



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA CUENCA DEL PAPALOAPAN

**DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A BENCIMIDAZOL
EN NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS
EN EL ESTADO DE PUEBLA**

Tesis que presenta:

BARTOLO LÓPEZ INÉS

Como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERÍA EN AGRONOMÍA

Tuxtepec, Oaxaca.

Marzo de 2019





INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
LA CUENCA DEL PAPALOAPAN



Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

**DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A BENCIMIDAZOL EN
NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS EN EL
ESTADO DE PUEBLA**

INÉS BARTOLO LÓPEZ

No. de control: 14810019

ASESOR INTERNO:

DR. Roberto Panuncio Mora Solís

ASESOR EXTERNO:

M.C. Sara Olazarán Jenkins

PERIODO DE REALIZACIÓN:

JULIO- MARZO 2019

SAN BARTOLO, TUXTEPEC, OAX. MARZO 2019

El presente trabajo de Tesis Profesional de la C. Inés Bartolo López, denominado "Diagnóstico de resistencia a bencimidazol en nematodos gastrointestinales de ovinos en el estado de Puebla" que se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), fue revisado y aprobado por el:

DIRECTOR INTERNO DE TESIS

DR. ROBERTO PANUNCIO MORA SOLÍS



SEP SES
T N M
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE LA CUENCA DEL PAPALOAPÁN
(Llave 200170008H)
SAN BARTOLO, TUXTEPEC OAX



DIRECTOR EXTERNO DE TESIS

M.C. SARA OLAZARÁN JENKINS



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS



CAMPO EXPERIMENTAL
LAS MARGARITAS

MARZO DEL 2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

San Bartolo, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 20 de marzo de 2019

ASUNTO: Dictamen de tesis aprobada

ING. ANTELMO PRADO LEAL

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERIAS

PRESENTE

El comité de revisión de tesis del C. Bartolo López Inés, asignado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan de San Bartolo, San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, integrado por los C.C. Dr. Roberto Panuncio Mora Solís, Dra. Tania Godoy Rodríguez y el Ing. Hugo Ortega Estrada, habiéndose reunido a fin de evaluar la tesis titulada "Diagnóstico de resistencia a bencimidazol en nematodos gastrointestinales de ovinos en el estado de Puebla", que se presenta como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero en Agronomía, de acuerdo con las normas de elaboración de tesis de licenciatura y posgrado vigentes en el instituto; dictamino su AUTORIZACIÓN para ser presentado en el Examen Profesional correspondiente.

ATENTAMENTE

Dra. Tania Godoy Rodríguez
SECRETARIO

Dr. Roberto Panuncio Mora Solís
DIRECTOR

Ing. Hugo Ortega Estrada
VOCAL



Av. Tecnológico No. 21, San Bartolo Tuxtepec, Oax.
Tel. 01 (287) 8753926, 8754015, e-mail: dir_cpapaloapan@tecnm.mx
www.tecnm.mx | www.itcuencap.edu.mx

La presente tesis, del C. Inés Bartolo López, denominada "Diagnóstico de resistencia a bencimidazol en nematodos gastrointestinales de ovinos en el estado de Puebla", que se desarrolló en Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP), fue revisado y aprobado para su impresión por el Honorable jurado integrado por:

DIRECTOR

DR. ROBERTO PANUNCIO MORA SOLÍS



FIRMA

SECRETARIO

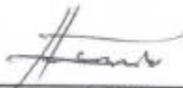
DRA. TANIA GODOY RODRÍGUEZ



FIRMA

VOCAL

ING. HUGO ORTEGA ESTRADA



FIRMA

MARZO DEL 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). CIR Golfo Centrol. Sitio Experimental “Las Margaritas”, Hueytamalco, Puebla, México.

A mi asesora de tesis M.C. Doctora Sara Olazarán Jenkins por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por el apoyo y los conocimientos adquiridos.

Al personal de laboratorio de CENID- PAVET.

A los ovinocultores que abrieron las puertas de sus corrales y nos tendieron la mano para hacer posible la realización de esta investigación.

A los docentes del Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan quienes compartieron sus conocimientos y experiencias en las aulas.

Y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, colaboraron en la participación del trabajo realizado en campo.

A mis padres, grande es el agradecimiento que siento hacia ellos por todo el apoyo incondicional que me dan, ya sea moral, económico etc. Por creer en mí, aconsejarme y por las palabras de motivación que me alientan día con día, a no rendirme y a seguir luchando para lograr mi meta propuesta.

DEDICATORIA

A UN SER SUPREMO

A Dios por todo lo que me ha brindado y por permitirme culminar una meta más.

A MIS PADRES

A mi papá por enseñarme a nunca rendirme ante los problemas y por la orientación que me has dado y así iluminar mi camino para avanzar y llegar a un futuro mejor.

A mi mamá por enseñarme que el amor es la fuerza más grande que existe, tu eres la persona que siempre me ha levantado los ánimos en los momentos difíciles de mi vida estudiantil, ustedes son los seres a quienes más valoro en esta vida.

A MIS HERMANOS

A todos mis hermanos que siempre han estado apoyándome incondicionalmente, por esos consejos y ánimos que ellos me dan.

A MIS PROFESORES

Agradecimiento hacia cada uno de ellos por la gran labor que hacen, por los conocimientos transmitidos, la exigencia, tolerancia, respeto, así como también le agradezco la oportunidad de demostrarle mis conocimientos.

A MIS AMIGOS

A todos y cada uno de los que me apoyaron con unas palabras de aliento. ¡Muchas gracias!

RESUMEN

El estudio se realizó en el estado de Puebla, con el objetivo de evaluar la resistencia antihelmíntica (RA) a bencimidazol (BZ) en nematodos gastrointestinales (NGI) en ovinos infectados naturalmente, empleando pruebas de campo, técnicas moleculares y genotipificar los géneros de NGI presentes. La prueba de reducción del recuento de huevos fecales (FECRT) se realizó en 10 rebaños en Distritos de Desarrollo Rural de Cholula, Tehuacán, Zacatlán y Teziutlán. Se formaron dos grupos de 10 a 15 animales por rebaño I Testigo y II Tratado (5 mg/kg vía oral de Albendazol) con carga parasitaria superior a 200 huevos por gramo de heces (HPG), diagnosticados mediante técnica de Mc Master. Se determinó el porcentaje de volumen celular aglomerado (%VCA), la evaluación de indicadores de fenotipo, (condición corporal (CC), color de la mucosa palpebral y signos de nematodiasis). Las heces se colectaron el día 0 y 14 (antes y después del tratamiento). Las larvas infectantes (L₃) se obtuvieron por coprocultivo para la extracción de ADN genómico (ADNg). Los polimorfismos de resistencia (RR) a BZ se determinaron mediante PCR alelo específico en el codón 200 del isotipo 1 del gen β - tubulina. La FERCT diagnosticó ocho rebaños RR, uno Susceptible (SS) y uno sospechoso (SR). Por PCR-AS se determinaron cinco rebaños RR y cinco RS. Los géneros presentes fueron *Cooperia*,

Haemonchus, Trichostrongylus, Teladorsagia y *Oesophagostomum*. La carga parasitaria (HPG) está relacionada con el %VCA y CC. La prevalencia de RA a BZ por los NGI en ovinos es elevada en Puebla.

Palabras clave: Resistencia Antihelmíntica, Bencimidazol, Nematodos Gastrointestinales, Ovinos.

ABSTRACT

The study was realized in the state of Puebla, with the objective of evaluating the anthelmintic resistance to benzimidazole (BZ) in gastrointestinal nematodes (GIN) of naturally infected sheep, using field tests and molecular techniques, as well as genotyping the genotypes of GIN present. The fecal egg count reduction test (FECRT) was realized in 10 herds at the Rural Development Districts of Cholula, Tehuacán, Zacatlán and Teziutlán. Two groups of 10 to 15 animals, I Witness and II Treated (5mg/kg orally of albendazole) with parasitic load higher than 200 eggs per gram of feces (EPG) diagnosed by Mc Master technique. Determine the percentage of agglomerated cell volume (% ACV), besides an evaluation of phenotype indicators, (body condition (BC), palpebral mucosa color (1, 2 and 3) and signs of nematode). The faeces were collected on day 0 and 14 (before and after treatment). Cocultivation was performed for the production of infective larvae (L3) for the extraction of genomic DNA (gDNA). The polymorphisms of resistance (RR) to BZ were determined by means of specific allele PCR in codon 200 of isotype 1 of the β -tubulin gene. The FERCT diagnosed eight herds RR one SS and one SR. By PCR-AS, five RR herds and five RS

were determined: the genera present were *Cooperia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* and *Oesophagostomum*. The parasitic load is related to % ACV and BC. The prevalence of RA to BZ for GIN is high in Puebla.

Key words: Resistance, Anthelmintic, Benzimidazole, Gastrointestinal Nematodes, Sheep.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	viii
ABSTRAC	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos.....	5
1.1.1 Objetivo general.....	5
1.1.2. Objetivos específicos.....	5
1.2. Hipótesis.....	6
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	7
2.1. Los nematodos gastrointestinales (NGI) de los rumiantes.....	7
2.2. Clasificación taxonómica de <i>Haemonchus contortus</i>	11
2.3. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	11
2.3.1. Fase exógena o no parásita.....	12
2.3.2. Fase endógena o parásita.....	14
2.4. Distribución geográfica de los NGI.....	15
2.5. Signos clínicos de los NGI.....	17
2.5.1. <i>Haemonchus contortus</i>	17
2.5.2. <i>Ostertagia circumcincta</i>	17
2.5.3. <i>Trichostrongylus</i>	18
2.5.4. <i>Nematodirus</i>	18
2.5.5. <i>Oesophagostomum</i> y <i>chabertia</i>	19

2.6. Los antihelmínticos.....	19
2.6.1. Principales familias de antihelmínticos.....	20
2.6.1.1 Bencimidazoles (Bz).....	20
2.6.2. Imidazotiazoles (Imz).....	22
2.6.3. Lactonas macrocíclicas.....	23
2.7. Resistencia antihelmíntica (RA).....	25
2.7.1. Tipos de resistencias.....	27
2.7.1.1. Resistencia paralela o lateral.....	28
2.7.1.2. Resistencia cruzada.....	28
2.7.1.3. Resistencia múltiple.....	28
2.7.2. Reporte de la RA.....	29
2.7.3. Diagnóstico de RA.....	31
2.8. Alternativa de control.....	33
2.8.1. Manejo de praderas.....	34
2.8.2. Hongos nematófagos.....	36
2.8.3. Bacteria entomopatógena.....	38
2.8.4. Suplementación alimenticia.....	39
2.8.5. Extracto de plantas.....	40
2.8.6. Agujas de cobre.....	42
2.8.7. Desparasitación selectiva.....	43
2.8.7.1. Determinación del número de huevos por gramas de he- ces (HPG).....	45
2.8.7.2. Determinación del porcentaje del Volumen Celular Aglo- merado (VCA).....	46
2.8.7.3. Técnica FAMACHA.....	46
2.8.7.4. Calificación de la Condición Corporal (CC).....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.1. Localización.....	54

3.2. Características de las unidades de producción.....	56
3.3. Animales.....	57
3.4. Prueba de reducción del recuento de huevos fecales (RCHH) prueba in vivo.....	60
3.5. Diseño experimental.....	61
3.6. Análisis estadístico para medir la eficacia del tratamiento antihelmíntico (prueba de campo)	62
3.7. Determinación de resistencia antihelmíntica por PCR alelo específico.....	64
3.7.1. Coprocultivo.....	64
3.7.2. Extracción de ADN genómico (ADNg).....	65
3.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	65
4. RESULTADOS	67
4.1. Resultados de la encuesta.....	67
4.1.1. Tamaño de los rebaños.....	67
4.1.2. Composición racial.....	68
4.1.3. Sistema de producción.....	69
4.1.4. Productos utilizados como complemento al pastoreo.....	71
4.1.5. Tratamiento para el control de NGI.....	72
4.1.6. otras enfermedades o signos que se presentan en los rebaños	74
4.1.7. Instalaciones y manejo del rebaño.....	78
4.1.8. Procedencia de animales que adquieren para pide de cría.	80
4.2. Resultados de la prueba de campo para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica.....	82
4.3. Resultados del estudio por medio de reacción en cadena de polimerasa alelo específico (PCR-AS) para el diagnóstico de resistencia a bencimidazoles.....	86
4.4. Genotipación de los géneros de NGI presentes en las pobla-	

ciones que parasitan los ovinos del presente estudio.....	87
4.5. Resistencia antihelmíntica a bencimidazol y su relación con los indicadores de fenotipo para la desparasitación selectiva contra NGI.....	91
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	94
5.1. Conclusiones.....	94
5.2. Recomendaciones.....	95
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	97
7. ANEXOS.....	104

ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1. Principales géneros de NGI que afectan a los ovinos.....	9
Cuadro 2. Clasificación taxonomía del género <i>Haemonchus</i>	11
Cuadro 3. Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes.....	20
Cuadro 4. Dosis recomendadas para los diferentes antiparasitarios más utilizados en ovinos.....	25
Cuadro 5. Resultados de estudios sobre RA de NGI a los diferentes productos antihelmínticos en México.....	30
Cuadro 6. Indicadores de fenotipo para la desparasitación selectiva contra nematodos gastrointestinales de ovino.....	44
Cuadro 7. Categorías clínicas de la coloración observada en la conjuntiva.....	49
Cuadro 8. Diseño experimental.....	61
Cuadro 9. Razas predominantes en los rebaños del estudio.....	69
Cuadro 10. Productos que se ofrece a los ovinos como complemento alimenticio.....	72
Cuadro 11. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en el DDR II Zacatlán- Puebla.....	82
Cuadro 12. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en el DDR VII Tehuacán- Puebla.....	83
Cuadro 13. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en el DDR V Cholula-Puebla y DDR III Teziutlán-Puebla.....	84

Cuadro 14. Clasificación de la Resistencia Antihelmíntica de acuerdo a los criterios de la Prueba de Reducción de huevos en heces (FECRT).....	85
Cuadro 15. Resultado de RA Bencimidazoles por PCR-AS.....	87
Cuadro 16. Géneros de nematodos identificados por genotipo presentes en las poblaciones de NGI por rebaño en estudio en El pre-tratamiento (día 0).....	88
Cuadro 17. Géneros de NGI identificados por genotipo en el muestreo pos-tratamiento (día 14) por rebaño y grupo experimental.....	90
Cudro 18. Relación de los valores de HPG y % VCA de los ovinos participantes en el estudio.....	92
Cudro 19. Relación de los valores de HPG y evaluación de la coloración de la mucosa palpebral de los ovinos participantes en el estudio.....	93
Cudro 20. Relación de los valores de VCA y la condición corporal de los ovinos participantes en el estudio.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Larva infectante (L ₃) de <i>Haemonchus contortus</i>	13
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	15
Figura 3. Escala de la condición corporal.....	53
Figura 4. División del estado de Puebla por Distrito de Desarrollo Rural.....	56
Figura 5. Poblaciones ovinas por unidad de producción por DDR.....	68
Figura 6. Tiempo que cada rebaño dedica al pastoreo.....	70
Figura 7. Rebaño en sistema semiextensivo.....	71
Figura 8. Productos utilizados para el control de nematodiasis en los rebaños donde se realizó el estudio.....	73
Figura 9. Frecuencia de aplicación de tratamientos antihelmínticos....	74
Figura 10. Otras enfermedades que se presentan en los rebaños.....	75
Figura 11. Épocas de presentación de enfermedades en los rebaños...	77
Figura 12. Primales y futuros sementales producción por Inseminación artificial.....	79
Figura 13. Procedencia de los animales.....	81
Figura 14. Adquisición de sementales en el Edo. de Hidalgo.....	81
Figura 15. Porcentaje de reducción de HPG de NGI al tratamiento con albendazol en los rebaños donde se realizó el estudio.....	85
Figura 16. Situación del estado de resistencia a bencimidazol de las poblaciones de NGI presentes en los rebaños participantes en el estudio.....	86

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Puebla cuenta con un inventario de 480,708 cabezas de ovinos, posicionándolo en el quinto lugar a nivel nacional; en cuanto a producción de carne, en el año 2012 produjo 7, 648 toneladas, ocupando el cuarto lugar a nivel nacional (SIAP-SAGARPA 2012). Por lo tanto, se considera un estado importante en la producción de ovinos de carne.

El ganado ovino que se explota en pastoreo y mantiene una relación directa con el medioambiente, lo que provoca que aparezcan enfermedades parasitarias causadas por nematodos gastrointestinales (NGI). Estas enfermedades constituyen la principal causa de pérdidas económicas en todo el mundo (Miller *et al.*, 2012).

Las enfermedades parasitarias afectan la productividad de los ovinos en pastoreo y son consideradas como uno de los principales problemas que enfrenta esta especie en todo el mundo (González *et al.*, 2011), principalmente en regiones pecuarias del trópico y subtropical (Esteban *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2014; Mora, 2016). Debido a las altas prevalencias, ocasionando las pérdidas económicas en los costos de producción en leche, lana, pelo, debido a los severos daños de salud que causan en la capacidad reproductiva (Martínez *et al.*, 2014).

Los principales géneros de NGI identificados en ovinos son *Cooperia*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus* y *Bunostomun* en intestino delgado; *Oesophagostomun*, *Chabertia* y *Trichuris*, en intestino grueso y *Haemonchus*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*) en abomaso.

En México, la especie *Haemonchus contortus* es el nematodo de mayor prevalencia en pequeños rumiantes bajo condiciones del trópico (Reyes *et al.*, 2016), es considerado como el nematodo parásito de mayor importancia pecuaria, causante del 80% de los casos clínicos en pequeños rumiantes. La acción mecánica de estos parásitos, provocan

ruptura e inflamación de la mucosa gastrointestinal disminuyendo la absorción de nutrientes, hemorragias y anemia aguda en animales susceptibles (Medina *et al.*, 2014).

El control de nematodosis es por medio de aplicación de productos químicos que ofrece el mercado. Los antihelmínticos disponibles en la actualidad se agrupan de acuerdo con su naturaleza química y sus efectos sobre los parásitos. Existen los bencimidazoles, los imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas son los más utilizados para el tratamiento de la nematodiasis, ya que son considerados antiparasitarios de amplio espectro. La resistencia antihelmíntica es la capacidad que tiene algunos parásitos para sobrevivir a los antiparasitarios y es el resultado de la selección activa y hecho por su propio antihelmíntico (López *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2014).

El uso incorrecto y continuo de las drogas antihelmínticas ha generado a nivel mundial graves problemas de resistencia de los parásitos a las mismas. Se entiende por Resistencia Antihelmíntica (RA), a la habilidad de una población de nematodos para resistir dosis de antihelmínticos

significativamente mayores a las necesarias para matar una población normal (Bonino *et al.*, 2003).

En el estado de Puebla, se identificó la primera cepa resistente de *Haemonchus contortus* a Bencimidazoles (Campos *et al.*, 1992) en un rebaño de ovinos. Actualmente los ovinocultores y técnicos extensionista, detectan deficiencia en la respuesta a los tratamientos antihelmínticos en los rebaños, con los consecuentes decrementos en la productividad, por ello, consideramos muy necesario conocer el estado que guarda la resistencia antihelmíntica, por lo que se propuso evaluarla con prueba de campo y técnicas moleculares que actualmente nos permiten conocer con mayor certeza el estado de las poblaciones de NGI y de acuerdo a los resultados obtenidos, desarrollar metodologías y estrategias para el control de la resistencia antihelmíntica y proponerlas a los productores para coadyuvar al control de las nematodosis en sus unidades de producción.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales de ovinos a derivados del bencimidazol, en el estado de Puebla, a través de pruebas de campo y técnicas moleculares.

