

61
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**CINETICA DE ANTICUERPOS DE OVINOS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
Haemonchus Contortus (POBLACIONES RESISTENTES
Y SUSCEPTIBLES A BENCIMIDAZOLES)**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE :
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
MAGDALENA MENDOZA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS :

M.V.Z., M. SC. V. MARIA EUGENIA LOPEZ ARELLANO
M.V.Z. J. ALFREDO CUELLAR ORDAZ

CUAUTITLAN IZCALLI. EDO. DE MEX. 1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

<i>I.</i>	<i>RESUMEN</i>	<i>1</i>
<i>II.</i>	<i>INTRODUCCION</i>	<i>3</i>
<i>III.</i>	<i>MATERIAL Y METODOS</i>	<i>9</i>
<i>IV.</i>	<i>RESULTADOS</i>	<i>15</i>
<i>V.</i>	<i>DISCUSION</i>	<i>18</i>
<i>VI.</i>	<i>CONCLUSIONES</i>	<i>23</i>
<i>VII.</i>	<i>LITERATURA CITADA</i>	<i>24</i>
<i>VIII.</i>	<i>APENDICE</i>	<i>36</i>

RESUMEN

MENDOZA, C. M: *Cinética de anticuerpos de ovinos infestados experimentalmente con H. contortus (Poblaciones Resistentes y Susceptibles a los Bencimidazoles). Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U. N. A. M. bajo la dirección de Ma. Eugenia López Arellano y J. Alfredo Cuellar Ordaz.*

El presente estudio evaluó la cinética de anticuerpos anti-H. contortus resistentes a las bencimidazoles (Herb) y H. contortus susceptibles a los bencimidazoles (Hesb). Se emplearon 40 ovinos de la raza Pelibuey de 6 meses de edad dividiéndose en 4 grupos al azar, grupo testigo A y C con 5 animales cada uno; grupos infestados B y D con 15 animales cada uno, inoculados por vía oral por ovino con 10,000 L3 de H. contortus resistente y susceptible a bencimidazoles, respectivamente. Se realizaron 6 muestreos de heces y suero para pruebas coproparasitológicas (Mc Master) y serológicas (Hemoaglutinación indirecta) cada 7 días durante 6 semanas. Los resultados obtenidos señalan un incremento en la eliminación de huevos en los grupos B y D con un promedio máximo de 10,850 y de 6,490 huevos por gramo para la población resistente y susceptible respectivamente. Los grupos testigo se mantuvieron libres de la infestación. Los resultados serológicos de los animales infestados con la población resistente señalan una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a partir de la 2a. semana posinfestación alcanzando un título de anticuerpos homólogos de 4.5-2.0, en lo que respecta a la población de H. contortus susceptible los títulos de anticuerpos homólogos se observaron estadísticamente significativo ($P < 0.5$) en la 2a. semana de posinfestación con un media y desviación estándar de 3.4(0.6) para

el grupo infestado y 2.8 ± 0.4 para el testigo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre la población de Herb y la población de Hcsb.

INTRODUCCION

Haemonchus contortus es una nemátodo patógeno de la familia Trichostrongylidae, que afecta principalmente a la ovinocultura de México en zonas templadas y subtropicales. Actualmente se desconocen con exactitud las pérdidas económicas causadas por este género, sin embargo existe información presentada por la American of Veterinary Parasitologist (4), quienes describen a las pérdidas económicas como resultado de la lana quebradiza en ovinos, disminución en la ganancia de peso y en algunas ocasiones muerte de los animales, principalmente de los jóvenes.

En base a su morfología éstos nemátodos son fácilmente identificables, miden aproximadamente de 10 a 30 mm de longitud y en su extremo anterior, presentan una lanceta oral la cual le sirve para succionar sangre, además presentan dos espículas cervicales en forma de espina de rosal en el primer tercio de su cuerpo. Los machos tienen un color cremoso uniforme, con una bursa copulatrix grande dividida en tres lobulos, dos laterales y un lobulo dorsal pequeño, el cual contiene un rayo dorsal en forma de "Y" invertida (25, 28).

La identificación de las hembras es en base al color blanquesino del útero entrelazado con el intestino de color rojizo, por lo que también se les conoce como gusanos en forma de "palo de barbería", asimismo, la hembra presenta una lengüeta supravulvar de forma elongada, localizada en la mitad del cuerpo (25, 28).

El ciclo biológico de H. contortus es directo y se divide en una fase no parásita (fuera del hospedero) y una segunda fase parásita (dentro del hospedero). H. contortus presenta cinco estadios evolutivos, de los cuales la larva uno (L1) y la larva dos (L2), se desarrollan en el ambiente externo bajo dos condiciones climatológicas principales: a) temperatura, que va de 25° a 30°C y b) humedad del 70 al 80%, para poder llegar al tercer estadio larvario o larva infestante (L3), la cual resiste temperaturas bajas (4°C) y sequías, gracias a una vaina protectora filariforme con una desviación en el extremo posterior dándole un aspecto de bayoneta. La L3 no se alimenta de sustancias u organismos externos, se mantiene de sus granulaciones alimenticias de reserva (16,22,23).

Cuando el hospedero ingiere la fase infestante, ésta se desarrolla y se convierte en larva cuatro (L4) y larva cinco (L5), dentro de la mucosa abomasal, causando severas lesiones patológicas como son pérdida de la continuidad de la mucosa, irritación mecánica, gastritis hemorrágica, petequias y por lo tanto alteraciones digestivas (1, 14).

