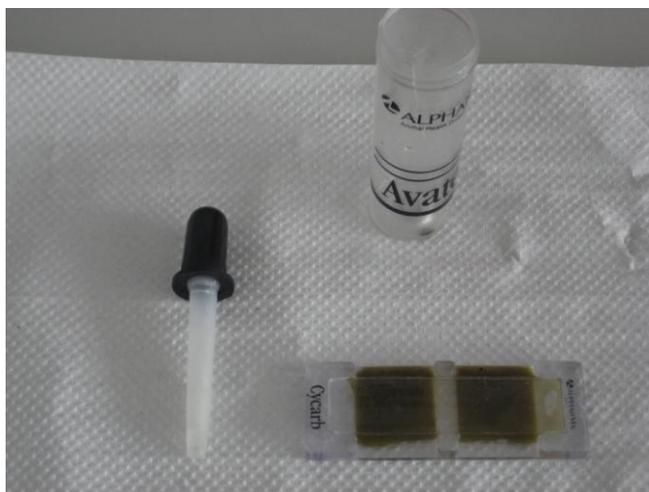


Figura 5. Equipo de Mc Master (cámara, tubo para diluir la muestra y gotero).

Esa muestra positiva se lavó con agua destilada a 4°C, con ayuda de una coladera y un vaso de precipitado, el agua resultado de este lavado se dejó en reposo por 10 minutos para que los huevos sedimentaran (fig. 6).



Figura 6. Lavado de la muestra de heces positiva a *Haemonchus contortus*.

Pasado este tiempo se decantó cuidadosamente evitando que se eliminara el sedimento, posteriormente se colocó en tubos Falcón para completar 45 mL en cada uno de ellos (fig. 7 y 8).



Figura 7. Reposo del agua proveniente del lavado para la sedimentación de los huevos de *Haemonchus contortus*.



Figura 8. Tubos Falcon donde se vertieron 45 mL del sedimento con huevos de *Haemonchus contortus*.

Los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm durante siete minutos a 4°C. Una vez más se decantó y agregó agua destilada hasta 45 ml, se introdujo a la centrifuga con las mismas constantes. Este paso se repitió entre tres y cuatro veces hasta que el líquido quedó transparente (fig. 9).



Figura 9. Los tubos Falcon se centrifugaron a 2,500 rpm durante siete minutos a 4°C.

Después de que se decantó el agua la última vez, se agregó solución saturada de cloruro de sodio a 3°C hasta completar 30 ml. Se volvió a centrifugar con las mismas constantes.

Posteriormente, con mucho cuidado se agregaron 10 ml de agua destilada a cada uno de los tubos para formar una interfase y se dejó reposar durante diez minutos (fig. 10).



Figura 10. Vista de la interfase en los tubos Falcon.

Después se tomó una muestra de la parte inferior de la interfase y se colocó en tubos con agua destilada para el lavado de los huevos y retirar la mayor cantidad de solución saturada de cloruro de sodio. Nuevamente se centrifugaron; este paso se repitió dos o tres veces hasta que los huevos quedaran en una suspensión al 0.1%. Se contó la cantidad total de huevos por cada mL de esta suspensión final (fig. 11).



Figura 11. Lavado por centrifugación de los huevos de *Haemonchus contortus*.

Preparación de diluciones.

Debido a que los fármacos utilizados no son solubles en agua se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) para preparar las diferentes concentraciones.

Se pesaron 24 mg de cada fármaco y se colocaron en 2 ml de dimetil sulfóxido, de esta mezcla, se tomaron 50 μ l de la solución preparada y se agregaron a 950 μ l de agua colocados en tubos tipo Eppendorf para completar 1 ml.

Posteriormente para las diluciones dobles seriadas, se tomaron 500 μ l de la solución previamente preparada y se colocaron en tubos tipo Eppendorf con 500 μ l de agua a 4°C y así sucesivamente hasta formar diluciones de 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.37 y 4.68 μ g/ml.

Exposición de los huevos de *Haemonchus contortus* a los antihelmínticos.

Se colocaron 100 μ l de la solución concentrada de huevos y 100 μ l de cada concentración de los antihelmínticos en una placa de 96 pozos. La mezcla se incubó 48 horas a una temperatura de 22 a 23°C (fig. 12).

