

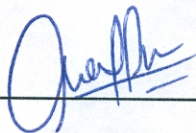
Instituto Tecnológico de Sonora

Presente.

El que suscribe **Ana Luz Leyva Mendivil**, por medio del presente manifiesto bajo protesta de decir verdad, que soy autor y titular de los derechos de propiedad intelectual tanto morales como patrimoniales, sobre la obra titulada: "**Evaluación de la obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en heces con diferentes días de refrigeración**", en lo sucesivo "LA OBRA", misma que constituye el trabajo de tesis que desarrolle para obtener el grado de **Médica Veterinaria Zootecnista** en ésta casa de estudios, y en tal carácter autorizo al Instituto Tecnológico de Sonora, en adelante "EL INSTITUTO", para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios del objeto del Instituto, es decir, sin fines de lucro, por lo que la presente autorización la extiendo de forma gratuita.

Para efectos de lo anterior, EL INSTITUTO deberá reconocer en todo momento mi autoría y otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente en LA OBRA.

De igual forma, libero de toda responsabilidad al EL INSTITUTO por cualquier demanda o reclamación que se llegase a formular por cualquier persona, física o moral, que se considere con derechos de autor sobre los resultados derivados de la presente autorización, o por cualquier violación a los derechos de autor y propiedad intelectual que cometa el suscrito frente a terceros con motivo de la presente autorización y del contenido de la misma obra.



Ana Luz Leyva Mendivil





INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA  
Educar para Trascender

“Evaluación de la obtención de  
larvas infectantes de *Haemonchus  
contortus* en heces con diferentes  
días de refrigeración”

Tesis que para obtener el título de  
Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta

Ana Luz Leyva Mendivil

Asesor

Dr. Javier Arturo Munguía Xóchihua

Ciudad Obregón, Son.

A Octubre de 2013

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

En la ovinocultura de México el fin productivo de tener ovejas puede ser de tres tipos: subsistencia, pasatiempo y empresa; este último se refiere a sistemas en los que se cuida la eficiencia productiva del rebaño, existe inversión, uso de tecnología avanzada y asesoría técnica profesional. La ovinocultura está tomando mayor importancia debido al aumento de la demanda de carne de ovino en el país (Soto, *et al.*, 2006).

Sonora ocupa el lugar número 20 a nivel nacional en producción de carne de ovinos, con un volumen aproximado de 445 toneladas en el 2008, lo cual es más del doble de lo producido tres años atrás. La comercialización se realiza en pie a través de intermediarios del centro del País (Ortega, *et al.*, 2008).

El manejo sanitario es importante en toda explotación pecuaria entre las cuales las enfermedades parasitarias son la causa más frecuente e importante que ocasionan una ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios del país; tales problemas disminuyen sutil o apreciablemente la producción de los animales trayendo como consecuencia baja utilidad al productor, favoreciendo el desaliento y abandono de la actividad pecuaria. Los agentes causantes de la parasitosis gastrointestinales en los rumiantes son diversos, por lo que su comportamiento biológico y efecto sobre el animal depende del tipo de parásito involucrado (Cuellar, 2007).

Los nematodos gastrointestinales son los parásitos más importantes de los ovinos y las cabras (Levine, 1983). En un estudio realizado en pequeños rumiantes en el Centro de Investigaciones Pecuarias del estado de Sonora (situado al este del Km 68 de la carretera Hermosillo-Nogales, Sonora), se utilizaron ovinos Pelibuey machos y hembras de 6 a 12 meses de edad, que estaban naturalmente infectados con *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum spp* y *Cooperia spp*, alimentados por pastoreo en una pradera de zacate bermuda (Campos, *et al.*, 2007).

*Haemonchus contortus* es el parásito más patógeno en ovinos, los adultos penetran hasta el fondo de las glándulas del abomaso; lesionando la mucosa para succionar sangre. Este es un nematodo considerado como el más dañino en el estómago de bovinos y ovinos en zonas tropicales y subtropicales. La acción expoliadora que ejerce es hematófaga, y se calcula que el consumo diario de sangre es de 0.05 ml por gusano por día, esto explica en parte la anemia tan marcada que causan las infestaciones por este nematodo. (Taylor, *et al.*, 2007).

La acción mecánica es de poca importancia dado el tamaño en relación con la luz gástrica. La acción tóxica es generada por sustancias anticoagulantes que infiltra en los tejidos alrededor de la pequeña úlcera que ocasiona para succionar sangre; al cambiar de sitio de alimentación, la úlcera continua sangrando, lo que

favorece la pérdida de sangre; ocasionando signos clínicos y mortalidad (Quiroz, 1984).

Prácticamente todos los animales de pastoreo están infectados con estrongilos y muchas de estas afecciones se presentan de manera asintomática. Los animales más jóvenes suelen ser los más susceptibles y pueden presentar la enfermedad en forma clínica y subclínica, con signos como la diarrea, anemia, hipoproteinemia, reducción en el crecimiento y en casos severos la muerte (Zajac y Conboy, 2006).

Los efectos negativos que *H. contortus* causa en las zonas tropicales y cálidas del país, hacen necesario que se realicen diversos estudios desde determinación de la morfología, comportamiento, fisiopatología, tratamientos químicos y resistencia del parásito. Por lo cual se realizan estudios tanto *in vitro* como *in vivo* y se requiere tener disponible larvas infectantes (larvas 3 o L3) del parásito para realizar los estudios correspondientes, que permitan realizar un control integral de este nematodo.

## **1.2 Planteamiento del problema**

La obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* es importante para la realización de diversos estudios *in vitro* e *in vivo*. La conservación convencional de las muestras de heces en refrigeración por varios días se ha observado que tiene un efecto negativo en la obtención de larvas infectantes de *H. contortus*, por lo cual es necesario determinar el tiempo adecuado de conservación en refrigeración para obtener el mayor porcentaje de larvas infectantes de *H. contortus* en el coprocultivo y tener suficiente material biológico para realizar las investigaciones.

### **1.3 Objetivo**

Determinar el tiempo en días más adecuado de conservación de heces por medio de refrigeración para la obtención de larvas tres de *Haemonchus contortus* utilizando la técnica de coprocultivo.

### **1.4 Justificación**

La problemática que se presenta en la región de *Haemonchus contortus* hace necesario el disponer en forma continua de larvas infectantes del nematodo por medio del coprocultivo. La forma ideal de la conservación de las heces con huevos de nematodos gastroentéricos (NGE) es la refrigeración, pero el tiempo en días de almacenamiento parece que tiene un efecto directo en la viabilidad de los huevos de NGE, los cuales al ponerlos en coprocultivo afecta la eclosión y desarrollo a larvas tres de NGE. Por lo cual es necesario determinar el tiempo ideal de conservación en refrigeración para obtener la mejor eclosión de larvas en el coprocultivo favoreciendo la cantidad de larvas tres que se requieran para identificación del género y especie en base a sus características morfológicas y ser utilizados en las diferentes pruebas *in vivo* e *in vitro* que se realizan en estudio de esta parasitosis.

### **1.5 Limitantes del estudio**

La obtención de muestras de heces positivas a huevos de *Haemonchus contortus*, estandarización de la técnica de coprocultivo, disponer de material como incubadora o estufa, reactivos como antimicótico.

## II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 Taxonomía de la oveja

La posición básica de la taxonomía de los ovinos domésticos es la siguiente:

Reino: *Animalia*

Phylum: *Chordata*

Clase: *Mammalia*

Orden: *Artiodactyla*

Familia: *Bovidae*

Género: *Ovis*

Especie: *Ovis aries*.