Allonby y Urquhart (3), mencionan que un nemátodo adulto de H. contortus es capaz de succionar 0.05 ml. de sangre al día, dejando sangrar la herida posteriormente; asimismo el daño causado por el estilete oral de adulto en la mucosa abomasal; provocando finalmente inflamación, erosiones focales, pérdida de peso y anemia, y sobre todo que los animales infestados continúan eliminando huevos a través de heces, dejando que éstos se desarrollen a larva tres para que se infesten otros animales. En algunos se ha llegado a presentar hemoncrosis fatal, la cual se caracteriza por la palidez extrema de la mucosa conjuntival, cursando con anasarca y degeneración grasa, debido al rápido agotamiento (14, 28).

Debido a estas características y a su alta virulencia, se están realizando en México y en otros países, algunas prácticas de control para evitar la infestación de los animales con H. contortus; estas prácticas consisten en aplicar la rotación de potreros y de combinar bovinos con ovinos, sin embargo no siempre se llevan a cabo, por cuestiones de manejo, espacio y economía, por lo cual se ha optado por el uso de antihelmínticos para el control de las infestaciones parasitarias, aunque por su aplicación inadecuada, ha generado resistencia parasitaria hacia algunos de estos productos, como sucede con los del grupo perteneciente a los benzimidazoles (7, 8).

La resistencia hacia los antihelmínticos se ha definido como la capacidad que poseen algunos nemátodos para desarrollar tolerancia (fisiológica o bioquímica) a los productos químicos desparasitantes después de algunos tratamientos como resultado de su alteración genética, la cual van a heredar subsecuentemente (24).

Soulsby (27), cita que el primer reporte de resistencia a los antihelmínticos fue hecho por Drudge et al., en el año de 1957, en un grupo de ovinos infestados con nemátodos que estuvieron en contacto con la fenotiazina.

Otras notificaciones en la literatura sobre resistencia antihelmíntica son mencionadas por Dash (11), Anderson (5) y Martín et al. (18), quienes reportaron algunos nemátodos como Trichostrongylus colubriformis, Ostertagia spp y Haemonchus contortus resistentes a productos como el levamisol y el oxfendazol, respectivamente. Lejambre et al. (15), reportaron una población de H. contortus resistentes al tiabendazol, morantel y levamisol.

Estudios realizados por campos (8), en Hueytamalco, Pue., en Mocochoá, Tab., y Tizimín, Yuc., en México reportan la resistencia adquirida a los bencimidazoles por una población de H. contortus, lo cual representa un grave problema para la ovinocultura de éstas zonas, puesto que los bencimidazoles son de los compuestos más comúnmente usados en la práctica de la desparasitación (28).

La resistencia antihelmíntica adquirida por H. contortus, ha favorecido el curso del daño causado por éste nemátodo, posiblemente más virulento e inmunogénico. La respuesta inmune humoral, representa una base de importancia en infestaciones con H. contortus, en ovinos adultos y principalmente en los jóvenes. Soulsby (29) y Nguyen (21), mencionan que los animales jóvenes (menores de 6 meses de edad) son más susceptibles a padecer enfermedades por su sistema inmune aún inmaduro.

Uno de los fenómenos inmunológicos más estudiados sobre H. contortus, es el llamado "fenómeno de autocuración", el cual se presenta con relativa frecuencia en diversos lugares del mundo y definido por Stewart (29) como un incremento de anticuerpos homólogos anti-H. contortus así como también la eliminación de los nemátodos adultos ya presentes, inhibición en la eliminación de huevos y cese del metabolismo de la L1 (fenómeno de hipobiosis), durante éste lapso los animales adultos adquieren un corto período de protección inmunológica, causada por una reacción de hipersensibilidad tipo I, principalmente bajo condiciones ambientales externas desfavorables. Pasado este período de protección los hospederos vuelven a ser susceptibles para adquirir la hemoncosis (2, 3, 31).

Miller, *et al.* (19), y Rothwell, *et al.* (26), describen un fenómeno inducido en animales adultos denominado "expulsión inmune", el cual se presenta en ovinos mayores de 8 meses de edad y de ambos sexos. El fenómeno de expulsión inmune se caracteriza por inoculación experimental de dosis pequeñas y continuas de L3 de *H. contortus*, desafiando posteriormente al hospedero con L3 de *H. contortus* observándose un fenómeno de expulsión larvaria después de 48 horas posinfestación por lo cual se sugiere que el mecanismo de expulsión fué causado por cambios histológicos en la mucosa gástrica.

El grado de padecimiento de la hemoncosis está íntimamente relacionado con sus hospederos, como lo señalan diversos estudios realizados con hembras lactantes y periparturientas, a lo que Urquhart (32), llamo "relajación inmunitaria" de periparturientas, observándose un incremento en el número huevos de nemátodos eliminados a través de heces, estimulado por un período de inmunodepresión causado por el incremento de los niveles circulantes de la hormona prolactina principalmente y por algunas hormonas esteroides (12).

El daño causado por la hemoncosis, seguramente representa graves pérdidas económicas y si se suma a ésto la resistencia de *H. contortus* a los bencimidazoles y su respuesta inmonológica aún no definida, posiblemente se tiene un agente parasitario de mayor importancia a la otorgada hasta ahora. Sin embargo, se conoce poco al respecto y considerando la importancia de ello para fines de control y tratamiento se pretende que a través de la detección de la cinética de anticuerpos homólogos anti-*H. contortus* resistentes y susceptibles a los bencimidazoles podemos contribuir para una mejor comprensión del problema parasitario respectivo, mediante estudios de tipo inmunológico como el presente.

OBJETIVOS

Determinar el título de anticuerpos homólogos anti-H. contortus de animales infestados experimentalmente con H. contortus población resistente y susceptible a los bencimidazoles.

MATERIAL Y METODOS

1.1 ANIMALES

1.1.1. OVINOS DONADORES

Se utilizaron dos ovinos de la raza Pelibuey que fueron inoculados con dos poblaciones de H. contortus : uno resistente y otro susceptible a los benzimidazoles designándose como Herb y Hesb respectivamente. La inoculación se realizó para la obtención de heces necesarias en la elaboración de cultivos coprológicos. Los animales donadores provenían del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-Parasitología), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la SARI (INIFAP-SARI), ubicado en Jiutepec, Mor. Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla, Kilómetro 12.5.