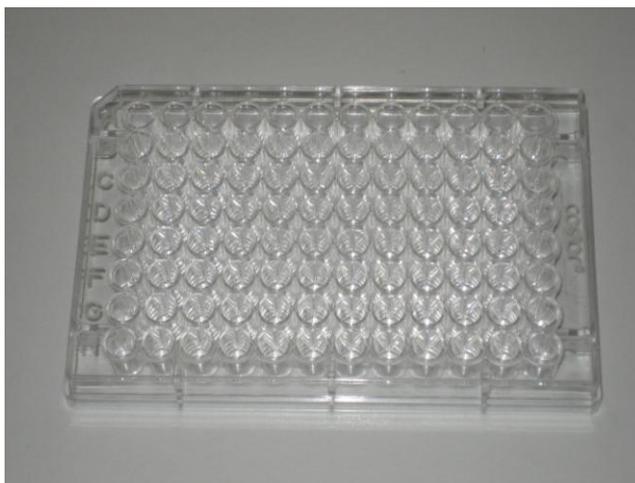


Fig. 12 Placa multipocillos donde se colocaron 100 μ l de la solución concentrada

de huevos de *Haemonchus contortus* y 100 µl de cada concentración de los antihelmínticos (albendazol, fenbendazol y oxibendazol)

Pasado este tiempo se contabilizó la cantidad de larvas y huevos sin desarrollo embrionario para determinar el porcentaje de eclosión. Cabe aclarar que se realizaron 20 repeticiones con cada fármaco evaluado.

Análisis de resultados.

Para determinar las dosis letales, DL₁₀, DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ de los antihelmínticos empleados se realizó el análisis Probit mediante el programa *Polo Plus*. Lo anterior permitió saber que concentraciones de los fármacos fueron necesarias para matar al 10, 50, 90 y 99% de los huevos de *H. contortus* expuestos.

El grado de resistencia a los antiparasitarios fue expresado como el índice de resistencia IR, que se calcula empleando la siguiente fórmula:

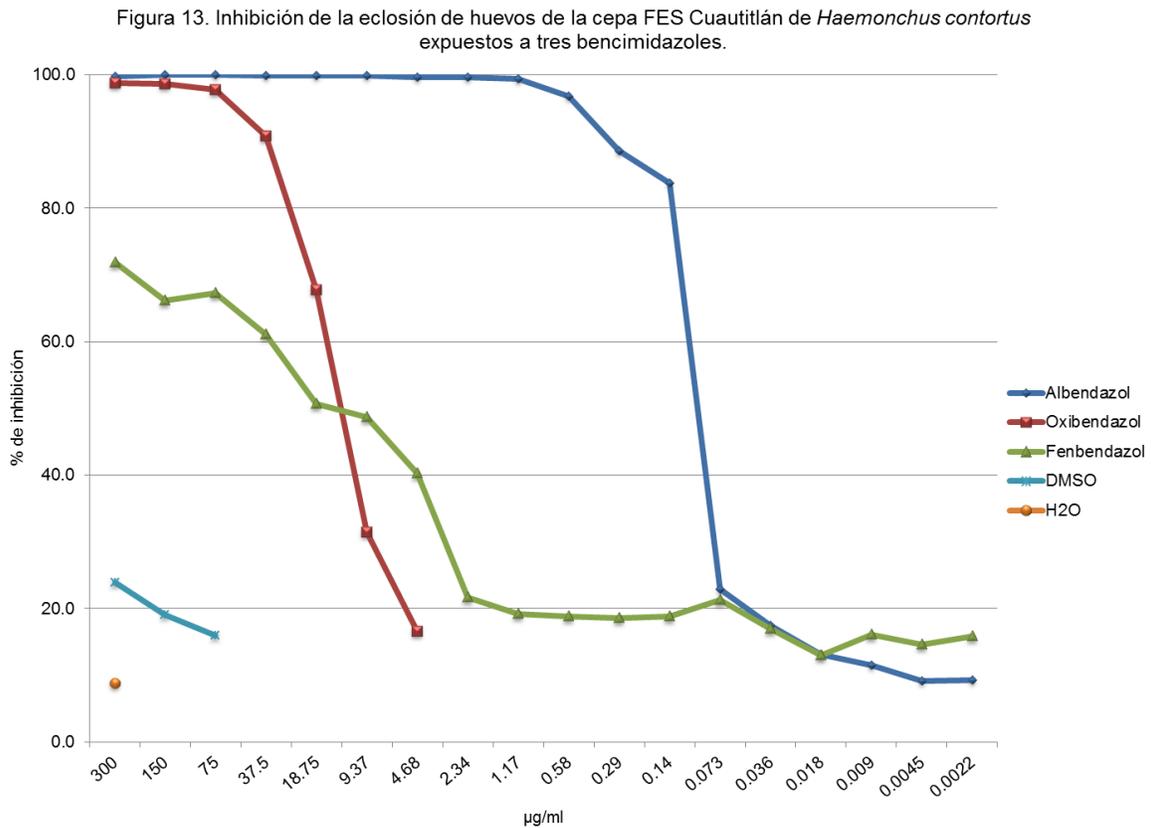
$$IR = \frac{\text{DL}_{50} \text{ de una cepa sospechosa a ser resistente}}{\text{DL}_{50} \text{ de la cepa considerada susceptible}}$$

