



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS
GASTROINTESTINALES EN OVINOS TROPICALES DE PELO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Innovación Ganadera

Presenta:

ITZEL SANTIAGO FIGUEROA

Bajo la supervisión de: ALEJANDRO LARA BUENO, DOCTOR



Chapingo, Estado de México, junio 2020.



ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS TROPICALES DE PELO

Tesis realizada por ITZEL SANTIAGO FIGUEROA bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de: DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: _____
Dr. Alejandro Lara Bueno

ASESOR: _____
Dr. Roberto González Garduño

ASESOR: _____
Dr. José Guadalupe García Muñiz

ASESOR: _____
Dr. Jorge Luis De La Rosa Arana

ASESOR: _____
Dra. Ema De Jesús Maldonado Simán

LECTOR EXTERNO: _____

Dr. Agustín Olmedo Juárez

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
DATOS BIOGRÁFICOS	viii
Resumen General	ix
General Abstract	xi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Hipótesis.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares	3
Estructura de la tesis.....	3
2 MÉTODOS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS: REVISIÓN.....	7
3 ANTHELMINTIC RESISTANCE IN HAIR SHEEP FARMS IN A SUB- HUMID TROPICAL CLIMATE, IN THE HUASTECA POTOSINA, MEXICO....	30
4 ANTHELMINTIC ASSESSMENT OF FOUR FODDER TREES AGAINST <i>Haemonchus contortus</i> UNDER <i>IN VITRO</i> CONDITIONS	35

5	DISCUSIÓN GENERAL.....	52
---	------------------------	----

LISTA DE CUADROS

Capítulo 2

1. Porcentaje de efectividad de extractos usados contra nematodos gastrointestinales de ovinos, reportados en literatura.....14
2. Porcentaje de efectividad de hongos nematófagos usados contra nematodos gastrointestinales de ovinos, reportados en literatura..... 16

Capítulo 3

1. Percentage of sheep infected by gastrointestinal nematodes on the tested farms.....32
2. Results of the faecal nematode egg count reduction test (FECRT) and egg hatch test (EHT) to determine anthelmintic resistance in hair sheep using a benzimidazole (febendazole) in a sub-humid tropical climate in Mexico..... 33
3. Results of faecal nematode egg count reduction tests (FECRT) to determine anthelmintic resistance in hair sheep using a macrocyclic lactone (ivermectin) and an imidazothiazole (levamisole) in a sub-humid tropical climate in Mexico..... 33

Capítulo 4

1. Percentage of hatching eggs and infective larvae mortality (L3) of *Haemonchus contortus* caused by a *Brosimum alicastrum* hydroalcoholic extract..... 41
2. Percentage of hatching eggs and infective larvae mortality (L3) of *Haemonchus contortus* caused by a *Guazuma ulmifolia* hydroalcoholic extract..... 41
3. Percentage of hatching eggs and infective larvae mortality (L3) of *Haemonchus contortus* caused by a *Erythrina americana* hydroalcoholic extract.....42

4. Percentage of hatching eggs and infective larvae mortality (L3) of <i>Haemonchus contortus</i> caused by a <i>Leucaena leucocephala</i> hydroalcoholic extract.....	43
5. Hydroalcoholic extract lethal concentrations 50 and 90 from four forage tree, required to egg hatching inhibition and infective larvae killing (L3) from <i>Haemonchus contortus</i> at 48 hours.....	44
6. Results of hydroalcoholic extract qualitative phytochemical analysis.....	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

1. Amplification of the PCR products by endpoint corresponding to the fragments of susceptibility (550 bp, S) or resistance (250 bp, R). MM: Molecular marker. R1 corresponds to farm 1, R2 to farm 2 and so on for each ranch..... 32
2. Genotypes of larvae-infecting gastrointestinal nematodes before anthelmintic treatment. *Ostertagia spp.* 257 bp, *Haemonchus spp.* 176 bp, *Oesophagostomus spp.* 329 bp, *Trichostrongylus spp.* 243 bp, *Cooperia spp.* 151 bp..... 32

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por darme la oportunidad de realizar todos mis estudios desde la preparatoria y concluir con el Doctorado.

Al **Posgrado en Producción Animal** y a todos los profesores que forman parte de esta comunidad, me llevo gran parte de los conocimientos de cada uno.

A los Doctores **Alejandro Lara Bueno, Roberto González Garduño, José Guadalupe García Muñiz, Jorge Luis de la Rosa Arana y Ema de Jesús Maldonado Simán** por todo su apoyo y oportunos aportes para la realización del presente trabajo, así como la disposición y empatía que siempre mostraron hacia mí y mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Unión Regional de Productores de Ovinos de la Huasteca Potosina, por su entera colaboración y a los productores de ovinos que lo conforman por prestar sus animales para realizar el diagnóstico de resistencia antihelmíntica.

Al Centro de Investigación Disciplinaria en Salud Animal-INIFAP por prestar sus instalaciones y equipo para realizar la estancia de investigación, así como por todo el apoyo de los grandes investigadores que lo conforman.

Al Dr. Agustín Olmedo Juárez por el apoyo, orientación y gran entusiasmo que siempre mostró para compartir sus conocimientos y experiencia en la realización de la evaluación del efecto nematocida de forrajeras arbustivas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos generales

Nombre: Itzel Santiago Figueroa

Fecha de nacimiento: 11 de junio de 1991

Lugar de nacimiento: Tlalnepantla, Estado de México

Estado civil: Casada

Domicilio: Calle Tercera privada de Insurgentes, San Diego, Texcoco, Estado de México.

CURP: SAFI910611MMNCGT03

Cédula profesional: 08764292

Cédula de maestría: 11511318



Desarrollo Académico

Licenciatura: Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo (2009-2013).

Maestría: Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera. Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo (2014-2015).

Doctorado: Doctorado en Ciencias en Innovación Ganadera. Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo (2016-2019).

Resumen General

ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS TROPICALES DE PELO

Los antihelmínticos provenientes de extractos de plantas pueden representar una alternativa a los obtenidos por síntesis química, para disminuir los efectos adversos que los nematodos gastrointestinales (NGI) causan en el ganado ovino. Uno de los objetivos del estudio fue identificar resistencia antihelmíntica (RA) a bencimidazol, ivermectina y levamisol en rebaños ovinos en la región de la Huasteca Potosina, así como evaluar la efectividad *in vitro* de nematicidas alternativos basados en extractos hidroalcohólicos de las forrajeras arbóreas *Leucaena leucocephala*, *Guazuma ulmifolia*, *Erythrina americana* y *Brosimum alicastrum*, para el control de NGI de ovinos. La identificación de RA se determinó mediante diagnóstico de campo en la región de la Huasteca Potosina en México. Para documentar la problemática de la resistencia antihelmíntica causada por el uso de productos de síntesis química, se realizó una extensa revisión de la literatura científica, y se identificaron las posibles opciones para el control alternativo de NGI utilizando extractos de varias especies de plantas. Para este fin, se evaluó la efectividad nematicida *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de las cuatro arbóreas forrajeras. De los productos de síntesis química, se identificó 100% de RA para bencimidazol e ivermectina, y susceptibilidad para levamisol. Se identificaron opciones no químicas para el control de nematodos gastrointestinales y, una de las más estudiadas fue el uso de plantas con compuestos vermífugos bioactivos, destacando las leguminosas por su alto contenido de taninos. Los extractos hidroalcohólicos de los árboles forrajeros estudiados, contienen metabolitos secundarios como taninos, saponinas,

triterpenos y alcaloides, y mostraron acción nematicida *in vitro* tanto en huevos como en larvas de *Haemonchus contortus*. Se concluye que la resistencia antihelmíntica a productos de síntesis química es un problema presente en la región de la Huasteca Potosina, no obstante, las plantas forrajeras con compuestos nematicidas bioactivos representan una opción para controlar cargas parasitarias en ovinos pastoreando forrajes tropicales.

Palabras clave: antihelmínticos alternativos, forrajes bioactivos, ovinos de trópico, resistencia antihelmíntica.

¹ Tesis de Doctorado en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Itzel Santiago Figueroa
Director: Dr. Alejandro Lara Bueno

General Abstract

ALTERNATIVES FOR THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN TROPICAL HAIR SHEEP

Alternative anthelmintics to those of chemical origin are an option to reduce the adverse effects that gastrointestinal nematodes (GIN) cause in sheep. The study aimed to identify anthelmintic resistance (AR) to benzimidazole, ivermectin and levamisole in flocks of hair sheep from the “Huasteca Potosina” region in Mexico, as well as to evaluate the *in vitro* nematicide activity of hydroalcoholic extracts of the forage trees *Leucaena leucocephala*, *Guazuma ulmifolia*, *Erythrina americana* and *Brosimum alicastrum*, for the control of GIN of sheep. The identification of anthelmintic resistance was determined by a field diagnostic test carried out in the Huasteca Potosina region in Mexico. To document the problem of anthelmintic resistance caused by the use of chemical synthesis products, an extensive review of the scientific literature was carried out. Possible options for the alternative control of gastrointestinal parasites using plant extracts were identified. For this purpose, the *in vitro* nematicidal effectiveness of hydroalcoholic extracts of the four forage trees was evaluated. Of the chemical synthesis products, 100% AR was identified for benzimidazole and ivermectin, and susceptibility for levamisole. Several non-chemical options for the control of GIN were identified, and one of the most studied is the use of plants with bioactive vermifuge compounds, highlighting legumes for their high tannin content. The hydroalcoholic extracts of the studied forage trees contain secondary metabolites such as tannins,

saponins, triterpenes, alkaloids, and showed nematicidal action *in vitro* in both eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. It is concluded that anthelmintic resistance to chemical synthesis products is a problem present in the Huasteca Potosina region. Forage plants with bioactive nematicidal compounds represent an option to control parasitic loads of hair sheep grazing tropical pastures.