1.1.2 OVINOS DE EXPERIMENTACION

Se emplearon 40 ovinos de la raza Pelibuey de 6 meses de edad, los cuales se dividieron al azar en 4 grupos, A, B, C y D; el primer grupo fue designado como grupo testigo o grupo A con 5 animales; el grupo B infestado con la población de Herb, con 15 ovinos; el grupo C infestado con la población de Hesb también con 15 animales y el grupo D designado como testigo con 5 animales. Previo al experimento se determinó que los animales estuvieran libres de nemátodos gastroentéricos, por medio de la técnica de Mc Master (39).

Los animales se mantuvieron aislados en corrales con piso de cemento, cuidando la limpieza para evitar posibles infecciones y se alimentaron con concentrado, alfalfa y agua ad libitum.

1.1.3. CONEJOS

Se emplearon dos conejos de la raza nueva Zelanda para la obtención de suero, mediante punción intracardiaca. El suero se mantuvo en refrigeración hasta su uso en la prueba serológica de Hemoaglutinación indirecta. Los animales se mantuvieron en el CENID-Parasitología Veterinaria y su alimentación fué a base de concentrado y agua.

1.2 METODOLOGIA.

1.2.1 OBTENCION DE LARVAS INFESTANTES DE H. contortus.

Las heces para la obtención de las larvas infestantes (L3) de H. contortus, provenían de los borregos donadores, con las que se realizaron los cultivos correspondientes a las dos poblaciones de H. contortus, susceptible y resistente a bencimidazoles. Los cultivos se elaboraron de la siguiente forma: en palanganas de plástico se colocaron las heces perfectamente maceradas con aserrín estéril y agua destilada, se homogeneizó hasta tener todo incorporado. Las palanganas se cubrieron con una tapa de papel aluminio a la que se le hizo un orificio cubierto con gasa para proporcionar ventilación. A los 15 días de haber puesto los cultivos se obtuvo la L3 a través de la técnica de Baermann (30).

La L3 colectadas se refrigeraron a 4°C durante 1 hora para descartar sobrenadante y poder obtener el sedimento, el cual se lavo por gradientes de densidad con sacarasa (17). Con el mismo método se obtuvieron las larvas necesarias para el inóculo y para la preparación del antígeno de ambas poblaciones.

1.2.2. INFESTACION DE LOS ANIMALES

Se inocularon 10,000 L3 de H. contortus suspendidas en solución salina fisiológica (SSF), para cada ovino por vía oral. Los grupos testigo se designaron como grupo A y D, sin inóculo y con 5 ovinos para cada uno. El grupo infestado con la población resistente a bencimidazoles (Herb), se designó como grupo B (con 15 ovinos), y el tercer grupo se infestó con la población de H. contortus susceptible a bencimidazoles (Hcsb) con 15 ovinos, se designó como grupo C. El día de la infestación se designó como día cero (0).

1.2.3. OBTENCION DE ANTIGENO DE EXTRACTO CRUDO (EC) DE LA LARVA INFESTANTE DE H. contortus RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A LOS BENCIMIDAZOLES.

El número de L3 de H. contortus resistente y susceptible, que se obtuvieron de los coprocultivos para la elaboración del antígeno fue de 1×10^6 L3 de cada población, las cuales se maceraron en un Tenbroeck en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH de 7.2 y adicionándole inhibidores de proteasas (EDTA, PMSF y TLCK) y antibiótico (penicilina y estreptomina) en hielo (34).

Posteriormente se centrifugó el macerado para la obtención del sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por medio de un espectrofotómetro. Los antígenos se conservaron a -70°C hasta su uso (34).

1.2.4. TECNICAS COPROPARASITOSCOPICAS

La determinación de huevos por gramos (thpg) de heces, se realizó por medio de la técnica de Mc Master. Las muestras fueron tomadas directamente del recto cada 7 días a partir de la infestación; se realizaron 6 muestreos en total. Las muestras fueron conservadas en hielo para su transportación y se trabajaron inmediatamente (30).

1.2.5. OBTENCION DE SUEROS

La muestra sanguínea de los ovinos, se tomo directamente de la vena yugular a partir del día cero y cada 7 días hasta completar 6 muestreos. Asimismo las muestras se transportaron en hielo y se centrifugaron a 350g para la obtención del suero, el cual se conservó a -70°C hasta su uso. Los sueros controles positivos y negativos fueron tomados de animales donadores y animales libres del parásito y se les corrió una prueba de Hemoaglutinación indirecta (HI), asimismo, se realizo la prueba de HI para la titulación del antígeno.

1.2.6. TECNICA SEROLOGICA

Se realizó la prueba serológica de Hemoaglutinación indirecta citada por López (17). Se trabajó con una concentración de antígeno de 90 ug/ml y los sueros se trabajaron en diluciones dobles*.

1.2.7. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó la prueba de t Student (9)

* Para la descripción de la técnica serológica de Hemoaglutinación indirecta pasar al apéndice página 33

RESULTADOS

1. COPROPARASITOSCOPICOS

A. Población de H. contortus resistentes a los bencimidazoles (Hcrb).

El nivel de eliminación de huevos por gramo (hpg) para esta población con respecto a su grupo testigo fué estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a partir de la 2a. a la 6a. semana postinfestación, con una media y desviación estándar de 514 ± 570 , 1657 ± 3667 , 1824 ± 5488 , 10850 ± 7252 y 5985 ± 7497 para el grupo infestado y con una media y desviación estándar de 0 para el grupo testigo. (Figura 1).