El IR expresa el número de veces que debe ser incrementada la dosis de una cepa eventualmente resistente a los antiparasitarios para lograr el efecto de una cepa susceptible a los fármacos. (Hall y col., 1978; Whitlock y col., 1980)

Resultados.

A continuación se describen los resultados obtenidos en la determinación *in vitro* de la resistencia a tres bencimidazoles (albendazol, fenbendazol y oxibendazol) de la cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán.

La inhibición en la eclosión de huevos de *H. contortus* tras la exposición a las primeras siete concentraciones de albendazol (de 4.68 a 300 $\mu\text{g/ml}$), varió entre el 99.6 y 100%. La menor inhibición ocurrió con la concentración de 4.68 $\mu\text{g/ml}$ y la máxima con 75 $\mu\text{g/ml}$, en las otras concentraciones de albendazol el porcentaje de inhibición osciló entre 99.8 y 99.9% (fig. 13).



Para el albendazol, existió la necesidad de efectuar más evaluaciones a concentraciones más diluidas, de esta manera se observó que entre las concentraciones de 0.58 y 2.34 $\mu\text{g/ml}$ de este principio activo donde el porcentaje de inhibición de la eclosión fue mayor al 99%. Por otra parte con las concentraciones de 0.14 y 0.29 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición fue alrededor del 85% y con las más diluidas, el porcentaje de inhibición disminuyó de 22.9% (0.073 $\mu\text{g/ml}$) hasta 9.3% (0.0022 $\mu\text{g/ml}$).

En el caso del oxibendazol, las concentraciones entre los 37.5 y 300 $\mu\text{g/ml}$ produjeron una inhibición en la eclosión de huevos superior al 90%. Sin embargo con la concentración de 18.75 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición disminuyó a 67.8%, después con el oxibendazol más diluido (9.37 y 4.68 $\mu\text{g/ml}$), se presentó una caída pasando de 31.4% y terminando con un 16.6% de inhibición.

Para el fenbendazol, la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* disminuyó gradualmente a medida que el principio activo se iba diluyendo. Así se obtuvo que a concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de inhibición fue del 71.9% (± 1.79), con 37.5 $\mu\text{g/ml}$ se logró un 61.1% (± 0.91) de inhibición para finalizar con un 42.0% de inhibición para las concentraciones de 9.37 y 4.68 $\mu\text{g/ml}$ de fenbendazol.

En cuanto a las dosis letales (DL) evaluadas (cuadro 3), se observa que la concentración de los fármacos necesaria para matar al 50% de los huevos de *H. contortus* (DL 50, IC 95%) se requirieron 0.016 $\mu\text{g/ml}$ de albendazol y 13.71 $\mu\text{g/ml}$ de fenbendazol, mientras que para lograr esa letalidad con oxibendazol, las DL fueron muy altas 29.9 $\mu\text{g/ml}$.

El albendazol es el que mostró el mejor desempeño para lograr la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*, pues a una dosis de 0.051 $\mu\text{g/ml}$ tuvo efecto en la mayoría de los individuos evaluados (DL 99). Con los demás fármacos, las

dosis requeridas para inhibir la eclosión de huevos en la mitad de los individuos o más (DL 50, 90 y 99) fueron altas.