1.1.2. Objetivos Específicos:

- Cuantificar la Resistencia antihelmíntica (RA) a bencimidazoles, de los nematodos gastrointestinales (NGI) de ovinos, en el estado de Puebla.
- Determinar el polimorfismo de resistencia a bencimidazol.
- Genotipar los NGI resistentes a derivados del bencimidazol.
- Determinar la relación entre la resistencia antihelmíntica a bencimidazol y los indicadores de fenotipo en la parasitosis por NGI en ovinos.

1.2. Hipótesis

El problema de la resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales a Bencimidazol, está ampliamente distribuida en los rebaños ovinos en el Estado de Puebla debido a que ha sido el producto de mayor uso en pequeños rumiantes para tratamientos antihelmínticos.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Los nematodos gastrointestinales (NGI) de los rumiantes

Los parásitos son organismos unicelulares o multicelulares que infestan a los seres vivos principalmente por dos vías, el contacto directo y la ingestión de alimento contaminado o infestado de formas larvarias o huevos. Los rumiantes son los animales más susceptibles a parasitosis por nematodos gastrointestinales y también al desarrollo rápido de los fenómenos de RA.

La clase **Nematoda**, palabra que proviene del griego “**nemas**” o “**nematos**”, es decir, **filiforme**. Son endoparásitos de forma cilíndrica, cubiertos por una cutícula quitinosa, que están presentes en la mayoría de los rumiantes de diferentes regiones del mundo; su mayor o menor presencia se ve determinada por factores propios de los parásitos y por factores medio ambientales como el clima, el manejo animal y la edad de los huéspedes expuestos a praderas contaminadas (Márquez, 2003

La parasitosis provocada por NGI representa uno de los problemas más importante para el desarrollo de la ovinocultura a nivel mundial (Dublín *et al.*, 2012), afectan desde un 80% a 100% de las explotaciones (Herrera y Velasco, 2012), debido a que provoca trastornos que interfieren en la nutrición y limitando el desarrollo de los animales, principalmente en los corderos , provocando pérdida de peso, anorexia, anemia, retraso en la madurez sexual, disminución en la producción de carne y leche, y favorece la susceptibilidad a enfermedades secundarias, provocando pérdidas considerable en los sistemas de producción (Zúñiga, 2015).

De acuerdo a las investigaciones que se han realizado, se ha determinado, que *Haemonchus contortus* llega a consumir de 0.05 ml a 0.07 ml de sangre al día (Herrera y Velazco, 2012; Dublín *et al.*, 2012), y que en los corderos altamente parasitados existe hasta un 50% de mortalidad; pérdidas de peso vivo de hasta un 20% y en el caso, si las razas son productoras de lanas la reducción es hasta un 30% (Dublín *et al.*, 2012). Aunque la variabilidad puede deberse a distintos niveles de infección, estadio de desarrollo del parásito, antecedentes genéticos, alimentación, estado inmunológico y más factores (Houdijk *et al.*, 2012).

Entre los géneros de nemátodos más importantes que afectan a los rumiantes se encuentran: *Haemonchus spp.*, *Mecistocirrus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia spp.*, *Bunostomum spp.*, *Nematodirus spp.*, *Oesophagostomum spp.* y *Dictyocaulus spp.* (Márquez, 2003). A continuación, se menciona las características de algunos nematodos gastrointestinales de los ovinos (Steffan *et al.*, 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales géneros de NGI que afectan a los ovinos.

Nombre	Ubicación	Tamaño (mm)	Lesiones/ Efecto
<i>Haemonchus contortus</i> “Lombriz roja grande”	Abomaso	Hembra 18 - 30 Macho 10 - 20	Hematófago. Puntillado hemorrágico.
<i>Teladorsagia circumcincta</i> “Lombriz marrón”	Abomaso	Hembra 9.8 - 12.2 Macho 7.5 - 3.5	Formaciones nodulares. Umbilicales.
<i>Trichostrongylus axei</i> “Lombriz pequeña”	Abomaso	Hembra 3.5 - 8 Macho 2.5 - 3.5	Áreas de mucosa deprimidas.
<i>Trichistrongylus colubriformis/ vitrinus</i> “Diarrea negra”	Intestino delgado	Hembra 5 - 7.2 Macho 4.5 - 5	Alteran proceso digestivo. En invierno con diarrea negra.
<i>Cooperia spp.</i> “Lombriz de cuello estriado”	Intestino delgado	Hembra 6 - 6.5 Macho 4.5 - 6	Poco frecuente pero importante en pastoreo combinado con bovinos.
<i>Nematodirus battus/ filicollis</i> “Lombriz de cuello delgado”	Intestino delgado	Hembra 15 - 24 Macho 10 - 17	Contribuyen a la diarrea negra.
<i>Oesophagostomum venulosum</i> “Lombriz toneliforme”	Intestino grueso	Hembra 16 - 24 Macho 10 - 18	Estadios inmaduros producen nódulos en intestino delgado.
<i>Chabertia ovina</i> “Lombriz de la boca grande”	Intestino grueso	Hembra 17 - 20 Macho 13 - 14	Lesiones en mucosa y eventual diarrea con sangre.

La infección por estos nematodos gastrointestinales siempre es mixta, es decir, participan simultáneamente varios de los parásitos mencionados, además de nemátodos de los géneros *Trichuris*, *Capillaria*, *Toxocara* y céstodos del género *Moniezia*. La infección puede ser subclínica, ocasionando pérdidas importantes en los sistemas de producción, como baja ganancia de peso, o clínica, con una alta morbilidad y mortalidad en animales jóvenes (Molina *et al.*, 2016).

Dentro de los principales nematodos, está la hemonconsis ocasionada por la presencia y acción del nematodo hematófago del abomaso *Haemonchus contortus* que afecta considerablemente a los rumiantes. Debido a que estos parásitos adultos irritan la mucosa del abomaso provocando inflamación (gastritis). También extraen cantidades considerables de sangre y si el huésped no es capaz de reemplazarla con suficiente rapidez, se desarrolla anemia porque el volumen celular desciende rápidamente, esto se debe al periodo que transcurre entre la pérdida. La cantidad de sangre extraída depende del número de gusanos presentes en el abomaso y de la capacidad del huésped para reponer la sangre perdida (Molina *et al.*, 2016).

2.2. Clasificación taxonómica de *Haemonchus contortus*

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género *Haemonchus ssp.*

Phylum:	<i>Nematelmintos</i>
Clase:	<i>Nematoda</i>
Orden:	<i>Strongylida</i>
Superfamilia:	<i>Trichostrongylidae</i>
Familia:	<i>Trichostrongylidae</i>
Género:	<i>Haemonchus</i>

2.3. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico de *Haemonchus contortus* es directo, se divide en una fase exógena o no parásita fuera del huésped y otra fase endógena o parásita que se desarrolla dentro del huésped (González, 2007). Los animales parasitados excretan junto con las heces huevos prácticamente indiferenciables, de forma ovoide, incoloros. Su tamaño oscila entre 70-100 μm de longitud por 40-60 μm de anchura, son excretados en forma de blástula con un número variable de blastómeros (Martínez, 2014).

La excreción de huevos es variable y depende del hospedador (edad, estado inmunitario, consistencia fecal) y del parásito (prolificidad de las hembras) *Haemonchus* es muy prolífico ya que en un solo día puede excretar de 5,000 a 10,000 huevos (González, 2007; Martínez, 2014).

2.3.1. Fase exógena o no parásita

Esta fase consiste en que los huevos que la hembra ovoposita diariamente, viaja al tracto digestivo y son eliminados a través de las heces fecales al suelo o a la pastura donde se exponen al medio ambiente externo (González, 2007). En condiciones ambientales propicias (humedad relativa >80%, temperatura de 20- 35°C y presencia de oxígeno) se exponen los huevos y se transforman a larvas que pasan por diferentes estadios (Zúñiga, 2015). El embrión del parásito dentro del huevo se desarrolla de 1-2 días, de donde se eclosionan una larva del primer estadio (L₁) (Liébano *et al.*, 2011), transcurrido un tiempo y después de un breve período de inmovilidad (unas horas) las larvas sufren su primer muda y cambia su envoltura y evolucionan a larva de segundo estadio (L₂); estos dos estadios larvarios se alimentan de bacterias y detritos vegetales (granos de

polen, esporas de hongos) que se encuentran a su alrededor hasta madurar y evolucionar a larvas del tercer estadio (L₃), la cual no desecha su vaina sino que permanece con una envoltura (Figura. 1), que tiene como función dar protección contra los factores externos como el frío, el calor y sequedad, esta tercera larva es la infestante (L₃) que tiene tropismos positivos a la luz solar y humedad, es capaz de subir a las puntas de la vegetación, para que los ovinos puedan ingerir las larvas L₃ al momento de consumirla (González, 2007; Zúñiga, 2015).

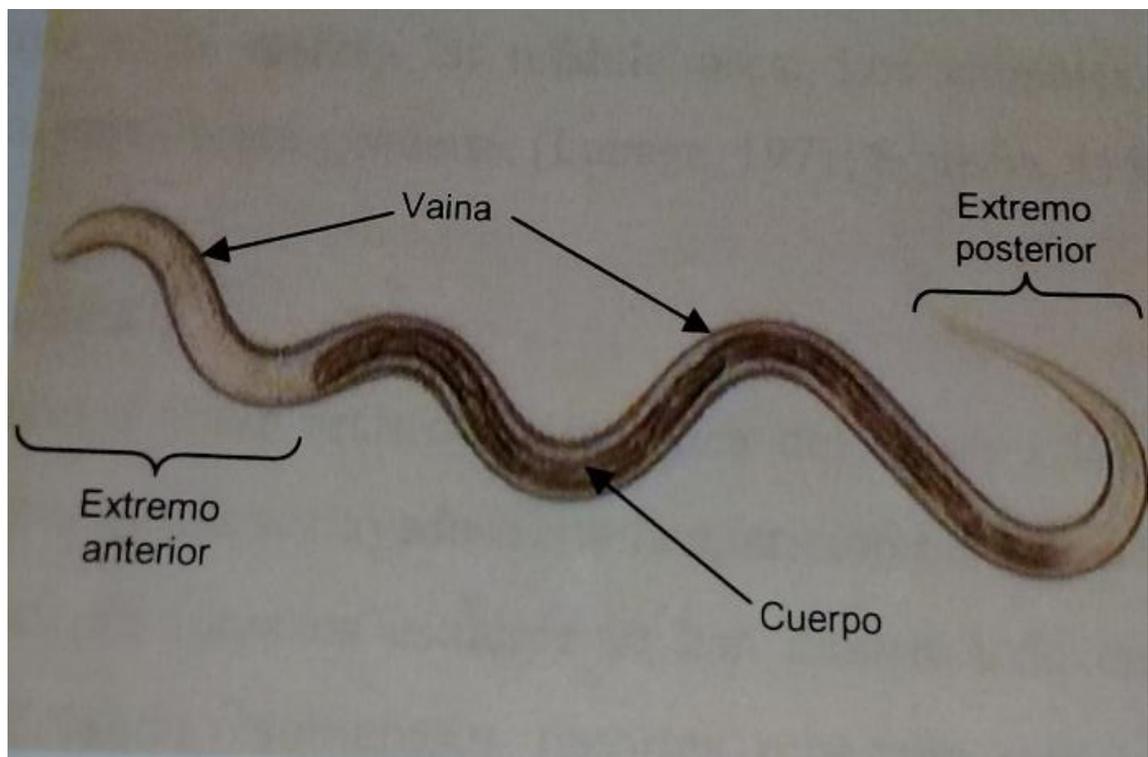


Figura 1. Larva infestante (L₃) de *Haemonchus contortus*, (González, 2007).

2.3.2. Fase endógena o parásita

La fase parásita se inicia cuando las larvas L₃ son ingeridas con el pasto penetran a la mucosa del abomaso donde sufren dos mudas más, convirtiéndose en larva del cuarto y quinto estadio y finalmente en nematodos adultos.

Con el incremento del pH ruminal, las larvas L₃ mudan mediante la enzima *leucino- aminopeptidasa* producida por las células neurosecretoras de la larva. En el abomaso las larvas L₃ invade las células epiteliales y se transforma en larvas L₄, entra en una fase tisular, penetra entre las glándulas epiteliales gástricas donde se alimenta de tejido y sangre, durante este proceso puede inhibir temporalmente su desarrollo, posteriormente sale para transformar larva L₅ o adulto joven y cambia directamente a parásito adulto hembra o macho listo para la reproducción, el periodo prepatente es de 19 a 21 días (Figura 2). Los gusanos adultos irritan la mucosa del abomaso provocando inflamación (gastritis). También extraen cantidades considerables de sangre y si el huésped no es capaz de reemplazarla con suficiente rapidez, se desarrolla anemia.

Esta anemia se manifiesta por la palidez de la conjuntiva y de las encías (González, 2007; Liébano *et al.*, 2011; Zúñiga, 2015; Molina *et al.*, 2016).

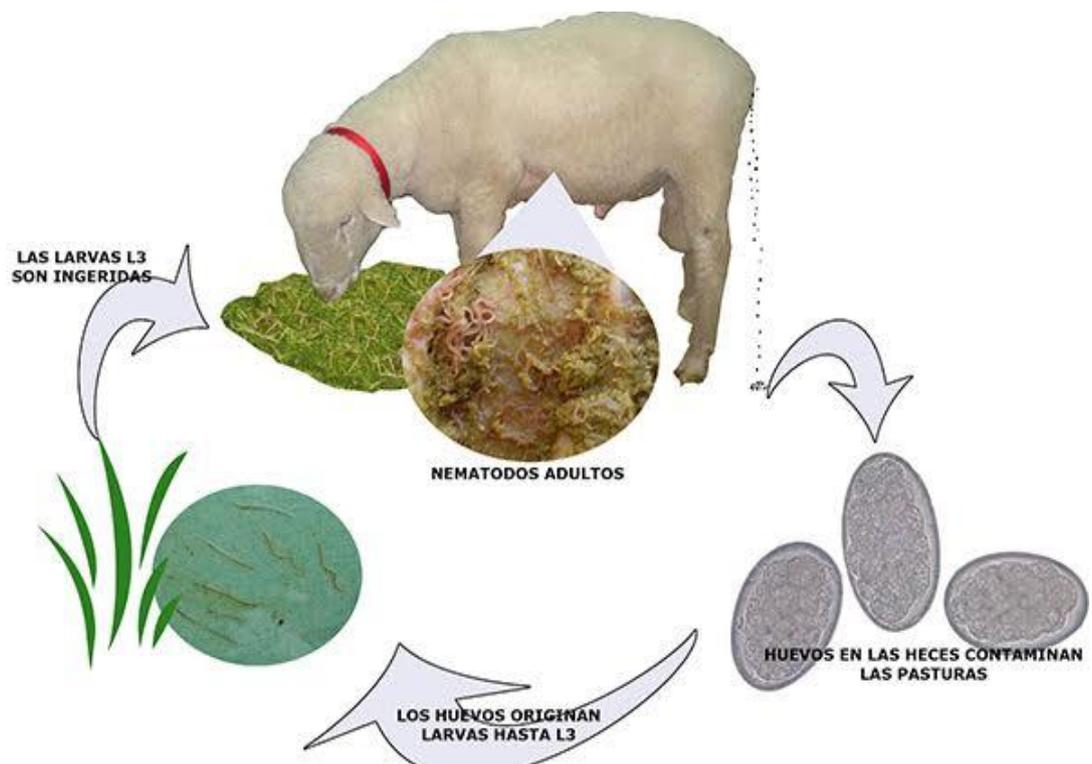


Figura. 2 Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

2.4. Distribución geográfica de los NGI

Los NGI están ampliamente distribuidos en los países tropicales y subtropicales, especialmente en aquellas zonas donde el sistema de producción es 100% pastoreo y las condiciones climáticas,

principalmente la temperatura y la humedad, favorecen la eclosión y el desarrollo de los huevos hasta las larvas infestantes durante todo el año, los efectos que produce en los animales son aspectos de gran importancia que repercuten en la producción ovina (Barreto, 2014; Zúñiga, 2015).

El desarrollo de las fases larvarias de este parasito depende de las condiciones ambientales propicias, como la temperatura, la humedad relativa y la presencia de oxígeno (González, 2007; Liébano *et al.*, 2011; Zúñiga, 2015). A temperaturas menores a 12°C retrasan el desarrollo del ciclo biológico, y a medida que la temperatura aumenta las larvas se desarrollan más rápido (temperatura de 20- 35°C) (Barreto, 2014). Una humedad relativa >80%, y presencia de oxígeno (Zúñiga, 2015).

La distribución geográfica de los NGI es mundial, en México se han registrados los siguientes géneros; *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Micistocirrus*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Toxocara*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Strongyloides*, y *Oesophagostomum*. La frecuencia y la intensidad varías de acuerdo al clima, sistema de manejo, importación de animales (Zúñiga, 2015).

2.5. Signos clínicos de los NGI

2.5.1. *Haemonchus contortus*

Es un parásito hematófago, presenta una estructura bucal en forma de lanceta, con la que erosiona la mucosa del abomaso del huésped para quedar adherida a ella por 12 minutos aproximadamente durante su alimentación). Cuando se desprende de la mucosa abomasal la hemorragia sigue por 7 minutos. (Ton Ho, 2008). A causa de la Haemoncosis el borrego sufre de anemia, existen grandes pérdidas económicas, entre ellas se mencionan el retardo de crecimiento, anorexia, retraso en la madurez sexual, muerte, disminución en la producción de carne y leche (Zúñiga, 2015).

2.5.2. *Ostertagia circumcincta*

La *Ostertagia* afecta el abomaso de los rumiantes, causando diarrea severa, deshidratación, heces con color verde oscuro, enflaquecimiento, afectando a los corderos, con una mortalidad alta.

2.5.3. *Trichostrongylus*

Este parásito se caracteriza por parasitar a los bovinos, ovinos, equinos y caprinos. En general provoca inflamación de la mucosa del estómago y úlceras, diarreas, pérdida de peso, falta de apetito causando lo que es la anemia (To Ho,2008).

2.5.4. *Nematodirus*

En los ovinos las infecciones causadas por *Nematodirus*, los signos clínicos que presentan los animales son inespecíficos, como diarrea, ruptura de tejido, inapetencia y pérdida progresiva de peso.

2.5.5. *Oesophagostomum* y *Chabertia*

Estos parásitos ocasionan diarreas sanguinolentas y engrosamiento de la pared intestinal, mala absorción de nutrientes, lo que ocasiona enflaquecimiento y formación de nódulos en la mucosa.

2.6. Los antihelmínticos

Los antihelmínticos constituyen actualmente el principal método de control de los nematodos de rumiantes en el mundo. Existen varios antihelmínticos (Cuadro 3) con diferentes mecanismos de acción, aunque las avermectinas, los bencimidazoles y los agonistas nicotínicos son los grupos de antihelmínticos más comúnmente usados en rumiantes (Márquez, 2003).

Cuadro 3. Antihelmínticos de amplio y corto espectro para el control de nematodos en rumiantes.

AMPLIO ESPECTRO		
Mecanismo de acción	Principio activo	Familia farmacológica
Fijadores de tubulina	Bencimidazoles	Cambendazol, Oxfendazol, Flubendazol, Mebendazol, Albendazol, Thiabendazol, Fenbendazol, Parbendazol, Luxabendazol, Triclabendazol.
	Probenzimidazoles	Febantel, Thiofanato, Netobimin.
Bloqueadores ganglionares	Imidazotiazoles	Tetramisol, Levamisol.
	Tetrahidropirimidina	Morantel, Pirantel.
Potenciadores GABA	Avermectinas	Ivermectina, Abamectina,
Doramectina	Milbemicinas	Moxidectin.
CORTO ESPECTRO		
Mecanismo de acción	Principio activo	Familia farmacológica
Desacopladores de la fosforilación oxidativa	Salicilanilidas	Cloxacanida, Oxiclosanida, Rafoxanide, Closantel.
	Sustitutos	Nitroxinil.
	Nitrofenílicos	Disofenol.
Antagonistas de acetilcolinesterasa	Organofosforados	Triclorfom, Haloxon, Naftalofos, Diclorvos.