(Ensminger y Parker, 1986).

## **2.2 Origen y domesticación de las ovejas**

Es cierto que las ovejas domésticas vienen de la oveja salvaje de Europa y Asia. Sin embargo, hay diferencias considerables en apariencia entre la oveja doméstica y sus ancestros, como el largo de la cola, color y tipo de pelaje, y la forma de la cornamenta, y muchos de esos cambios se dieron durante el proceso de domesticación. La capa externa del pelaje de las ovejas salvajes es dura y peluda y cubre una capa corta de lana, mientras que las ovejas domésticas la capa externa peluda está ausente. Los datos más antiguos encontrados de una oveja lanuda datan del año 6000 a.C. en Irán, mientras que alrededor del año 3000 a.C., se ha encontrado arte mesopotámico y libros babilónicos que hacen referencia a ovejas que muestran la forma de la cornamenta, ovejas sin cuernos, largo de la cola, y lana blanca, correspondiente a las ovejas domésticas (Ensminger y Parker, 1986).

## **2.3 Situación de la ovinocultura en el estado de Sonora**

La cría de ovinos a nivel nacional no es capaz de satisfacer la cada vez más grande demanda de carne de ovino (Cuellar, 2007). A pesar de que en el país cada vez es mayor la demanda de esta carne para consumo, en México sigue existiendo deficiencia de 61,000 toneladas para el consumo nacional (Soto, *et al.*, 2006).

Aunque la ovinocultura en el estado se ha desarrollado en forma significativa en los últimos años, Sonora ocupa el lugar 20 a nivel nacional en producción de carne de ovino, pero la mayor parte de la producción del estado se destina al centro y sur del país, donde el consumo es mayor que en la región del norte. Debido a esto, los ovinocultores se han organizado en asociaciones que han recibido apoyos gubernamentales para incrementar el número de animales, así como su calidad a corto y mediano plazo (Soto, *et al.*, 2006).



El reciente desarrollo de la cría de ovinos en Sonora, trae consigo el riesgo de introducir enfermedades infecciosas de importancia económica (Contreras, *et al.*, 2012 y Cruz, *et al.*, 2012), por lo que es necesario establecer programas de diagnóstico, prevención y control de enfermedades, entre ellas las causadas por parásitos gastroentéricos, por lo que se debe realizar un análisis epidemiológico para determinar la situación actual y así poder diseñar programas de control específicos que den como resultado una mejora en la calidad sanitaria de los hatos y un aumento en las características productivas de la especie (Soto, *et al.*, 2006).

#### **2.4 Factores que afectan a una explotación ovina**

Las causas principales que determinan las pérdidas económicas en las explotaciones ovinas son las siguientes:

- a) Ineficiencia reproductiva (fundamentalmente asociada con el manejo inadecuado de los partos múltiples).
- b) Mortalidad perinatal (desde el nacimiento hasta el destete, aunque la frecuencia es mayor en los dos primeros días de vida).
- c) Deficiencias nutritivas de las ovejas productoras en los estados críticos del ciclo productivo como lo son por ejemplo, el final de gestación y durante la lactancia.
- d) Enfermedades infecciosas y parasitarias (helminosis gastrointestinales, ectoparasitosis, pederio, mamitis o procesos crónicos como la infección por el virus Maedi-Visna, entre otros) (Contreras, *et al.*, 2012 y Cruz, *et al.*, 2012).
- e) Gastos asociados a la utilización de fármacos (especialmente antihelmínticos), administrados muchas veces sin estrategia de control alguna y en momentos inadecuados.
- f) Falta de integración entre los programas de manejo y sanidad.
- g) Falta de atención a largo plazo de los programas de producción por parte del veterinario (Buxadé, 1996).

## **2.5 Helmintosis gastrointestinal**

Las helmintosis gastrointestinales son la mayor causa de disminución de la producción de carne, leche y lana de oveja. El rango de infección parasitaria de una enfermedad aguda, frecuentemente se relaciona con altas tasas de mortalidad, la enfermedad crónica, con varios grados de morbilidad y sacrificio prematuro, y la infección subclínica con ovejas aparentemente saludables pero generalmente con rendimiento por debajo de su potencial máximo (Coop y Holmes, 1996).

Los parásitos helmintos de la oveja pueden ser subdivididos en nematodos (gusanos redondos), trematodos y cestodos (gusanos planos) (Coop y Holmes, 1996).

### **2.5.1 Nematodos**

El *phylum* Nematoda incluye el grupo más numeroso de parásitos de los animales domésticos y del hombre. Su cuerpo es cilindroide, no segmentado con un tracto intestinal y una cavidad general. Son de forma redonda en sección transversa y están cubiertos por una cutícula más o menos resistente a la digestión intestinal (Quiroz, 1984).

Los nematodos son gusanos que se encuentran extensamente distribuidos en una variedad de hábitats. Algunos tienen vida libre; otros son parásitos de plantas y de animales vertebrados o invertebrados (Quiroz, 1984).

Los nematodos son parásitos de los animales domésticos que tienen gran importancia económica, debido a la frecuencia y elevada mortalidad con que se

presentan en las diferentes especies. Generalmente tienen carácter crónico y casi todos interfieren con un buen crecimiento. Se localizan en la mayoría de los órganos; sin embargo, es el tracto digestivo donde se encuentran gran parte de las especies. Tiene ciclo evolutivo directo o indirecto y algunas de ellas tienen un importante papel como zoonosis (Quiroz, 1984).

Las especies de nematodos pueden estar presentes en la oveja según en las siguientes partes del tracto gastrointestinal de la oveja:

- Abomaso: *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Ostertagia (Teladorsagia) trifurcata*, *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus contortus*.
  - Intestino delgado: *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus filicollis*, *Cooperia curticei*, *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum trigonocephalum*, *Moniezia expansa*.
  - Intestino grueso: *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis*.
- (Coop y Holmes, 1996)

## **2.6 *Haemonchus contortus***

### **Taxonomía**

Reino: *Animalia*

Phylum: *Nematoda*

Clase: *Secernentea*

Subclase: *Secernenta*

Orden: *Strongylida*

Superfamilia: *Trichostrongyloidea*

Familia: *Trichostrongylidos*

Subfamilia: *Haemonchinae*

Género: *Haemonchus*

Especie: *H. contortus*

(Euzéby, 2001)

El nematodo *H. contortus* se considera como el parásito más patógeno que se encuentra en los animales domésticos, principalmente de pequeños rumiantes como las ovejas y cabras, pero se ha reportado que puede afectar a otros rumiantes, como ciervos salvajes, camellos y llamas. Su distribución es mundial, encontrándose en todas las razas de ovinos y caprinos, generando pérdidas económicas importantes para los productores. En los animales adultos se puede encontrar habitando en el abomaso, atribuyéndosele como el nematodo más dañino por su acción voraz de alimentarse de la sangre del hospedador (Bush, *et al.*, 2001).

*H. contortus* es el estróngilo más grande (2-3 cm); las hembras de *H. contortus* son más voluminosas con ovarios blancos enrollados en forma espiral alrededor del intestino de color rojo (debido a que está repleto de sangre) dando la apariencia de palo de peluquería (Kassai, 2002). El *H. contortus* macho mide de 10 a 20 mm de largo. En cambio la hembra mide de 18 a 30 mm de largo (Quiroz, 1984).

