

Bioensayos como herramienta para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica en ovinos y caprinos^φ

Beatriz Alejandra Balam-Chan¹, María Gabriela Mancilla-Montelongo^{*2},
Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta¹

Introducción

Las infecciones parasitarias por nematodos gastrointestinales (NGIs) representan uno de los problemas más costosos para los productores de pequeños rumiantes en sistemas de producción basados en el pastoreo (Mendoza de Gives *et al.* 2023). Para controlar este problema, se han usado fármacos antihelmínticos (AHs) comerciales. Sin embargo, los AHs se han usado de forma inadecuada, excesiva y, en muchas ocasiones, sin la recomendación, entrenamiento o supervisión de un médico veterinario (Torres-Acosta *et al.* 2025).

El desconocimiento del uso adecuado de los AHs ha propiciado el surgimiento de poblaciones de NGIs resistentes a los fármacos, es decir, poblaciones de parásitos que sobreviven a dosis establecidas de AHs que eliminarían a la población susceptible (Torres-Acosta *et al.* 2019). Entonces, antes de usar alguno de estos medicamentos en una granja, es necesario diagnosticar si sus poblaciones de NGIs son resistentes a los AHs comerciales disponibles (Kaplan *et al.* 2023).

Aunque el diagnóstico de campo es sencillo, en ocasiones se complica por falta de suficientes animales con cargas parasitarias adecuadas. En este sentido, los bioensayos son prácticos. El objetivo de este trabajo es describir los métodos para diagnosticar la resistencia antihelmíntica (RAH) en ovinos y caprinos con énfasis en bioensayos o pruebas *in vitro*.

^φ ¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán

² Secihti-Universidad Autónoma de Yucatán. *maria.mancilla@correo.uady.mx

DOI: <http://doi.org/10.56369/6589>



Parásitos de importancia veterinaria en pequeños rumiantes

La producción de ovinos y caprinos en el trópico mexicano se basa principalmente en el pastoreo, que representa la forma más económica de obtener alimento para los adultos. Sin embargo, cuando la pradera se maneja inadecuadamente puede reducirse su calidad nutricional y se contamina con parásitos, sobre todo durante la época de lluvias. Entre los parásitos problemáticos para los ovinos y caprinos en pastoreo están los NGIs. Sus infecciones son mixtas, es decir, un mismo animal puede tener gusanos de los géneros *Trichostrongylus* y *Oesophagostomum*, los cuales reducen la absorción de nutrientes, y *Haemonchus contortus* que por ser hematófago (se alimenta de sangre) se le ha atribuido más afectaciones para el ganado (Mendoza-de-Gives *et al.* 2023).

Los géneros de NGIs se desarrollan bajo un ciclo biológico similar que consta de dos fases (una externa y otra interna), y sin necesidad de la intervención de otros animales para completarse. La fase externa inicia con la expulsión de huevos de los NGIs por las heces. En condiciones climáticas adecuadas ($> 20^{\circ}\text{C}$ y 80 % de humedad), los huevos eclosionan a larvas L1 que pasarán al segundo (L2) y tercer estadio (L3, fase infectante). Las larvas L3 migran de las heces hacia el suelo, y suben a los tallos y hojas de pastos y herbáceas que sirven de alimento para los ovinos y caprinos. Aquí inicia la fase interna donde una vez que las larvas L3 son ingeridas, éstas mudan en el rumen, abomaso e intestino, hasta llegar a larvas L5 y finalmente a adultos (machos y hembras). Éstos copulan posteriormente, y las hembras producen huevos haciendo que se reinicie la fase externa del ciclo. En la península de Yucatán, se pueden encontrar al menos tres especies: *H. contortus* alojados en el abomaso, *Trichostrongylus colubriformis* en el intestino delgado y *Oesophagostomum columbianum* en el intestino grueso (Jaimez-Rodríguez *et al.* 2019).

Resistencia antihelmíntica

El control de parasitosis se basa en el uso de AHs, cuya frecuencia ha ocasionado la aparición de poblaciones de parásitos resistentes, y ha provocado que su eficacia sea reducida (Sepúlveda-Vázquez *et al.* 2021). Las familias de AHs poseen varios modos de acción sobre los NGIs de ovinos y caprinos (Debuf 1994), y las más comunes son: (a) Bencimidazoles: se unen a una proteína (β -tubulina) en los microtúbulos de las células de los gusanos y la disrupción de los microtúbulos provoca su muerte (Lacey 1988); (b) Imidazotiazoles (levamisol): son absorbidos por la cutícula de los parásitos y afectan la neurotransmisión causando la parálisis rígida en los nematodos (Boulin *et al.* 2011); (c) Lactonas macrocíclicas: actúan sobre receptores de la membrana celular de los nematodos afectando la motilidad con una parálisis flácida que impide que se mantengan en su zona “habitual” y sean eliminados, además de limitar su capacidad de fecundación y de alimentación (Lifschitz *et al.* 2017). Estas últimas se consideran de amplio espectro ya que también afectan a ectoparásitos como piojos, ácaros y garrapatas.