Key words: alternative anthelmintics, nematicide forages, tropical sheep, anthelmintic resistance.

²Doctoral Thesis in Livestock Innovation, Graduate Program in Animal Production, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Itzel Santiago Figueroa
Advisor: Dr. Alejandro Lara Bueno

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas de producción ovina en el trópico, se enfrentan a problemáticas originadas por la incidencia de parásitos internos, debido a las condiciones de alta temperatura y humedad que favorecen su desarrollo, en específico, por los nematodos gastrointestinales (NGI), que son los que ocasionan las mayores pérdidas económicas para los ganaderos. En Australia, se ha calculado el costo anual asociado a los parásitos gastrointestinales en 100 millones de dólares en el ganado ovino; además, el problema de los parásitos gastrointestinales en ovinos de Australia ha sido catalogado como el segundo problema más importante de salud que afecta a los rebaños (Lane, Jubb, Shephard, Webb, & Fordyce, 2015). En tanto que en México se han estimado pérdidas causadas por NGI en ganado bovino (tanto de leche como de carne) por cerca de 500 millones de dólares para 2013 (Rodríguez et al., 2017).

Para mitigar los efectos que estos organismos causan en la salud del ganado, se ha recurrido al uso frecuente de tres principales grupos de antihelmínticos de amplio espectro (bencimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas), los cuáles en sus inicios resultaron efectivos (Tariq, 2017). Sin embargo, poco después de que se empezó a usar el tiabendazol (el primer antihelmíntico moderno), se reportó el primer caso de resistencia antihelmíntica y a partir de entonces se tienen muchos indicios de resistencia para los tres grupos de antihelmínticos (Sangster, Cowling, & Woodgate, 2018). Durante años se ha reportado resistencia antihelmíntica en muchas regiones del mundo, tanto en Europa como en Australia, así como en África (Lamb, Elliot, Chambers, & Chick, 2017; Mphahlele, Tsotetsi, Moerane, Mashiloane, & Thekiso, 2019; Traversa & von Samson, 2016). En diversas zonas de México, también se ha reportado resistencia a los tres grupos de antihelmínticos; en Tabasco se encontró resistencia a los tres grupos en todos los rebaños muestreados (Herrera, Ojeda, González, Cámara, & Torres, 2017), en la Zona Centro del mismo estado se reportó resistencia a albendazol y closantel (Alcalá, Ocampo, Sumano, Gutiérrez, & Tapia, 2016). Más recientemente, se creó un nuevo grupo de antihelmínticos

derivado de amino acetonitrilo (monepantel); sin embargo, a menos de cuatro años de su introducción en el mercado ya se reportó resistencia (Zajíčková, Thuy, Skálová, Raisová, & Matoušková, 2020).

Para elaborar estrategias eficientes de control de NGI en los rebaños afectados, es de suma importancia diferenciar los rebaños resistentes de los susceptibles. De esta forma se podrá contribuir a retardar el desarrollo de resistencia en los rebaños susceptibles y evitar que la presión de selección de cepas resistentes siga aumentando en los rebaños donde ya se encuentra resistencia establecida (Kaplan, 2020).

Se han estudiado nuevas alternativas para ayudar a la prevención y el control de los NGI, como la creación de químicos que tienen modo de acción diferente, el uso de forrajes con compuestos bioactivos, el resguardo de cepas de nematodos susceptibles a los antihelmínticos, entre otros (Zajíčková et al., 2020). Una de las alternativas que tiene mayor potencial es el uso de forrajes con elementos bioactivos, debido a que diversas plantas usadas para la alimentación animal, además de aportar nutrimentos a la dieta, contienen metabolitos secundarios que presentan actividad biológica, principalmente taninos condensados, flavonoides, alcaloides y terpenos (Taylor, Coop, & Wall, 2016; Zajíčková et al., 2020). Algunas de las plantas más usadas en las regiones tropicales para la alimentación del ganado por su alto contenido de proteína son *Brosimum alicastrum* (13%), *Leucena sp.* (25%), *Guazuma ulmifolia* (12%), *Erythrina sp* (29%), entre otras (Flores, Bolívar, Botero e Ibrahim, 1998; Carranza; Sánchez, Pineda y Cuevas, 2003). Algunas de estas plantas también han sido estudiadas por su contenido de metabolitos secundarios (López, Ibarra, Cantó, Vásquez, Tejada y Shimada, 2005) taninos condensados principalmente, contra nematodos que afectan a los ovinos ya que se han comprobado sus efectos antihelmínticos (Torres, Alonso, Hoste, Sandoval y Aguilar, 2008). Aunque se han realizado diversos estudios sobre el tema, todavía no está claro como funcionan estos metabolitos y queda mucha brecha de conocimiento para

establecer la dosis, los efectos secundarios, el modo de acción y la posible resistencia de los nematelmintos a estos metabolitos.

Hipótesis

En la región Huasteca de San Luis Potosí existe resistencia antihelmíntica de los ovinos hacia alguno de los grupos de fármacos comúnmente usados.

Las especies forrajeras del presente estudio exhiben propiedades antihelmínticas y pueden representar una opción viable para el control de nematodos gastrointestinales en ovinos.

Objetivo general

Evaluar métodos alternativos para el control de nematodos gastrointestinales en ovinos mediante extractos de forrajes arbustivos para el posible uso en rebaños resistentes a los antihelmintícos convencionales.

Objetivos particulares

- Realizar un diagnóstico de la resistencia antihelmíntica a Fenbendazol, Ivermectina y Levamisol, usando las técnicas de conteo fecal de huevos en campo, inhibición de la eclosión de huevos *in vitro*, y confirmación con PCR.
- Evaluar, *in vitro*, el efecto nematicida de extractos hidroalcohólicos de las arbóreas forrajeras *Leucaena leucocephala*, *Guazuma ulmifolia*, *Erythrina americana* y *Brosimum alicastrum*, para el control del nematodo *Haemonchus contortus*.

Estructura de la tesis

El **Capítulo 2** es una revisión de la literatura científica que aborda los principales métodos de control de NGI empleados en ovinos. Este capítulo cubre una descripción de los antihelmínticos químicos comúnmente usados por los

productores, el desarrollo de resistencia antihelmíntica a estos productos de síntesis química, así como los métodos no convencionales que se han desarrollado en las últimas décadas, como son: el manejo del pastoreo, el uso de plantas bioactivas, los hongos nematófagos, el desarrollo de vacunas y, la selección genética de animales resistentes.

Para implementar programas de control de parásitos en el ganado se requiere conocer el estado de las poblaciones de nematodos que existen en una región específica. Por lo tanto, en el **Capítulo 3** de la presente tesis se presenta el resultado del trabajo realizado en una región cálida de México, donde no se tenían reportes de resistencia antihelmíntica. Esto, a pesar de las condiciones climáticas con las que cuenta y de la importancia que el ganado ovino tiene en la región.

Una vez confirmado el grave problema de resistencia antihelmíntica múltiple en la región de estudio, se consideró necesario abordar el problema y proponer alternativas que podrían ayudar a disminuir el impacto negativo de las parasitosis. Por lo anterior, se procedió a la obtención de extractos hidroalcohólicos de arbóreas forrajeras para evaluar su actividad antihelmíntica sobre *Haemonchus contortus*, el principal nematodo que afecta al ganado ovino. Los resultados de esta investigación se presentan en el **Capítulo 4**.

Literatura citada

- Alcalá, C. Y., Ocampo, C. L., Sumano, L. H., Gutiérrez, O. L., & Tapia, P. G. (2016). Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Veterinaria México*, 3, 1-11 (Open access). doi: 10.21753/vmoa.3.4.374.
- Carranza, M. M. A., Sánchez, V. L. R., Pineda, L. M. R. y Cuevas, G. R. (2003) Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caducifolio de la sierra de Manantlán. *Agrociencia*, 37, 203-210.