2.6.1. Principales familias de antihelmínticos

2.6.1.1 Bencimidazoles (Bz). En 1950 se estableció el uso potencial de los Bz, estos son compuestos que muestran alta toxicidad con una

amplia actividad farmacológica, entre las principales está el efecto quimioterapéutico en contra de enfermedades parasitarias, seguido por la acción anti-fungal, anti-neoplásicos, cardiotónicos y analgésico.

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

Una característica importante de los bencimidazoles es su baja solubilidad en agua, lo que afecta su eficacia especialmente en rumiantes, en los cuales se absorben sólo pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal, con excepción del febendazol, el oxfendazol y el thiabendazol. Esto hace que la absorción y la biotransformación sean factores importantes que pueden afectar la eficacia de los bencimidazoles (Márquez, 2003).

Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción o Farmacodinamia es inhibir la polimerización de la tubulina y la enzima reductasa de fumarato, lo que produce deficiencia en la generación de energía (Adenin trifosfato –ATP-) y así, la muerte del parásito.

De esta manera se confirmó que los compuestos Bz actúan ligándose selectivamente a la proteína *beta* tubulina de nematodos y cestodos, modificando el patrón de polimerización para la formación de los microtúbulos. Originando una pérdida del homeostasis celular que, si persiste en el tiempo, puede resultar letal para el parásito. Los microtúbulos (son estructuras intracelulares que poseen una amplia variedad de funciones celulares) están formados por dos subunidades proteicas muy relacionadas, *alfa* tubulina y *beta* tubulina (Ton Ho, 2008).

2.6.1.2 Imidazotiazoles (Imz). Estos compuestos son desparasitantes muy utilizados por su alta eficacia en contra de una gran variedad de especies de nematodos. Los primeros estudios de los imidazotiazoles son a partir de 1961, cuando se hizo la notificación de tetramizol como

el primer producto derivado de los imidazotiazoles altamente efectivo (López *et al.*,2010).

Mecanismo de acción:

La absorción del medicamento por parte de los parásitos se hace a través de la cutícula; como el levamisol es un agonista colinérgico directo, afecta la neurotransmisión causando un efecto denominado parálisis espástica a los nematodos. Esto no mata al parásito, pero lo expulsa vivo, este efecto paralizante es causa de la acción colinérgica de los Imz sobre los ganglios del parásito susceptibles. A esta acción se le conoce como acción agonista nicotínica. Los Imz son efectivos contra los estadios maduros de los NGE de rumiantes y las formas larvianas maduras de los parásitos pulmonares, pero es poco eficaz contra larvas hipobióticas y carece de acción ovicida (Márquez, 2003).

2.6.1.3 Lactonas macrocíclicas (LM). Las LM son moléculas obtenidas de la fermentación del hongo *Streptomyces sp*, se sabe que tienen efectos antiparasitarios y que solo actúan contra nematodos, ectoparásitos, y otras actividades farmacológicas que son antimutágenos y analgésicos (Zúñiga, 2015). Estos comprenden dos

grupos principales: avermectinas y milbemicinas. Las avermectinas son productos de fermentación de *Streptomyces avermitilis* y las milbemicinas son productos de fermentación de dos especies de hongos (Sumano y Ocampo, 1999). Estos compuestos son bastante eficaces contra los estados larvarios y maduros de nematodos gastrointestinales y nematodos pulmonares con porcentajes de reducción de los niveles de excreción de huevos en heces superiores al 96% (Márquez, 2003; Cervantes, 2005).

Mecanismo de acción:

La acción de estos fármacos es estimular la liberación del ácido gamma aminobutírico (GABA) del parásito, el cual es un neurotransmisor inhibitorio de los estímulos nerviosos en la placa neuromuscular, esta inhibición ocasiona parálisis e incluso la muerte del parásito (Cervantes, 2005). A continuación, se ilustra un cuadro (4) donde se resumen algunas familias de los antihelmínticos, su forma de administración, la dosis y el tiempo de retiro de los residuos en la carne (Martínez, 2014).

Cuadro. 4. Dosis recomendadas para los diferentes antiparasitarios más utilizados en ovinos.

Nombre del antihelmíntico (Familia)	Vía de administración	Dosis	Tiempo de retiro para la carne
Benzimidazoles			
Albendazol	Oral	5-10 mg/kg	14 días
Oxfendazol	Oral	5.0 mg/kg	14 días
Febendazol	Oral	5.0 mg/ kg	14 días
Tiabendazol	Oral	44-66 mg/kg	14 días
Probenzimidazoles			
Febantel	Oral	5.0 mg/kg	7 días
Netobimin	Oral	7.5 mg/kg	10 días
Tiofanato	Oral	50 mg/kg	7 días
Imidazotiazoles			
Levamisol	SC	7.0 mg/kg	7 días
Lactonas macrocíclicas			
Ivermectina	SC	0.2mg/kg	21 días
Doramectina	SC	0.2mg/kg	21 días
Moxidectina	SC	0.2mg/kg	21 días
Salicilanilidas			
Closantel (5%)	Oral	5 mg/kg	28 días
Closantel (5%)	SC	5 mg/kg	28 días

2.7. Resistencia antihelmíntica (RA)

Actualmente, la resistencia a los medicamentos antihelmínticos constituye una amenaza importante para el control de los parásitos

nematodos. Que generalmente se encuentra en expansión un fenómeno de multirresistencia, que consiste en que todas las familias de antiparasitarios disponibles en el mercado han perdido la eficacia ante varios géneros de NGI, éstos, debido a diferentes componentes estructurales del parásito, ya sean proteínas estructurales, o enzimas que facilitan el transporte del desparasitante a través de las membranas (González, 2011).

La RA se ha estudiado ampliamente en ovinos porque se ha encontrado baja efectividad de los principales productos químicos (Taylor *et al.*, 2002) como son: bencimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Arece *et al.*, 2004; Papadopoulos, 2008) e incluso a las combinaciones como Netobimin Levamisol contra cepas resistentes de *Haemonchus contortus*. Sin embargo, el uso de varios fármacos a la vez es una solución temporal, ya que la resistencia se puede generar rápidamente en ambos productos provocando resistencia lateral, cruzada o múltiple (Coles *et al.*, 2006).

La RA se define como la capacidad que tiene una fracción de una población parásita para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas

que son letales para otras poblaciones de la misma especie (Márquez, 2003; Bonino *et al.*, 2003). A partir de los años 60's cuando apareció el primer antihelmíntico de amplio espectro (Tiabendazol), nace una nueva era en el control de los NGE, caracterizada por el uso exclusivo de antihelmínticos y la ausencia de un método de diagnóstico adecuado, lo que origina el uso indiscriminado de los antihelmínticos (Cuéllar, 2007).

La RA es una capacidad heredable de los parásitos para sobrevivir a tratamientos con drogas antihelmínticas, que, a dosis terapéuticas, normalmente causan la inhibición del crecimiento o la muerte de los individuos de una población normal o susceptible (Cristel y Suárez, 2006; Torres *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2014).

2.7.1. Tipos de resistencias

De acuerdo a las investigaciones que se han realizado, se reportan que existen tres tipos de RA (Márquez, 2003; González, 2011), que a continuación se menciona:

2.7.1.1 Resistencia paralela o lateral. Se presenta cuando los individuos de una población resistente a una sustancia química son también resistentes a otro compuesto que tiene similar mecanismo de acción. Es el caso de la resistencia al parbendazol y febendazol que puede presentar *Haemonchus contortus*.

2.7.1.2 Resistencia cruzada. A diferencia de la anterior, ésta se presenta cuando involucra sustancias químicas de modo de acción diferentes; un ejemplo de ésta, es la resistencia al levamisol e ivermectina que puede darse en *Ostertagia*.

2.7.1.3 Resistencia múltiple. Se presenta cuando los parásitos son resistentes a más de dos grupos de antihelmínticos diferentes. La misma es resultado de la selección independiente para cada grupo o como resultado de resistencia cruzada.

2.7.2. Reporte de la RA

En México, los productos derivados de Bz y LM son comúnmente usados en regiones productoras de borregos por su amplio espectro de acción. En México se determinó resistencia a Bz a NGI (*H. contortus*) en ovinos desde 1990, inicialmente se reportó únicamente en el estado de Puebla, pero posteriormente se notificó en otros estados como Morelos, Veracruz y Yucatán.

De acuerdo al estudio realizado en el 2006 en el estado de Tlaxcala, de los 20 ranchos que entraron en dicho estudio reportan que dos fueron reportados como sospechosos a febendazol y tres rebaños sospechosos a resistencia a ivermectina y uno más confirmado a resistencia a esta última; los géneros identificados con tolerancia a dosis terapéuticas de ivermectina dieron *Haemonchus sp.* y *Teladorsagia sp.* así mismo se detectaron diversos factores de riesgo para la presencia de resistencia antihelmíntica, como son el uso inadecuado de ivermectina, debido a la ausencia de un programa de desparasitación. (Montalvo *et al.*, 2006).

Hoy en día, el fenómeno de la RA de los parásitos está muy extendido y se ha convertido uno de los principales problemas muy graves en los países productores de ovinos. México no está exento del problema, se ha detectado RA en los estados de la República ubicados en el golfo de México y algunos del centro del país (García, 2016). Actualmente, a nivel nacional, se encuentra ya establecido un fenómeno de multirresistencia antihelmíntica donde se ven comprometidas todas las familias de antiparasitarios disponibles en el mercado y varios géneros de NGI. En el cuadro 5 se muestra una compilación de los datos de RA en México (Cervantes, 2005).

Cuadro 5. Resultados de estudios sobre RA de NGI a los diferentes productos antihelmínticos en México.

LUGAR	ANTIHELMINTICO	GÉNERO DE NGI	AUTOR Y AÑO
Hueytamalco, Puebla	ABZ, FEN, OXF, FEB	<i>Haemonchus</i>	Campos <i>et al.</i> , 1992
Tizimín, Yucatán	ABZ, FEN, OXF, FEB	<i>Haemonchus</i>	Campos <i>et al.</i> , 1992
Tlapacoyan, Veracruz	SO-ABZ	<i>Haemonchus</i>	Figueroa <i>et al.</i> , 2000
Este de Yucatán	ABZ	<i>Haemonchus</i>	Torres <i>et al.</i> , (2003a)
Centro y sur de Yucatán	FEN, IVM	<i>Haemonchus</i>	Torres <i>et al.</i> , 2003b
Tlaxcala	IVM	<i>Haemonchus</i>	Montalvo <i>et al.</i> , 2003
Tabasco	NET, IVM	<i>Haemonchus</i> , <i>Teladorsagia</i>	González <i>et al.</i> , 2003

Continuación del Cuadro 5.

Edo de Campeche	BZ,LM	<i>Trichostrongylus</i>	Torres. Acosta <i>et al.</i> , 2007
Centro y Altos de Chiapas	BZ,IMZ, LM	<i>Haemonchus y</i> <i>Teladorsagia</i>	Sánchez <i>et al.</i> , 2008
Centro de Tabasco	BZ,IMZ, LM	<i>Haemonchus y</i> <i>Trichostrongylus</i>	Medina <i>et al.</i> , 2011

BZ= Bencimidazol, IMZ= Imidazotiazoles, LM= Lactonas Macrocíclicas, ABZ= Albendazol, FEN= Febendazol, OXF= Oxfendazol, FEB=Febantel, SO=Sulfóxido de albendazol, NET= Netobimín.

2.7.3. Diagnóstico de RA

La detección de RA de los NGI a los fármacos, puede realizarse por medio de la prueba de Reducción del Conteo de Huevos en Heces (RCHH) o por sus siglas en inglés FECRT (Fecal egg count reduction test). Que determina la eficacia antihelmíntica comparando la eliminación de huevos antes y después de un tratamiento. Otra prueba, muy laboriosa y de resultados inseguros, se realiza *in vitro* y consiste en determinar la inhibición del desarrollo (parálisis) de las larvas LDA (larval development assay) al ser sometidas a diferentes concentraciones de un producto determinado (Coles, 1990). También está la Prueba de eficacia AH controlada, que se determina por la

comparación de poblaciones en grupos de animales tratados y testigos distribuidos aleatoriamente y en la necropsia se realiza la identificación y conteo del total de nematodos, comparando entre los dos grupos, sin embargo, es una prueba costosa dado el número de animales requeridos para ser sacrificados (Márquez, 2003).

Con los resultados de HPG se realiza la RCHH que a la fecha es de aplicación práctica como prueba de Campo para darnos una estimación de la RA de una población de NGI de ovinos al analizar estadísticamente los resultados.

El conteo de huevos de NGI se realiza por medio de la técnica coprológica de McMaster, el diagnóstico de laboratorio permite establecer la presencia de nematodos siempre y cuando los parásitos sean adultos y eliminen huevos, se reportan resultados en número de huevos por gramo de heces (HPG), esta técnica no diferencia género y especie de los parásitos presentes. Para lograr la identificación de los géneros de NGI presentes se recurre a la técnica de coprocultivo con el objeto de identificar larvas infectantes, que, por su morfología, es posible distinguirlos claramente por personal bien entrenado (Liébano 1991).

Actualmente en el Laboratorio de Centro Nacional Disciplinario en Parasitología Veterinaria del INIFAP, es posible diagnosticar la RA de NGI a Bencimidazoles con técnicas moleculares (AS-PCR) a partir de la extracción de ADN de la L₃, siendo esta técnica muy sensible al determinar el gen mutante que expresa el desarrollo de la RA, sin embargo, no es de aplicación práctica para el productor común, debido a que aún el costo resulta elevado. Así mismo la identificación de géneros de NGI por genotipo (genotipado o genotipificación), es posible realizarse a partir de ADN de la L₃ de los NGI con técnicas moleculares (PCR-punto final).

2.8. Alternativas de control

Debido a la problemática que han desarrollado los parásitos gastrointestinales y las desventajas que se han generado por el mal uso de los tratamientos antihelmínticos, se han buscado diversas estrategias de control y medidas preventivas para lograr disminuir de manera eficaz las cargas parasitarias a niveles aceptables para desarrollar el potencial productivo en la ganadería.

Dentro las estrategias de alternativas de control de las parasitosis gastrointestinales, se encuentran; la rotación de los potreros, control biológico, suplementación alimenticia, uso de plantas con actividad nematicida, uso de indicadores de fenotipo (desparasitación selectiva) y vacunas (Esteban *et al.*, 2013; López *et al.*, 2015).

2.8.1. Manejo de praderas

El manejo de los pastoreos (sea sobre praderas o pastizales), va a determinar el riesgo de enfermedad en el sistema de producción. Así, a medida que se incrementa la carga animal, el riesgo aumenta debido a que los niveles de contaminación de la pastura suelen ser altos y uniformes en el área de pastoreo, y además los animales se ven forzados a comer más bajo. A medida que el sistema de pastoreo se hace más extensivo, con menor carga animal y permitiendo a los animales pastorear con selección de áreas, el riesgo de la enfermedad tiende a disminuir (Steffan *et al.*, 2012).

En invierno, el problema se agrava cuando la disponibilidad de forrajera se va disminuyendo y los animales se ven forzados a pastar cada vez más cerca del área diseminadas sobre la pastura, incrementando peligrosamente el riesgo de infección al ingerir pasto de áreas con máxima densidad de larvas infectivas. Esto ocurre usualmente, ya que, debido a las bajas temperaturas y el decreciente fotoperiodo, los animales mantienen una alta riesgo de enfermarse debido a que la corta altura de la pastura (5-10 cm) garantiza la ingestión de una gran cantidad de larvas infectivas (Steffan *et al*, 2012).

La rotación de potreros es una manera de disminuir el impacto de los parásitos, ya que reduce la ingestión de larvas infectantes en el forraje que ingieren los animales. Cuando se utiliza la rotación de potreros se permiten períodos de descanso de la pradera, lo que permite que la radiación solar y el ciclo biológico natural de los NGI reducen la población de larvas infectantes (García, 2016).

El descanso del área de los pastizales, permite disminuir las poblaciones de las larvas, por no haber huésped quien lo ingiera, provocando la pérdida de viabilidad y finalmente mueren en un período

de aproximadamente de 28 a 35 días (López *et al.*,2015), aunque esa reducción nunca llega a cero (Fiel, 2005).

2.8.2. Hongos nematófagos

Los hongos nematófagos, son microorganismos del suelo que poseen la capacidad para desarrollar órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos para finalmente nutrirse de sus tejidos (Arroyo *et al.*, 2008).

Este tipo de control se basa en la utilización de agentes biológicos naturales que actúan como organismos enemigos que atacan a los nematodos infectante que habite en la pradera como una fuente de alimentación y así disminuye la infección a niveles más bajos, aunque no la elimina radicalmente del ambiente. Entre estos agentes biológicos, los que han demostrado un rol importante sobre los estados de vida libre de nematodos intestinales son escarabajos fecales, gusanos de tierra, bacterias, hongos depredadores, protozoarios, entre

otros que alguna manera disminuye las poblaciones de nematodos en la naturaleza (López *et al.*, 2015; Ruiz, 2015).

Estudios recientes llevados a cabo en México, en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria , INIFAP, han evaluado el uso de clamidosporas del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*, y se ha reportado que éstas al ser administradas en los animales y después de pasar a través del tracto gastrointestinal y ser eliminadas al medio ambiente, colonizan la materia fecal capturando y destruyendo a la población de larvas infectantes de nematodos ante que este emigre y así evite completar el ciclo biológico de estos parásitos dentro del hospedador e impidiendo la diseminación de larvas infectantes en los potreros, y finalmente disminuyendo considerablemente las cargas parasitarias en los animales (Arroyo *et al.*, 2008; López *et al.*, 2015). Se propone que su utilización no tiene efectos adversos sobre el ambiente y que se puede utilizar ampliamente a nivel mundial por lo que su comercialización puede ser ventajosa (Ruiz, 2015).

El trabajo realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), perteneciente a INIFAP, situado en Jiutepec, Morelos, México. Donde evaluaron la combinación de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* con un antihelmíntico (albendazol) logró un efecto benéfico reduciendo la población larvaria de *Haemonchus contortus*, en casi un 80 %, en heces de ovinos y disminuyendo el número de tratamientos químicos, retardando la aparición de resistencia antihelmíntica (Arroyo *et al.*, 2008).

2.8.3. Bacteria entomopatógena

El uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos. La bacteria *B. thuringiensis* es un bacilo Gram (+) que se localiza en diferentes hábitats del medio como cadáveres de insectos, semillas y granos. Ésta bacteria es una herramienta de control con posible potencial tóxico en contra de nematodos de importancia veterinaria y agrícola.

De acuerdo a las investigaciones realizadas, reporta que el efecto letal de la toxina soluble de IB-16 es inhibir la eclosión de huevo a larva de *Haemonchus contortus*; al mismo tiempo, las larvas que logran eclosionar, mueren en un periodo muy corto (12 h) y el movimiento de las mismas fue disminuyendo en forma visible, hasta quedar muerta (Vázquez *et al*, 2012).

2.8.4. Suplementación alimenticia

De acuerdo a los estudios realizado, se ha detectado que cuando los animales reciben buena dieta alimenticia en especial las proteínas, energía, vitaminas y los minerales, desarrollan una buena inmunidad que les permita enfrentar en contra de los nematodos gastrointestinales y se vuelven tolerantes o resilientes, pudiendo mantener niveles productivos aceptables a pesar de albergar altas cargas parasitarias. Clínicamente, el animal se presenta saludable (López *et al.*, 2015; Olmedo, 2015).