“El control de parasitosis se basa en el uso de AHs, cuya frecuencia ha ocasionado la aparición de poblaciones de parásitos resistentes, y ha provocado que su eficacia sea reducida.”

Diagnóstico en campo de la RAH

Desparasitar con AHs que han generado resistencia en NGIs ocasiona pérdidas económicas por ser infructuoso. El diagnóstico de la RAH en rebaños de ovinos y caprinos se hace con la prueba de campo de reducción del conteo de huevos en heces (FECRT, por sus siglas en inglés) (Coles *et al.* 2006; Kaplan *et al.* 2023). Esta prueba compara el número de huevos de NGIs en heces de animales antes y después del tratamiento con el fármaco a evaluar. Se seleccionan solo individuos infectados por NGIs (que tengan huevos de NGIs en sus heces). Cada grupo debe estar compuesto por ocho individuos, con un promedio de 40 huevos contados, y hasta 15 animales con un promedio de ocho huevos cada uno. La cantidad de grupos dependerá de cuántos fármacos se evaluarán.

Cada animal se pesa individualmente y se le aplica la dosis aceptada internacionalmente para ovinos o caprinos (Debuf 1994). Dependiendo del tratamiento, se hace un segundo conteo post-tratamiento, 3-7 días después para levamisol, 8-10 días para bencimidazol, o 14-17 días para lactonas macrocíclicas. La interpretación de resistencia se hace con base en el porcentaje de reducción en los individuos tratados o el límite inferior del intervalo de confianza (IC 95%) después del análisis estadístico recomendado por Kaplan *et al.* (2023). Sin embargo, en muchas ocasiones las granjas no tienen suficientes animales parasitados para hacer la prueba de campo y entonces se recurre a los bioensayos.

Los bioensayos para el diagnóstico de RAH

Son técnicas especializadas, bajo ambientes controlados de laboratorio, para conocer los efectos de ciertas sustancias sobre los NGIs. Si la sustancia evaluada tiene algún efecto (sea positivo o negativo) sobre el nematodo, se dice que tiene actividad biológica o farmacológica. Las sustancias evaluadas pueden ser extractos de plantas, fracciones de esos extractos, o sustancias químicas puras, como los AHs comerciales (Ávila-Cervantes *et al.* 2019).

El diagnóstico de resistencia a las tres familias de AHs puede dividirse en dos tipos de bioensayos, de acuerdo con la fase del parásito que afectan, huevos o larvas:

(1) **Prueba de inhibición de eclosión de huevos:** para diagnóstico *in vitro* de RAH a los bencimidazoles (von Samson-Himmeltsjerna *et al.* 2009) y se basa en la actividad ovicida de esta familia de AHs. Se requieren heces frescas del animal de las que se obtiene una suspensión de huevos que se incuban por 48 h a 28 °C en una placa de pozos con soluciones de diferente concentración de tiabendazol, además de un control positivo y uno negativo. El experimento se corta agregando dos gotas de una solución fijadora de Lugol, se cuentan los huevos y las larvas L1 resultantes en cada tratamiento. La prueba se realiza por triplicado con dos réplicas y los datos se procesan con un programa estadístico para calcular la concentración de tiabendazol necesaria para matar el 50% de los huevos (CE50) (Fig. 1). La población de nematodos será considerada resistente cuando la CE50 sea $> 0.1 \mu\text{g/mL}$.

“El diagnóstico de resistencia a las tres familias de AH puede dividirse en dos tipos de bioensayos, de acuerdo con la fase del parásito que afectan: huevos o larvas.”



Figura 1. Diagrama de la prueba de inhibición de la eclosión de huevos para el diagnóstico de RAH a bencimidazoles. El tratamiento por triplicado corresponde a agua, como control negativo (pozos rojos), diferentes diluciones de tiabendazol (pozos cafés), o la solución madre de tiabendazol como control positivo (pozos verdes) (Elaborado por Beatriz Alejandra Balam Chan).