Cuadro 3. Dosis letales (DL) de tres bencimidazoles para la cepa de *Haemonchus contortus* de la FES Cuautitlán evaluadas mediante la técnica *in vitro* de inhibición de la eclosión de huevos.

	Producto	I.C. 95%	Mínimo-máximo
DL 10	Albendazol	0.008	0.007 - 0.009
	Oxibendazol	4.15	2.98 - 5.36
	Fenbendazol	0.08	0.016 - 0.27
DL 50	Albendazol	0.016	0.014 - 0.018
	Oxibendazol	13.71	11.48 - 16.00
	Fenbendazol	29.98	18.65 - 43.73
DL 90	Albendazol	0.030	0.025 - 0.039
	Oxibendazol	45.34	38.55 - 54.84
	Fenbendazol	>10000	5,027.96 - 30,401.82
DL 99	Albendazol	0.051	0.039 - 0.078
	Oxibendazol	120.19	93.83 - 165.07
	Fenbendazol	>1000000	297,712.58 - 10,215,903.0

ND= No determinada.

IC= Índice de confianza.

Cuando se calculó el índice de resistencia (IR), tomando como referencia la DL₅₀ del albendazol (0.016 µg/ml), que en esta evaluación se consideró susceptible, se obtuvo un IR de 856.8 para el oxibendazol y 1,873.7 para el fenbendazol.

Por lo que se considera que la cepa de *Haemonchus contortus* es susceptible al albendazol y resistente al oxibendazol y fenbendazol esto por los valores obtenidos en las dosis letales.

Discusión.

La cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán UNAM tuvo una muy alta susceptibilidad al albendazol evaluada por medio de la técnica *in vitro* de inhibición de la eclosión de huevos, lo que obligó a efectuar ensayos con concentraciones más diluidas. Este procedimiento fue utilizado inicialmente por Le Jambre (1976) para demostrar que a mayor concentración del fármaco a evaluar ocurría un menor porcentaje de eclosión.

La DL₉₉ se logró con una concentración de 0.051 µg/ml de albendazol, cifra inferior a la reportada por Várady y col. (2007) que con 0.138 y 0.265 µg/ml consideraron a sus cepas de *H. contortus* como susceptibles a bencimidazoles (tiabendazol). Cuando se tomó en cuenta la DL₅₀ en la cepa de *H. contortus* estudiada, se encontró que se requirieron 0.016 µg/ml de albendazol para lograr la inhibición de la eclosión del 50% de los huevos de nematodos, cifra similar (0.023 µg/ml) a la reportada por Whitlock y col. (1980) para definir una cepa de *H. contortus* como susceptible a los bencimidazoles.

Lo anterior resalta el buen efecto antihelmíntico del albendazol. Es conocida su eficacia antiparasitaria contra el *H. contortus* con cifras cercanas al 100% en la reducción en la eliminación de huevos y contra las fases adultas (Theodorides y col., 1976; Rodríguez y col., 1981; Bogan y col., 1987). Se sabe que la acción antihelmíntica de ese antiparasitario se debe a que inhibe la síntesis de los microtúbulos y altera irreversiblemente la captación de la glucosa, esto da como resultado que el parásito se inmovilice o muera con lentitud por la falta de energía (Katzung, 2007).

Una razón de la alta susceptibilidad de la cepa evaluada al albendazol, es que no ha estado en contacto con ese fármaco antiparasitario, Le Jambre (1976) obtuvo resultados similares al evaluar cepas de *Haemonchus* y *Ostertagia* que no habían sido expuestas a los bencimidazoles. Es sabido que el fenómeno de resistencia a los antihelmínticos es consecuencia de un contacto continuo a los principios activos (Torres, 2001) por un incremento en la frecuencia de desparasitación de los rebaños, que en algunas partes de México ocurre cada mes (Cuéllar, 2009).

En muchos lugares del mundo se han reportado casos de cepas de (NGE) con resistencia a ese grupo de antihelmínticos, siendo actualmente un problema frecuente y grave en el continente americano (Torres, 2001). En México en 1990 se notificó por primera vez la existencia de *H. contortus* resistente a bencimidazoles (específicamente al albendazol) en una unidad de producción ovina de raza Pelibuey, donde se empleó una prueba *in vitro* para conocer el índice de resistencia (Campos y col., 1990).