- Flores, O. I., Bolivar, D. Ma., Botero, J. A. & Ibrahim, M. A. (1998). Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajera para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 10. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd10/1/cati101.htm> Consultado el día 20 de Mayo de 2020.
- Herrera, M. F. A., Ojeda, R. N. F., González, G. R., Cámara, S. R., & Torres, A. J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid trópics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9, 29-33.
- Kaplan, M. R. (2020). Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36, 1, 17-30.
- Lamb, J., Elliot, T., Chambers, M., & Chick, B. (2017). Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Veterinary Parasitology*, 241, 48-51.
- Lane, J., Jubb T., Shephard, R., Webb, J., & Fordyce, G. (2015). Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Meat & Livestock Australia Limited. Sydney Australia.
- López, J., Ibarra, O.F., Cantó, G.J., Vásquez, C.G., Tejada, Z.I., Shimada, A. 2005. In vitro effect of condensed tannins from tropical fodder crops against eggs and larvae of the nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 3:191-194.
- Mphahlele, M., Tsotetsi K. A. M., Moerane, R., Mashiloane, L. M., & Thekiso, M. M. O. (2019). Risk factors associated with occurrence of anthelmintic resistance in sheep of resource-poor farmers in Limpopo province, South Africa. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 555-563.
- Rodríguez, V. I., Grisi, L., Pérez, de L. A. A., Silva, V. H., Torres, A. J. F. J., Fregoso, S. H., Romero, S. D., Rosario, C. R., Saldierna, F., & García, C.

- D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in México. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 61-74.
- Sangster, C. N., Cowling, A., & Woodgate, G. R. (2018). Ten events that defined anthelmintic resistance research. *Trends in Parasitology*, 34, 553-563.
- Tariq, A. K. (2017). Anthelmintic and emergence of anthelmintic resistant nematodes in sheep: need of an integrated nematode management. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 2, 13-19.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology*. Oxford, UK: Wiley blackwell.
- Torres, A. J. F. J., Alonso, D. M. A., Hoste, H., Sandoval, C. C. A., Aguilar, C. A. J. (2008) Efectos negativos y positivos del consume de forrajes ricos en la producción de caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9, 83-90.
- Traversa, D., & von Samson, H. G. (2016). Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in Europe. *Small Ruminant Research*, 135, 75-80.
- Zajíčková, M., Thuy, L. N., Skálová, L., Raisová, L. S., & Matoušková, S. (2020). Anthelmintic in the future: Current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discovery Today*, 25, 430-437. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>

Este capítulo fue redactado para ser enviado a *Tropical and Subtropical Agroecosystems*

2 MÉTODOS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS: REVISIÓN

METHODS FOR THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN SHEEP: A REVIEW

Itzel Santiago-Figueroa¹, Alejandro Lara-Bueno^{1}, Roberto González-Garduño²,
Ema J. Maldonado-Simán¹.**

¹ *Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C.P. 56230. *alarab_11@hotmail.com*

² *Unidad Regional Universitaria Sursureste. Universidad Autónoma Chapingo. Km 7 Carretera Teapa-Vicente Guerrero, Ranchería San José Puyacatengo, Teapa, Tabasco. C.P. 86800.*

***Corresponding author*

Summary

In sheep production systems, the control of gastrointestinal nematodes (GIN) is fundamental for a profitable production; although for this purpose, there are several options, none eliminates the problem. The objective of this review was to collect and analyze the information available in the scientific literature on the methods of anthelmintic control in sheep, especially those related to farm and flock management, and the use of plant extracts with biological action against GIN. The resistance reported in the three groups of anthelmintics (benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones) has led to the search for options such as extracts of forage plants and their inclusion in grazing systems, the use of properly balanced diets to improve the response of the host's immune system against the GIN. Additionally, vaccines and nematophagous fungi have proven to be useful, but more research is needed on these subjects. The selection of breeds and individuals within breeds, resistant to nematodes, is also a recommended practice for the control of GIN. It is concluded that more research is required to develop viable GIN control alternatives, using both plant extracts and innovations in farm and flock management, and implemented as management programs in sheep production systems in tropical Mexico.

Resumen

El control de nematodos gastrointestinales (NGI) en sistemas de producción de ovinos es fundamental para una producción rentable; aunque para este fin existen varias opciones, ninguna elimina el problema. El objetivo de esta revisión fue recabar y analizar la información disponible en la literatura científica sobre los métodos de control antihelmíntico en ovinos, especialmente los relacionados con el manejo de la explotación y el rebaño, y el uso de extractos de plantas con acción biológica contra los NGI. La resistencia reportada en los tres grupos de antihelmínticos (bencimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas) ha llevado a la búsqueda de opciones como extractos de plantas forrajeras y su inclusión en los sistemas de pastoreo, y el uso de dietas balanceadas para mejorar la respuesta del sistema inmune del hospedero en contra de los NGI. Adicionalmente, las vacunas y el uso de hongos nematófagos han demostrado ser útiles, pero se requiere más investigación en estos temas. La selección de razas y animales dentro de razas, resistentes a nematodos, es también una práctica recomendada para el control de NGI. Se concluye que se requiere más investigación para desarrollar alternativas viables de control de NGI, utilizando extractos de plantas e innovaciones en el manejo de la explotación y del rebaño, para implementarse como programas integrales de manejo en los sistemas de producción ovina del trópico mexicano.

Keywords: anthelmintic resistance, plant extracts, *Haemonchus contortus*, alternative control of endoparasites.

Palabras clave: resistencia antihelmíntica, extractos vegetales, *Haemonchus contortus*, control alternativo de endoparásitos.

Introducción

La infección por parásitos gastrointestinales en ovinos es una de las principales limitantes de la productividad de esta especie. Los parásitos internos causan pérdidas de peso y en casos extremos la muerte de los animales, sobre todo en climas tropicales, además de ser uno de los problemas de mayor costo de producción (Rojas *et al.*, 2006). En las unidades de producción es importante disponer de algún método alternativo de control para los

nematodos gastrointestinales (NGI), debido a que se obtienen mayores ganancias de peso en animales libres de parásitos, ya que el costo metabólico de un animal parasitado es alto (Retama *et al.*, 2012). Sin embargo, en los últimos años diversas investigaciones en varios países han reportado resistencia a los antihelmínticos de origen químico, por lo que es necesario recurrir a otros métodos de control, o a la combinación de métodos alternativos, lo que ha llevado a plantear el término de control integral de parásitos (Torres *et al.*, 2012).

En aportación para reducir la resistencia antihelmíntica (RA), se han estudiado diversos métodos de control, como el manejo del pastoreo, el cual ha mostrado reducir la infestación de nematodos; por ejemplo, el uso de praderas asociadas con arbóreas o arbustivas (Hoste *et al.*, 2005; Soca *et al.*, 2007). Esta es una opción fácilmente aplicable por los ovinocultores, aunado a que el contenido de metabolitos secundarios tales como taninos, saponinas y glucósidos, que poseen este tipo de plantas forrajeras, contribuye a la reducción de las poblaciones de NGI en los rebaños que ya se encuentran infectados. Los taninos, particularmente han mostrado intervenir en el ciclo de vida de los nematodos, y causar daños a sus estructuras impidiendo su reproducción (Martínez *et al.*, 2013). Su utilización ha demostrado que los animales parasitados prefieren una dieta rica en taninos, sobre aquella que carece de ellos (Villalba *et al.*, 2009). Otra de las estrategias usadas para mejorar la resiliencia de los ovinos frente a los nematodos es la suplementación con proteína, misma que ayuda a mejorar la respuesta inmune a nivel de abomaso e intestino delgado, y mejorar la expresión de anticuerpos en la sangre (Hoste *et al.*, 2012; Toscan *et al.*, 2017). El control de NGI con hongos nematófagos funciona para reducir las poblaciones de larvas a nivel *in vitro* e inoculadas en el animal (Ribeiro y de Araújo, 2014). Sin embargo, aún existen condiciones que impiden su implementación en campo; por ejemplo, el medio de cultivo (González *et al.*, 2005), así como la ausencia de un producto comercial y estandarizado (Ribeiro y de Araújo, 2014). Las vacunas son una innovación en desarrollo para disminuir el impacto de las cargas de nematodos en los ovinos; sin embargo, hasta ahora no se ha logrado estandarizar tanto el coadyuvante, como el antígeno que mejor funcione (Bassetto y Amarante, 2015). Los animales resistentes al ataque contra NGI puede ser una opción viable, ya que estos animales además de lograr una menor infección en las pasturas, logran mejores ganancias de peso que los animales susceptibles (Morteo *et al.*, 2004; Bambou *et al.*, 2009).

Control con antiparasitarios químicos y desarrollo de resistencia

Durante muchos años el control de los NGI en los rumiantes se realizó con antihelmínticos de origen químico, como el único método usado para lograr la mayor producción en los animales (Pedreira *et al.*, 2006). El uso sistemático de estos productos originó problemas serios en la ovinocultura, y con cada aplicación que se realizaba, se incrementó la resistencia antihelmíntica (RA) en las poblaciones de nematodos (Kaplan *et al.*, 2004), al grado que este problema ha sido reportado y revisado por autores en muchas partes del mundo (Mwamachi *et al.*, 1995; Echevarria *et al.*, 1996; Papadopoulos, 2008). El desarrollo tan rápido de la RA, en parte, fue por el uso continuo de los productos químicos y también porque los NGI tienen una tasa de reproducción muy alta, lo cual favorece la transmisión de genes de nematodos resistentes de una generación a otra (Kaplan *et al.*, 2004). Los bencimidazoles son un grupo de compuestos químicos con mayor frecuencia de uso en ovinos, por su fácil aplicación por vía oral. Estos compuestos actúan destruyendo los microtúbulos de las células intestinales de los NGI, impidiendo la utilización de la glucosa consumida, y ocasionando así su muerte (Martin, 1997). El primer producto usado en animales domésticos con fines antihelmínticos fue tiabendazol y mostró una alta efectividad en ovinos, especialmente contra *Trichostrongylus* y *Ostertagia* (Anderson *et al.*, 1969). Sin embargo, después de veinte años se han encontrado poblaciones de nematodos resistentes a diferentes productos de la familia de los bencimidazoles, tal como el albendazol y febendazol (Martin *et al.*, 1985). En la actualidad, se han reportado rebaños resistentes a los diferentes productos del grupo de bencimidazoles, tanto en Europa (Traversa y von Samson, 2016) como en varios países de América Latina, entre ellos México y Colombia (García *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2017).