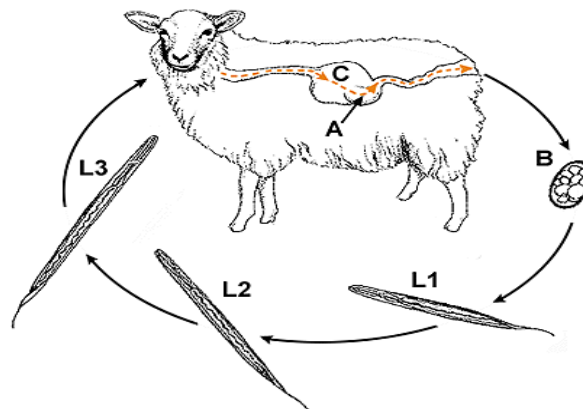
El macho posee un lóbulo asimétrico dorsal y espículas; la hembra usualmente tiene un colgajo vulvar. En ambos sexos hay papilas cervicales y tienen pequeñas lancetas dentro de la cápsula bucal. Las L3 poseen 16 células intestinales; la cabeza es estrecha y de forma redondeada, la vaina de la cola es el bulbo reproductor. Los huevos son de tamaño medio (74 x 44  $\mu\text{m}$ ), posee un borde elíptico regular con aspecto de barril y numerosos blastómeros que casi llenan todo el huevo (Taylor, *et al.*, 2007).

### 2.6.1 Ciclo de vida

La L3, es ingerida en pastos contaminados durante el pastoreo. La L3 luego se introduce al interior de la capa interna del abomaso (estómago verdadero), donde se desarrolla a larva 4 (L4), de preadulta a larva adulta. L4 muda a larva 5 (L5), la forma adulta. Los gusanos machos y hembras adultos viven en el abomaso de los borregos, donde se alimentan de sangre. Los gusanos se aparean y producen huevos. Las hembras adultas depositan de 5000 a 10000 huevos por día, donde son pasados a través de las heces del borrego al pasto. Los huevos son incubados en el suelo. Cuando el suelo está caliente y húmedo; los huevos eclosionan a L1 (el primer estadio juvenil). Después de L1 se desarrolla a L2 y L3. Un gran número de L3 pueden acumularse en gran medida en los pastos utilizados para el pastoreo (Leite, 2006).

Figura No. 1

#### ***Haemonchus* - Ciclo de vida**



A: Abomaso, B: Huevo, C: Rumen (Johnstoner, 1998).

### 2.6.2 Larva infectante de *Haemonchus contortus*

Las larvas infectantes o L3 constituyen la última etapa del ciclo biológico fuera del huésped definitivo, el rumiante. Ingeridas con el pasto penetran en la mucosa del

abomaso e intestino, donde sufren dos mudas más, convirtiéndose en larvas de cuarto y quinto estado y finalmente en los nematodos maduros, formas sexuales (Rodríguez y Cob, 2005).

El conocimiento morfométrico del estadio L3 de los nematodos gastrointestinales es de gran importancia, ya que con base en éstas se podrá determinar la presencia de los diferentes géneros y especies parasitarias de los rumiantes, así como establecer el grado y tipo de contaminación. En las claves de identificación larvaria se señalan aquellas características morfométricas que permiten la identificación del género y especie (Campos y Bautista, 1989). Para su identificación se basa en tamaño, forma y número de células intestinales, estructuras del extremo anterior y posterior, entre otras características (Munguía, 2010).

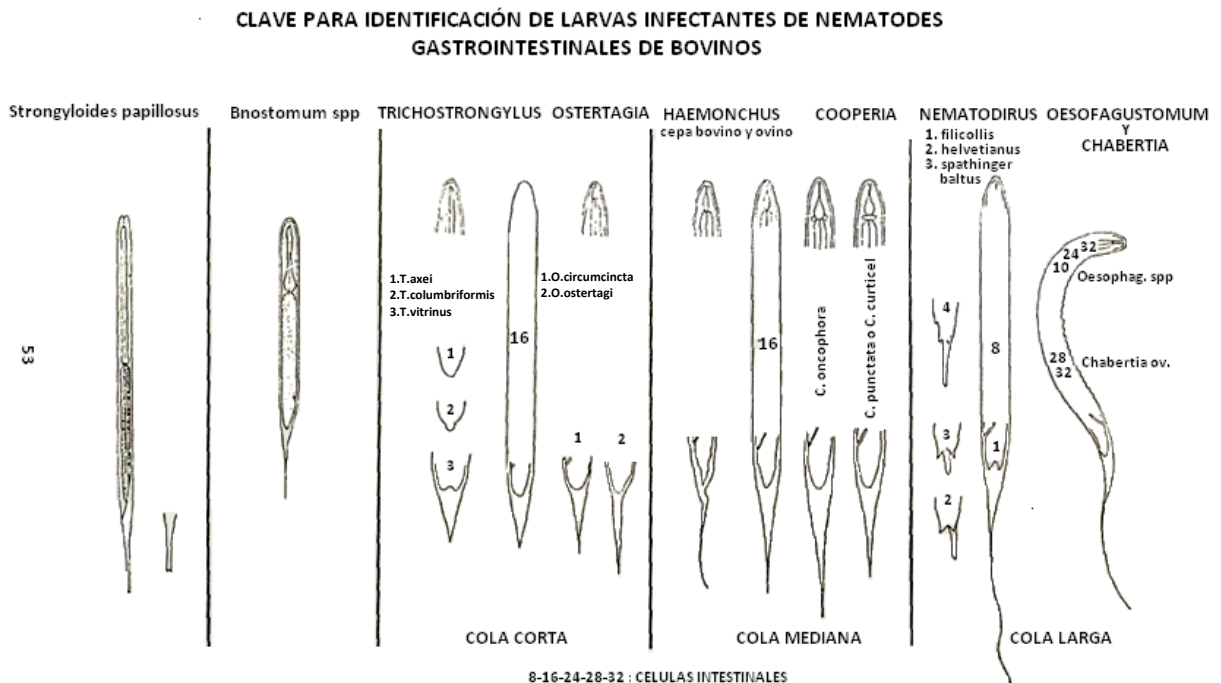
En las descripciones de las L3 de NGE de bovinos y ovinos, hay solamente ciertos caracteres morfológicos que pueden orientar para la ubicación y clasificación dentro de un grupo o de una especie. La envoltura de la segunda muda ("vaina"), sirve como punto de referencia para la clasificación de las L3 de NGE de los rumiantes. Los orificios naturales (boca, ano) de la larva propiamente dicha están encerrados por la "vaina" de la segunda muda que no se ha desprendido, pero son igualmente visibles y sirven de puntos de referencia para la clasificación y diferenciación. La cavidad bucal de la L3 es menor que la de L2, siendo característica para ciertas especies o faltando en otras. El esófago de la L3 es filiforme, sin pronunciada deformación bulbosa y sin aparato valvular. Las células intestinales dorsales y ventrales, de diferentes formas (triangulares, rectangulares o pentagonales) son bien diferenciables (Rodríguez y Cob, 2005).

Hay claves que clasifican a los diferentes tipos de L3 de acuerdo al largo de la cola de la vaina larval, integrados en tres grupos: a) larvas de cola y vaina corta, b) larvas con cola de vaina mediana y c) larvas con cola de vaina larga. La L3 de *H. contortus* pertenece al grupo de larvas con cola de vaina mediana (Campos y Bautista, 1989).

Dentro del grupo de colas medianas tenemos dos géneros: *Haemonchus* y *Cooperia*, cuyas larvas poseen dieciséis células intestinales. Dentro del género *Haemonchus*, las larvas de *H. placei* (cepa bovina) son mayores que las de *H. contortus* (cepa ovina). Ambas poseen colas de vaina larval filiformes y de terminación fina, pero la de *H. placei* es más larga, más robusta y menos latigiforme (Rodríguez y Cob, 2005).