B. Población de H. contortus susceptible a los bencimidazoles (Hcsc).

La eliminación de hpg por parte de la población infestada se observó estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a partir de la 3a. a la 6a. semana posinfestación con una media y desviación estándar de 3000 ± 6137 , 4547 ± 5456 , 6490 ± 6434 , 3400 ± 6400 respectivamente, mientras que el grupo testigo se mantuvo en 0. (Figura 2).

C. La diferencia con respecto a la eliminación de hpg entre los dos grupos infestados fue evidente, ya que el número de hpg eliminado por la población Hcrb fue más elevado siendo estadísticamente significativo ($P < 0.05$), comparada con el número de hpg eliminado por la población Hcsc. Con una media y desviación estándar de $10,850 \pm 7,252$ por la población Hcrb durante la 5a. semana posinfestación y con una media y desviación estándar de $6,490 \pm 6,435$ hpg para la población Hcsc en la misma semana (Figura 3).

2.- SEROLOGICOS

D. Población de H. contortus resistente a los bencimidazoles (Hcrb).

El título de anticuerpos homólogos anti-H. contortus del grupo infestado, se observó estadísticamente significativo durante la 2a., 4a., 5a., y 6a. semana posinfestación con una media y desviación estándar de 4.3 ± 1.8 , 4.6 ± 2 , 4.3 ± 1.8 , 4.6 y 2.5 , respectivamente. El grupo testigo presentó una media y desviación estándar de 2.2 ± 0.4 , 2.6 ± 0.8 , 2.8 ± 0.5 , 2.8 ± 0.8 , durante las mismas semanas. (Figura 4)

E. Población de H. contortus susceptible a los bencimidazoles (Hcsb).

El comportamiento del grupo testigo e infestado con la población de Hcsb, fue similar en la mayoría de los muestreos, por lo que estadísticamente los resultados de las semanas 0, 1, 3, 4 y 5 no fueron significativos ($P > 0.05$), con una media y desviación estándar de 3.8 ± 1.1 , 3.0 ± 0.9 , 3.4 ± 0.6 , 3.6 ± 1.5 , 2.8 ± 0.4 , 3.2 ± 1.2 , para el grupo infestado; para el grupo testigo fue de 3.8 ± 0.4 , 2.9 ± 0.4 , 2.8 ± 0.4 , 2.6 ± 0.5 , 2.6 ± 0.5 , 2.4 ± 1.8 , respectivamente a excepción de la 2a. semana posinfestación la cual fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$), con una media y desviación estándar de 3.4 ± 0.6 para el grupo infestado y 2.8 ± 0.4 para el testigo (Figura 5).

F. En los títulos de anticuerpos para la población Herb con respecto a la población Hcab no se observaron diferencias estadísticamente significativo ($P > 0.05$) en ninguna de las semanas posinfestación (Figura 6).

NOTA: Todas los animales del grupo testigo e infestado con esta población fueron muestreados 8 veces para la obtención del suero, los cuales fueron guardados en diferentes cajas, según la semana del muestreo, pero los sueros correspondientes a las dos primeras semanas (0 y 1) se contaminaron, por lo cual se carece de éstos datos y se optó por alargar 2 semanas más el muestreo.

DISCUSION

En México, el control de las diversas parasitosis que afectan a la economía pecuaria, se ha venido realizando por años, con los diferentes antihelmínticos existentes en el mercado, cuyos principios activos más empleados son pertenecientes al grupo de los imidotiazoles, las ivermectinas, los probencimidazoles y bencimidazoles (8, 14)

Generalmente la efectividad de estos productos químicos ha estado dentro de un rango comprendido entre el 70 y 100%, considerándose como buena (8, 13, 25).

Sin embargo, algunos de estos productos han disminuido su efecto letal por la resistencia antihelmíntica adquirida por algunos géneros parásitos entre los cuales se citan los nemátodos gastroentéricos como Ostertagia spp., Trichostrongylus spp., Cooperia spp. y Haemonchus spp. (5, 8).

El fenómeno de la resistencia ha sido definido como la habilidad de un individuo a sobrevivir al efecto de un producto antihelmíntico y es un problema multidimensional complejo, el cual puede ser propiedad fisiológica o bioquímica, como resultado de la selección genética dentro de la población; la intensidad de esta selección no va a depender estrictamente de la frecuencia del tratamiento sino de algunos factores ecológicos, de población, de localización, resultando generaciones subsecuentemente resistentes a los antihelmínticos (16).

Dentro del grupo de las parasitosis resistentes a los antihelmínticos, el género Haemonchus contortus, ha sido reportado como un nemátodo resistente al grupo de los bencimidazoles en México y en otros países. En México H. contortus se encuentra dentro del grupo de los nemátodos que más afectan a los pequeños rumiantes reportado como nemátodo resistente a los bencimidazoles (8, 20)

Sin embargo, el daño económico causado específicamente por éstos nemátodos no ha sido aún evaluado y la información existente está relacionada a las pérdidas causadas en otros países como Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y los Estados Unidos (20).

La inversión de los ganaderos principalmente en los productos químicos antihelmínticos, como los bencimidazoles, es importante y el uso irracional en algunas ocasiones ha generado nuevas poblaciones resistentes a su efecto letal (24).

Esto representa un grave problema, ya que en el hospedero va a persistir la infestación, por lo que también se esperaría que el sistema inmune protector del hospedero actuará contra este nemátodo.

En el presente estudio se evaluó la cinética de anticuerpos homólogos anti-H. contortus de dos poblaciones, resistentes y susceptibles a los productos químicos derivados de los bencimidazoles por considerar que la respuesta inmunológica representa un importante papel en la infestación de la hemoncosis; así lo describen otros autores que han evaluado esta respuesta en hospederos infestados con este nemátodo tomando en cuenta la edad de los animales, el sexo, la raza y el estado nutricional, además de considerar la virulencia del

parásito, su habilidad de adaptación y las condiciones medio ambientales que favorecen su desarrollo y establecimiento (12, 21, 27, 31).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran un incremento ligeramente mayor de título de anticuerpos homólogos detectados a partir de la segunda semana posinfestación en los ovinos infestados con la población resistente de H. contortus, comparada con la población H. contortus susceptible, en la cual no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) al compararla con su correspondiente grupo testigo, como se observó en las figuras 4 y 5.