El potencial antihelmíntico de los imidazotiazoles, de los cuales el más conocido es el levamisol, se empezó a probar en las diferentes especies de interés zootécnico, demostrando ser eficaz, al causar parálisis de los helmintos e interfiriendo en las conexiones neuromusculares (Coles *et al.*, 1975). Este antihelmíntico es usado para reducir las cargas parasitarias en ovinos infestados con *H. contortus* resistentes a bencimidazoles (Bennet *et al.*, 1980). Sin embargo, durante la década de los 80 se reportó

resistencia en NGI, identificándose los *loci* involucrados en el desarrollo de resistencia (Lewis *et al.*, 1980), así como el mecanismo de resistencia de *T. colubriformis* y *H. contortus*, y se describió como una disminución en la expresión de los receptores para levamisol (Sangster *et al.*, 1988).

Otros productos empleados actualmente son las lactonas macrocíclicas, éstas son derivadas de la fermentación de bacterias *Streptomyces avermitilis* (Burg *et al.*, 1979) usadas en décadas pasadas, con alta eficacia para eliminar nematodos gastrointestinales hasta por tres semanas al ser administradas por vía subcutánea (Marriner *et al.*, 1987). Las lactonas macrocíclicas actúan en el músculo de los NGI causando parálisis (Martin, 1997). A finales de la década de los 80 y principios de los 90 se empezaron a realizar los primeros experimentos *in vivo* e *in vitro*, que demostraron el desarrollo de resistencia hacia ivermectina en diversas especies de nematodos que afectan a ovinos (Giordano *et al.*, 1988; Miller y Barras, 1994). Actualmente, se ha demostrado que, en algunas zonas, principalmente tropicales, existe también resistencia cruzada a los tres grupos de antihelmínticos (Herrera *et al.*, 2017). Simultáneamente, en algunos trabajos se concluyó que los antihelmínticos del grupo de albendazoles tienen menor eficacia que los otros dos grupos, mientras que otros estudios demuestran que ningún tratamiento es eficaz para reducir la carga parasitaria en ovinos (Costa *et al.*, 2017; Goolsby *et al.*, 2017).

Alternativas de control de NGI

Manejo del pastoreo

El manejo del sistema de pastoreo tiene impacto sobre las poblaciones de NGI. El fundamento de este método de control, es proporcionar el descanso suficiente a los potreros para reducir la supervivencia de las larvas infectantes de los NGI, de modo que después de 30 a 50 días de descanso de un potrero, los animales tengan menores probabilidades de infestarse con los NGI. Aunque, se ha observado que los ovinos manejados en pastoreo rotacional, muestran mayores conteos fecales de huevos de NGI, lo cual se explica porque se ven obligados a alimentarse de pasto más cerca del suelo, y por lo tanto a consumir mayor número de larvas infectantes 3 (L₃) (Hutchings *et al.*, 2002; Vásquez *et al.*, 2006).

Los sistemas de pastoreo asociados de pasturas con árboles y/o arbustos forman un ambiente desfavorable para los NGI, ya que al consumir el forraje de estratos más elevados consumen un menor número de larvas infectantes (Hoste *et al.*, 2005). Además, las heces de los animales depositadas en el suelo, son descompuestas más rápidamente en un sistema asociado con árboles que en una pradera monófito. Las heces depositadas en el suelo con manejo silvopastoril, al día siete ya se ha descompuesto el 99% de la materia orgánica, y no contiene larvas infectantes, mientras que en el monocultivo apenas se ha descompuesto el 65% (Soca *et al.*, 2007). Aunque la infestación de los potreros puede ser desde el día cuatro en el que algunas larvas infectantes abandonan las heces. La humedad se menciona como el principal factor para la sobrevivencia de las larvas, y debido a las interacciones que se obtienen en sistemas asociados de leñosas y pastos, aún existen diversos resultados, algunas veces desfavorable y otras veces favorables para los nematodos (Ferreira *et al.*, 2016).

Forrajes con actividad antihelmíntica

Especies diversas de plantas se han usado con éxito en el control de parásitos gastrointestinales (Cuadro 1), ya que constituyen una opción económica y efectiva para el control de nematodos en la producción ovina (Akhtar *et al.*, 2000). Si bien las plantas no eliminan por completo a los parásitos, sí tienden a disminuir su reproducción y con ello es posible reducir el uso de antihelmínticos químicos (Molan *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los ovinos seleccionan dietas ricas en taninos cuando se encuentran parasitados con nematodos (Villalba *et al.*, 2009) y aunque los taninos no son los únicos metabolitos con capacidad antihelmíntica, sí son los que más se han estudiado. Además de los taninos, se han incluido en las investigaciones otros compuestos secundarios como los alcaloides y glucósidos (Githiori *et al.*, 2006), polifenoles y saponinas.

Taninos. Los taninos son polifenoles hidrosolubles que se encuentran en un gran número de plantas y tienen la capacidad de precipitar proteínas (Scalbert, 1991). Estos metabolitos secundarios han demostrado eficacia para reducir las cargas de nematodos en los animales y, por lo consiguiente, la contaminación de las pasturas. Aun cuando el impacto de los metabolitos secundarios de las plantas, sobre los nematodos, depende de la edad de la planta y del estado de desarrollo del parásito, éstos presentan mayor efectividad en larvas,

pero no en nematodos adultos (Athanasiadou *et al.*, 2001; Hounzangbe *et al.*, 2005). El modo de acción de los taninos puede ser tanto directo como indirecto, primero causando daños en la cutícula de los NGI, debido a que ésta se encuentra formada en gran parte por glicoproteínas que pueden formar complejos con los taninos condensados (Athanasiadou *et al.*, 2001), evitando así que las larvas desenvainen para convertirse en adultos (Hoste *et al.*, 2006). Taninos de *Lysiloma latisiliquum* y *Onobrychis viciifolia* han mostrado cambiar las características de la región bucal y cefálica de *H. contortus*, lo que afecta su nutrición y motilidad y, por consiguiente, su capacidad reproductiva (Martínez *et al.*, 2013). Los efectos indirectos pueden ser a causa de los complejos tanino-proteína que se forman en el rumen, que bien pueden disminuir los nutrientes disponibles para el parásito. Las proteínas asociadas con el tanino en el rumen pasan directamente al abomaso para ser digeridas y aprovechadas por el hospedero en forma de aminoácidos, que pasan a formar parte de los tejidos, lo cual mejora la capacidad de defensa contra el parásito y regenera los tejidos dañados (Iqbal *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2012). Se han evaluado taninos aislados de *Guazuma ulmifolia*, *Leucaena leucocephala*, *Arachis pintoi* y *Manihot esculenta*, que reducen hasta 100% la viabilidad de las larvas L3 de *H. contortus*, pero no tienen el mismo efecto sobre los huevos (López *et al.*, 2005). En el caso de *L. leucocephala* hay controversia, debido a que se han obtenido resultados contradictorios, desde reducir el 100% de la viabilidad, hasta reducir solo 30% de larvas de *H. contortus* (López, 2005; Calderón-Quintal *et al.*, 2010), por lo que es necesario seguir estudiando las causas de estos resultados incongruentes.

Saponinas. Estos metabolitos presentes en algunas plantas se han estudiado para probar su potencial antihelmíntico con resultados positivos (Wang *et al.*, 2010; Alil *et al.*, 2011). Las saponinas han demostrado actuar destruyendo las mitocondrias y dañando la membrana de las células de los NGI, debido a que forman complejos de colesterol y aumentan la permeabilidad de la membrana, desestabilizándola (Augustin *et al.*, 2011). Esta podría ser la causa principal de su acción en contra de los NGI; sin embargo, se conocen muchas otras propiedades antihelmínticas de las saponinas, por lo cual los estudios para descubrir esos efectos no han sido suficientes aún.