La fase infectante, desde el punto de vista epidemiológico y etiológico, representa el eslabón más importante de la cadena evolutiva ya que tiene la facultad de adaptarse a diversas condiciones de humedad, temperatura, precipitación pluvial, luminosidad y tipo de pasto, estos factores están estrechamente relacionados con la sobrevivencia de las larvas de *H. contortus*, si alguno de estos factores sufre variaciones, su población y distribución se ve afectada (Liébano, *et al.*, 1998).

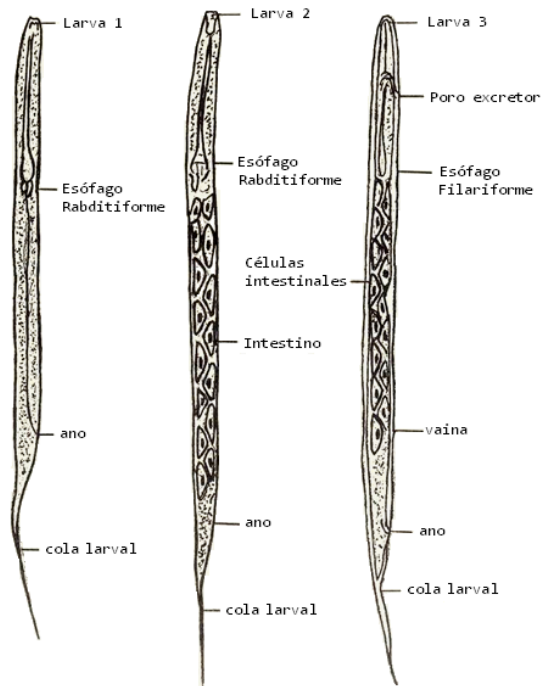
**Figura No. 2**



(Campos y Bautista, 1989).

**Figura No. 3**

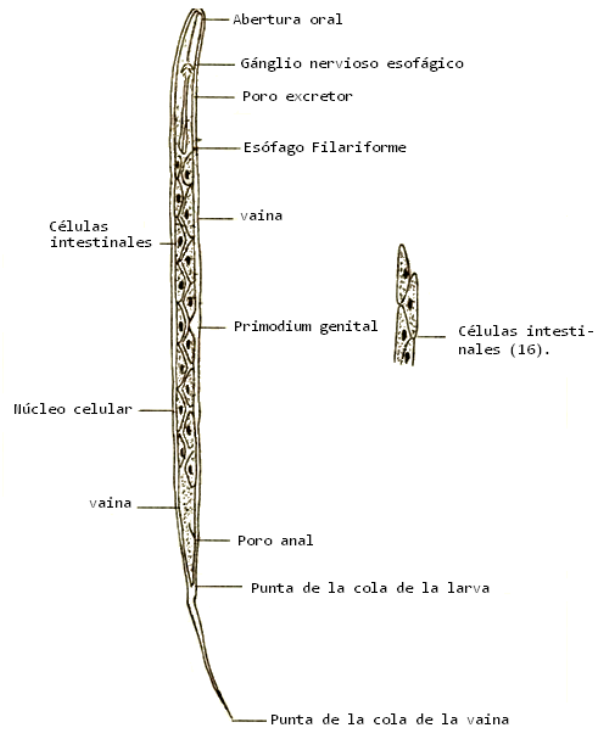
LARVA 1, 2 y 3 DE *Haemoncus contortus*



(Campos y Bautista, 1989).

**Figura No. 4**

LARVA INFECTANTE DE *Haemoncus contortus*



(Campos y Bautista, 1989).

La L3 de *H. contortus* (cepa ovina), es una larva de tamaño mediano, delgada. La cavidad bucal es ovalada; en muchos casos a la altura de la cavidad bucal se observa una placa quitinosa, oscura. Posee dieciséis células intestinales. La terminación de la cola larval es cónica, en muchos casos arrugada. La cola de la vaina larval, que adelgaza gradualmente, termina en una prolongación filamentosa. Según datos de varios autores, *H. contortus* (ovino), presenta en micras un largo total de 600-805, largo del esófago de 119-175 micras y un largo de la cola de la vaina larval de 119-159 micras (Rodríguez y Cob, 2005).

### 2.6.3 Signos clínicos

La presencia de *H. contortus* ocasiona como principal signo clínico agudo, la anemia con grados variables de edema, letargo, coloración oscura de las heces y



lana quebradiza. En los casos crónicos se muestra pérdida de peso y debilidad, en ambos casos puede ocasionar la muerte del huésped (Scheuerle, *et al.*, 2009).

En el caso de *Haemonchus*, la parasitosis se caracteriza por la producción de un cuadro anémico marcado, ya que dicho parásito es capaz de succionar 0.05 ml de sangre del hospedador en un día y en infecciones graves puede haber una pérdida diaria de 6 a 25 % de eritrocitos y los animales se muestran débiles y emaciados al disminuir la reserva de hierro y la capacidad de absorción de alimentos (Rodríguez, *et al.*, 2003).

#### **2.6.4 Diagnóstico**

El diagnóstico clínico preliminar es importante el cual debe ser corroborado con el diagnóstico parasitológico realizado por medio de la técnica de flotación, para evidenciar la presencia de huevos de *H. contortus* y la técnica de McMaster que es útil para conocer el grado de infestación en forma cuantitativa (Munguía, 2010).

Dentro de los métodos de diagnóstico parasitológico destacan las técnicas coprológicas. Estas técnicas abarcan todos los conocimientos referentes al estudio físico, químico y parasitológico de la materia fecal (Liébano, *et al.*, 2011).

El análisis del excremento de rumiantes debe realizarse bajo un concepto amplio de diagnóstico parasitológico y no solamente con base en la cantidad de huevos de NGE. La técnica de McMaster es una útil herramienta diagnóstica que nos permite estimar de manera semicuantitativa el número la cantidad de huevos que los parásitos eliminan por gramo de heces; no obstante, esta información es muy limitada, sobre todo si tomamos en cuenta que la mayoría de los huevos de los nematodos gastrointestinales, son muy similares y no es posible diferenciar un genero o especie de otro. Por tal motivo, es necesario extender este análisis a

otras técnicas complementarias, como la elaboración de cultivos fecales para la obtención de la L3 que son factibles de ser identificadas utilizando claves morfométricas diseñadas para este fin (Liébano, *et al.*, 2011).

#### **2.6.4.1 Técnica de Coprocultivo**

Salvo algunas excepciones (*Nematodirus* y *Bunostomum* del ganado vacuno), la identificación de especies de estróngilos gastrointestinales de rumiantes, caballo y cerdo no se puede hacer en base a la morfología de sus huevos, o al menos no con la precisión deseable. Como por el contrario la identificación morfológica de L3 es más característica, pueden realizarse cultivos hasta alcanzar este grado de desarrollo (Kraft y Schillinger, 1998).

El coprocultivo proporciona las condiciones necesarias para que los huevos en la materia fecal puedan evolucionar hasta L3, tal como se realiza en condiciones naturales. Las condiciones que se deben proporcionar son: humedad, temperatura y oxigenación (Munguía, 2010).

Para llevar a cabo la técnica de coprocultivo, primero se realiza alguna técnica cualitativa de flotación y después la cuantitativa de McMaster, en la primera se determinan las muestras positivas y con la segunda se determinan los HGH presentes, con esta última, se determinan las muestras con mayor carga para que se facilite la mayor obtención de las larvas (Munguía, 2010).