Las diferencias observadas entre ambas poblaciones fueron principalmente dos: 1) la población de Hcrb tardó menos tiempo en empezar a eliminar huevos a través de heces, los cuales se mantuvieron bajos durante 1a, 2a., 3a. y 4a. semana posinfestación comparada con la población de Hcsb, la cual se mantuvo con un número de hpg mayor que el de la población resistente. 2) Asimismo, durante todos los muestreos serológicos, el título de anticuerpos homólogos fue mayor para la población Hcrb por lo cual se sugiere que posiblemente si exista diferencia entre poblaciones (Hcrb y Hcsb), sin embargo, por el diseño experimental realizado en el presente estudio, no se detectó a que nivel se encuentra dicha diferencia.

Algunos autores sugieren que la respuesta entre poblaciones resistente y susceptible a los antihelmínticos, posiblemente sea de origen genético, por lo que no son fácilmente detectables, asimismo los bencimidazoles provocan mutaciones a nivel del genoma de la beta-tubulina, afectando el proceso energético del ATP y de la mitocondrias, por lo cual, se recomienda seguir realizando pruebas como

electroforesis e isoenzimas, que nos permitan observar el posible mecanismo de diferenciación entre poblaciones, asimismo se recomienda realizar estudios histopatológicos con objeto de tener mayor información sobre la infiltración de la respuesta inmune celular a nivel local.

En los resultados obtenidos se observó un incremento de la respuesta inmune humoral sérica anti-H. contortus de la población resistente, sin embargo, no se observó que esta respuesta inmunogénica y protectora se localice a nivel de la mucosa abomasal, como lo reportan algunos estudios, en donde el mucus constituido por una glicoproteína forma una barrera física que funciona como una trampa en caso de animales hiperinmunizados, aunado a la reacción de hipersensibilidad de tipo I y al incremento de inmunoglobulinas G1 y A, las cuales han sido detectadas en infestaciones parasitarias. En caso de IgA, se ha experimentado que hospederos con dietas ricas en proteínas e infestados con H. contortus, la IgA se incrementa más y la infestación disminuye (9, 19, 33).

Respecto a la población de Hcsb, se sugiere que la repuesta inmune humoral no se incremento por el bajo número de nemátodos adultos establecidos, afectados por la respuesta inmune celular y humoral a nivel local, ya que algunos estudios mencionan un incremento de la IgG1 a nivel de mucosa abomasal e intestinal en infestaciones parasitarias, sin haber sido inmunoprotectora (30).

electroforesis e izoenzimas, que nos permitan observar el posible mecanismo de diferenciación entre poblaciones, asimismo se recomienda realizar estudios histopatológicos con objeto de tener mayor información sobre la infiltración de la respuesta inmune celular a nivel local.

En los resultados obtenidos se observó un incremento de la respuesta inmune humoral sérica anti-H. contortus de la población resistente, sin embargo, no se observó que esta respuesta inmunogénica y protectora se localice a nivel de la mucosa abomasal, como lo reportan algunos estudios, en donde el mucus constituido por una glicoproteína forma una barrera física que funciona como una trampa en caso de animales hiperinmunizados, aunado a la reacción de hipersensibilidad de tipo I y al incremento de inmunoglobulinas G1 y A, las cuales han sido detectadas en infestaciones parasitarias. En caso de IgA, se ha experimentado que hospederos con dietas ricas en proteínas e infestados con H. contortus, la IgA se incrementa más y la infestación disminuye (9, 19, 33).

Respecto a la población de Hexb, se sugiere que la respuesta inmune humoral no se incrementa por el bajo número de nemátodos adultos establecidos, afectados por la respuesta inmune celular y humoral a nivel local, ya que algunos estudios mencionan un incremento de la IgG1 a nivel de mucosa abomasal e intestinal en infestaciones parasitarias, sin haber sido inmunoprotectora (30).

CONCLUSIONES

- El promedio de huevos por gramo de heces con la población resistente fue mayor que con la población susceptible lo que sugiere una mayor prolificidad de la primera.
- Los títulos de anticuerpos homólogos anti-H. contortus se incrementaron ligeramente en los ovinos infestados con la población resistente que en aquellos infestados con la población susceptible lo que sugiere mayor antigenicidad de la población resistente.

LITERATURA CITADA

1. Abin, M.J.G.: *Patología del sistema digestivo. Primera Edición. Ed. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1982.*
2. Adams, D.B.: *Observations on the self-cure reaction and others forms of immunological responsiveness against Haemonchus contortus in sheep. Int. J. Parasit., 13 : 571-578 (1983).*
3. Allonby, E.W. and Urquhart, G.M.: *Self-cure of Haemonchus contortus infections under fields conditions. Parasitol., 66: 43-45 (1973).*
4. American Association of Veterinary Parasitologists. : *Research need and priorities for ruminant internal parasites in the United States. Am. J. Vet. Res., 44: 1836-1847 (1983).*
5. Anderson, N., Martin, P.J., Jarret, R.G. Brown, T.H. and Miller, D.W.: *Secuential development of resitante to thiabendazole and Levamisole in nematodes of sheep. Int. J. Parasit., 18: 234-249 (1988).*
6. Behm, C.A. and Bryant, C.: *Resistance in nematodes to antihelminthics drugs. Aust. Wool. Corp. (1985).*