Otros compuestos. Se han estudiado otro tipo de extractos contra *H. contortus*, tales como los alcaloides de *Nicotiana tabacum*, y se han reportado reducciones en el conteo de HPG de hasta 59% (Iqbal *et al.*, 2006). Así como los alcaloides de diversas especies de *Erythrina* como *E. americana* han sido caracterizadas principalmente el alcaloide β -eritroidina (Fahmy *et al.*, 2019) Por otra parte, el extracto alcohólico de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Carica papaya*, *Newbouldia laevis* y *Morinda lucida*, redujeron la viabilidad de 37 a 39% en huevos de *H. contortus* (Hounzangbe *et al.*, 2005), lo cual se atribuye a los flavonoides y taninos que contienen estas especies, aunque no se tiene claro la fracción que actúa. El extracto alcohólico de *Iris hookeriana* redujo hasta 60% la viabilidad de los huevos de *H. contortus* (Tariq *et al.*, 2008a), mientras que el extracto acuoso de *Achillea millifolium* mostró 50% de reducción en la sobrevivencia de larvas de *H. contortus* (Tariq *et al.*, 2008b).

Otra alternativa a los extractos de plantas es ofrecer el follaje de plantas directamente como forraje a los animales como, *Arachis pintoi*, *Gliricidia sepium*, *Manihot esculenta* y *Havardia albicans*, las cuales mostraron efectividad de 50 a 70% en la reducción de la sobrevivencia de larvas a excepción de la última especie vegetal, que no mostró reducción en la sobrevivencia de larvas pero si afectó la fecundidad de los parásitos hembras (López *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2006; Galicia *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Munguía *et al.* (2013) se demostró que el uso de orégano molido (*Lippia graveolens*) administrado a corderos, actúa como un desparasitante alternativo, ya que controló hasta un 65% de la infección por *H. contortus*. El extracto de morera también ha demostrado tener un impacto larvicida en los géneros *Haemonchus* y *Trichostrongylus*, debido a su contenido de compuestos polifenólicos (García *et al.*, 2005). De acuerdo con lo revisado, se puede indicar que existe un gran potencial de plantas con efecto antihelmíntico, pero aún hace falta en muchos casos identificar la fracción específica del compuesto que actúa, además de estandarizar las dosis a las cuales esos extractos o partes de plantas son efectivas.

Cuadro 1. Porcentaje de efectividad (PE) de extractos usados contra nematodos gastrointestinales de ovinos, reportados en literatura

Autor y año	Planta	Extracto	PE	Infección	Ambiente
Iqbal <i>et al.</i> , (2007)	Mezcla comercial	Taninos condensados	32	Mixta*	<i>In vivo</i>
Akkari <i>et al.</i> , (2008)	<i>Acacia cyanophylla</i>	Pastoreo + PEG	14.5	Mixta*	<i>In vivo</i>
Tariq <i>et al.</i> , (2008)	<i>Achillea millifolium</i>	Acuoso	65.5	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
López <i>et al.</i> , (2005); Rojas <i>et al.</i> , (2006)	<i>Arachis pintoi</i>	TC y follaje	53	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i>
Hounzangbe <i>et al.</i> , (2005)	<i>Carica papaya</i>	Alcohol	36	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
Rojas <i>et al.</i> , (2006)	<i>Gliricidia sepium</i>	Follaje	51	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
López <i>et al.</i> , (2005)	<i>Guazuma ulmifolia</i>	TC	50	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
Tariq <i>et al.</i> , (2008)	<i>Iris hookeriana</i>	Etanol	42.5	Mixta*	<i>In vivo</i> e <i>In vitro</i>
López <i>et al.</i> , (2005); Merera <i>et al.</i> , (2013)	<i>Leucaena leucocephala</i>	TC y follaje	44.4	Mixta*	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i>
Munguía-Xochihua <i>et al.</i> , (2013)	<i>Lippia</i>	Follaje	65	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
García <i>et al.</i> , (2017)	<i>Lisyloma acapulcensis</i>	Follaje	70	Mixta*	<i>In vivo</i>
López <i>et al.</i> , (2005)	<i>Manihot esculenta</i>	TC	51	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
Rojas <i>et al.</i> , (2006)	<i>Medicago sativa</i> + <i>Arachis pintoi</i>	Follaje	70	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
Rojas <i>et al.</i> , (2006)	<i>Medicago sativa</i> + <i>Manihot esculenta</i>	Follaje	56	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
Hounzangbe <i>et al.</i> , (2005)	<i>Morinda lucida</i>	Alcohol	39	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
Hounzangbe <i>et al.</i> , (2005)	<i>Newbouldia laevis</i>	Alcohol	39	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
Hounzangbe <i>et al.</i> , (2005)	<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	Alcohol	37	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>

*Infección con más de una especie de nematodos por infección natural. PEG: Polietinolglicol. TC: taninos condensados.

Nutrición

El balance energía-proteína de la dieta que se ofrece a los ovinos permite reducir el impacto del daño que las altas cargas de NGI pueden ocasionarle al animal, por lo que la suplementación de nutrimentos, incluyendo minerales, es clave para minimizar los daños de la infestación parasitaria, sobre todo en ovejas que pastorean gramíneas de bajo valor nutrimental (Steel, 2003; Hoste *et al.*, 2005; Retama *et al.*, 2012; Arece *et al.*, 2013). En el caso de la proteína, es necesario tener un buen aporte de este nutriente en la dieta, ya que es de importancia para la respuesta inmune, y reparar el tejido de la mucosa intestinal que es dañado por los nematodos (Sumbria y Sanyal, 2009).

El uso de bloques de urea-melaza constituye una opción para aumentar la resistencia a helmintos gastrointestinales ya que, según Knox (2003) el nitrógeno no proteico contenido en el bloque disminuyó hasta 55% el tratamiento con antihelmínticos para el control de parásitos. De modo similar, las ovejas suplementadas con energía y proteína durante la gestación, presentaron mayor resistencia a NGI en comparación con las ovejas no suplementadas, aunque no así en la época preparto, en la cual no se observaron diferencias en número de larvas de helmintos en las heces (Williams *et al.*, 2010). Retama *et al.* (2012) reportaron que ovejas pastoreando un sistema silvopastoril, tuvieron mejores ganancias de peso cuando fueron suplementadas con maíz a 1.5% del peso vivo, en comparación con las ovejas sin suplementación, aun cuando ambos grupos presentaron cargas similares de nematodos, lo cual muestra una mejor respuesta frente a una infección con nematodos. El nivel de proteína en la dieta no afecta la carga de nematodos, sin embargo, sí se obtienen mayores ganancias de peso en corderos (Khan *et al.*, 2012). Por lo anterior, es necesario tener una dieta balanceada para obtener un menor impacto en los animales parasitados.

Control biológico de endoparásitos

Los microorganismos tales como bacterias y hongos hematófagos han sido objeto de estudio en las últimas décadas, porque constituyen una alternativa al uso de antihelmínticos comerciales, o bien, para lograr un efecto complementario de éstos. El hongo *Duddingtonia flagrans* es uno de los más estudiados a nivel *in vitro*, y ha mostrado actividad antihelmíntica, tanto en larvas como en huevos de nematodos (Cuadro 2). Los resultados obtenidos son muy variables, ya que las reducciones de la sobrevivencia han

sido desde 0 hasta 92% (Chauhan *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010; Sagües *et al.*, 2011). *Arthrobotrys* es un género de hongo que se ha estudiado por su capacidad nematófaga, aunque su eficacia depende de sus diferentes especies, de las cuales *A. conoides* resultó 99% eficaz (Graminha *et al.*, 2005) mientras que *A. musiformes* tuvo efectos dispersos (Chauhan *et al.*, 2005; Graminha *et al.*, 2005). Por otra parte, en cuatro estudios con *A. robusta* se obtuvieron tendencias similares en la disminución de la carga de nematodos (Cuadro 2). Sin embargo, se ha planteado que las diferencias pueden deberse al medio en el que se cultiva el hongo, ya que cuando se cultiva en medios ricos en almidón, el hongo disminuye su actividad contra los nematodos (González *et al.*, 2005). Por lo tanto, el control de NGI con hongos es una buena opción para disminuir los daños que los nematodos ocasionan, sin embargo, la principal problemática que presenta este método se restringe a la falta de un producto en el mercado con un estándar del inóculo y del medio en el que se cultiva (Ribeiro y de Araújo, 2014).