La relación alimentación-parasitismo, son considerados como los factores que más influyen en la relación huésped-parásito, donde una alimentación adecuada disminuye la susceptibilidad y prevalencia de las infestaciones en los hospederos y aumenta la resistencia, con respuestas inmunológicas adecuadas contra estas parasitosis (Olmedo, 2015).

2.8.5. Extracto de plantas

Las plantas han evolucionado para contrarrestar el ataque de los insectos y han desarrollado mecanismos de protección, como la repelencia, acción insecticida, fungicida, entre otros.

El árbol de Neem (*Azadirachta indica*, *A. juss*) produce un compuesto antiparasitario natural y biodegradable llamado azadiractina, el poder desparasitante de la azadiractina se ha confirmado en 500 especies de insectos plaga y su baja toxicidad en campo para vertebrados e insectos benéficos. Las hojas, corteza, flores, semillas y los frutos, se han utilizado para el propósito medicinal desde hace siglos. Presenta

propiedades medicinales que incluyen antiinflamatorio, antiviral, antipirético, inmunoestimulante, analgésico, diurético, antimicrobianas y antihelmínticos

Entre sus efectos se destacan la inhibición del apareamiento sexual, impedimento de la ovoposición, eclosión de huevos, esterilidad en adultos, bloqueo de las fases de muda y bloqueo de la síntesis de quitina en los parásitos. Este extracto es eficaz contra nematodos de géneros como *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia* y *Strongylus* (Zúñiga, 2015).

Otras plantas con propiedades antiparasitarias que han permitido confirmar el interés potencial es la *Cratylia argétea*, *Lespedeza china*, *Trifolium repens* (López et al., 2015), ajo (*Allium sativa*), de saifoin (*Onobrychis viciifolia*), papaya (*Carica papaya*), hoja de yuca (*Manihot sculenta*), o algunas arbóreas tropicales como *Leucaena leucocephala*, *Lysiloma latisiliquum*, *Pithecellobium dulce* y *Lysiloma acapulcensis*, entre otras), (Olmedo et al., 2015).

Estudios recientes revela que el extracto de *Lespedeza cuneata* y el *Oxalis tetraphylla* en ovinos permite reducir la eliminación de huevos de nematodo *Haemonchus contortus* en valores cercanos al 50% (López *et al.*, 2015). Como también los extractos acuosos de liofilizados de *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce*, en una evaluación in vitro sobre la eclosión de huevecillos, desarrollo y migración larvaria de nematodos gastrointestinales de ovinos ambas especies presentaron efectos antiparasitarios, lo cual revela su potencial para el control de nematodos gastrointestinales de ovinos criados bajo condiciones subtropicales (Olmedo, 2014).

2.8.6. Agujas de cobre

El óxido de cobre, cuando es administrado en capsulas por vía oral, pasa a través del rumen y se aloja en los pliegues del abomaso, donde libera iones de cobre que ejercen un efecto antihelmíntico, reduce las cargas de *H. contortus* entre un 75 y 90 %; pero no mejoran la ganancia de peso de los animales (Medina *et al.*, 2014).

2.8.7. Desparasitación selectiva

Es una metodología que nos permite identificar ovinos que requieran ser tratados con antihelmínticos (susceptibles) y ovinos que no lo requieran (resistentes). El objetivo es tratar solo los animales que así lo requieran, reduciendo el uso de antihelmínticos para retardar la resistencia antihelmíntica y afectar en menor grado el medio ambiente. El productor que implementa esta metodología, a través del tiempo, identifica los ovinos resistentes fenotípicamente a los nematodos gastrointestinales, información que puede utilizar en beneficio de su rebaño.

La desparasitación selectiva se basa en el uso de indicadores de fenotipo que son mediciones prácticas para determinar el daño causado por nematodos gastrointestinales a los ovinos (López *et al.*, 2012).

Los indicadores de fenotipo son: número de HPG (Técnica McMaster), el %VCA (microhematocrito), calificación de la condición corporal (CC)

(Russel *et al.*, 1969; Suiter, 1994), la evaluación de la coloración de la mucosa palpebral considerando el método FAMACHA (1 y 2=1, 3=2, 4 y 5=3) y la observación de signos clínicos.

Esta metodología se inicia realizando un inventario con información básica de cada uno de los animales del rebaño (identificación, sexo, edad, genotipo, estado fisiológico, etc.). Se registran los valores de los indicadores de fenotipo y de acuerdo al Cuadro 6 se procede a tratar o no tratar con antihelmíntico.

Cuadro 6. Indicadores de fenotipo para la desparasitación selectiva contra nematodos gastrointestinales de ovinos.

INDICADOR	NO TRATAR	TRATAR	TRATAR
HPG	≤450	500-2500	>2500
% VCA	≥30	23-29	≤22
CC	≥2.5	2.5-2.0	<2.0
MUCOSAS	1	2	3
SIGNOS	Ausentes	Presentes todos o algunos	Presentes todos o en su mayoría
	Seleccionar resistentes		Eliminar altamente susceptibles

HPG= huevos por gramo de heces
CC=condición corporal
3= rosa muy pálido a blanco

VCA= Volumen celular aglomerado
Mucosas: 1= rosa-rojo, 2= rosa pálido

La aplicación de la Desparasitación Selectiva pretende guiar a los ovinocultores en la selección de animales resistentes a nematodos y tratar solo a los susceptibles. Además, pretende disminuir los problemas de salud por nematodosis y resistencia antihelmíntica (López *et al.*, 2010).

2.8.7.1 Determinación del número de huevos por gramo de heces

(HPG). La determinación se realizó con la Técnica de Mc Master. El conteo de HPG se realizó siguiendo la metodología citada por (Thienpont, 1986). Utilizando bolsas de plástico, se tomaron muestras de heces de los animales directamente del recto para evitar contaminación, estas muestras fueron identificadas para su traslado al laboratorio manteniéndolas a 10°C en hieleras de polietileno para controlar la eclosión de los huevos. Se tomaron dos gramos de heces y se mezclaron con 28 ml de solución salina saturada en tubos de 50 ml hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se colocó una gasa al tubo para impedir el paso de dedritos, con ayuda de una pipeta de plástico, se tomó una muestra de 0.30 ml para llenar la cámara de Mc Master, teniendo cuidado de tomar la muestra mientras la solución se encontraba en movimiento. La lectura se realizó en un microscopio compuesto con el objetivo 10X, los huevos que se encontraban dentro de las líneas marcadas de los dos compartimientos correspondientes

eran sumados para tener un conteo final y aplicar la siguiente fórmula (el resultado es expresado en HPG):

$$\text{HPG} = \text{Conteo final} \times 100 / 2$$

2.8.7.2 Determinación del porcentaje del Volumen Celular Aglomerado (VCA). A partir de la obtención de una muestra de sangre venosa obtenida con aguja Vacutainer estéril de la vena yugular, se utilizaron tubos estériles con anticoagulante (E.D.T.A) llenándose a un tercio de su capacidad. Los tubos se identificaron y conservaron en refrigeración, se trasladaron al laboratorio, donde de cada muestra se realizó el llenado de tubo capilar para microhematocrito hasta $\frac{3}{4}$ partes, se sellaron por un extremo, posteriormente se colocaron en la centrifuga para microhematocrito (LW Scientific, Inc. Modelo LWS-M24), durante 5 minutos a 2500 rpm.. Concluido el tiempo se formó el conglomerado o paquete celular separándose del plasma, se procedió a la lectura y se registró el dato como porcentaje (% de VCA).

2.8.7.3 Técnica FAMACHA. Debido a la RA que los parásitos gastrointestinales han adquirido, se tuvo la necesidad de crear un

método para lograr identificar el grado de anemia de los animales parasitados, es así como a lo largo años de investigación se diseñó la técnica denominada FAMACHA.

El término FAMACHA es un acrónimo del autor de la idea, Dr. Faffa Malan, FAffa MALan CHArt, relativa al método consistente en evaluar clínicamente a los animales de un rebaño para que indirectamente pueda conocerse el efecto de la parasitosis y, en base a eso, se tome la decisión de aplicar el tratamiento antihelmíntico de forma selectiva en campo (Coles *et al.*, 1992; Malan *et al.*, 1992).

Este método parte del principio que dentro de un hato existe una proporción de individuos completamente susceptibles, mientras que otros muestran distintos grados de resistencia o tolerancia a los nematodos. La utilización de modelos matemáticos permitió desarrollar la hipótesis de que la resistencia antihelmíntica puede ser dilatada en el tiempo, tratando sólo aquellos animales afectados severamente por los nematodos. En este caso, el refugio de población sin tratar (larvas en las pasturas aportadas por los animales no tratados) sería el encargado de diluir las poblaciones de nematodos resistentes. Como FAMACHA sólo detecta anemia, como una manifestación del efecto

Haemonchus, es más una medida de resiliencia que de resistencia (FAO 2003).

Un animal resiliente es aquel que tiene la habilidad de mantener niveles productivos aceptables a pesar de albergar altas cargas parasitarias. Clínicamente, el animal se presenta saludable (Morales *et al.*,2006; Mora, 2016).

Esta metodología sólo debe utilizarse cuando existan infecciones por NGE y donde mayoritariamente esté presente el *Haemonchus contortus* y se recomienda que sólo sea una más de otras medidas de control. Existe una relación entre la coloración de la mucosa conjuntiva ocular, algunos valores de la composición de la sangre y la presencia de parásitos.

Para la evaluación de este método se establecieron cinco categorías de coloración relacionado con el grado de anemia que el animal padece y pueda compararlos con la proporción de glóbulos rojos (Cuadro 7)

observable a través del hematocrito, la técnica de laboratorio (porcentaje de volumen celular aglomerado).

Cuadro 7. Categorías clínicas de la coloración observada en la conjuntiva.

CATEGORÍA CLINICA	COLOR DE LA MUCOSA PALPETRAL	HEMATOCRITO	RECOMENDACIÓN DE DESPARASITAR
1	Rojo	≥ 28	No
2	Rojo- rosado	23-27	No
3	Rosado	18-22	*
4	Rojo-blanco	13-17	Si
5	Blanco	≤ 12	Si

*En este caso, queda a criterio del productor de desparasitar o no.

Las categorías 1 y 2 corresponden a las tonalidades más oscuras y definen a los animales más saludables, por eso no requieren de la aplicación de desparasitantes. La Categoría 3 se califica como punto intermedio. En este caso, queda a criterio del productor de desparasitar o no. Las categorías 4 y 5 corresponden a animales en estado anémico riesgoso o severo, en cuyo caso, debe aplicarse el desparasitante lo antes posible.

2.8.7.4 Calificación de la Condición Corporal (CC). La Condición corporal (CC) se define como la cantidad de grasa en relación a la cantidad de materia no grasa en el cuerpo del animal en vivo (Russel *et al*, 1969).

Existen diversas técnicas para calificar la CC sin embargo no se pueden utilizar en condiciones de campo como la medición profunda de diversos tejidos por medio de ultrasonido, pero es más utilizado en bovinos. La medición de la profundidad de la grasa dorsal 12^a costilla con la ayuda de ultrasonido encontraron un coeficiente de correlación de 0.91 cuando se comparó esta medición encima del músculo *longissimus dorsi* en la última costilla y la profundidad de la grasa en canal, y 0.76 cuando se correlacionó la medición del ultrasonido con el total de la grasa de la canal.

La evaluación subjetiva de CC puede estimar de manera muy práctica la proporción de grasa en el cuerpo del animal. Investigaciones preliminares realizadas por Russel y su grupo de colaboradores en un lapso de tres años, en los cuales contaron con la colaboración de seis observadores, demostraron, que la repetibilidad del grado de condición

corporal dentro de observadores fue mayor del 80%, de tal manera que menos del 15% de las observaciones difirieron de 1.0 grado. La repetibilidad entre observadores fue más del 70% difiriendo menos del 20% por 0.5 grado y menos del 10% en 1.0 grado.

En este método referido es el siguiente: primero se debe juzgar la prominencia de las apófisis espinosas de las vértebras lumbares mediante palpación, la angulosidad y grado de cobertura al final de las apófisis transversas de las vértebras lumbares. La cantidad del tejido muscular y grasa por debajo de las apófisis transversas de las vértebras lumbares, se evalúa sujetando las vértebras lumbares entre los dedos medio, índice y pulgar. Para apreciar la profundidad del músculo *Longissimus dorsi* y la cantidad de grasa subcutánea, se palpa el tejido que queda entre las apófisis espinosas y transversas.

Grado 1: Las apófisis espinosas están prominentes y angulosas; las apófisis y transversas también están angulosas, los dedos pasan fácilmente por debajo de los extremos de las apófisis pudiendo sentir cada apófisis; el músculo *L. dorsi* es poco profundo es poco profundo y carece de grasa subcutánea perceptible encima (Romero, 2015).

Grado 2: Las apófisis espinosas se sienten prominentes. Debajo de la piel un tejido liso se puede sentir con corrugaciones finas; las apófisis transversas están lisas y redondeadas, y se pueden pasar los dedos por debajo de los extremos de las apófisis ejerciendo poca presión; la profundidad del *L. dorsi* es moderada y la grasa subcutánea es escasa.

Grado 3: Las apófisis espinosas tienen una pequeña elevación, están lisas y redondeadas, se pueden sentir un poco de tejido si se ejerce una ligera presión con los dedos; las apófisis transversas están lisas y bien cubiertas, se requiere de una presión firme para sentir sus extremos; el músculo *L. dorsi* está totalmente cubierto con una moderada cantidad de grasa subcutánea.

Grado 4: Las apófisis espinosas se detectan solo si se ejerce una presión firme en sus extremos; el músculo *L. dorsi* está completamente cubierto con una capa gruesa de grasa subcutánea; las apófisis transversas no se sienten.

Grado 5: Las apófisis espinosas no se pueden sentir a menos que se ejerza una presión muy intensa, hay una depresión en la grasa

subcutánea cuando las apófisis espinosas podrían sentirse normalmente; las apófisis transversas no pueden sentirse; el músculo *L. dorsi* está completamente cubierto por una muy gruesa capa de grasa subcutánea; puede haber grandes depósitos de grasa sobre la pelvis y base de la cola.

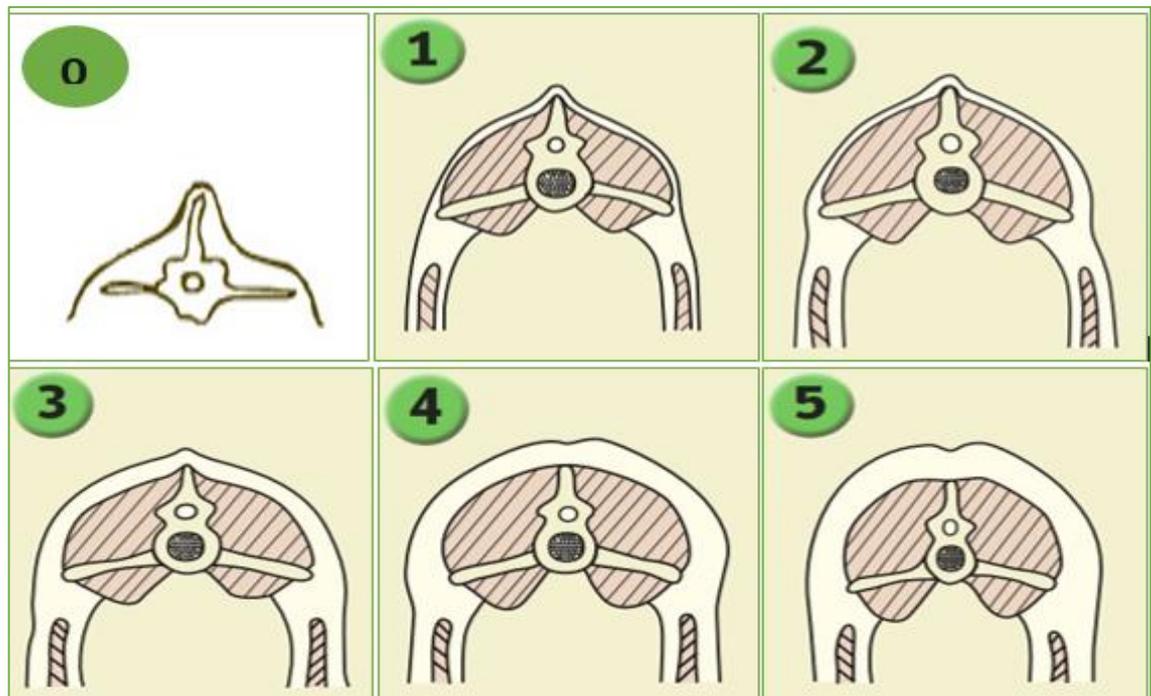


Figura 3. Escala de la condición corporal.

La CC tiene efecto en la productividad de las ovejas, es en el grado 3 donde pueden manifestar su capacidad productiva, las ovejas Pelibuey con menor CC presentan un número menor de estros en los meses de marzo y abril en comparación con las mejor calificadas (Olazarán, 2005; Romero, 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el estado de Puebla, en rebaños de ovinos que tienen como base de alimentación el pastoreo en terrenos propios o comunales, de distintas razas y manejo de tradicional a semitecnificado. Participaron productores cooperantes localizados en el área de influencia de los Distritos de Desarrollo Rural de Zacatlán, Teziutlán, Tehuacán y Cholula. El estudio se desarrolló en el período de marzo 2018 a enero 2019.

3.1. Localización

En el estado Puebla el 35% de la superficie del estado presenta clima templado subhúmedo presente en la región central y sureste, el 25%

presenta clima cálido subhúmedo en la parte norte y sureste, el 19% presenta clima seco y semiseco hacia el sur y centro oeste, el 14% presenta clima cálido húmedo localiza en el norte y sureste, el 7% presenta clima templado húmedo en la región norte y una pequeña área hacia el sureste, también encontramos un pequeño porcentaje (0.2) de clima frío en la cumbre de los volcanes.

Se evaluaron 10 unidades de producción de ovinos, distribuidos en cuatro Distritos de Desarrollo Rural (DDR) del estado de Puebla (Figura 4). Un rebaño en San Francisco Teotimehuacán, Pue., de la zona centro del estado de Puebla (DDR V), dos rebaños en San Marcos municipio de Tehuacán, de la zona Sur- Oriente (DDR VIII), dos rebaños en Acoculco y dos rebaños en Potrerillos, en el municipio de Chignahuapan de la zona norte de Zacatlán (DDR II),; dos rebaños de El Llanete- Tepecuahuiusco municipio de Ixtacamaxtitlan de la zona norte del estado(DDR II), y el último rebaño, de Yagostera, Hueytamalco Pue., dentro de la región de la sierra nororiente del estado (DDR III).

Cada DDR predominan climas semejantes, en Cholula posee clima templado subhúmedo con lluvias en verano, en Tehuacán, con clima templado subhúmedo y semicálido, en Zacatlán presenta clima semifrío

y templado húmedo y en Teziutlán con clima semicálido subhúmedo y cálido húmedo.