En un vaso desechable, se coloca 5 gr de materia fecal positiva, se adiciona aserrín, agua destilada (hasta obtener una consistencia pastosa) y unas gotas de un antimicótico (para evitar la proliferación de hongos), se identifica y se coloca en la estufa o incubadora a una temperatura de 28°C durante 5 a 7 días. La humedad se checa diariamente y se remueve el contenido para oxigenar el medio.

Pasado el tiempo de incubación se saca de la estufa y se coloca en el aparato de Baerman, se colecta el líquido de donde se obtienen las larvas. Se toman varias gotas a las cuales se adiciona una gota de lugol para inmovilizarlas, se observan las características morfológicas y con las claves correspondientes se determina el género y especie (Munguía, 2010).

### **III MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación del estudio**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología ubicado en el edificio Centro de Especialidades de Diagnóstico Integral en Patología y Producción Animal (CEDIPPA) del Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto del Tecnológico de Sonora, en Ciudad Obregón, Sonora.

#### **3.2 Material biológico**

Se utilizaron dos borregos machos raza pelibuey de 37kg de 10 meses de edad. Se les dio una semana de aclimatación en condiciones ambientales naturales, en verano (temperatura de 40 a 48°C, humedad de 32 a 46%), con un espacio de alojamiento de 3 metros cuadrados por animal en corrales ubicados en el Instituto

Tecnológico de Sonora campus Náinari, en el que recibieron alfalfa henificada como alimento y agua a libre acceso.

Se realizaron las técnicas cualitativa de flotación, cuantitativa de McMaster y de migración larvaria (técnica de Baerman), las cuales se llevaron a cabo según lo establecido en el *Manual de prácticas laboratorio de Parasitología* (Munguía, 2010).

Se realizó la prueba de flotación para la búsqueda de huevos de nematodos gastrointestinales. Al resultar positivos se desparasitó con clorhidrato de levamisol a una dosis única de 7.5 mg/kg y se aseguró que quedaran libres de parásitos por medio de la técnica de flotación a los 7 y 15 días. A los 20 días de aplicado el desparasitante se procedió a infectar los ovinos. En un tubo de cultivo de 15 ml, se recolectaron 4,800 L3 de *H. contortus* en 5 ml de agua destilada, se homogenizó el contenido del tubo y se les aplicó vía oral. La toma de muestras de heces fue a los días -4, 0, 7, 14, 21 y 28, hasta llegar a las 3 a 4 semanas, a la eliminación de huevos, se tomaron muestras tres veces a la semana, para determinar la presencia y cantidad de huevos, por medio de las técnicas de flotación y de McMaster (Munguía, 2010).

### **3.3 Tipo de investigación**

Es de tipo descriptiva, prospectiva y longitudinal (Thrusfield, 2005).

### **3.4 Arreglo experimental**

Debido a que el objetivo del estudio era evaluar la viabilidad de la muestra para la cosecha de L3 de *H. contortus* al ser sometida a diferentes días en refrigeración,

el estudio se dividió en tres ensayos que consistieron en diferentes tiempos de refrigeración durante A). 2 y 4d, B). 7, 14 y 21d y C). 28, 35 y 42d. En cada ensayo, el día de la colecta (d0) fue considerado como grupo control para observar los cambios en la viabilidad de la muestra. Después del acondicionamiento, los ovinos fueron sometidos a un régimen de muestreo que consistía en tres colectadas de 5 gr por animal para cada ensayo (A, B y C). Las muestras después de ser colectadas y en cada tiempo de refrigeración, eran analizadas coprológicamente (d0) para determinar la cantidad de HGH y preparadas para el coprocultivo.

### **3.5 Variables a analizar**

El número de HGH se determinó por el conteo de huevos del parásito con la técnica de McMaster. El número de L3 fue determinado a partir del conteo de L3 recuperadas del coprocultivo en la técnica de Baerman mediante la toma de alícuota, conteo de larvas y estimación de larvas en el volumen final (5ml) (Castaño, 2005). La emergencia (Em) se calculó mediante  $Em = L3/HGH$  en cada una de las muestras. Las variables fueron medidas, HGH al día 0 (al tomar la muestra) y L3 resultantes del coprocultivo de cada muestra (controles y refrigeradas) (Rodríguez y Cob, 2005).

### **3.6 Análisis coprológico y cultivo de L3**

A las 5 semanas de la infección, se realizó un estudio de McMaster a ambos ovinos obteniéndose una carga igual a mayor a 500 HGH, y se empezaron a tomar muestras de heces de 50 gr por las mañanas (de 8:00 a 11:00 AM) tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) de cada animal durante 7 semanas por medio del uso de un calzón recolector de manta (Javier Arturo Munguía Xóchihua, patente en proceso) para reducir el manejo de las heces y evitar su contacto con el suelo, las cuales se identificaron por día de recolección, se realizó la técnica de McMaster

para determinar la carga de HGH y se pusieron en refrigeración a 4° C, conservándose durante siete semanas. Se refrigeraron 21 muestras de cada ovino.

Las heces se dividieron en muestras tratamiento las cuales se conservaron en refrigeración a 4°C y muestras de heces control, que eran heces recién tomadas y sin refrigeración, recolectadas de los dos ovinos el mismo día que se realizó el coprocultivo de ambas grupos.

Los coprocultivos se realizaron en tres grupos debido a la capacidad disponible de tres incubadoras, por lo cual se inicio con las muestras de mayor a menor tiempo de refrigeración. De cada grupo se procedió a realizar la técnica de coprocultivo por triplicado (tres coprocultivos de la misma muestra) con 5 g de heces en cada uno. Grupo I de 6 a 4 semanas y 3 controles con heces recién recolectadas sin refrigeración, con un total de 57 coprocultivos incubados al mismo tiempo. Grupo II, se colocaron las muestras de 3 a 1 semana con sus 3 controles. Grupo III, incubaron por triplicado las muestras de 4, 2 y 0 días de conservación, con un total de 18 muestras. En total, se realizaron 132 coprocultivos.

Las muestras se incubaron a una temperatura de 28°C y a partir de los 5 días se revisó para comprobar la presencia de L3 del nematodo. Cuando se detectaron L3 (5 a 7 días de incubación) se pusieron en el aparato de Baerman para la recolección de las larvas en el agua obtenida en dicha técnica. Se recolectaron en tubos graduados de 40 ml de plástico y con tapadera.

Para realizar el conteo se debió hacer lavados de la muestra y finalmente obtener 5 ml de agua. Se realizó de la siguiente manera:

1. Los tubos recolectados de la técnica de Baerman fueron refrigerados a 4°C por 40 minutos, lo que generó que las larvas dejaran de moverse por el agua

fría y se asentaron en el fondo del tubo, ya que la mayoría de los nemátodos se tornan inactivos a temperaturas bajas entre 5 y 10°C (Liébano, *et al.*, 1998).

2. Al sacarlos de la refrigeración y evitando que se mezclara el contenido, se fue extrayendo poco a poco la alícuota (el agua de la superficie) del tubo con una pipeta pasteur y se vertió en una caja de petri. Se revisó minuciosamente el contenido en el microscopio estereoscopio, para asegurarse que no hubiera larvas. Una vez descartada la presencia de larvas se desechó el agua.
3. El proceso se repitió hasta que el agua en el tubo quedó en 5 ml.
4. Se llenó nuevamente el tubo con agua destilada hasta 30 ml y se repitió todo el proceso dos veces más.
5. Cuando se obtuvo por última vez un volumen de 5 ml se homogenizó el contenido del tubo agitándolo de forma circular.
6. Con la ayuda de una micropipeta se realizaron 3 líneas del contenido homogenizado de 100 µl cada una en una caja de petri.
7. En el microscopio estereoscopio se contabilizaron las larvas en los 300 µl.