Cuadro 1. Porcentaje de efectividad (PE) de hongos nematófagos usados en contra de nematodos gastrointestinales de ovinos, reportados en la literatura

Año	Autor	Especie	PE	Infección	Ambiente
	Graminha <i>et al.</i>				
2005	<i>al.</i>	<i>A. conoides</i>	99	<i>Trichostrongylus</i>	<i>In vitro</i>
2005	Chauhan <i>et al.</i>	<i>A. musiformis</i>	-1	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
	Graminha <i>et al.</i>				
2005	<i>al.</i>	<i>A. musiformis</i>	74	<i>Trichostrongylus</i>	<i>In vitro</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>A. robusta</i>	46	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>A. robusta</i>	60	Mixta*	<i>In vivo</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>A. robusta</i>	98	<i>Trichostrongylus</i>	<i>In vitro</i>
2016	Sinott <i>et al.</i>	<i>B. circulans</i>		Mixta*	<i>In vivo</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	-276	<i>Trichostrongylus</i>	<i>In vitro</i>
2005	Chauhan <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	30	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	39	<i>H. contortus</i>	<i>In vitro</i>
2010	Silva <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	64	Mixta*	<i>In vivo</i>
2005	González <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	75	Mixta*	<i>In vitro</i>
2011	Sagües <i>et al.</i>	<i>D. flagrans</i>	92	<i>H. contortus</i>	<i>In vivo</i>

*Infección con más de una especie de nematodos por infección natural

Vacunas

Las vacunas son una alternativa porque evitan el uso de antihelmínticos. Sin embargo, la efectividad encontrada aún no ha sido totalmente satisfactoria. Se ha reportado desde décadas pasadas en distintas razas de ovinos, el ensayo y estudio de uno de los antígenos de *H. contortus*, el antígeno H11, aislado del intestino del parásito, el cual ha mostrado buena efectividad en la inmunidad de los ovinos hasta por más de cinco meses (Andrews *et al.*, 1995; Andrews *et al.*, 1997; Nisbet *et al.*, 2016). Algunos otros antígenos aislados del parásito han funcionado a nivel experimental con ayuda de coadyuvantes comerciales (Piedrafita *et al.*, 2012), un ejemplo son las metaloendopeptidasas. Sin embargo, se ha complicado su purificación; por lo tanto, no se obtienen resultados similares a los que se obtienen con H-gal-GP, un antígeno comercial de *H. contortus* que funciona en ovinos (Cachat *et al.*, 2010). Adicionalmente, el antígeno Hc23 probado con hidróxido de aluminio como coadyuvante, ayudó a reducir considerablemente las cargas parasitarias en los corderos (Fawzi *et al.*, 2015). Actualmente, *Barberbax*® ha sido la única vacuna contra este nematodo comercializada en el mercado, y cuya eficacia y seguridad fue probada mediante simulación digital (Basseto y Amarante, 2015). Otros nematodos menos comunes como *Ostertagia ostertagi*, también se han podido controlar con vacunas de proteínas aisladas del parásito, y se encontró buena efectividad; sin embargo, hace falta seguir realizando investigaciones en esta área del conocimiento (Nisbet *et al.*, 2016).

Selección Genética

Los ovinos poseen una adaptabilidad inmunológica a la infección con nematodos gastrointestinales y se ha comprobado que existen diferencias en el genoma de los ovinos resistentes, comparados con los ovinos susceptibles. Similarmente, se han identificado las áreas genómicas relacionadas con esta característica en los ovinos. Éstas consisten en 14 regiones de los cromosomas 1, 4, 16 y 19 (McRae *et al.*, 2014) y, por lo tanto, en animales que han sido seleccionados de acuerdo a su resistencia contra nematodos gastrointestinales, se observa una recuperación rápida y responden eliminando menor cantidad de huevos en heces, aun cuando se inoculen con una cantidad importante de L3 (Liu *et al.*, 2005; Esteban *et al.*, 2013). En corderos criollos resistentes a nematodos, se tuvo reducción de hasta 98.5% del conteo fecal de huevos, comparados con corderos no

resistentes. Como resultado adicional al de una menor carga parasitaria, también se presenta una mayor rentabilidad del rebaño, porque los corderos obtienen mayores ganancias de peso (Morteo *et al.*, 2004; Bambou *et al.*, 2009). Por lo tanto, la selección genética posee potencial para disminuir el impacto de los parásitos gastrointestinales en los rebaños; sin embargo, para fines prácticos es necesario implementar estrategias de selección para resistencia a NGI que sean fácilmente aplicables. Las razas de ovinos adaptadas al trópico son más resistentes a los nematodos que aquellos de clima templado. En especial, los ovinos de raza Suffolk han mostrado ser más susceptibles que animales de otras razas (Miller *et al.*, 1998; Amarante *et al.*, 2004) y, dentro de las razas de ovinos de pelo, la raza Pelibuey ha resultado más resistente a NGI que Kathadin (Palomo *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Los métodos convencionales para el control de los nematodos gastrointestinales han perdido efectividad a través del tiempo, por lo que es necesario estudiar otras alternativas con el fin de disminuir el efecto sobre los rebaños ovinos. Si bien, se han propuesto alternativas simples, como es el manejo del pastoreo, hasta muy complejas como el desarrollo de vacunas, no existen en el mercado productos disponibles con estándares confiables para aplicarse en los rebaños. Por lo anterior, es recomendable continuar con el estudio de las alternativas no químicas de control de los NGI. Dentro de las más promisorias está el uso de plantas con metabolitos secundarios que actúan como antihelmínticos, para establecer los niveles en los que se tiene la mayor reducción de los nematodos gastrointestinales con ovinos en pastoreo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento durante los estudios de Doctorado en Ciencias del primer autor.

REFERENCIAS

Akhtar, M.S., Iqbar, Z., Khan, M.N., Lateef, M. 2000. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Research*. 38:99-107. DOI: 10.1016/S0921-4488(00)00163-2

- Akkari, H., Darghouth, M.A., Salem, H.B. 2008. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl: Excretion of gastrointestinal nematode egg in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Ruminant Research*. 74:78-83. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.03.012
- Alil, N., Wadood, S., Shah, A., Shah, I., Ahmed, G., Ghias, M., Khan, I. 2011. Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea Wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium Stocksianum* boiss. *Complementary and Alternative Medicine*. 11:106-113. DOI: 10.1186/1472-6882-11-106
- Amarante, A.F.T., Bricarello, P.A., Rocha, R.A., Gennari, S.M. 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology*. 120:91-106. DOI: 10.1016/j.vetpar.2003.12.004
- Anderson, F.L., Hoopes, K.H., Fox, J.C. 1969. The efficacy of Haloxon and Thiabendazole as anthelmintics against gastro-intestinal nematodes in sheep. *The Great Basin Naturalist*. 29:35-41. <https://scholarsarchive.byu.edu/gbn/vol29/iss1/7>
- Andrews, S.J., Hole, N.J.K., Munn, E.A., Rolph, T.P. 1995. Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: Prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. *International Journal for Parasitology*. 25:839-846. DOI: 10.1016/0020-7519(94)00221-9
- Andrews, S.J., Rolph, T.P., Munn, E.A., Taylort, M.A. 1997. Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Research in Veterinary Science*. 62:223-227. DOI: 10.1016/S0034-5288(97)90194-6
- Arece, J., López, Y., Molina, M., Alpízar, A. 2013. Cambios fisiopatológicos en ovinos Pelibuey en estabulación, después de infestación experimental con estrongílicos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*. 36:354-359. http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v36n3/en_pyf07313.pdf
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and

in vivo studies. Veterinary Parasitology. 99:205-219. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00467-8

Augustin, M.J., Kuzina, V., Andersen, B.S., Søren, B. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry. 72:435-457. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015

Bambou, J.C., González-García, E., de la Chevrotière, C., Arquet, R., Vachiéry, N., Mandonnet, N. 2009. Peripheral immune response in resistant and susceptible Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Small Ruminant Research. 82:34-39. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2009.01.008

Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T. 2015. Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. Journal of Helminthology. 89:517-525. DOI: 10.1017/S0022149X15000279

Bennet, E.M., Behm, C., Bryant, C., Chevis, R.A.F. 1980. Synergistic action of mebendazole and levamisole in the treatment of a benzimidazole-resistant *H. contortus* in sheep. Veterinary Parasitology. 7:207-214. DOI: 10.1016/0304-4017(80)90025-4

Burg, W.R., Brintom, M., Miller, M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, A.S., Hartman, R., Kong, Y.L, Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, B.J., Wallick, H., Stapley, O.E., Oiwa, R., Omura, S. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15:361-167. <https://aac.asm.org/content/aac/15/3/361.full.pdf?pagewanted=all>

Cachat, E., Newlands, G.F.J., Ekoja, S.E., McAllister, H., Smith, W.D. 2010. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. Parasite Immunology. 32:414-419. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2010.01208.x.

Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J. Sandoval-Castro, C.A., Alonso, M.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A. 2010. Adaptación de *Haemonchus contortus* a los taninos condensados: ¿puede ser posible? Archivos de Medicina Veterinaria. 42:161-171. DOI: 10.4067/S0301-732X2010000300007

Chauhan, J.B., Sanya, P.K., Subramanian, R.B. 2005. The nematode-trapping efficacy of two chlamydospore-forming fungi against *Haemonchus contortus* in sheep. *Journal of Helminthology*. 79:315-319. DOI: 10.1079/JOH2005291

Coles, G.C., East, J.M., Jenkins S.N. 1975. The mechanism of action of the anthelmintic levamisole. *General Pharmacology: The Vascular System*. 6:309-313. DOI: 10.1016/0306-3623(75)90030-0

Costa, P.T., Costa, R.T., Mendonça, G., Vaz, R.Z. 2017. Eficácia anti-helmíntica comparativa do Nitroxinil, Levamisol, Closantel, Moxidectina e Fenbendazole no controle parasitário em ovinos. *Boletim de Indústria Animal*. 74:72-78. DOI: 10.17523/bia.v74n1p72

Echevarria, F., Borba, M.F.S., Pinheiro, A.C., Waller, P.J., Hansen, J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*. 62:199-206. DOI: 10.1016/0304-4017(95)00906-X

Esteban, A.D. González, G.R., Garduza, A.G., Ojeda, R.N.J., Reyes, M.F., Gutiérrez, C.S. 2013. Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 60:169-181. <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407639237003.pdf>

Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., & Singab, N. A. (2019). Alkaloides of genus *Erythrina*: An updated review. *Natural Product Research*, 1-22. doi:10.1080/14786419.2018.1564300.