7. Balman, G.M.: La resistencia de los parásitos gastrointestinales a los antihelmínticos en ovinos. Reflexiones sobre algunas de sus causas. Vet. Arg., 6: 189-192 (1989).
8. Campos, R.R.: Resistencia de Haemonchus contortus a los benzimidazoles en ovinos de México. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1989).
9. Curtain, C.C. and Anderson, N. : Immunocytochemical localization of the ovine immunoglobulins IgA, IgG1 and IgG2 effect of gastrointestinal parasitism in the sheep. Clin. exp. immunol., 8: 151-162 (1971).
10. Daniel, W.W.: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Primera edición. Ed. LIMUSA, México, D.F., 1977.
11. Dash, K.M.: Multiple anthelmintic resistance in Trichostrongylus colubriformis. Aust. Vet. J., 63: 45-47 (1986).
12. Gibbs, H.C. and Barger, I.a.: Haemonchus contortus and other trichostrongylid infections in parturient, lactating and dry ewes. Vet. Parasit., 22:57-66 (1986).
13. Hembry, G., Miller, J.E., Sims, D., Rodríguez, S., Stagg, L.C.: Efficacy of repeated doses of levamisole, morantel, fenbendazole and ivermectin, against gastrointestinal nematodes in ewes. Am J. Vet. Res., 47: 1677-1679 (1986).

14. Jubb, K.V.F. y Kennedy., P.C. : *Patología de los animales domésticos*. Tercera ed. Ed. Labor. Barcelona, España, 1974.
15. Lefambre, Southcott, W., II, and Dash, K.H.: *Resistanace of selected lines of Haemonchus contortus to Thiabendazole, Morantel and Levamisole*. Int. J. Parasit., 6: 217 (1976).
16. Liebano, H.E.: *Sobrevivencia de las larvas infectantes de Haemonchus contortus en un clima cálido subhúmedo*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM (1990).
17. López, A.M.E: *Determinación de la respuesta celular y humoral en ovinos infectados experimentalmente con Haemonchus contortus*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, (1990).
18. Martín, P.J., Anderson, N. and Jarret, R.G.: *Detecting becimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays*. Aust. Vet. J. 66: 527-532 (1989).
19. Miller, H.R.P., Jackson, F., Newlands, G. and Appleyard, W.T.: *immune exclusion at mechanism of protection against the ovino nematode Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci. 35: 357-363 (1983).
20. Ngommo, A.J., Kassaku, A.A. and Ruheta, M.R.: *Critical Controlled test to evaluate resistance of field strains of Haemonchus contortus to Thiophanate*. Vet. Parasit., 36: 21-26 (1990).

21. Nguyen, T.C.: *The immune response ins sheep: Analysis of age, sex and genetic effects on the cuantitative antibody response to chick in red blood cell.* Vet. Immunol. Immunopathol.,5: 237-245 (1983-1984).
22. Nicc, R.: *Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de ovinos y bovinos.* Inst. Nac. de Tecnología Agropecuaria., Buenos Aires Argentina, (1986).
23. Perez, P.P.: *Caracterización morfológica de la larva infectante de Haeminchus contortus.* Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F. (1984).
24. Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, C.A. and Donal, A.D.: *The problem of anthelmintic resitance in nematodes.* Aust. Vet. J. 56: 239-249 (1980).
25. Quiroz, R.H.: *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos.* Primera edición, Ed. LIMUSA, México, D.F. 1984.
26. Rothwell, T.L.W: *Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract.* Int. J. Parasit., 19:273-280 (1989).
27. Soulsby, E.J.L.: *immunity to animal parasites.* Academic Press., N.Y., USA, 1972.
28. Soulsby, E.J.L.: *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* Séptima ed. Ed. Interamericana, México, D.F. 1987.

29. Stewart, D.F.: Studies on resistance of sheep infestation with Haemonchus contortus and Trichostrongylus spp. and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. Aust. J. Agric. Res., 1:301-321 (1950).
30. Thiepont, D., Rochette, F. and Vanpariis, D.F.J.: Diagnosing helminthiuis through coprologycul examination. Firsth ed. Jannsen Research Foundation. Beerse, Belgium, 1979.
31. Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. Segunda ed. Ed. Interamericana. México, D.F., 1987.
32. Urquhart, G.M.: Epidemiology of rumiunt gastroenteritis. En: Memoria de la VI Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. Morelia, Mich., 1985; 13-18. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C., Morelia, Mich., (1985).
33. Wedrychowicz, H., Abbott, E.M., and Holmes, P.H.: use of coproantibody measurement to assess the influence of diet on local immune responses of sheep vaccinated against Haemonchus contortus. Res. Vet. Sci., 36: 240-246 (1984).
34. Wedrychowicz, H. and Bezubik, B.: Studies on the antigens of Ostertagia circumcincta. I. Somatic antigens of infective larvae. Acta Parasit. Pol., 28: 233-245 (1981).