(2) Prueba de inhibición de la migración larvaria: evalúa los efectos del AH sobre la motilidad de las larvas L3 y su capacidad de atravesar una malla (Demeler *et al.* 2010). Se preparan placas de incubación de L3 con soluciones a diferentes concentraciones del fármaco (levamisol o ivermectina), junto con los controles negativo y positivo (Fig. 2: incubación). Se preparan las placas de migración, con tamices (malla de 25 μm) por los cuales deberán pasar las larvas. Para cada placa de incubación, se preparan dos de migración para recuperar las L3 que no logren migrar. Después de 24 h de incubación, el contenido de los pozos se coloca en los tamices de las placas de migración y se dejan migrando por 24 h (Fig. 2: migración).

Después, se recuperan las L3 dentro de los tamices hacia los pozos de la línea inferior. Se agrega Lugol en todos los pozos y se cuentan las larvas migradas (LM) y no migradas (LNM) (Fig. 2: recuperación LNM). La prueba se realiza por triplicado con dos réplicas, y se estima la CE50 con sus respectivos IC 95%. La resistencia de una población de NGI se expresa como la comparación entre la CE50 obtenida con la CE50 de un aislado de referencia que debe estar disponible en cada país.

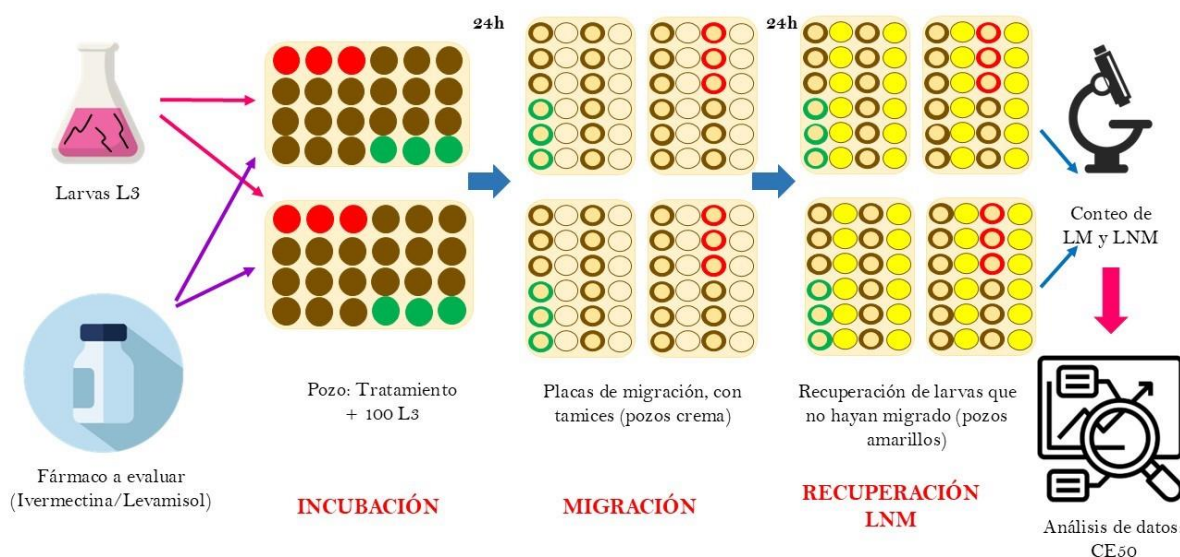


Figura 2. Diagrama de la prueba de inhibición de migración larvaria para el diagnóstico de RAH a levamisol o ivermectina. El tratamiento por triplicado en la “incubación” corresponde a agua como control negativo (pozos rojos), diferentes diluciones de fármaco (pozos cafés) o la solución madre del fármaco como control positivo (pozos verdes). Las larvas migradas (LM) atraviesan la malla del tamiz (pozos crema), y las larvas no migradas (LNM) se recuperan del tamiz hacia el respectivo pozo inferior (amarillo) (Elaborado por Beatriz Alejandra Balam Chan).

Cada bioensayo tiene ventajas y desventajas. La prueba de eclosión de huevos tiene un punto de corte establecido que indica la resistencia o susceptibilidad de la población de NGIs evaluada. Sin embargo, si la recuperación de los huevos de las heces hasta el inicio de la incubación del ensayo *in vitro* se demora más de dos horas, comenzará el desarrollo de la L1 y el resultado podría ser un falso negativo para RAH. En la prueba de migración larval, la

ventaja es un conteo más rápido. No obstante, esta última prueba aún no cuenta con valores estandarizados para declarar resistencia o susceptibilidad a los AHs, y se requiere comparar con valores de CE50 de cepas de referencia de conocida susceptibilidad o resistencia a los fármacos evaluados.