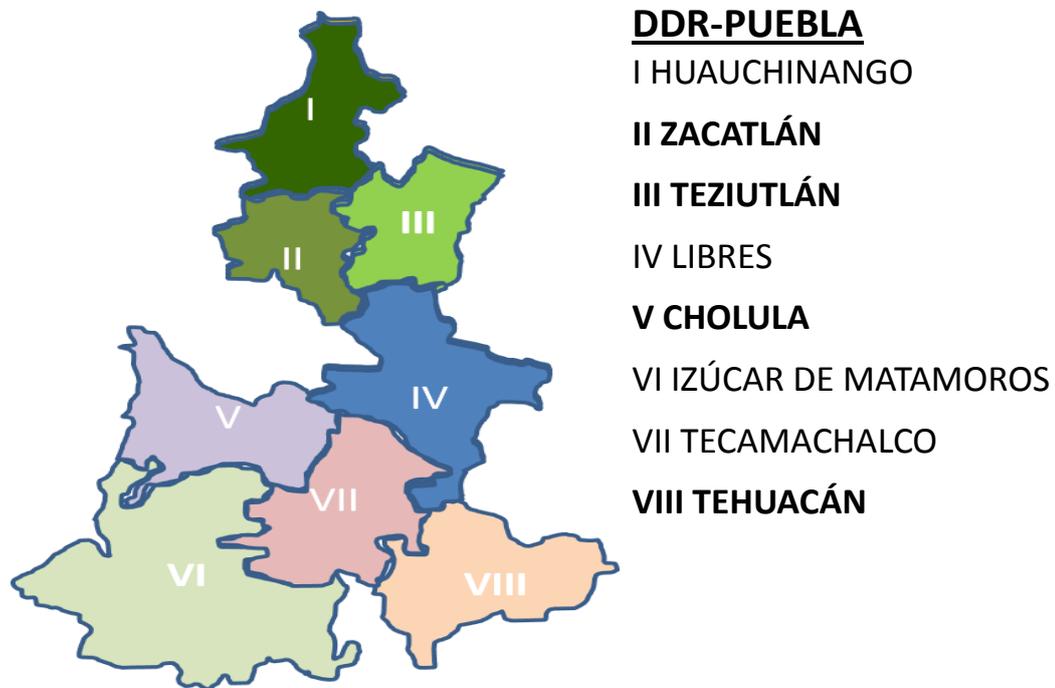


Figura 4. División del estado de Puebla por Distrito de Desarrollo Rural.

3.2. Caracterización de las unidades de producción

Se le aplicó una encuesta a los ovinocultores (Anexo I) para conocer la infraestructura y el manejo que se aplica en cada unidad de producción y contar con antecedentes de cada animal, la información recabada forma parte de la base de datos y se consideró útil para identificar factores que tuviesen algún efecto en la presencia de resistencia antihelmíntica.

Durante la visita en que se realizó la encuesta, se llevó a cabo una capacitación al productor y ovinocultores invitados, sobre los daños que causa la parasitosis por nematodos en los ovinos, su diagnóstico y control, además de informarlos del problema de la presencia de resistencia antihelmíntica y causas que la aceleran. La capacitación también incluyó el protocolo del presente estudio, su participación y compromisos durante su desarrollo.

3.3. Animales

Las unidades de producción participantes deberían tener como base de su alimentación el pastoreo, contar con más de 20 animales mayores de 4 mes de edad, no haber recibido tratamiento con antihelmínticos en un período igual o mayor a 60 días y que los propietarios manifestaran que aun aplicando sus tratamientos antiparasitarios, notaban que un número importante de los animales, mostraban signos de parasitosis gastrointestinal.

En la visita a las unidades de producción participantes, se realizó un muestreo general, obteniendo muestras de heces a todos los animales

mayores de cuatro meses de edad. (día -1), con su situación en cuanto a carga parasitaria cuantificada de NGI.

Del muestreo general se seleccionaron de 20 a 30 ovinos infestados de manera natural con NGI por unidad de producción, con carga igual o mayor a 200 HPG, diagnosticados mediante estudio coproparasitoscópico en laboratorio (Técnica de Mc Master). Se tomaron muestras de sangre para determinar el porcentaje de volumen celular aglomerado (%VCA) realizando microhematocrito. Además, se llevó a cabo la evaluación de indicadores de fenotipo como, condición corporal (CC) escala 1-5), Color de la mucosa palpebral (1, 2 y 3) y signos de nematodiasis.

Los animales seleccionados fueron distribuidos en dos grupos aleatoriamente en cuanto al sexo (macho o hembra), la edad, raza y carga parasitaria (HPG).

Una vez conformados los grupos experimentales (I Testigo= sin Tratamiento y II Tratado= 5 mg/kg de peso vivo vía oral), al grupo

Testigo se le suministró un placebo y al grupo Tratado se le aplicó la dosis de antihelmíntico previo pesaje, a los dos grupos, previamente al tratamiento se les colectó muestra de heces fecales, en suficiente cantidad para realizar el estudio de carga parasitaria (Mc Master) pre-tratamiento y destinar una porción para efectuar un coprocultivo para la obtención de L₃ de NGI por medio de la técnica de coprocultivo en palangana (día 0).

El manejo de los ovinos fue el que normalmente realizaban y solo se evitó suministrar algún producto o medicamento con propiedades nematicidas.

Una vez que pasaron 14 días, se regresó a cada unidad de producción para trabajar con los grupos experimentales en la obtención de muestra de heces fecales en suficiente cantidad para realizar el estudio de carga parasitaria (Mc Master) pos-tratamiento y destinar una porción (10 a 30 g) para efectuar un coprocultivo para la obtención de L₃ de NGI por medio de la técnica de coprocultivo en palangana (día 14).

Con los datos de carga parasitaria pre-tratamiento (día 0) y pos-tratamiento (día 14) de los grupos I Testigo y II Tratado, se realizó el diagnóstico de resistencia antihelmíntica con la prueba de Campo (Prueba de reducción del recuento de huevos fecales).

3.4. Prueba de reducción del recuento de huevos fecales (RCHH) (prueba in vivo)

El diagnóstico de resistencia antiparasitaria por medio de esta Prueba, se inició con la selección de los rebaños para su estudio tomando como base los siguientes criterios (Coles *et al.*, 2006):

- Animales infectados con un periodo mínimo de 60 días sin haber sido tratados con ningún producto AH.
- Distribuir aleatoriamente a los animales o distribuir según los recuentos de huevos.
- Los animales deben de ser de 3 a 6 meses de edad o si son mayores con un recuento de huevos > 150 hpg.
- Cada Grupo experimental con mínimo 10 animales.
- Muestra de heces mínima cantidad de 3 g. y tomada directamente del recto.

- Mantener a 4°C las muestras durante 24 h si se usa para cultivo.
- Pesaje de los animales para la dosificación exacta del producto de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

3.5. Diseño experimental

En el Cuadro 8 se muestra el diseño experimental de la Prueba de reducción de huevos en heces (FECRT) que compara el número de huevos eliminados antes y después del tratamiento antihelmíntico.

Cuadro 8. Diseño experimental.

Día	Grupos	
	-Testigo Sin tratamiento	-Tratado con Albendazol
-1	-Obtención de muestra de heces. -Determinación de HPG (Mc Master). -Coprocultivo en palangana.	-Obtención de muestra de heces. -Determinación de HPG (Mc Master). -Coprocultivo en palangana.
0	-Aplicación de placebo. -Registro de indicadores de fenotipo.	-Aplicación de tratamiento con 5 mg/kg peso vivo vía Oral. -Registro de indicadores de fenotipo.

Continuación del Cuadro 8.

	-	
	-Obtención de muestra de heces	-Obtención de muestra de heces.
	-Determinación de HPG (Mc Master)	-Determinación de HPG (Mc Master).
14	-Coprocultivo en palangana. -Registro de indicadores de fenotipo.	-Coprocultivo en palangana -Registro de indicadores de fenotipo.
	Tratamiento con Albendazol con 5 mg/kg peso vivo vía Oral.	

HPG= huevos por gramo de heces

El coprocultivo en palangana para la obtención de L₃ se realizó por fecha de muestreo (días pre-tratamiento y pos-tratamiento), por rebaño y por grupo experimental.

3.6. Análisis estadístico para medir la eficiencia del tratamiento antihelmíntico (Prueba de Campo).

Para la interpretación de los datos de la Prueba de Resistencia Antihelmíntica se aplicó el análisis estadístico Excell RESO © (CSIRO,

1993 Division Animal Health de Wursthorn y Martin) recomendada por Coles et al., (1992-2006) quienes mencionan que los parámetros para determinar si hay resistencia a los antihelmínticos, tiene que tener un porcentaje de reducción menor al 95% y menos del 90% del intervalo de confianza (95%), siendo los únicos parámetros que se toman en cuenta para medir la resistencia a los antihelmínticos (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006).

El análisis Excell RESO © se basa en las siguientes fórmulas:

1.- El cálculo para la obtención del porcentaje de reducción

$$R = 100 (1 - \bar{X}_T / \bar{X}_G)$$

Donde:

R= % de Reducción de huevos

\bar{X}_T = Media aritmética del grupo tratado

\bar{X}_G = Media aritmética del grupo testigo (sin tratar)

2.- Cálculo para el intervalo de confianza (95%) se realizó siguiendo la media aritmética.

Límite de Confianza

Superior

$$100 [1 - \bar{X}_T / \bar{X}_G \exp (-2.048\sqrt{y^2})]$$

Inferior

$$100 [1 - \bar{X}_T / \bar{X}_G \exp (+2.048\sqrt{y^2})]$$

Donde:

\bar{X}_T = Media aritmética del grupo tratado.

\bar{X}_G = Media aritmética del grupo testigo (sin tratar).

y= Varianza de reducción.

Criterio de clasificación

RESISTENTE: Si R es menor de 95% y si el límite de Intervalo de Confianza (95%) es menor a 90%.

SOSPECHOSO: Cuando solo uno de los criterios se cumple

SUSCEPTIBLE: Si no se cumple alguno de los dos criterios antes mencionados.

3.7. Determinación de Resistencia Antihelmíntica por PCR-alelo-específico**3.7.1. Coprocultivo**

Se realizó la técnica de coprocultivo en palangana para la obtención de larvas infectantes (L₃). Posteriormente, se eliminó la segunda muda de L₃ con hipoclorito de sodio (0.187%) y detritus fecales con gradientes de sacarosa (40%) y centrifugación (2500 r.p.m.). Finalmente, se formaron pellets de 10 a 30 L₃, y se conservarán a -20 C hasta su uso. El coprocultivo en palangana para la obtención de L₃ se realizó por fecha de muestreo (días pre-tratamiento y pos-tratamiento), por rebaño

y por grupo experimental. En el Laboratorio del CENID-PAVET del INIFAP, se realizaron las técnicas para el análisis molecular.

3.7.2. Extracción de ADN genómico (ADNg)

El ADN genómico (ADNg) de L₃, fue aislado con un kit comercial de extracción para tejido adaptado a nematodos siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó la cuantificación de cada muestra para determinar la concentración de ADNg. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso. Así mismo, se utilizaron muestras controles de ADNg de poblaciones de NGI susceptibles y resistentes a Bencimidazol del CENID-PAVET, INIFAP.

3.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La detección de la mutación en el codón 200 del gen de la β -Tubulina se realizó mediante PCR alelo-específico siguiendo la metodología citada por Silvestre y Humbert (2000) y Winterrow et al., (2003). Por tratarse de una técnica más sensible para detectar la Resistencia

Antihelmíntica, en el Laboratorio del CENID-Pavet del INIFAP se cuantificó por este método el cual se describe en el Anexo II.

El Genotipado, se llevó a cabo por PCR de punto final utilizando iniciadores específicos para determinar los géneros de nematodos presentes en la infección parasitaria, siguiendo la metodología de Encalada *et al.*, (2014).

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de la encuesta

En todos los casos, el entrevistado fue el propietario de los animales, y lo que ellos manifestaron fue lo que registró el entrevistador.

4.1.1. Tamaño de los rebaños

Se muestrearon 10 unidades de producción con un total de 868 ovinos, de los DDR de Zacatlán, Cholula, Tehuacán y Teziutlán. La media de la población por rebaño fue de 87 animales, con un rango de 20 a 160 (Figura 5).

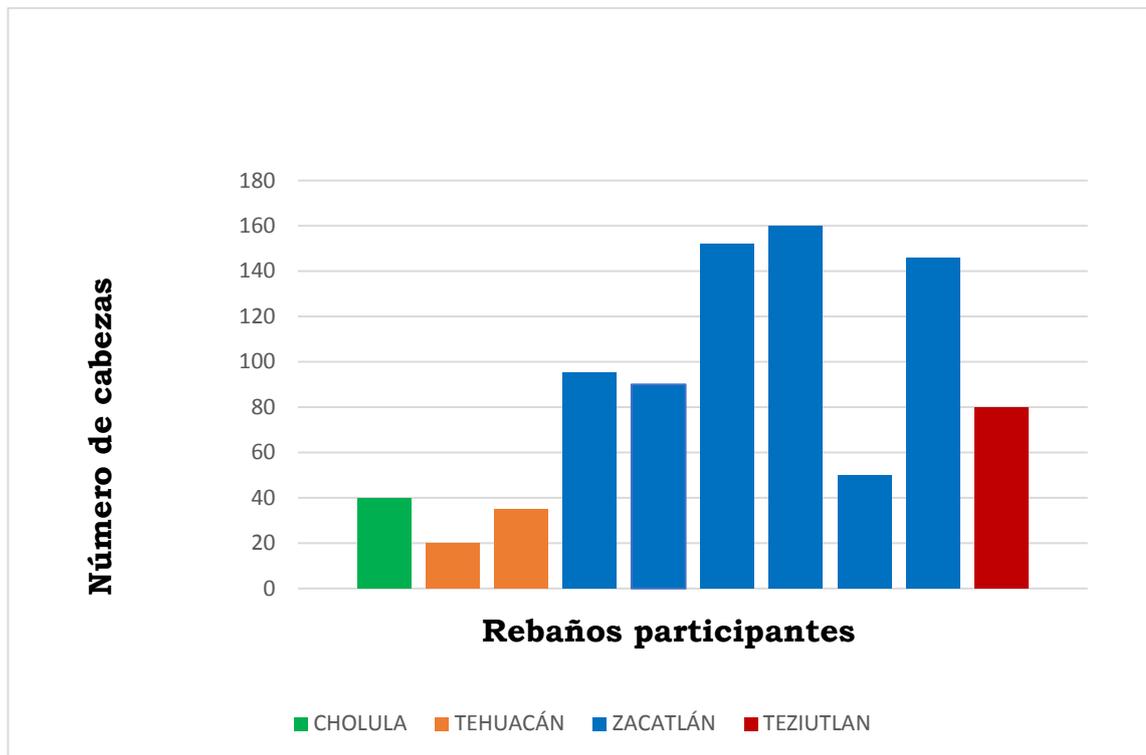


Figura 5. Población ovina por unidad de producción por DDR.

4.1.2. Composición racial

Predominan los animales con mezcla de razas (cruzas), tanto de razas de lana como razas de pelo. En el DDR Zacatlán se encuentran los animales con mayores características de raza pura (Cuadro 9).

Cuadro 9. Razas predominantes en los rebaños en estudio

Raza o fenotipo	N° de rebaños	%
Hampshire	4/10	40
Cruzas de razas de Pelo (Pelibuey, Dorper, Katahdin)	4/10	40
Dorper/Katahdin	1/10	10
Cruzas de razas de lana (Suffolk, Hampshire)	1/10	10

4.1.3. Sistema de producción

El 70 % de los ovinocultores tienen un sistema de producción extensivo, realizan el pastoreo entre 6 y 10 horas al día basando su alimentación en el consumo de pastos nativos en potreros propios y comunales (Figura 6).

El 30% restante, mantienen a sus animales en un sistema semiextensivo (Figura 7), dependen del pastoreo, pero complementan en época crítica y suplementando corderos en la engorda que se realiza de forma estabulada. Todos manifiestan que en la época de frío reducen

el tiempo de pastoreo para evitar la exposición prolongada de los animales a las bajas temperaturas y precipitaciones.

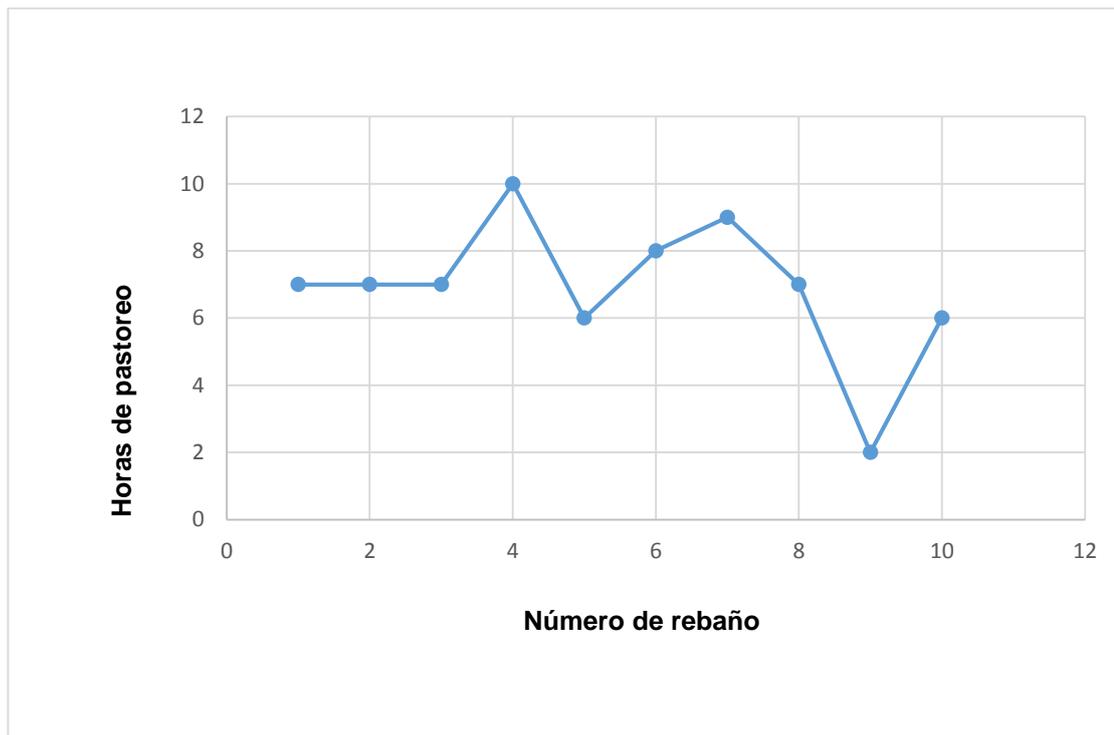


Figura 6. Tiempo que cada rebaño dedica al pastoreo.



Figura 7. Rebaño en sistema semiextensivo.

4.1.4. Productos utilizados como complemento al pastoreo

Los productos utilizados son aquellos esquilmos que poseen de sus cultivos como el tlazole (planta del maíz), pajas de cebada o avena, forrajes que cultivan para tal fin como la avena forrajera que suministran achicalada, maíz grano que lo ofrecen quebrado o molido. Solo el 30 % de los productores compran pastas oleaginosas y/o granos para balancear raciones que ofrecen a sus animales (Cuadro 10).

Cuadro 10. Productos que se ofrece a los ovinos como complemento alimenticio.

N° de Rebaños	Tlazole, pajas	Maíz grano	Avena forrajera	Brócoli, calabaza	Caña japonesa	Alimento balanceado
1						
2		X		X		
3	X			X		
4						X
5	X		X			
6	X		X			
7			X			X
8	X	X	X			
9	X	X	X			X
10					X	

4.1.5. Tratamiento para el control de NGI

El total de los rebaños son tratados con algún producto antihelmíntico comercial. Los más utilizados son a base de derivados del Bencimidazol (BZ) y Lactonas macrocíclicas (LM), en menor grado el uso de Imidazotiazoles y Salicilanilidas (Figura 8).