Por otro lado el oxibendazol y el fenbendazol también tuvieron una buena acción antiparasitaria contra *H. contortus*, sin embargo, la máxima acción para el primero (99%) en la inhibición de la eclosión de huevos ocurrió desde una dosis de 37.5 hasta los 300 µg/ml, no obstante para el fenbendazol su máximo efecto (72%) se logró con 300 µg/ml. Con el hecho de que la cepa de *H. contortus* estudiada fue susceptible al albendazol, el cálculo del índice de resistencia (IR), resultó de 856.8 para el oxibendazol y 1,873.7 para el fenbendazol, lo que indica que es necesario multiplicar esas cifras de IR para lograr la eficacia del albendazol. Lo anterior permite sospechar que la cepa de *H. contortus* de la FES es resistente a esos dos bencimidazoles. Ambos antiparasitarios tienen un mecanismo de acción similar a cualquier bencimidazol, pero además se ha reportado que interfieren con la asimilación de la glucosa evitando su integración en forma de glucógeno en el parásito, también alteran la producción de energía y además se cree que tienen efectos neurotóxicos para los parásitos (Sumano,

1997). Es probable que ese efecto lo tengan principalmente sobre las fases adultas de los nematodos y no sobre la eclosión de los huevos lo que pudiera ser la razón de su menor efecto y la pronta disminución de la eficacia en esos principios activos.

Conclusiones.

- La cepa de *Haemonchus contortus* aislada y mantenida en la FES Cuautitlán UNAM tuvo una muy alta susceptibilidad al albendazol evaluada por medio de la técnica *in vitro* de inhibición de la eclosión de huevos. La DL99 se logró con una concentración de 0.051 µg/ml de albendazol.
- El oxibendazol y el fenbendazol también tuvieron una buena acción antiparasitaria contra *H. contortus*. La máxima eficacia para el primero (99%) en la inhibición de la eclosión de huevos ocurrió entre los 37.5 y 300 µg/ml, para el fenbendazol su mejor efecto (72%) se logró con 300 µg/ml.
- Se ratifica que la cepa de *H. contortus* de la FES es resistente al oxibendazol y fenbendazol pues el índice de resistencia (IR), resultó de 856.8 para el oxibendazol y 1,873.7 para el fenbendazol.

Bibliografía.

1. Álvarez SM, Pérez GJ, Rojo VF. Métodos para detección de la resistencia antihelmíntica. Arg. Vet. J. 24: 125-136. 2002.
2. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA, Arundel JH, Gay CC. Medicina veterinaria. Nueva Editorial Interamericana. Séptima Edición. México, 1986.
3. Bogan J, Armour J. Anthelmintics for ruminants. Int. J. Parasitol. 17 (2): 483-491. 1987.
4. Booth NH, Mc Donald LE. Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th Ed. Iowa State Press/Ames. USA: 887-937. 1991.
5. Carballo M. Verminosis gastrointestinal. En: Enfermedades de los lanares. Edit. por: J. Bonino, M. Durán del Campo y J.J. Mari. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 1987.
6. Campos RR., Herrera RD., Quiroz RH. Resistencia de *Haemonchus contortus* a benzimidazoles en ovinos de México. Téc. Pecu. México. 1990. 28, 30-34.
7. Campos RR. Diagnóstico y control de nematodos resistentes a los antihelmínticos en: Diagnóstico y Control de Parásitos de animales y el hombre. Edit. por Quiroz, R. H. UNAM, 506-527. 1991.
8. Chartier C, Pors I, Hubert J, Rocheteau D, Benoit C, Bernard N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. Small Rum. Res, 1998. 29, 33-41.
9. Coles GC, Simkins K. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. Res. Vet. Sci. 22, 386-387. 1977.