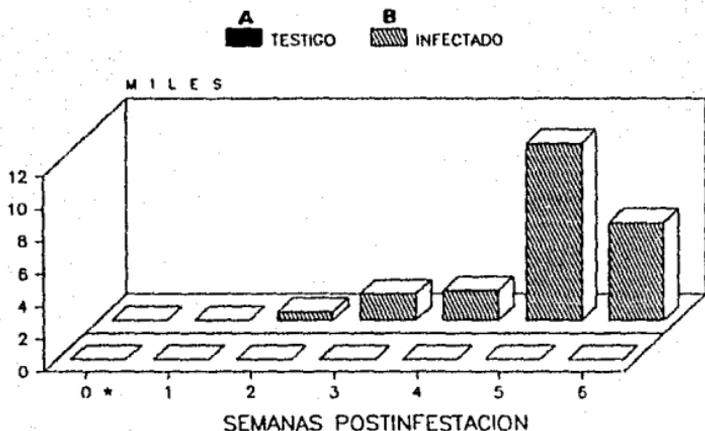
FIGURAS

	Pag.
Figura 1. <i>Número de HPG* eliminados por animales infestados con <u>H. contortus</u> resistente a bencimidazoles.</i>	27
Figura 2. <i>Número de HPG* eliminados por animales infestados con <u>H. contortus</u> susceptible a bencimidazoles.</i>	28
Figura 3. <i>Cinética de anticuerpos de ovinos infestados con L3 de <u>H. contortus</u> resistente a bencimidazoles, ante un antígeno homólogo.</i>	29
Figura 4. <i>Cinética de anticuerpos de ovinos infestados con L3 de <u>H. contortus</u> susceptible a bencimidazoles ante un antígeno homólogo.</i>	30
Figura 5. <i>Número de de HPG* eliminados por animales infestados con las poblaciones de <u>H. contortus</u> resistente a bencimidazoles y <u>H. contortus</u> susceptible a bencimidazoles.</i>	31
Figura 6. <i>Cinética de anticuerpos de ovinos infestados con L3 de <u>H. contortus</u> resistente a bencimidazoles y <u>Haemonchus contortus</u> susceptible a bencimidazoles ante sus antígenos homólogos correspondientes.</i>	32

*HPG. Huevos por gramo de heces.

Figura 1

NUMERO DE HPG* ELIMINADOS POR OVINOS.
ANIMALES INFESTADOS CON Haemonchus
contortus POBLACION RESISTENTE



Grupo A = Grupo testigo (5 animales)

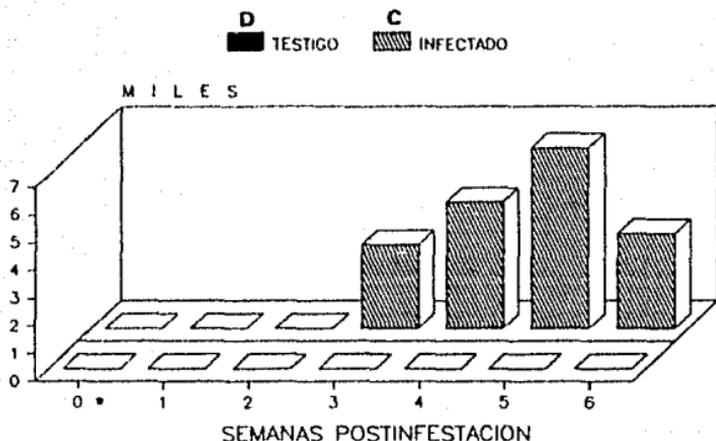
Grupo B = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus resistente a bencimidazoles, via oral por ovino (15 animales).

U * = Día de la inoculación.

* = Huevos por gramo de heces.

Figura 2

NUMERO DE HPG* ELIMINADOS POR OVINOS
INFESTADOS CON Haemonchus contortus
POBLACION SUSCEPTIBLE



Grupo D = Grupo testigo (5 animales).

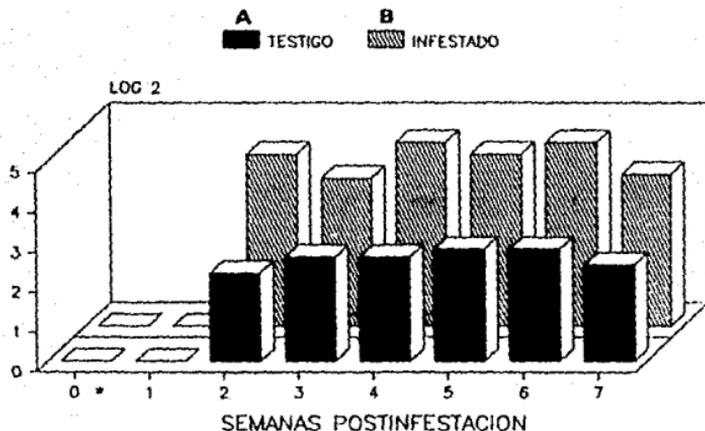
Grupo C = Animales infestados con 10 000 L3 de
H. contortus susceptible a bencimidazo
les, via oral por ovino (15 animales).

U = = Día de la inoculación.

* = Huevos por gramo de heces.

Figura 3

CINETICA DE ANTICUERPOS
ANTI-Haemonchus contortus
POBLACION RESISTENTE



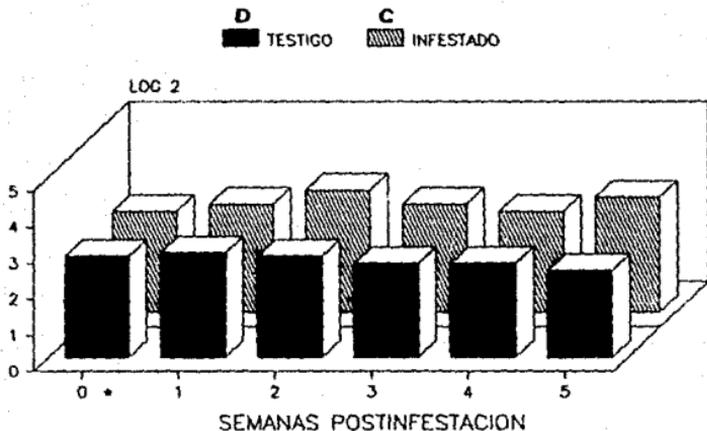
Grupo A = Grupo testigo (5 animales).

Grupo B = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus, via oral por ovino, con 15 animales. (población resistente)

Ag = Se emplearon 1×10^6 L3 de Hcrb y 1×10^6 L3 de Hcsb, para la preparación de los antígenos de extracto crudo (EC) correspondientes.

Figura 4

CINETICA DE ANTICUERPOS
ANTI- Haemonchus contortus
POBLACION SUSCEPTIBLE



Grupo D = Grupo testigo (5 animales).