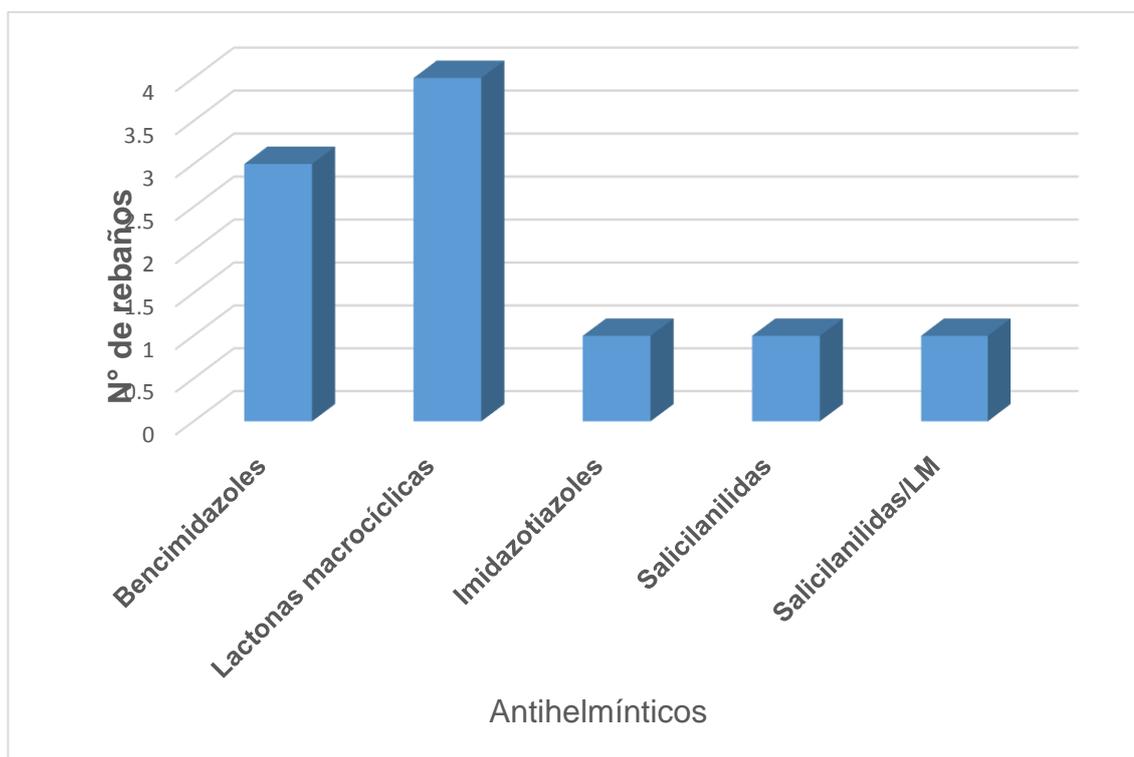


Figura 8. Productos utilizados para el control de nematodiasis en los rebaños donde se realizó el estudio.

En cuanto a la pregunta de cada cuando desparasitan contra nematodos gastrointestinales, manifiestan los productores que lo realizan de 1 a 3 veces al año (Figura 9), sin embargo, no acuden al laboratorio para el diagnóstico, no tienen un criterio para la elección del producto a utilizar, solo si observan que no hay un efecto deseado incrementan la dosis y/o eligen otro o el que le recomienden en el comercio donde lo adquieren. No realizan el pesaje previo al tratamiento para aplicar la dosis exacta, solo a la observación de cada animal le calculan a su experiencia el peso corporal.

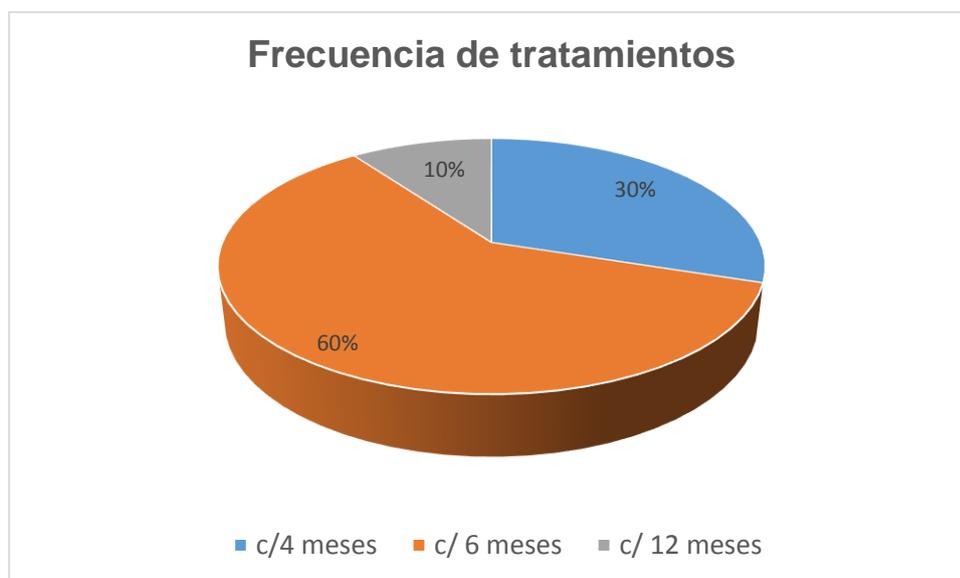


Figura 9. Frecuencia de aplicación de tratamientos antihelmínticos.

Ningún productor a definido con apoyo de resultados de laboratorio, la periodicidad que requieren para tratamiento de control de nematodosis sus animales y desconocen a que se refiere el término de resistencia antihelmíntica.

4.1.6. Otras enfermedades o signos que se presentan en los rebaños

Además de los problemas por parasitosis, los productores manifestaron que se presentan enfermedades del tracto respiratorio, infecciones podales, desnutrición, edema submaxilar y anemia (Figura 14). Solamente el propietario de la unidad de producción número uno

respondió que no detectaba otros problemas de salud en sus animales. No acuden a laboratorio de diagnóstico. El 80% no consultan a profesionales del área, solamente tienen asesoría cuando el gobierno del estado les asigna un técnico extensionista.

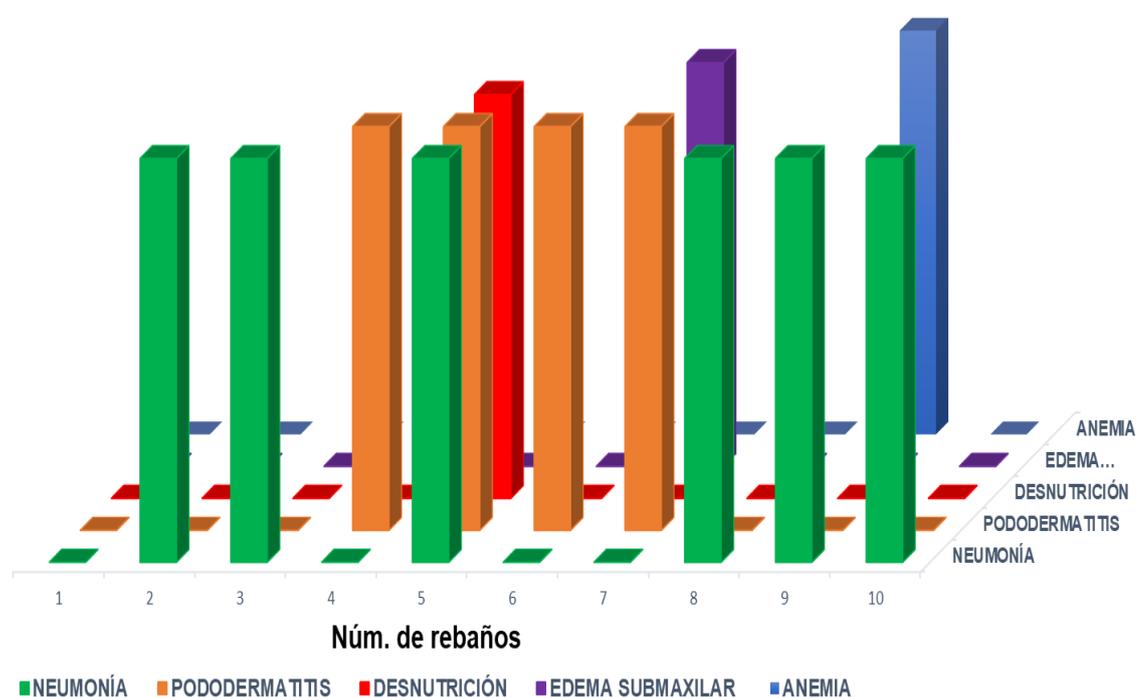


Figura 10. Otras enfermedades que se presentan en los rebaños.

Al preguntar por la época de presentación de las enfermedades, los productores definen las épocas de Frío (meses de octubre a febrero), Invierno (meses de diciembre a marzo) and Sequía (meses de diciembre a mayo) (Figura 11).

No aplican bacterinas o vacunas para prevenir enfermedades, solo mencionan que esporádicamente aplican reconstituyentes (vitaminas) a los animales que notan con un retraso en el desarrollo. El productor de la unidad de producción número 1 no definió época porque manifestó que no se le enferman o mueren, solo cree tener problemas de parasitosis.

Cinco unidades de producción identifican la época de Frío como la época que se presentan más enfermos y muertes; dos unidades de producción ubicadas en la región de Zacatlán, identifican una época más larga que la definen como sequía, al parecer al escasear los pastizales, tienen problemas de desnutrición y con ello se predispone a la presentación de otras enfermedades y defunciones; dos unidades de producción de la región de Zacatlán, identifican el invierno, siendo una época de menos duración.

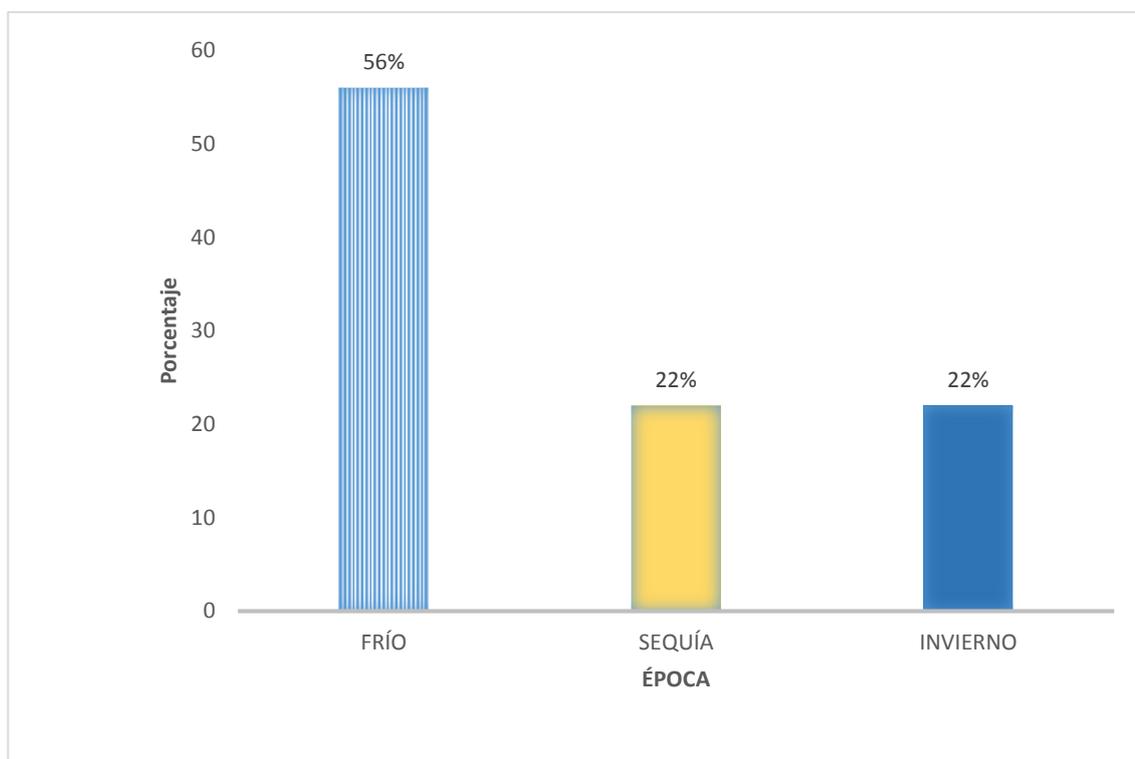


Figura 11. Épocas de presentación de enfermedades en los rebaños.

La mortalidad en el rebaño la desconocen porque no llevan registros productivos. Al preguntar sobre el porcentaje de mortalidad, las respuestas fueron desde el 0 hasta el 10% en adultos y desde el 1 hasta 20% en corderos.

4.1.7. Instalaciones y manejo del rebaño

Todas las instalaciones cuentan con techado de lámina galvanizada en buenas condiciones, el 50% de las unidades de producción tienen piso de tierra, el 30% de concreto y el 20% tienen una parte de tierra y una parte de concreto.

Las paredes y divisiones de los corrales cumplen su función aun cuando las construyen de diferentes materiales, el 60% de las unidades de producción tienen construcciones de mampostería, todas ellas están ubicadas en el DDR de Zacatlán. El 20% utiliza malla borreguera y madera para delimitar y dividir sus corrales. El 20% de las unidades de producción utiliza solo malla borreguera.

Los apriscos están provistos de comederos contruidos con madera y bebederos que son depósitos de plástico algunos adaptados para tal fin, otros poco funcionales y provocan pisos con gran cantidad de humedad. Al momento del encierro se dividen en grupos los animales, lotes conformados como tal en base a edad o a estado fisiológico, a

excepción de los corderos machos destinados a la engorda, todos los animales pastorean juntos guiados por un pastor.

Las ovejas se aparean desde el mes de mayo, El 20% de los productores contratan técnico para realizar la inseminación artificial con protocolos que incluyen el uso de hormonales (Figura 12).



Figura 12. Primas y futuros sementales producción por Inseminación artificial

4.1.8. Procedencia de animales que adquieren para pie de cría

Todos los productores adquieren animales en distintos DDR, con el objetivo de mejorar la genética en su unidad de producción. En la figura 13 se puede apreciar la procedencia y el porcentaje de los animales adquiridos por DDR. Los productores del DDR de Tehuacán los adquieren principalmente de San Pablo Tepetzingo, Tehuacán. Los productores del DDR de Teziutlán los adquieren principalmente en Hueytamalco Los productores del DDR de Cholula adquieren animales principalmente de Tepeaca, Pue. Los ovinocultores del DDR de Zacatlán, adquieren animales, principalmente Sementales en Singuilucan, Hidalgo (Figura 14)., y en la misma región de Zacatlán (Chignahuapan).

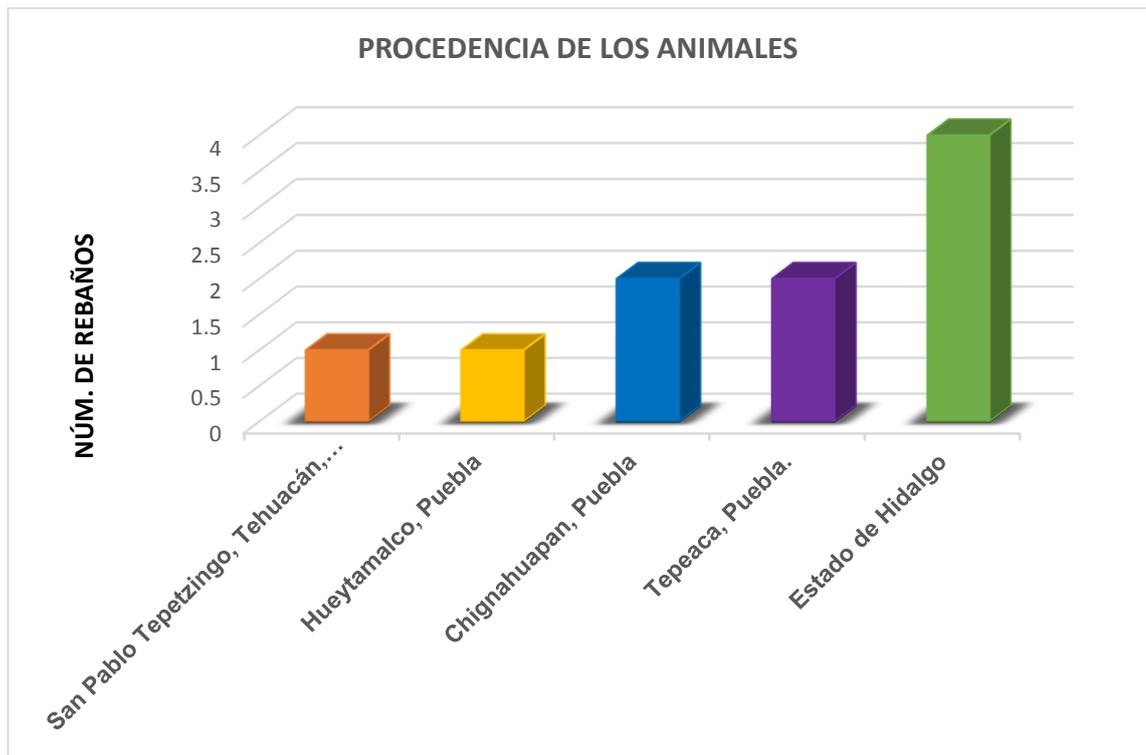


Figura 13. Procedencia de los animales.



Figura 14. Adquisición de sementales en el Edo. De Hidalgo.

4.2. Resultados de la prueba de campo para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica

En el Cuadro 11 se reportan los resultados de la reducción de huevos por gramo de heces de las pruebas pre-tratamiento y pos-tratamiento de los grupos I Testigo y II Tratado con Albendazol, 5 mg /kg de peso corporal, nos dio como resultado la eficiencia del producto aplicado y el estado de la población de nematodos gastrointestinales parásitos de ovinos de cada unidad de producción considerada en el estudio, con relación a la resistencia antihelmíntica.

Cuadro 11. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en el DDR II Zacatlán-Puebla.

No. Rebaños	Control		Tratamiento		I.C. 95 %		% Reducción de HPG	Estado
	N	\bar{X} HPG	N	\bar{X} HPG	Límite superior	Límite inferior		
4	11	236	11	523	67.00	0.00	0.00	R
5	11	336	11	155	90.00	0.00	54.00	R
6	11	3500	11	2400	85.00	0.00	31.00	R
7	14	2643	11	1900	83.00	0.00	28.00	R
8	11	1527	11	109	98.00	79.00	93.00	R
9	15	3427	15	813	87.00	56.00	76.00	R

N = número de animales
confianza al 95%

R = resistente \bar{X} = media aritmética I.C. 95 %= Intervalo de
HPG = número de huevos por gramo de heces

Los resultados de la Prueba de Campo, identifican poblaciones de NGI resistentes al producto utilizado (ABZ), todos los rebaños presentan esa condición.

Los resultados que se obtuvieron del porcentaje de reducción de HPG del DDR VIII se presentan en el cuadro 12. El rebaño número 2, resultó con poblaciones de NGI susceptibles al Albendazol por lo que el tratamiento con este fármaco tiene efecto esperado. El rebaño número 3 posee poblaciones tanto resistentes como susceptibles por lo que se diagnostica su estado como sospechoso. Ambos rebaños se localizan en la región de Tehuacán.

Cuadro 12. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en el DDR VIII Tehuacán-Puebla.

No. Rebaños	Control		Tratamiento		I.C. 95 %		% Reducción de HPG	Estado
	N	\bar{X} HPG	N	\bar{X} HPG	Límite superior	Límite inferior		
2	10	770	10	5	100.00	94.00	99.00	S
3	11	1150	11	27	100.00	85.00	98.00	RS

N = número de animales **S** = susceptible **R** = resistente **RS** = sospechoso

\bar{X} = media aritmética **I.C. 95 %** = Intervalo de confianza al 95%

HPG = número de huevos por gramo de heces.

Los resultados del cuadro 13 muestra que las poblaciones del rebaño 1 y 10 que presentan resistencia a Albendazol, este producto resulta ineficaz para el tratamiento de NGI de las poblaciones que actualmente cuentan.