(Álvares, *et al.*, 2007)

El porcentaje de emergencia se calculó tomando como base el número de HGH obtenido por la prueba de McMaster, comparándolo con las L3/ml obtenidas de los coprocultivos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Em} = \text{L3/ml} / \text{HGH} \times 100 \text{ (Rodríguez y Cob, 2005).}$$

### **3.7 Análisis de datos**

Para determinar el porcentaje de obtención de L3 de *H. contortus* se calculó el porcentaje de emergencia.



### **3.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se basó en la comparación de medias del número de L3 de *H. contortus* que se colectaron del grupo tratamiento y en cada grupo testigo, por lo que se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, donde se determinó la diferencia en la recolección de L3 de *H. contortus* adultos (Zar, 1996). El análisis se realizó por medio del paquete estadístico electrónico SAS 9.1.2 (Cary, 2004).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

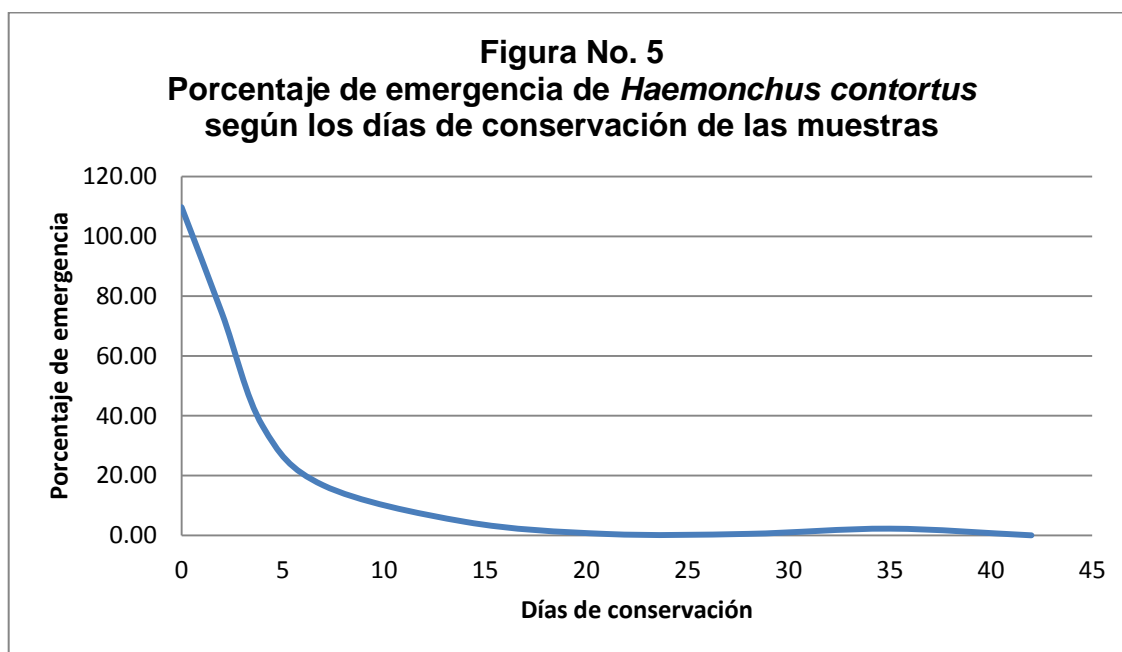
El cuadro 1 muestra que el conteo de L3 de *H. contortus* y su porcentaje de emergencia, se obtuvieron resultados negativo a las 6 semanas de refrigeración, 64.27 (2.23%) a las 5 semanas, 17.55 (0.49%) a las 4 semanas, 6.94 (0.46%) a las 3 semanas, 92.44 (4.53%) a las 2 semanas y 327.22 (16.73%) a primera semana. A los cuatro días de conservación se obtuvieron 274.66 (36.62%) L3, a los 2 días 649.50 (74.22%) y a los 0 días 1371.83 (100%). Los controles 1, 2 y 3 realizados el mismo día de cada grupo tuvieron 1371 (64.51%), 566.33 (64.72%) y 1371 (100%) respectivamente.

**Cuadro 1. Porcentaje de emergencia de larvas 3 de *Haemonchus contortus* obtenidas de muestras conservadas en diferentes tiempos de refrigeración.**

Grupos	Tiempo de conservación semanas	McMaster Promedio HGH*	Huevos en 5 gr de heces**	L3 obtenidas del coprocultivo	Porcentaje de emergencia de L3
Tratamientos	6	641	3205	0	0
	5	575	2875	64.27	2.23
	4	716	3580	17.55	0.49
Control ***	0	425	2125	13.71	64.51
Tratamientos	3	300	1500	6.94	0.46
	2	408	2040	92.44	4.53
	1	391	1955	327.22	16.73
Control ***	0	175	875	566.33	64.72
Tratamientos	4 días	150	750	274.66	36.62
	2 días	175	875	649.50	74.22
Control ***	0	200	1000	1317.83	100

\*HGH = Huevos por gramo de heces. \*\* Total de HGH en 5 gr.

\*\*\* Muestra sin refrigeración recolectada el mismo día del coprocultivo



Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de emergencia en cada grupo control de coprocultivo y el día 0, realizados el mismo día de la toma de muestra, se obtiene un porcentaje del 64 al 100%.

Se encontró que a mayor tiempo de conservación de las heces, el porcentaje de emergencia disminuye considerablemente, caso contrario entre menos días se conserve la muestra hay mas obtención de larvas en el coprocultivo. Lo óptimo es realizar el cultivo larvario con muestras obtenidas el mismo día sin refrigeración para tener un crecimiento mayor de L3 de *H. contortus* y obtener el mejor porcentaje de emergencia.

#### **4.2 Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico en el programa SAS (Cary, 2004), el cual mostró que hay diferencia estadística significativa entre las semanas y días de refrigeración con respecto a cada grupo control en la obtención de larvas de *H. contortus* ( $P < 0.05$ ).

Debido al tipo de distribución de datos de las variables HGH y L3, los registros originales fueron normalizados ( $\text{Log}+0.5$ ), previa evaluación de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Barlett. Con los datos transformados, se procedió al análisis de varianza mediante el procedimiento GLM (Cary, 2004) considerando como factor fijo de variación a *Días de refrigeración*. La comparación de medias se realizó mediante el procedimiento LSMEANS (Cary, 2004). Para su presentación, los datos fueron transformados en sus unidades originales (HGH).

### Cuadro No. 2

Obtención de Larvas 3 de *Haemonchus contortus* a partir de muestras con cero a cuatro días de conservación en refrigeración.

Variable	Día Acumulado		
	0d	2d	4d
HGH	200 <sup>a</sup>	175 <sup>a</sup>	150 <sup>a</sup>
L3	1,371 <sup>a</sup>	649 <sup>ab</sup>	274 <sup>b</sup>
<sup>a,b</sup> Indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre columnas.			

### Cuadro No. 3

Obtención de Larvas 3 de *Haemonchus contortus* procedentes de muestras con 7 a 21 días de conservación en refrigeración.

Variable	Día Acumulado			
	0d	7d	14d	21d
HGH	400 <sup>a</sup>	391 <sup>a</sup>	408 <sup>a</sup>	300 <sup>a</sup>
L3	1,137 <sup>a</sup>	327 <sup>ab</sup>	92 <sup>bc</sup>	7 <sup>c</sup>
<sup>a,b,c</sup> Indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre columnas.				