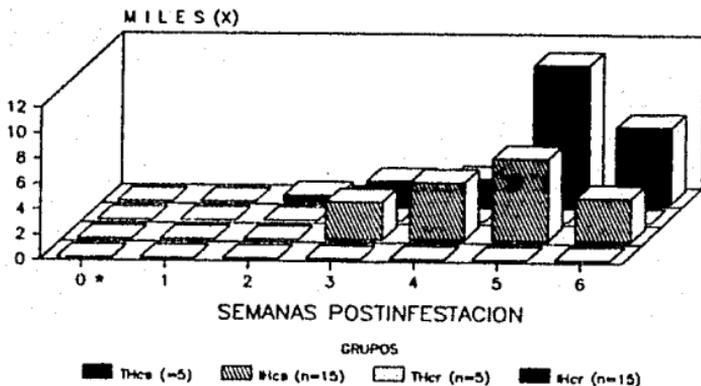
Grupo C = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus, via oral por ovino, con 15 animales (población susceptible).

0 * = Día de la inoculación.

Ag = Se emplearon 1×10^8 L3 de Hcsb y 1×10^8 L3 de Hcsb, para la preparación de los antígenos de extracto crudo (EC) correspondientes.

Figura 5

PROMEDIO DE HPG* ELIMINADOS POR OVINOS
INFESTADOS CON Haemonchus contortus
POBLACIONES RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE



THcs = GRUPO TESTIGO DE LA POBLACION de H. contortus susceptible a bencimidazoles (5 animales).

IHcs = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus susceptible a bencimidazoles, via oral por ovino (15 animales)..

THcr = GRUPO TESTIGO DE LA POBLACION de H. contortus resistente a bencimidazoles, via oral por ovino (5 animales)

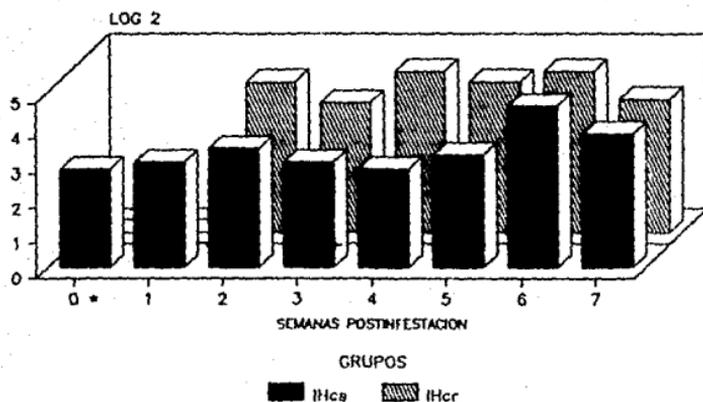
IHcr = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus resistente a bencimidazoles, via oral por ovino (15 animales)

0 * = Día de la inoculación.

* = Huevos por gramo de heces.

Figura 6

CINETICA DE ANTICUERPOS
ANTI- Haemochus contortus
POBLACIONES RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE



IHcr = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus resistente a bencimidazoles vía oral por ovino (15 animales).

IHcs = Animales infestados con 10 000 L3 de H. contortus susceptible a bencimidazoles, vía oral por ovino (15 animales).

0* = Día de la inoculación.

Ag = Se emplearon 1×10^8 L3 de Hcrb y 1×10^8 L3 de Hcsb para la preparación de los antígenos de extracto crudo (EC) correspondientes.

APENDICE

Hemoaglutinación indirecta: previo a la prueba experimental se realizaron los siguientes dos puntos:

- A. Estandarización de sueros controles
- B. Estandarización óptima del antígeno de extracto crudo de L3 de H. contortus.

Procedimiento:

1. Obtención del suero normal del conejo (SNC), para descomplementario (56° C) y absorberlo (0.1 ml de suero y 0.9 de sangre) con globulos rojos de borrego (GRB).
2. Colecta de GRB en solución de Alservers
3. Diluir el SNC (1/100) en Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (SSAF), pH 7.2
4. Preparación de la dilución de Acido Tanico (1/10,000) en SSAF pH 7.2

Tanizado de GRB (GRBt)

- Suspender los GRB en SSAF pH 7.2 y centrifugarlo a 360 xg/min durante 10 minutos dos vecesy una última suspensión durante 5 minutos.
- Resuspender los GRB en SSAF pH 7.2 junto con un volumen igual de la dilución de acido tanico.
- Incubar a 37 C/10 min. y centrifugar 300 xg/5 min
- Resuspender los GRBt en SSAF pH 7.2 y centrifugarlo dos veces a 350 xg durante 10 y una última suspensión en SSAF pH 6.4 durante 5 min.

Sensibilización de GRB (GRBs)

- Agregar un volumen igual de una dilución óptima de antígeno e incubar a 37°C 30 min. y centrifugar a 300 xg/min durante 5 min. y obtener el sobrenadante.
- Colocar en placas de microtitulación 50 ul de SNC s; 1% en cada pozo.

- Poner 50 ul de Sx en los pozos de la primera hilera.
- Mezclar y hacer diluciones dobles a partir de la primera basando 50 ul.
- Adicionar 25 ul de GRBs a cada pozo.
- Dejar reposar a 4°C durante 12 horas
- Hacer la lectura

Control de SNC

- Colocar 50 ul de SNC al 1%
- Adicionar 25 ul de GRB al 1.5%
- Reposar

El resultado deberá ser negativo

Control de Sueros sospechosos (Sx)

- Colocar en la placa de microtitulación 50 ul de SNC al 1% en todos los pozos.
- Colocar 50 ul del Sx y hacer 6 diluciones dobles a partir del primer pozo.
- Colocar 25 ul de GRBt al 1.5%

El resultado deberá ser negativo.