Cuadro 13. Porcentaje de reducción de cuentas de huevos, posterior al tratamiento con Albendazol (5 mg/kg) en DDR V Cholula-Puebla y DDR III Teziutlán-Puebla.

No. Rebaños	Control		Tratamiento		I.C. 95 %		% Reducción de HPG	Estado
	N	\bar{X} HPG	N	\bar{X} HPG	Límite superior	Límite inferior		
1	11	64	11	18	94.00	0.00	71.00	R
10	10	1430	10	840	68.00	0.00	41.00	R

N = número de animales
de confianza al 95% **R** = resistente **\bar{X}** = media aritmética **I.C. 95 %** = Intervalo de confianza al 95%
HPG = número de huevos por gramo de heces.

Como se observa en la Figura 15, solo la población de NGI del rebaño número 2 se diagnostica susceptible (SS) al tratamiento con Albendazol, que se aplicó de acuerdo al peso corporal, a una dosis de 5 mg/ kg de peso vivo por vía oral. El rebaño número 3 se diagnostica como sospechoso (RS) porque solo cumple con uno de los criterios que exige la prueba (%R I.C. menor al 90%) para considerarse resistente (RR).

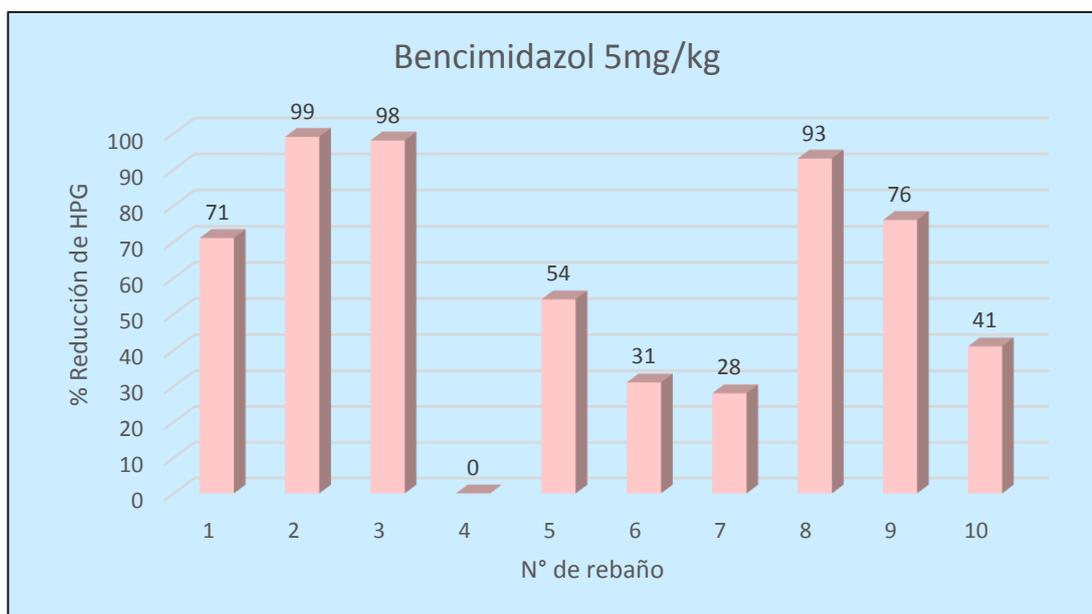


Figura 15. Porcentaje de reducción de HPG de NGI al tratamiento con Albendazol en los rebaños donde se realizó el estudio.

En el cuadro 14 se presenta la evaluación en forma concreta, considerando los criterios para el diagnóstico de poblaciones de NGI resistentes a antihelmínticos.

Cuadro 14. Clasificación de la Resistencia Antihelmíntica de acuerdo a los criterios de la Prueba de Reducción de Huevos en heces (FECRT).

CRITERIOS				
N° de rebaños	%R <95%	I.C. (95%) <90%	CLASIFICACIÓN	ESTADO
1	71	94/0	RESISTENTE	RR
2	99	100/94	SUSCEPTIBLE	SS
3	98	100/85	SOSPECHOSO	SR
4	0	67/0	RESISTENTE	RR
5	54	90/0	RESISTENTE	RR
6	31	85/0	RESISTENTE	RR
7	28	83/0	RESISTENTE	RR
8	93	98/79	RESISTENTE	RR
9	76	87/56	RESISTENTE	RR
10	41	68/0	RESISTENTE	RR

%R= porcentaje de reducción

I.C.= intervalo de confianza

Los resultados de la Prueba de Campo indican que la resistencia a bencimidazol por parte de los nematodos gastrointestinales en ovinos del estado de Puebla, es preocupante por su alto porcentaje (80%) en las unidades de producción de ovinos que participaron en este estudio (Figura 16).

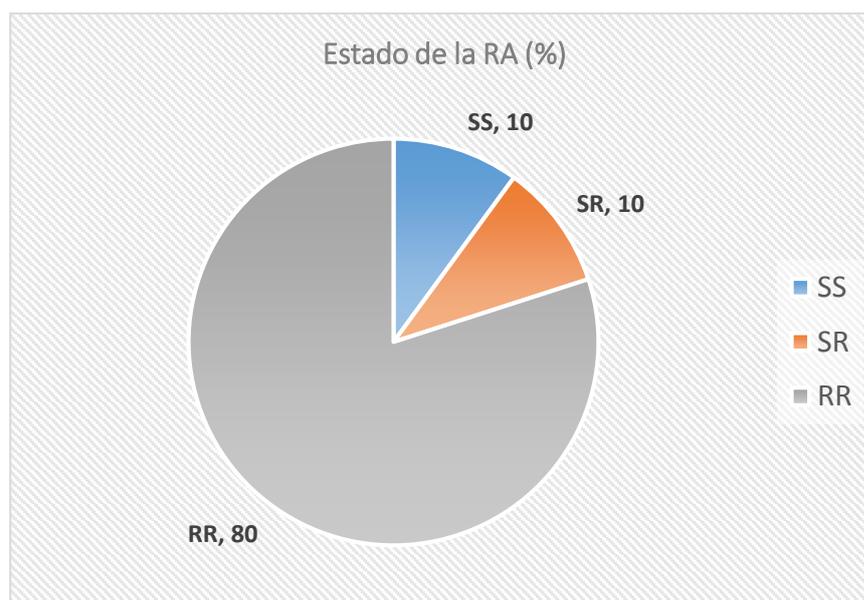


Figura 16. Situación del estado de la resistencia a bencimidazol de las poblaciones de NGI presentes en los rebaños participantes en el estudio.

4.3. Resultados del estudio por medio de reacción en cadena de la polimerasa alelo específico (PCR- AS)) para el diagnóstico de resistencia a bencimidazoles

Actualmente existen técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad que permiten realizar diagnósticos, en Parasitología Veterinaria se ha realizado investigación para disponer de este tipo de herramientas para el diagnóstico de enfermedades, entre ellas las mutaciones que dan origen a la RA a Bencimidazoles por los NGI.

Los resultados que se obtuvieron se presentan en el Cuadro 15, donde las unidades de producción con poblaciones de NGI resistentes (RR) a Bencimidazoles representan el 50 %. El otro 50% lo representan los individuos heterocigotos (RS). Con esta técnica no se identificó ninguna población con individuos solamente susceptibles (SS).

Cuadro 15. Resultado de RA a Bencimidazoles por PCR-AS

N° de rebaño	RA		RESULTADO	ESTADO
	RR	SS		
1	X	X	RS	SOSPECHOSO
2	X	X	RS	SOSPECHOSO
3	X	X	RS	SOSPECHOSO
4	X		RR	RESISTENTE
5	X		RR	RESISTENTE
6	X		RR	RESISTENTE
7	X		RR	RESISTENTE
8	X	X	RS	SOSPECHOSO
9	X	X	RS	SOSPECHOSO
10	X		RR	RESISTENTE

RR=homocigoto resistente RS= heterocigoto resistente SS= homocigoto susceptible

4.4. Genotipificación de los géneros de NGI presentes en las poblaciones que parasitan los ovinos del presente estudio

Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR- punto final) para la identificación de géneros de NGI presentes y relacionados con la resistencia antihelmíntica. El estudio se realizó por rebaño, por grupo experimental y por pre-tratamiento y pos-

tratamiento. En todas las unidades de producción a excepción del rebaño 8, existen más de un género presente, como se muestra en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Géneros de nematodos identificados por genotipo presentes en las poblaciones de NGI por rebaño en estudio en el pre-tratamiento (día 0).

N°. de Rebaños	Coope- ria	Haemon- chus	Trichostron- gylus	Teladorsa- gia	Oesophagos- tomum
1	X	X	X	X	
2	X	X	X	X	
3	X	X	X		
4		X	X		
5	X	X	X		
6		X	X		X
7		X	X		
8			X		
9		X	X	X	
10	X	X	X	X	

Sombreado= Rebaños localizados en la región de Zacatlán

Como puede observarse en la región de DDR II-Zacatlán, solo en el rebaño 9 se encontró el género *Teladorsagia* (antes *Ostertagia*), sin embargo, fue la única región donde se identificó el género *Oesophagostomum* (rebaño 6). El género *Trichostrongylus* está presente en todos los rebaños y el género *Haemonchus* es el segundo más frecuente ya que solo en el rebaño 8 no se identificó.

En el cuadro 17 se presenta los resultados obtenidos en la identificación de los géneros de NGI presentes en el muestreo pos-tratamiento, en los rebaños 1 y 2, el género *Teladorsagia* ya no se identifica en el grupo tratado (T II ABZ), por lo que podemos pensar que se trata de poblaciones susceptible al producto utilizado (ABZ).

El género *Trichostrongylus* no se identifica en las muestras de los animales tratados de los rebaños 5, 6 y 9, por lo que podemos entender que, a pesar de ser el género presente en todos los rebaños, aún existen cepas susceptibles al Albendazol. Para el caso del género *Oesophagostomum*, la única población identificada en el rebaño 6 se comportó como susceptible al tratamiento del Albendazol, al no ser identificada en el muestreo pos-tratamiento.

Uno de los resultados más preocupante de este estudio, es que el género *Haemonchus* se identifica como resistente en todos los rebaños en que se encuentra, ya que en los tratamientos con albendazol no fue afectado. Su hábito de alimentación (hematófago), sigue causando serios problemas productivos, así como de predisposición a la presentación de otras enfermedades que ocasionan bajas en los rebaños.

Cuadro 17. Géneros de NGI identificados por genotipo en el muestreo post-tratamiento (día 14) por rebaño y grupo experimental.

	Genotipificación				
	<i>Cooperia</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Oesophagostomum</i>
Rebaño 1					
T I (Testigo)	X	X	X	X	
T II (ABZ)	X	X	X		
Rebaño 2					
T I (Testigo)	X	X	X	X	
T II (ABZ)	X	X	X		
Rebaño 3					
T I (Testigo)	X	X	X		
T II (ABZ)	X	X	X		
Rebaño 4					
T I (Testigo)		X	X		
T II (ABZ)		X			
Rebaño 5					
T I (Testigo)		X	X		
T II (ABZ)		X			
Rebaño 6					
T I (Testigo)		X			
T II (ABZ)					
Rebaño 7					
T I (Testigo)		X			
T II (ABZ)		X	X		
Rebaño 8					
T I (Testigo)			X		
T II (ABZ)			X		
Rebaño 9					
T I (Testigo)		X		X	
T II (ABZ)		X		X	
Rebaño 10					
T I (Testigo)	X	X	X	X	
T II (ABZ)	X	X	X	X	

DDR V-Cholula
 DDR VIII-Tehuacán
 DDR II Zacatlán
 DDR III-Teziutlán
 Cepas Susceptible

4.5. Resistencia Antihelmíntica a Bencimidazol y su relación con los Indicadores de fenotipo para la desparasitación selectiva contra NGI

En la metodología de la Desparasitación selectiva contra nematodosis, los valores de los indicadores de fenotipo son utilizados para seleccionar los ovinos que requieren tratarse con un antihelmíntico y los ovinos que no requieren tratamiento. Al realizarse periódicamente la evaluación de indicadores de fenotipo, podemos identificar animales que a través del tiempo no han requerido tratamiento, entonces los consideramos fenotípicamente resistentes a nematodosis. Así mismo, se identifican aquellos animales que cada evaluación, requieren tratamiento presentando altas cargas de HPG y valores de indicadores de fenotipo que nos permiten identificarlo como un animal altamente susceptible a las nematodosis. Para el control de la RA, actualmente, una de las propuestas que consideramos de aplicación práctica en campo, es la desparasitación selectiva en base a indicadores de fenotipo. Durante este estudio, se confirma la utilidad de esta metodología con los siguientes resultados (Cuadro 18).

Cuadro 18. Relación de los Valores de HPG y % VCA de los ovinos participantes en el estudio.

Rango de HPG	\bar{X} HPG	\bar{X} %VCA	(N)
≤ 500	329.6 \pm 109.8	33.7 \pm 4.5	81
> 500< 2500	1354.6 \pm 595	31.1 \pm 4.8	130
>2500	6951.9 \pm 4606.5	27.9 \pm 5.6	105

HPG= Huevos por gramo de heces Celular Aglomerado %VCA= Porcentaje de Volumen
N= Número de observaciones

El % VCA sigue siendo un buen indicador de la presencia de NGI, debido a que el género *Haemonchus* es el predominante en todas las poblaciones de NGI de los ovinos participantes en el estudio. En relación a la RA es el género que permanece presente en el día 14 (análisis pos-tratamiento).

En el Cuadro 19 se presenta la relación de la evaluación de la mucosa palpebral con la carga parasitaria (HPG). En donde se puede apreciar que cuando un animal tiene una carga parasitaria menor el color de la mucosa palpebral reflejada es de una tonalidad más fuerte (rojo- rosa fuerte), a comparación de un animal con una carga de HPG elevada el color de la mucosa palpebral es más pálido.

Cuadro 19. Relación de los Valores de HPG y evaluación de la coloración de la mucosa palpebral de los ovinos participantes en el estudio.

Evaluación de la mucosa	\bar{X} HPG	(N)
1	1318.8±1353.8	72
2	2764.1± 3888	192
3	5905± 6935.8	52

HPG= huevos por gramo de heces N= número de observaciones
Evaluación de la mucosa palpebral= 1 (rojo-rosa fuerte)
2 (rosa pálida) 3 (rosa muy pálido a casi blanco).

En el Cuadro 20 se presenta la relación de VCA y la condición corporal. La condición corporal de los animales, no solo depende de las cargas parasitarias que presente, sino que se ve muy influenciada por el majeño nutricional y estado fisiológico en el momento de la calificación, sin embargo, ha demostrado ser mejor indicador que el peso corporal debido a que la metodología empleada, está relacionada con la cantidad de reservas del animal.

Cuadro 20. Relación de los Valores de VCA y la condición corporal de los ovinos participantes en el estudio.

Calificación de la CC	\bar{X} %VCA	(N)
1- 1.5	26.0± 5.5	26
2.0	30.1± 5.6	65
2.5	30.4± 4.6	79
3.0- 4.0	32.0± 5.5	122

CC= Condición Corporal (escala 1 a 5)
%VCA= Porcentaje de volumen celular aglomerado
N= número de observaciones

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se presentó Resistencia Antihelmíntica a Bencimidazoles en las poblaciones de Nematodos Gastrointestinales que parasitan los ovinos estudiados en los cuatro Distritos de Desarrollo Rural del estado de Puebla, diagnóstico a partir de la Prueba de reducción del conteo de huevos en heces (FERCT) (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006).

Se presentó Resistencia Antihelmíntica a Bencimidazoles en las poblaciones de Nematodos Gastrointestinales que parasitan los ovinos estudiados en los cuatro Distritos de Desarrollo Rural del estado de Puebla, al analizar por medio de la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa por alelo específico (PCR-AS).

Los géneros de nematodos gastrointestinales *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Teladorsagia*, fueron los que se identificaron en el estudio pos-tratamiento con BZ, a partir de la técnica molecular Reacción en cadena de la Polimerasa punto final (PCR-punto final).

5.2. Recomendaciones

Las recomendaciones para el retraso de la RA en NGI de ovinos en el estado de Puebla, y control de nematodiasis comprende:

El uso del laboratorio de diagnóstico para conocer la carga parasitaria y el tipo de parasitosis que se está presentando en la unidad de producción.

El uso adecuado de los antihelmínticos que existen en el mercado, en cuanto a elección, dosificación y frecuencia de aplicación.

El manejo adecuado de la alimentación como suplementación energética y proteica de acuerdo a la edad y estado fisiológico de los ovinos y considerando la disponibilidad de forraje durante el pastoreo. Realizar la desparasitación selectiva en base a indicadores de fenotipo,

que en el presente trabajo confirman estar relacionados con las nematodiasis y son una herramienta efectiva. La desparasitación selectiva permite reducir el uso de antihelmínticos e identificar los ovinos resistentes a nematodos gastrointestinales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arece G.; M. Mahieu; H. Archimède; G. Aumont; M. Fernández; E. González; O. Cáceres, y A. Menéndez B. 2004. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of gastrointestinal nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*. 61-67 pp.
- Arroyo B, FL.; Mendoza G, P; López A, ME.; Liébano H.; E; Vázquez P, V.; Miranda M, E.; Ortiz de Montellano Nolasco, AM. 2008. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas Técnica Pecuaria en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Mérida, México. Vol. 46, No. 2, 217-223 p.
- Bonino Jorge y Mederos América. 2003. Resistencia antihelmíntica en ovinos. *Revista del plan agropecuario*. 42-44 p.
- Barreto T, H. 2014. Determinación de la prevalencia de *haemonchus contortus* en ovinos en el Municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo, México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coahuila, México. 31 p.
- Campos, R, R.; Herrera, R.D.; Quiroz, R.H. 1992. Diagnóstico in vitro de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol, y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey. *Vet. Méx.* 23 (1): 51-56 p.
- Cervantes R, M.T.2005. Detección de resistencia a antihelmínticos en ovinos infectados naturalmente con nematodos gastroentericos y el uso del sistema FAMACHA como método alternativo de control. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuatitlán. 97 p.
- Coles G, C. 1990. Larval development test for detection of antihelmintic nematodes. *Research in veterinary Science*. Vol.45. 50-53 p.
- Coles, G.C.; Bauer, C.; Borsteede, F.H.M.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P). Methods for the detection of

anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44: 35-44 p.

- Coles, G, C; F. Jackson; W. Pomroy; R. Prichard; G. von SamsonHimmelstjerna; A. Silvestre; M.A. Taylor y J. Vercruysse. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology.* 167–185 p.
- Cristel, S. L.; Suárez, V.H. 2006. Resistencia antihelmíntica: evaluación de la prueba de reducción del conteo de huevos RIA. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, vol. 35, No. 3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Buenos Aires, Argentina. 29-43 p.
- Cuéllar O, A. 2007. Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Nematodos Gastroentéricos Congreso de Especialista en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. Departamento de Ciencia Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. 1- 12 p.
- Dublín D, R.; Roque L, E.; Estrada O, J. 2012. Eficacia del extracto de las hojas del Neem *Azadirachta indica* A. Juss en el control de nemátodos gastrointestinales en ovino Pelibuey. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. Veterinaria Organización* Málaga, España. Vol. 13, No. 7, 1-16 p.
- Encalada M, L; Tuyub S, H; Ramirez V, G; Mendoza G, P; Aguilar M, L; López A, ME. 2014. Phenotypic and genotypic characterisation of *Haemonchus spp.*, and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, México. *Veterinary Parasitology.* 246-254 p.
- Esteban A, D.; González G, R.; Garduza A, G; Ojeda R, NJ.; Reyes M, F.; Gutiérrez C, S. 2013. Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. *Revista de la Facultad de Medicina y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá* Bogotá, Colombia. Vol. 60, No. 3, 169-181 p.
- FAO. 2003. FAMACHA ©. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal, 157: 32-33 p.