### Cuadro No. 4

Obtención de Larvas 3 de *Haemonchus contortus* procedentes de muestras con 28 a 42 días de conservación en refrigeración.

Variable	Día Acumulado			
	0d	28d	35d	42d
HGH	50 <sup>a</sup>	716 <sup>b</sup>	575 <sup>b</sup>	641 <sup>b</sup>
L3	583 <sup>a</sup>	17 <sup>ab</sup>	66 <sup>bc</sup>	0 <sup>c</sup>
<sup>a,b,c</sup> Indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre columnas.				

#### 4.3 Discusión de resultados

Los huevos de nematodos gastroentéricos en heces embrionan rápidamente en el medio exterior por lo cual se deben refrigerar si no se van a analizar de inmediato, pero es recomendable realizar los análisis con las muestras con menor tiempo de recolección (Taylor, *et al.*, 2007). Situación que con frecuencia no se puede realizar y es necesario refrigerar las muestras de heces, lo cual puede afectar la obtención de larvas tres de dichos parásitos.

En este estudio se obtuvieron datos relevantes sobre el tiempo óptimo de conservación de muestras de heces para la obtención de L3 de *H. contortus* por medio de coprocultivo, los cuales pueden ser utilizados en la investigación relacionada con el efecto patógeno del parásito y sus posibles alternativas de tratamiento en pruebas *in vitro* e *in vivo*. Estudios donde se realizaron coprocultivos de *H. contortus* a diferentes temperaturas (5 a 35°C) por 22 días, demostró que se obtiene el mejor resultado de 20 a 30°C; menciona que los coprocultivos realizados a 5°C no obtuvieron larvas de ningún tipo y al final del periodo de incubación (22 días), los huevos presentes en dicha muestra se habían deteriorado considerablemente afectando la emergencia de larvas (Coyne y Smith, 1992). También se indica que se puede incubar en un rango de temperatura de 21-27°C por 7 días o a temperatura ambiente (20°C) por 10 días (Kassai, 1998). La incubación del coprocultivo realizado en este trabajo fue de 28°C, dentro del rango adecuado, además, se conservaron las muestras por más de 22 días, lo cual posiblemente explica la razón por la cual no presentaron crecimiento de L3, ya que los huevos deben haberse deteriorado (Coyne y Smith, 1992).

Con respecto a la cantidad de HGH, esta varía mucho por la hora del día de toma de muestra, edad de la infección parasitaria, respuesta inmunológica del huésped y edad del huésped, estrés, alimentación entre otros factores, lo cual puede deberse al ciclo productivo de las hembras adultas de *H. contortus* presentes en el abomaso, ya que presentan un aumento gradual en la producción de huevos antes de llegar a su punto máximo para posteriormente decrecer la producción hacia el final de su vida reproductiva, así mismo se indica que hay oscilaciones en la eliminación de huevos debido a factores biológicos y fisiológicos del parásito y del huésped (Borchert, 1981 y Sargison, *et al.*, 2011). Como se observa en las tablas de resultados, existe mucha variación en el número de huevos contabilizados por la técnica de McMaster en las muestras, y debido a eso fue que el porcentaje de emergencia no se realizó en base a la muestra control, sino al número de HGH de la muestra con la que se realizó el coprocultivo, antes de conservarlo en refrigeración. Se ha mencionado la importancia de la conservación en refrigeración de las muestras de heces para evitar la eclosión de los huevos de parásitos, sin embargo

no se habla de un tiempo límite para conservar la muestra; se indican que la muestra debe llegar al laboratorio en no más de 24 horas de ser tomada para su procesamiento, y no se indica un tiempo en específico para realizar el diagnóstico coprológico, solo se recomienda con frecuencia que las muestras deben ser recién tomadas y conservadas poco tiempo en refrigeración (Mehlhorn, *et al.*, 1994; Kraft y Schillinger, 1998; Wyk, *et al.*, 2004).

El número de huevos en heces se ve afectado por varios factores, entre ellos está la técnica de diagnóstico que depende de los factores biológicos por lo cual se deben utilizar técnicas validadas. Dentro de los factores biológicos están la variación individual, estado reproductivo del huésped, clima, estación del año, variación diarias de clima y la fase de infección del parásito (Villanueva, *et al.*, 2006).

Un estudio determinó la relación entre la carga de huevos en heces y el número de parásitos dentro del huésped, así mismo no se encontró diferencia estadística entre la hora de toma de muestra y la huevos en heces en caprinos (Rinaldi, *et al.*, 2009).

Es importante el estudio de parásitos como *H. contortus*, que tienen una amplia distribución a nivel mundial y que generan grandes pérdidas en la producción ovina. El conocimiento de su ciclo de vida, morfología y de su comportamiento en el ambiente y dentro del huésped, apoya en poder determinar medidas de control químico y de manejo para disminuir las poblaciones del nematodo. Es relevante determinar el tiempo adecuado de conservación para la máxima obtención de L3 de *H. contortus*, los cuales pueden ser utilizados para los siguientes fines: identificación genérica y específica de parásitos, precisión en el diagnóstico, producción de larvas infectantes, producción de material antigénico, estudios *in vitro* e *in vivo* de compuestos nematodocidas, estudios epidemiológicos (Liebano, *et al.*, 2011).

Para la obtención de L3 infectantes se realiza por medio de coprocultivo el cual debe tener las siguientes condiciones para favorecer la mayor cantidad de fases evolutivas del nematodo como son: una humedad relativa óptima entre el 80 y 90%,

la temperatura óptima para la eclosión larvaria es de 26 a 28°C y el pH, el cual tiene un papel importante para el desarrollo larvario que va de es de 6.5 a 7.5 (Liebano, *et al.*, 2011; Wyk, *et al.*, 2004). Estas condiciones y otras como el mantenimiento del coprocultivo diario como remoción del contenido para oxigenar el medio, verificar la humedad del coprocultivo, estabilidad de la incubadora, entre otros, fueron cubiertas en el estudio por lo cual la diferencia de la obtención de las larvas infectantes en este estudio está relacionado al tiempo de refrigeración de las muestras de heces.

El estudio muestra en forma puntual el efecto de la conservación en refrigeración y el utilizar muestras recién obtenidas sin refrigerar, previo al proceso de coprocultivo para la obtención de la mayor cantidad de L3 para ser utilizados para diferentes objetivos, con lo cual se permita ir avanzando en el conocimiento científico de este nematodo que merma en forma importante la producción de rumiantes en el estado de Sonora.



## **V. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIÓN**

### **5.1 Conclusión**

Se determinó que la refrigeración de las heces tiene un efecto en la obtención de L3 de *H. contortus* por medio de la técnica de coprocultivo. Para obtener la mayor cantidad de larvas infectantes se deben utilizar muestras recién recolectadas y sin haberse sometido a refrigeración y hasta dos días refrigeradas.

### **5.2 Recomendación**

Se deben realizar estudios en los cuales se determine el potencial biótico de los nematodos a diferentes edades en infecciones artificiales, para que permita inferir los resultados que se obtengan en pruebas de campo en infecciones naturales. Para avanzar en el conocimiento de *Haemonchus contortus*.