Fawzi, E.M., González, S.M.E., Corral, M.J., Alunda J.M., Cuquerella, M. 2015. Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Veterinary Parasitology*. 211:54-59. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.04.029

Ferreira, F.E., Bastos, L.L., dos Reis, K.D., dos Santos, P.D., Kanadani, C.A. 2016. Effect of the integrated livestock–forest system on recovery of trichostrongylid nematode

infective larvae from sheep. *Agroforestry Systems*. 90:305-311. DOI: 10.1007/s10457-015-9855-1

Galicia, A.H.H., Rodríguez, G.L.A., Capetillo, L.C.M., Cámara, S.R., Aguilar, C.A.J., Sandoval, C.C.A., Torres, A.J.F.J. 2012. Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science and Technology*. 176:178:184. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.021

García, D.E., Soca, M., Medina, M.G. 2005. Acción antihelmíntica de seis extractos de morera en la viabilidad de larvas infestantes (L3) de nematodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*. 28:319-328

García, H.C., Arece, G.J., Rojo, R.R., Mendoza, M.G.D., Albarrán, P.B., Vázquez, A.J.F., Avendaño, R.L., Olmedo, J.A., Marie, M.C. & López, L.Y. 2017. Nutraceutic effect of free condensed tannins of *Lysosima acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Tropical Animal Health and Production* 49: 55-61. DOI: 10.1007/s11250-016-1157-8

García, M.B.C., Sprenger K.L., Ortiz B.E., Molento B.M. 2016. First report of multiple anthelmintic resistance in nematodes of sheep in Colombia. *Anais da Academia Brasileira da Ciencias*. 88:397-402. DOI: 10.1590/0001-3765201620140360

Giordano, D.J., Tritschler, J.P., Coles G.C. 1988. Selection of Ivermectin-resistant *Trichostrongylus colubriformis* in lambs. *Veterinary Parasitology*. 30:139-148. DOI: 10.1016/0304-4017(88)90161-6

Githiori, H.J., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139:308-320. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.04.021

González, G.R., Mendoza, de G.P., Torres, H.G., Becerril, P.C., Ortega, J.E., Hernández, M.O. 2005. *In vitro* predacious ability of *Duddingtonia flagrans* against gastrointestinal nematode larvae of hair sheep. *Técnica Pecuaria en México*. 43:405-414.

- Graminha, B.N.E., Costa, J.A., Oliveira, P.G., Monteiro, C.A., Palmeira, B.S.S. 2005. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:717-722. DOI: 10.1007/s11274-004-4045-8
- Goolsby, M.K., Leite, B.M.L., Browning, J.R. 2017. Evaluation of parasite resistance to commonly used commercial anthelmintics in meat goats on humid subtropical pasture. *Small Ruminant Research*. 146:37-40. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.11.022
- Herrera, M.F.A., Ojeda, R.N.F., González, G.R., Cámara, S.R., Torres, A.J.F.J. 2017. Gastrointestinal nematode population with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of México. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 9:29-33. DOI: 10.1016/j.vprsr.2017.04.007
- Hoste, H., Torres, A.J.F., Paolini, V., Aguilar, C.A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C. 2005. Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research*. 60:141-151. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.06.008
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, M.S., Hoskin, O.S. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22:253-261. DOI: 10.1016/j.pt.2006.04.004
- Hoste, H., Martínez, O.De-M.C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda, R.N., Fourquaux, I., Torres, A.J.F.J., Sandoval, C.C.A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infection. *Veterinary Parasitology*. 186:18-27. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.042
- Hounzangbe, A.M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 78:155-160. DOI: 10.1016/j.rvsc.2004.05.009
- Hutchings, R.M., Milner, M.J., Gordon, I.J. 2002. Grazing Decisions of Soay Sheep, *Ovis aries*, on St Kilda: A Consequence of Parasite Distribution? *Nordic Society Oikos*. 96:235-244. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2002.960205.x

- Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Nabeel, G.M., Hassan, G.A. 2006. *In vitro* and *In vivo* anthelmintic activity of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. *Phytotherapy Research*. 20:46-48. DOI: 10.1002/ptr.1800
- Iqbal, Z., Sarwar, M., Jabbar, A., Ahmed, S., Nisa, M., Sohail, M.S., Nisar, M.K., Aftab, K.M., Yaseen, M. 2007. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Veterinary Parasitology* 144, 125-131. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.09.035
- Kaplan, M. 2004 Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. 20: Disponible en <http://www.sciencedirect.com> DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.001
- Khan, F.A., Sahoo, A., Sonawane, G.G., Karim, S.A., Dhakad, S., Pareek, A.K., Tripathii, B.N. 2012. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. *Livestock Science*. 150:143-151. DOI: 10.1016/j.livsci.2012.08.013
- Knox, M.R. 2003. Impact of non-protein nitrogen supplements on nematode infected sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 43:1463-1468. DOI: 10.1071/EA03008
- Lewis, J.A., Wu, C.-H., Berg, H., Levine, J.H. 1980. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 95:905-928. <https://www.genetics.org/content/genetics/95/4/905.full.pdf>
- Liu, S.M., Smith, T.L., Palmer, D.G., Karlsson, L.J.E., Besier, R.B., Greeff, J.C. 2005. Biochemical differences in merino sheep selected for resistance against gastro-intestinal nematodes and genetic and nutritional effects on faecal worm egg output. *Animal Science*. 89:149-157. DOI: 10.1079/ASC50180149
- López, J., Ibarra, O.F., Cantó, G.J., Vásquez, C.G., Tejada, Z.I., Shimada, A. 2005. *In vitro* effect of condensed tannins from tropical fodder crops against eggs and larvae of the nematode *Haemonchus contortus*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 3:191-194. DOI: 10.1234/4.2005.598
- Marriner, S.E., McKinnon, I., Bogan, J.A. 1987. The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *Journal of Veterinary and*

Pharmacology and Therapeutics. 10:175-179. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1987.tb00097.x

Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G. 1985. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. Australian Veterinary Journal. 62:38-43. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1985.tb14230.x

Martin, J.C. 1997. Review Modes of action of anthelmintic drugs. The Veterinary Journal. 154:11-34. DOI: 10.1016/S1090-0233(05)80005-X

Martínez, O. De-M.C., Arroyo, L.C., Fourquaux, I., Torres, A.J.F.J., Sandoval, C.C.A., Hoste, H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannins-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. Experimental Parasitology. 133:281-286. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.11.024

McRae, K.M., McEwan, J.C., Dodds, K.G., Gemmell, N.J. 2014. Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. BMC Genomics. 15:637. DOI: 10.1186/1471-2164-15-637

Merera, C., Anaya, T., Gudeta, T. 2013. Effect of feeding *Leucaena pallida* with concentrate and antihelminthic treatment on growth performance and nematode parasite infestation of Horro ewe lambs in Ethiopia. International Journal of Livestock Production. 4: 155-160. DOI: 10.5897/IJLP2013.0176

Miller, J.E., Barras, S.R. 1994. Ivermectin resistant *Haemonchus contortus* in Louisiana lambs. Veterinary Parasitology. 55:343-346. DOI: 10.1016/0304-4017(94)90074-4

Miller, J.E., Bahirathan, M., Lemarie, S.L., Hembry, F.G., Kearney, M.T., Barras, S.R. 1998. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. Veterinary Parasitology. 74:55-74. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00094-0

Molan, A.L., Meaher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S. 2003. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of

Trichostrongylus colubriformis. International Journal of Parasitology. 33:691-1698. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00207-8

Morteo, G.R., González, G.R., Torres, H.G., Nuncio, O.G., Becerril, P.C.M., Gallegos, S.J., Aranda, I.E. 2004. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. Agrociencia. 38: 395-404. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30200402.pdf>

Munguía, X.J.A., Valenzuela, M.W., Leyva, C.J.C., Morales, P.M.I., Figueroa, C.J.A. 2013. Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 9:150-154. <https://www.itson.mx/publicaciones/rlrn/Documents/v9-n1-18-potencial-del-oregano-como-alternativa-natural-para-controlar-haemonchus-contortus-en-ovinos-de-pelo.pdf>

Wamachi, D.M., Audho, J.O., Thorpe, W., Baker, R.L. 1995. Evidence for multiple anthelmintic resistance in sheep and goats reared under the same management in coastal Kenya. Veterinary Parasitology. 60: 303-313. DOI: 10.1016/0304-4017(95)00794-1

Nisbet, A.J., Meusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M. 2016. Chapter Eight-Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccines development. Advances in Parasitology. 93: 353-393. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.011

Palomo, C.J.G., Aguilar, C.A.J., Torres, A.J.F.J., González, G.R. 2017. Comparing the phenotypic susceptibility of Pelibuey and Katahdin female lambs against natural gastrointestinal nematode infections under hot humid tropical conditions. Parasitology Research. 116:1627-1636. DOI: 10.1007/s00436-017-5437-7