- Fiel, CA. 2005. Manual técnico: Antiparasitarios internos y endectocidas de bovinos y ovinos. Extractado de: Manual Técnico de Biogénesis, Bs.As. Veterinarianism, UNICEN- Tandil. 1- 17 p.
- García H, C. 2016.Efecto nutraceutico de los taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis (Kunth) benth* sobre la infestación parasitaria y repuesta productiva de borregos pelibuey. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México. 67 p.
- González R, JL. 2007. Caracterización fenotípica de corderos pelibuey resistentes y susceptibles a *Haemonchus contortus* bajo condiciones naturales. Tesis Profesional. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tecamachalco Puebla. 37 p.
- González G, R.; Córdova P, C; Torres H, G.; Mendoza G, P.; Arece G, J. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. Vet. México.Vol.42, No. 2, 125- 135 p.
- González O, M. 2011.Evaluación In Vitro de la Resistencia hacia el Benzimidazol de dos poblaciones de *Haemonchus contortus* aisladas en el estado de Chiapas. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. 28 p.
- Herrera O, LA.; Velasco A, JJ.2012. Evaluación de cuatro antihelmíntico sobre parásitos gastrointestinales de ovinos en la hacienda el Rosario. Tesis Profesional. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia. 135 p.
- Houdijk, J.G., Kyriazakis, I., Kidane, A., Athanasiadou, S., 2012. Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. Veterinary Parasitology. 38-50 p.
- Liébano H, E.; López A, ME.; Mendoza G, P; Aguilar M, L.2011.Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Publicación especial No.2. Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP). Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET). Jiutepec, Morelos, México. 48p.

- López A, ME.; Mendoza G, P.; Aguilar M, L.; Liébano H, E.2010. Buenas prácticas en el manejo de antihelmíntico para el control de parásitos en rumiantes. Folleto técnico No.8. Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Jiutepec, Morelos, México. Av. Progreso No. 5. Col.Barrio de Santa Cantarina, Coyoacán. C.P 04010.México D.F. 38 p.
- López A, ME.; Olazarán J, S.; Mendoza G, P.; Liébano H, E Aguilar M, L.; Liébano H, E.; Vega M, V.2012. Uso de indicadores de fenotipo para la desparasitación selectiva contra nematodos gastroentéricos en ovinos en trópico. Desplegable para Productores No.1. Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.
- López A, ME.; Mendoza G, P.; Aguilar M, L 2015. Plantas con uso potencial contra nematodos gastrointestinales de ovinos como alternativa de control. Folleto técnico No.14. Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Jiutepec, Morelos, México.20 p.
- Malan, F.S., Van Wyk, J.A. 1992. The packed cell volume and colour of the conjunctivae as aids for monitoring *Haemonchus contortus* infestations in sheep. In: Proceedings of the South Africa Veterinary Association Biennial National Veterinary Congress. Grahamstown, FAO.
- Márquez L, D. 2003. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Revista Corpoica Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Cundinamarca, Colombia. vol. 4, No. 1, 55-71 p.
- Martínez S, JL.2014. Determinación de *Haemonchus contortus* en muestras de materia fecal de ovinos del municipio de Acambay, estado de México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coahuila, México.43 p.
- Medina, P.; Guevara, F.; La O, M.; Ojeda, N.; Reyes, E. 2014. Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nemátodos gastrointestinales. Estación Experimental de Pastos y

- Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba. Pastos y Forrajes, Vol. 37, No. 3. 257-263 p.
- Miller, C. M.; Waghorn, T. S.; Leathwick, D. M.; Candy, P. M.; Oliver, A. M. B. & Watson, T. G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet. Parasitol.* 186 (3-4):376-381 p.
- Molina F, KA.; Osegueda P, MG.; Conrado M, JJ. 2016. Desparasitación de nemátodos gastrointestinales en ovinos de encaste pelibuey-blackbelly (*Ovis aries L.*) con hoja de Nim (*Azadirachta indica J.*) en el Centro de Capacitación Chinampa, San Salvador, El Salvador. Tesis Profesional. Universidad de el Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Zootecnia. 51 p.
- Montalvo A, X.; López A, ME.; Vázquez P, Vázquez P, V.; Liébano H, E; Mendoza G, P. 2006. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Técnica Pecuaria en México*, Vol. 44, No.1, pp 81-90. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Mérida, México.
- Morales, G; Pino, L.A; Sandoval, E; Florio, J. y Jiménez, D. 2006. Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes, resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño Criollo Río Limón. *Zootecnia Tropical*, 24(3):333-346 p.
- Mora E, B. 2016. Actividad ovicida *in vitro* de dos extractos hidroalcohólicos (hojas y frutos) de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* contra huevos de nematodos gastrointestinales de rumiantes. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario UAEM Temascaltepec. Temascaltepec de González, México. 85p.
- Olazarán J, S. 2005. Efecto de la condición corporal sobre la manifestación del comportamiento estral en ovejas pelibuey mantenidas en clima subtropical húmedo durante dos épocas del año. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Maestría en Ciencias de la Reproducción. México, D.F.p-35.
- Olmedo J, A. 2014. Efecto nutricional y antiparasitario de dos extractos acuosos de árboles forrajeros en ovinos. Tesis Doctoral. Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de México. 108 p.

Olmedo J, A.; Mendoza G, P.; López A, ME.; Reyes G, DE.; Aguilar M, L.; Ramírez V, G. 2015. Uso de plantas medicinales para controlar las lombrices del ganado. Folleto para productores No.2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Jiutepec, Morelos, México. 19 p.

Papadopoulos, E. 2008. "Anthelmintic resistance in sheep nematodes". Small Ruminant Research (76): 99–103 p.

Reyes G, D.E.; López A, ME.; González G, R; Ramírez V,G.; Mendoza G, P.; Olazarán J,S.; Aguilar M, L.; Olmedo J, A. 2016. Identificación quírozdel alelo B del gen de interferón gamma asociado al rechazo de la infección por *haemonchus contortus* en corderos pelibuey. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, Jiutepec, Morelos, México. 3-9 p.

Romero O. 2015. Evaluación de la Condición corporal y edad de los ovinos. Herramienta de manejo animal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. No. 79 Temuco, Chile. 4 p.

Ruiz L, PM. 2015. Efecto del pastoreo de *Plantago Lanceolata* y *Cichorium Intybus* sobre la incidencia de parásitos gastrointestinales en engorda de corderos. Tesis de Magister. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 69 p.

Russel A, JF; Doney and JM, Gunn R, G. 1969. Subjetive assessment of body fat in live sheep. J.Agric Sci.Vol. 72. 451- 454 p.

SIAP-SAGARPA, 2012.

Steffan E, P.; Alberto F, C.; Alberto F, D. 2012. Endoparásitos más frecuentes de los rumiantes en sistemas pastoriles de producción. Ciencia Veterinarias 2. Parasitología 3. Rumiantes. Área de parasitología Facultad de ciencia Veterinarias UNCPBA. 5-112 p.

Sumano L. H. y Ocampo C. L. 1999. Farmacología Veterinaria. 2da edición. McGrawHill Interamericana. 253-276 p.

Taylor, M.; K. Hunt, y K. Goodyear. 2002. "Anthelmintic resistance detection methods". Veterinary Parasitology (103):183–194 p.

- Thienpont, D.; Rochette, F. y Vanparijs, O. 1986. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Janssen Research Foundation, Beerse. 40-43p.
- Ton Ho, JP.2008. Determinación de la resistencia a antihelmínticos de los nematodos gastrointestinales que afectan a los ovinos de una granja del distrito Cayo, Belice. Tesis profesional. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Escuela de medicina Veterinaria.Guatemala.65 p.
- Torres V, Prada, GA, Márquez L, D.2007.Resistencia antihelmíntica en los Nemátodos Gastrointestinales del bovino. Revista de Medicina Veterinaria No. 13: 59-76 p.
- Vázquez P, A.; Bravo P, A.; Mendoza G, P.; Liébano H, E.; Hernández L, I.; Yáñez P, N.; Aguilar M, L.; Ramírez V, G.; Hernández C, E.; Gutiérrez S, I.; López A, ME. 2012. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria. Revisión. Revista Mexicana Ciencia Pecuaria. Vol. 3, No.1, 77- 88 p.
- Zúñiga N, JM. 2015. Comprobación de la capacidad antiparasitaria del extracto de las hojas de Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) en ovinos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. División Regional de Ciencia Animal. Torreón, Coahuila. 46 p.

ANEXOS

ANEXO I. CUESTIONARIO

Nombre del propietario: _____

Domicilio: _____ **Municipio:** _____

Fecha de diagnóstico: _____ **N° Hato:** _____

N° de ovinos	Edad		Sexo		Raza
	Jóvenes	Adulto	M	H	

Sistema de producción: Intensivo () Semi intensivo () Extensivo()

Utiliza suplemento: SI () NO () **Cuál:** _____

Horas de pastoreo: _____ **Lotes:** _____

Alimentación: _____

Control de NGI:

Fecha de tratamiento: _____ **Medicamento:** _____

Dosis: _____ **Frecuencia de tratamiento:** _____

¿Cuándo desparasita lo hace en base al peso? SI () NO ()

Instalaciones m²: _____ **Sombra:** _____ **Sol:** _____

Material de instalaciones: _____

Tipo de piso: Tierra () Cemento () Otros ()

Cuenta con servicios de médico veterinario: SI () NO ()

Diagnóstico de nematodiasis por medio de laboratorio: _____

Que enfermedades se han presentado en el hato: _____

Porcentaje de mortalidad: Adultos: _____ **Corderos:** _____

En qué mes se presenta mayor mortalidad: Lluvia () Sequía () Frío ()

Ha adquirido animales procedentes de otros países /regiones:

SI () NO ()

¿De dónde?: _____ **Son cuarentenados:** SI () NO ()

ANEXO II

TECNICA PARA LA DETECCION DE RESISTENCIA A BENCIMIDAZOL Y GENOTIPIFICACIÓN

Las muestras de heces se maceraron y se homogenizaron con hule espuma y un poco de agua por siete días para que puedan eclosionar los huevos y se desarrollen hasta la larva L3 o larva infectante. Posteriormente se recuperaron las larvas mediante un embudo de Baerman conectado a un tubo de ensaye y se hicieron muñones de la mezcla de heces por 24 horas, al término se filtraron con papel filtro y se recuperaron para lavarlas con sacarosa

LAVADO DE LARVAS CON SACAROSA

- En dos o más tubos de 10 ml (dependiendo de la cantidad de larvas) que contengan 4 ml de SACAROSA al 40%, se deposita el pellet de larvas L₃ sin agua sobre la superficie de la sacarosa. Tener cuidado de no homogenizar.
- Los tubos debidamente balanceados se centrifugan a 3500 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos. Al término en la parte media del tubo se formará un anillo de larvas limpias y al fondo el detritus y desechos sucios.
- Con una pipeta de plástico tomar todo el anillo de larvas limpias y depositarlas en otro tubo de 10 ml limpio.
- Llenar a 10 ml con agua destilada y centrifugar a 2500 rpm durante 2 minutos. Con una pipeta retirar el agua sin homogenizar el pellet de larvas. Repetir todo el paso por un total de 3 veces con la finalidad de eliminar la sacarosa. Al final el tubo debe contener solo el pellet de larvas sin agua.
- Proceder inmediatamente con la escisión de la vaina.

ESCISIÓN DE LA VAINA

- En un tubo de 10 ml preparar previamente 4 ml de solución de Hipoclorito de sodio al 0.187% de la siguiente manera:

AGUA DESTILADA	HIPOCLORITO DE SODIO	VOLUMEN TOTAL
3876 μ l	124 μ l	4000 μ l

NOTA: El Hipoclorito de sodio utilizado es de marca comercial (CLORALEX) y viene a una concentración de 6%.

- Depositar con una pipeta de plástico los 4 ml de hipoclorito de sodio al 0.187% en el tubo que contiene el pellet de larvas L₃ limpias y homogenizar. Tomar el tiempo con un cronometro por un total de 7 minutos.
- Tomar una muestra de 5 μ l en un portaobjetos, visualizar en el microscopio con el objetivo de 10x con la finalidad de ver el momento en que las larvas escinden su vaina protectora.
- Homogenizar el tubo con una pipeta de plástico por lapsos hasta completar los 7 minutos.
- Aforar el tubo a 10 ml de agua destilada y centrifugar a 2500 rpm durante 2 minutos. Con una pipeta retirar el agua sin homogenizar el pellet de larvas Repetir todo el paso por un total de 3 veces con la finalidad de eliminar el hipoclorito de sodio.
- En la última centrifugación al retirar el agua dejar 1 ml aproximadamente y homogenizar, con la pipeta pasar las larvas a un tubo de plástico de 1.5 ml.
- Centrifugar en una microcentrifuga a 2500 rpm por 1 minuto y retirar todo el sobrenadante (agua).
- Proceder inmediatamente a la extracción de ADN o guardar a 20 °C bajo cero hasta que se vaya a utilizar.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realiza con el Kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit de la marca QIAGEN

- Al tubo de 1.5 ml que contiene el pellet de larvas agregar 180 μ l de buffer ATL.
- Agregar 20 μ l de proteinasa K y vortexear vigorosamente e incubar a 56 °C hasta que las larvas o la mayoría estén lisadas. Vortexear ocasionalmente durante el lapso de incubación para ayudar a lisar las larvas.
- Adicionar 200 μ l de buffer AL y vortexear el tubo.
- Adicionar 200 μ l de etanol (96-100%) y mezclar por vortexeo.
- Colocar toda la mezcla incluyendo cualquier precipitado dentro de la mini columna que se encuentra colocada en un tubo colector de 2 ml y que viene dentro del kit.
- Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar el tubo colector junto con lo filtrado.
- Colocar la mini columna en un nuevo tubo colector, adicionar 500 μ l de Buffer AW1, centrifugar por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm). . Descartar el tubo colector junto con lo filtrado.
- Colocar la mini columna en un nuevo tubo colector, adicionar 500 μ l de Buffer AW2, y centrifugar por 3 minutos a 20,000 x g (14,000 rpm) para secar la membrana de la mini columna. Descartar el tubo colector junto con lo filtrado.
- Colocar la Mini columna en un tubo limpio de 1.5 o 2 ml, pipetear 200 μ l Buffer AE directamente en la membrana de la mini columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugar por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para eluir y recuperar el ADN.
- Colocar el tubo en hielo y cuantificar a 260/280 nm. Realizar inmediatamente la PCR o guardar el ADN a -20 °C

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La detección de la mutación en el codón 200 del gen de la β -Tubulina se realizó mediante PCR alelo-específico siguiendo la metodología citada por Silvestre y Humbert (2000) y Winterrow et al. (2003), para ello se realizó un primer PCR con 1 μ l de cada uno de los siguientes oligonucleótidos: Pn1 (5'-GGCAAATATGTCCCACGTGC-3') y Pn2 (5'-GAAGCGCGATACGCTTGAGC-3'), una mezcla maestra comercial (GoTaq®), 100 ng de ADN y agua libre de nucleasas. El primer PCR se desarrolla de la siguiente manera:

- En un tubo de PCR de 0.2 ml realizar la siguiente mezcla

REACTIVO	VOLUMEN/CONCENTRACIÓN
GoTaq PROMEGA	10 μ l
Oligo Pn1 (Fw) 20 μ M	1 μ l
Oligo Pn2 (Rv) 20 μ M	1 μ l
ADN	100 ng
Agua libre nucleasas	C b p 20 μ l

- El tubo o los tubos dependiendo de las muestras a analizar, se colocan en un termociclador con el siguiente programa de ciclado.

PASO		TEMPERATURA en °C	TIEMPO
Desnaturalización inicial		94	5 minutos
Desnaturalización	33 ciclos	94	55 segundos
Alineamiento		60	55 segundos
Extensión		72	55 segundos
Extensión final		72	10 minutos

Posteriormente un segundo PCR (anidado) se llevó a cabo con una mezcla maestra comercial (GoTaq®), el producto del primer PCR, y los siguientes oligonucleótidos para la detección del producto de

resistencia de 250 pb: P1 (5'-GGAACGATGGACTCCTTTCG-3'), P2 (5'-GATCAGCATTTCAGCTGTCCA-3') y un oligonucleótido específico de resistencia P3 (5'-CTGGTAGAGAACACCGATGAAACATA-3'); para la detección del producto de susceptibilidad de 550 pb en tubo por separado se utilizaron los siguientes: P1, P2 y un oligonucleótido específico de susceptibilidad P4 (5'-ATACAGAGCTTCGTTGTCAATACAGA-3')

REACTIVO	VOLUMEN/CONCENTRACIÓN
GoTaq PROMEGA	10 μ l
Oligo Ph1 20 μ M	1 μ l
Oligo Ph2 20 μ M	1 μ l
Oligo Ph3 20 μ M	1 μ l
Oligo Ph4 20 μ M	1 μ l
(Pn1-Pn2)	100 ng
Agua libre nucleasas	C b p 20 μ l

- El tubo o los tubos dependiendo de las muestras a analizar, se colocan en un termociclador con el programa de ciclado del primer PCR.
- Al término, preparar un gel de agarosa al 1% y cargar los productos de PCR en el gel colocado en la cámara de electroforesis, correr el gel a 90 volts durante 50 minutos
- Visualizar el gel en un fotodocumentador o luz ultravioleta.

Al analizar el gel de agarosa en el fotodocumentador se debe visualizar un producto de PCR de 250 pares de bases (pb) en caso de que la cepa de larvas sea resistente (R), un producto de 550 pb en caso que sea susceptible (S) o ambos productos en caso que presente ambos alelos (R/S); puede aparecer un tercer producto de 750 pb inespecífico.

GENOTIPIFICACIÓN

La identificación de los NGI se realizó mediante la técnica de PCR multiplex, siguiendo la metodología de Encalada et al (2014), para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada género citados por Zarlenga et al. (2001), los cuales fueron los siguientes: *Haemonchus* spp. (176 pares de bases (pb) ETS (AF343971) Fw (5'-CATTTTCGTCTTGGGCGATAT3'), Rv(5'TGAGACCGCACGCGTTGATTCCGAA-3'); *Oesophagostomum* spp. (329 pb) ITS-1 (AF344881) Fw (5'-GCAGAACCGTGACTATGGTC-3') ITS 2(AJ006149) Rv(5'GACAAGGAGATCACGACATCAGCAT-3'); *Cooperia* spp. (151 pb) ETS (AF343972) Fw(5'-TCGATGAAGAGTTTTTCGGTGTTC3'), Rv(5'TTCACGCTCGCTCGTGACTTCA-3'); *Trichostrongylus* spp. (243 pb) ITS-2 (S69220) Fw (5'-CAGGGTCAGTGTGCGAATGGTCATTGTCAAATA-3') Rv (5'-CAGGGTCAGTGGTTGCAATACAAATGATAATT-3'); y *Ostertagia* spp. (257 pb) 3'SSrDNA Fw (5'-TAAAAGTCGTAACAAGGTATCTGTAGGT-3') ITS-1 (AF044933) Rv (5'-GTCTCAAGCTCAACCATAACCAACCATTGG-3'). Para la realización del PCR se utilizó una mezcla maestra comercial (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), 1 µl de cada oligonucleótido (Fw y Rv) de cada género, 100 ng de ADN, y agua libre de nucleasas. El programa que se utilizó en el termociclador (C-1000 Touch™, BIO-RAD, California USA) fue el siguiente: desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 33 ciclos de desnaturalización a 94 oC por 55 seg, alineación a 60°C por 55 seg, extensión a 72°C por 55 seg y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio y luz ultravioleta en un fotodocumentador.