## LITERATURA CITADA

- Álvares, V., Hernández, J. & WingChing, R. (2007). Eficacia de aserrines para inhibir el desarrollo *in vitro* de larvas de parásitos gastrointestinales de ovinos. *Agronomía Costarricense*. 31(1):71-75 ISSN:0377-9424
- Borchert, A. (1981). *Parasitología veterinaria* (Cordero, D.C.M., Trad.). Humboldt, Berlín: Acribia.
- Bush, A.O., Fernández J.C., Esch G.W. & Seed R. (2001). *Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge, E.U.: Cambridge University Press.
- Buxadé, C.C. (1996). *Zootecnia. Bases de la producción animal. Tomo VIII: Producción ovina*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Campos, R.R. Limón, N.E. & Sáenz, F.M. (2007). Efecto en ovinos del albendazol y oxfendazol administrados solos o combinados contra nemátodos resistentes y susceptibles al tiabendazol. *Tec. Pecu. Mex.* Vol 35 No. 1

- Campos, R.R. & Bautista, G.R. (1989). *Diagnóstico de helmintos y hemoparásitos de rumiantes*. México: Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A.C.
- Cary, N.C. (2004). *SAS (Statistical Analysis System) SAS/STAT User's Guide*. [Programa]. Software Version 9.1.2. E.U.: SAS Institute Inc.
- Castaño, Z.R. (2005). *Estudio de la variación genética entre cepas de nematodos parásitos trichostrongylídeos de los rumiantes, resistentes y susceptibles a la ivermectina mediante el empleo de marcadores moleculares*. Tesis de maestría no publicada, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Contreras, A.R, Henao, D.A, Molina, B.R., Cedillo, C.J. & Munguía, X.J. (2012). Neumonía Progresiva Ovina al sur de Sonora. *Memorias del Congreso XXI Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios AC UNAM*. León, Guanajuato, México: ISBN 978-607-9012-03-8.
- Coop, R.L. & Holmes, P.H. (1996). Nutrition and parasite interaction. En Martin, W.B & Aitken, I.D. (Eds.). *Diseases of sheep* (3a ed.). Edinburgo, Escocia: Blackwell Science.
- Coyne, M.J. & Smith, G. (1992). The development and mortality of the free-living stages of *Haemonchus contortus* in laboratory culture. *International Journal for Parasitology*.
- Cruz, G.J., Cedillo, C.J., Santillan, F.M.A, Molina, B.R.M. & Munguía, X.J.A. (2012). Paratuberculosis en un hato ovino de Navojoa, Sonora, introducida por sementales de reemplazo. *Memorias del Congreso XXI Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios AC UNAM*. León, Guanajuato, México: ISBN 978-607-9012-03-8.

- Cuellar, O.J.A. (2007). *Control antiparasitario de los rebaños ovinos* [en línea]. México: Organismo de la Unidad Nacional de Ovinocultores (UNO). [Fecha de consulta: 11 de diciembre de 2012]. Disponible en: <<http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/empezar/parasitosis.html>>
- Ensminger, M.E. & Parker, R.O. (1986). *Sheep & Goat Science (Animal Agriculture Series)* (5th ed.). Danville, Illinois, E.U.: The Interstate Printers & Publishers, Inc.
- Euzéby, J. (2001). *Los parásitos de las carnes: epidemiología, fisiopatología, incidencias zoonósicas* (Sánchez, A.C., del Cacho, M.E., Quílez, C.J. & López, B.F. Trads). Francia: Acribia.
- Johnstone, C. (1998). *Parásitos y enfermedades parasíticas de los animales domésticos* [en línea]: Pensilvania: Pennsylvannia University. [fecha de consulta: 6 de diciembre de 2012] Disponible en: <[http://cal.vet.upenn.edu/projects/merialsp/Trichosp/images/haecy\\_sp.gif](http://cal.vet.upenn.edu/projects/merialsp/Trichosp/images/haecy_sp.gif)>
- Kassai, T. (2002). *Helmintología veterinaria*. España: Acribia.192, 193.
- Kraft, H. & Schillinger, D. (1998). *Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos* (Carda, A.P. Trad). Alemania: Acribia.
- Leite, B.M.L. (2006). *Haemonchus contortus (Barber pole worm). Infestation in goats*. Alabama, E.U.: Alabama corporative extension system.
- Levine, N.D. (1983). *Tratado de Parasitología veterinaria* (Trazona, V.J.M., Trad). Urbana, Illinois, E.U.: Acribia.
- Liébano, H.E., López, A.M., Mendoza, G.P. & Aguilar, M.L. (2011). *Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nemátodos gastrointestinales en rumiantes*. México: INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.

- Liébano, H.E., Vázquez, P.V. & Fernández, R.M (1998). Sobrevivencia de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en un clima subcálido subhúmedo en México. *Vet. Mex* 29(3).
- Mehlhorn, H., Düwel, D. & Raether, W. (1994). *Manual de Parasitología veterinaria* (GRASS Ediciones Trad). Hohenheim, Stuttgart, Alemania: Grass-latros.
- Munguía, X.J.A. (2010). *Manual de prácticas laboratorio de Parasitología*. Sonora, México: Instituto Tecnológico de Sonora.
- Ortega, G.C., Ibarra, D.G.D., Enríquez, C.E. & Zapata, M.M.A. (2008). *Catálogo: Productores de ovinos de registro en el estado de Sonora*. Sonora, México: Centro de Investigación Regional del Noroeste Campo experimental Costa de Hermosillo.
- Quiroz, R.H. (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Limusa.
- Rinaldi, L., Veneziano V., Morgoglione, M.E., Pennacchio S., Santaniello M., Schioppi, M., Musell. V., Fedele, V. & Cringoli, G. (2009). Is gastrointestinal strongyle faecal egg count influenced by hour of sample collection and worm burden un goat?. *Veterinary Parasitology*. 163:81-86.
- Rodríguez, N., Durand, R., Bulnes, C., Gallardo, Y., Muñoz, M.C. & Rodríguez, J. (2003). Mortalidad en ovinos como consecuencia de la infestación por *Haemonchus contortus* y *Moniezia expansa*. *Rev. Salud Animal*. Vol. 25 No 2.
- Rodríguez, V.R.I. & Cob, G.L. (2005). *Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria* (2da ed.). Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.

- Sargison, N.D., Jackson, F. & Gilleard, J.S. (2011). Effects of age and immune suppression of sheep on fecundity, hatching and larval feeding on different strains of *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*.189(3):296-301
- Scheuele, M.C., Mahlinf, M. & Pfister, K. (2009). Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and southern Germany. *Wien Klin Eochenschr*. Oct:121 Sppl 3:46-9. doi: 10.1007/s00508-009-1235-2
- Soto, L.C., Delgado, M. & Cuéllar, A. (2006). *Situación de la ovinocultura en México* [en línea]: México: Cordero Supremo Asesores. [fecha de consulta: 26 de septiembre de 2012] Disponible en: <<http://corderosupremo.com/art01.pdf>>
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology* (3rd ed.). E.U.: Blackwell Publishing.
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary Epidemiology* (3rd. ed.). Oxford, Inglaterra: Blackwell Science.
- Rinaldi, L., Veneziano V., Morgoglione, M.E., Pennacchio S., Santaniello M., Schioppi, M., Musell. V., Fedele, V. & Cringoli, G. (2009). Is gastrointestinal strongyle faecal egg count influenced by hour of sample collection and worm burden un goat?. *Veterinary Parasitology*. 163:81-86.
- Villanueva, D., Perez-Rodriguez, L., Gortazar, C., Hofle, U. & Vinuela, J., (2006). Avoiding bias in parasite excretion estimates: the effect of sampling time and type of faeces. *Parasitology* 133, 251–259.
- Wyk, J.A.V., Cabaret J. & Micahel, L.M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*. 1119: 277-306.

Zajac, A.M. & Conboy, G.A. (2006). *Veterinary clinical Parasitology* (7a ed.). E.U.: Blackwell Publishing.

Zar, J.H. (1996). *Biostatistical analysis*. N.J., E.U.: Prentice-Hall.