La disponibilidad de estos bioensayos para el diagnóstico de RAH en las poblaciones de NGIs de las granjas también es útil para caracterizar la susceptibilidad de aislados monoespecíficos utilizados en los laboratorios de investigación (Can-Celis *et al.* 2019). Estos aislados pueden considerarse después como las cepas de referencia.

Conclusión

El diagnóstico de RAH es útil para hacer un plan de control adecuado de poblaciones de NGIs con base en las necesidades de cada granja. Aunque la prueba de campo es fácil, cuando no hay suficientes animales con huevos de NGIs en heces, se pueden emplear los bioensayos para conocer la susceptibilidad o resistencia de una población de parásitos en una granja de ovinos o caprinos.

Agradecimientos

MGMM agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti, México) por el proyecto IxM No. 692.

ISSN 2007 - 431 X

Referencias

- Ávila-Cervantes RA, Mancilla-Montelongo G, González-Pech PG, Sandoval-Castro CA y Torres-Acosta F. 2019. Bioensayos *in vitro* de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrociencias* 12(1):34-41.
- Boulin T, Fauvin A, Charvet C, Cortet J, Cabaret J, Bessereau JL y Neveu C. 2011. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetyl-choline receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology* 164(5):1421-1432.
- Can-Celis A, Mancilla-Montelongo G, Castañeda-Ramírez GS, Chan-Pérez JI y Torres-Acosta JFJ. 2019. Isolation of pure *Trichostrongylus colubriformis* strains from naturally infected sheep using two methodologies. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 22:100474.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA y Vercruysse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136(3-4):167-185.
- Debuf YM. 1994. *The Veterinary Formulary: Handbook of Medicines Used in Veterinary Practice*. Second edition. The Pharmaceutical Press. UK. 460 pp.

- Demeler J, Küttler U, El-Abdellati A, Stafford K, Rydzik A *et al.* 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 174(1-2):58-64.
- Jaimez-Rodríguez PR, González-Pech PG, Ventura-Cordero J, Brito DRB, Costa-Júnior LM, Sandoval-Castro CA y Torres-Acosta JFJ. 2019. The worm burden of tracer kids and lambs browsing heterogeneous vegetation is influenced by strata harvested and not total dry matter intake or plant life form. *Tropical Animal Health and Production* 51:2243-2251.
- Kaplan RM, Denwood MJ, Nielsen MK, Thamsborg SM, Torgerson PR, Gilleard JS, Dobson RJ, Vercruysee J y Levecke B. 2023. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology* 318:109936.
- Lacey E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* 18(7):885-936.
- Lifschitz A, Lanusse C y Alvarez L. 2017. Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants. *New Zealand Veterinary Journal* 65(4):176-184.
- Mendoza de Gives P, Torres Acosta JFJ, Figueroa Castillo JA, Soberanes Céspedes N, Mancilla Montelongo *et al.* 2023. Diagnóstico y control sustentable de nematodos gastrointestinales en ovinos y caprinos en la era de la resistencia antihelmíntica. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. México. 106 pp.
- Sepúlveda-Vázquez J, Lara-Del-Rio MJ, Vargas-Magaña JJ, Quintal-Franco JA, Alcaraz-Romero RA *et al.* 2021. Frequency of sheep farms with anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in the Mexican Yucatán peninsula. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 24:100549.
- Torres-Acosta JF, Hoste H, Sandoval-Castro CA, Torres-Farjado RA, Ventura-Cordero J, González-Pech PG, Mancilla-Montelongo MG, Ojeda-Robertos NF y Martínez-Ortiz-de-Montellano C. 2019. El "Arte de la Guerra" contra los nematodos gastrointestinales en rebaños de ovinos y caprinos en el trópico. *Revista Acadêmica Ciência Animal* 17(Supl. 1):39-46.
- Torres-Acosta JFJ, Hoste H, Cuéllar-Ordaz JA, Costa-Junior LM, Mancilla-Montelongo MG, González-Pech PG, Marin-Tun CG y Sandoval Castro CA. 2025. Challenges associated with controlling internal parasites in goats. En: Sejian V, Silpa MV y Thirunavukkarasu D (eds.) *Sustainable goat production in the changing climate*. Academic Press. India. pp. 245-262.
- von Samson-Himmelstjerna G, Coles GC, Jackson F, Bauer C, Borgsteede F *et al.* 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research* 105(3):825-834.

Balam-Chan BA, Mancilla-Montelongo MG, Torres-Acosta JFJ. 2025. Bioensayos como herramienta para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica en ovinos y caprinos. *Bioagrociencias* 18 (2): 170-176.
DOI: <http://doi.org/10.56369/BAC.6589>