10. Cuéllar OJA. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo y respiratorio en ovinos y caprinos. Memorias del Curso: Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos: Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia (Michoacán), 1992.
11. Cuéllar OJA. Agentes etiológicos de la nematodiasis gastrointestinal en los diversos ecosistemas ovinos en México. Memorias del Segundo Curso Internacional: Epidemiología y Control Integral de Nematodos Gastrointestinales de Importancia Económica en Pequeños Rumiantes. Mérida, Yucatán. 2002.
12. Cuéllar OJA. Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Memorias del V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Mendoza, Argentina. 2007.
13. Cuéllar OJA. Uso eficaz de los tratamientos antihelmínticos en ovinos. Memorias del Primer Foro Nacional de Ovinos de Pelo, AMTEO. Guadalajara, Jalisco. 2008.
14. Cuéllar OJA. Evaluación de la resistencia a los desparasitantes. En: Avances en el Control de la Parasitosis Gastrointestinal de ovinos en el Trópico. Editado por: R. González, G. y A.C. Berumen, A. Universidad Autónoma Chapingo, Ovinocultores Asociados del Sureste, S.C. de R.L. 2009.
15. Cutulle C, Eddi C, Caracostantogolo J, Castaño Z, Schapiro J, Métodos *in vitro* para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica, Veterinaria Argentina Vol. XVI 2003, 514-521
16. Dobson RJ, Donald AD, Waller PJ, Snowdon KL. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Vet. Parasitol.* 19: 77-84. 1986.
17. Elard L, Cabaret J, Humbert JF. PCR diagnosis of benzimidazole-susceptible and -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 80: 231-237. 1999.

18. Hall CA, Campbell NJ, Richardson NJ. Level of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* recorded from an egg hatch test procedure. *Res. Vet. Sci.* 25 (3): 360-363. 1978.
19. Jennings FW. The anaemias of parasitic infection. En: *Pathophysiology of parasitic infection*. Edit. por: E. J. L. Soulsby. Academic Press. London. 1976.
20. Johansen MV. An evaluation of techniques use for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Vet. Res. Comm.* 13 (6): 455-466. 1989.
21. Lacey E, Prichard RK. Interactions of levamisole (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 9: 1971-181. 1986.
22. Le Jambre L.F. Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes, *Veterinary Parasitology*, 1976. 385-391
23. Martin RJ. Larval paralysis as an vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Vet. Science Communications* (3): 159-164. 1979.
24. Meana MA y Rojo VFA *Trichostrongilidosis y otras nematodiasis*. En: *Parasitología veterinaria editores*. Mc Graw-Hill Interamericana, 1999.
25. Nari A. *Enfonque Epidemiológico sobre el diagnostico y control de resistencia a antihelmínticos en ovinos*. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 1987.
26. Prichard RK, Hall CA, Kellys JD, Martin ICA, Donald AD. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* May: 239-252. 1980.
27. Quiroz RH. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México: Limusa, 2003.
28. Rodríguez A, Vázquez V, Méndez JJ, Escutia JS. Efectividad de cuatro antihelmínticos contra formas adultas de nematodos gastroentéricos de ovinos Tabasco o Pelibuey. *Memorias de la XV Reunión Anual de Investigación Pecuaria*. INCA Rural y SARH. 1981.

29. Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Séptima edición. Edit. Interamericana. México, 1988.
30. Sumano, L.H., y Ocampo, CL. 1997. Farmacología Veterinaria. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México
31. Torres AJFJ, Aguilar CA. Nematodos gastrointestinales de caprinos y ovinos en el trópico: Control integral. Notas de curso Medicina y enfermedades infecciosas de pequeños rumiantes en el trópico. Yucatán, México, 2000. 114-117.
32. Torres AJF. Diagnóstico y control de resistencia a antihelmínticos en pequeños rumiantes. Memorias del Curso Ovinotecnia. Pachuca, Hidalgo. 2001.
33. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn MM, Jennings FW. Parasitología veterinaria. Edit. Acribia. México, 2001.
34. Van Houtert, MFJ, Sykes AR. Implications of nutrition for ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infection. J. Parasitol. 26: 1151-1168. 1996.
35. Van Wyk JA, Van der Merwe JS, Vorster RJ, Viljoen PG. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. Onderstepoort J. Vet. Res. 1999; 66: 273-284.
36. Varady M, Cudekova P, Corba JC. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test Vet. Parasitol. 149: 104–110. 2007.
37. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. Vet. Parasitol. 7: 215-232. 1980.