Papadopoulos, E. 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Ruminant Research. 76:99–103. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.12.012

Pedreira, J., Paz, S.A., Sánchez, A.R., Suárez, J.L., Arias, M., Lomba, C., Díaz, P., López, C., Díez, B.P., Morondo, P. 2006. Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. Preventive Veterinary Medicine. 75:56-62. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2006.01.011

- Piedrafita, D.P., de Veer, M.J., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M., Meeusen, E.N. 2012. Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. *Vaccine*. 30:7199-7204. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.10.019
- Retama, F.C., Torres, A.J.F.J., Sandoval, C.C.A., Aguilar, C.A.J., Cámara, S.R., Canul, K.H.L. 2012. Maize supplementation of Pelibuey sheep in a silvopastoral system: fodder selection, nutrient intake and resilience against gastrointestinal nematodes. *Animal*. 6:145-153. DOI: 10.1017/S1751731111001339
- Ribeiro, B.F., de Araújo, J.V. 2014. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiological Biotechnology*. 98:71-82. DOI: 10.1017/S1751731111001339
- Rojas, D.K., López, J., Tejada, I., Vázquez, V., Shimada, A., Sánchez, D., Ibarra, F. 2006. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 128:218–228. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.10.008
- Sagües, F.M., Fusé, A.L., Fernández, S.A., Iglesias, E.L., Moreno, C.F., Saumell A.C. 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*. 109:707-713. DOI: 10.1007/s00436-011-2302
- Sangster, N.C., Riley, F.L., Collins, G.H. 1988. Investigation of the mechanism of levamisole resistance in trichostrongylid nematodes of sheep. *International Journal for Parasitology*. 18:813-818. DOI: 10.1016/0020-7519(88)90123-3
- Scarlbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875-3883. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426
- Silva, F.B., Carrijo, M.J.R., Braga, R.F., Campos, K.A., Araújo, V.J., Amarante, F.T.A. 2010. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. *Parasitology Research*. 106:1343-1350. DOI: 10.1007/s00436-010-1805-2

- Sinott, M.C., de Castro, L.D., Leite, F.L.L., Gallina, T., De-Souza, M.T., Santos, D.F.L., Leite, F.P.L. 2016. Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep. *Journal of Helminthology*, 90:68-73. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000844>
- Soca, M., Simón, L., Roque, E. 2007. Árboles y nemátodos gastrointestinales en bovinos jóvenes: un nuevo enfoque en las investigaciones. *Pastos y Forrajes*. 30: Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa>. Consultado el día 17 de Octubre de 2016.
- Steel, J.W. 2003. Effects of protein supplementation of young sheep on resistance development and resilience to parasitic nematodes. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 43:1469-1476. DOI: 10.1071/EA03004
- Sumbria, D., Sanyal, P.K. 2009. Exploiting nutrition-parasite interaction for sustainable control of gastrointestinal nematodosis in sheep. *Vet Scan* 4: Disponible en: <http://vetscan.co.in/v4n2/> Consultado el día 26 de Septiembre de 2017.
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., Tantray, M.A. 2008a. Evaluation of anthelmintic activity of *Iris hookeriana* against gastrointestinal nematodes of sheep. *Journal of Helminthology*. 82:135-141. DOI: 10.1017/S0022149X08912360
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S. 2008b. Anthelmintic efficacy of *Achillea millifolium* against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Helminthology*. 82:227-233. DOI: 10.1017/S0022149X08972515
- Torres, A.J.F.J., Mendoza, de G.P., Aguilar, C.A.J., Cuéllar, O.J.A. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 189:89-96. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.037
- Toscan, G., Cauduro, C.G., Tadinello, L.J.F., Weber, A., Heinloft, P.H., Medeiros, F.D.M., Sangioni, L.A., Silveira, F.V.F. 2017. Immune response of sheep naturally infected with *Haemonchus* spp. on pastures with two different nutritional conditions. *Semina: Ciências Agrárias*. 38:809-819. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n2p809

- Traversa, D., von Samson, H.G. 2016. Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in Europe. *Small Ruminant Research*. 135:75-80. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2015.12.014
- Vásquez, H.M., González, G.R., Torres, H.G., Mendoza, de G.P., Ruíz, R.J.M. 2006. Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nematodos. *Veterinaria México*. 37:15-27. <https://www.redalyc.org/pdf/423/42337102.pdf>
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., Hall, J.O., Lisonbee, I.D. 2009. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode. *Journal of Animal Science*. 88:2189-2198. 10.2527/jas.2009-2272
- Wang, G.X., Jiang, D.X., Li, J., Han, J., Liu, Y.T., Liu, X.L. 2010. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*. 107:1365-1371. DOI: 10.1007/s00436-010-2010-z
- Williams, A.R., Greeff, J.C., Vercoe, P.E., Dobson, R.J., Karlsson, L.J.E. 2010. Merino ewes bred for parasite resistance reduce larval contamination onto pasture during the peri-parturient period. *Animal*. 4:122-127. DOI: 10.1017/S1751731109990802

This chapter was published in *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*

3 ANTHELMINTIC RESISTANCE IN HAIR SHEEP FARMS IN A SUB-HUMID TROPICAL CLIMATE, IN THE HUASTECA POTOSINA, MEXICO

Itzel Santiago-Figueroa^a, Alejandro Lara-Bueno^a, Roberto González-Garduño^{b,*}, María
Eugenia López-Arellano^c, Jorge Luis de la Rosa-Arana^d, Ema de Jesús Maldonado-
Simán^a

^aPosgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera
México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. CP 56230.

^{b*}Unidad Regional Universitaria Sursureste, Universidad Autónoma Chapingo. km 7.5
Carretera Teapa-Vicente Guerrero. Teapa, Tabasco, México. robgardu@hotmail.com

^cInstituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro
Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Km 11.5,
Carretera Federal Cuernavaca-Progreso, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

^dInstituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Francisco de P. Miranda 177,
Lomas de Plateros, 01480 Ciudad de México.

Corresponding author.

E-mail address: robgardu@hotmail.com (R. González-Garduño).



Short Communication

Anthelmintic resistance in hair sheep farms in a sub-humid tropical climate, in the Huasteca Potosina, Mexico



Itzel Santiago-Figueroa^a, Alejandro Lara-Bueno^a, Roberto González-Garduño^{b,*},
Ma. Eugenia López-Arellano^c, Jorge Luis de la Rosa-Arana^d, Ema de Jesús Maldonado-Simán^a

^a Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México 56230, Mexico

^b Unidad Regional Universitaria Sursureste, Universidad Autónoma Chapingo, Km 7.5 Carretera Teapa-Vicente Guerrero, Teapa, Tabasco, Mexico

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Km 11.5, Carretera Federal Cuernavaca-Progreso, Jiutepec, Morelos 62550, Mexico

^d Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Ciudad de México, CDMX 06140, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Benzimidazole
Imidazothiazole
Macrocyclic lactones
Nematodes
PCR

ABSTRACT

This is the first report about anthelmintic resistance (AR) in hair sheep farms determined in a sub-humid tropical climate, in an area known as Huasteca Potosina, Mexico. Faecal egg count reduction tests (FECRT) and egg hatch *in vitro* tests were conducted to identify the level of AR against benzimidazole (BZ) in parasitic gastrointestinal nematode (GIN) populations. An allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) was performed to obtain a 250 bp band, indicating resistance, and a 550 bp band, indicating susceptibility to BZ. Macrocyclic lactones (ML) and imidazothiazole (IMZ) drugs were also tested with the FECRT. A PROBIT analysis was conducted using SAS to determine the 50% lethal doses (LD₅₀) of the drugs according to the egg hatch *in vitro* test. Resistance to BZ and ML was found on all farms (0–70% effectiveness), whereas the susceptibility of nematodes to IMZ was detected with the FECRT (93–100% effectiveness). The LD₅₀ was higher than the discriminating dose (0.1 µg ml⁻¹) for BZ and confirmed AR to this anthelmintic; we also confirmed a high AR frequency with AS-PCR. Therefore, we suggest that strategic deworming should be performed to avoid the development of resistance to imidazothiazole.

1. Introduction

Anthelmintic drugs are commonly used to increase sheep productivity by controlling gastrointestinal nematodes (GIN) in flocks. The frequent use of these products causes genetic changes, which induce parasitic nematode populations to survive, producing the well-known problem of anthelmintic resistance (AR). Currently, worldwide, AR dispersion is indicated for almost all commercial products against GIN in ruminants (Van den Brom et al., 2015).

The anthelmintic resistance problem is reducing flock productivity due to the mortality of lambs by gastrointestinal parasitism, discouraging ovine production (Torres-Acosta et al., 2012; Goolsby et al., 2017). Due to increasing concerns for AR in tropical areas in Mexico (Herrera-Manzanilla et al., 2017), it has become necessary to record AR in areas with a high prevalence of GIN, like the sub-humid regions of Mexico, to contribute to the epidemiological study of AR in these areas and to have a proper deworming programme and integrate other husbandry procedures to support the agricultural economy.

A widely used method to detect AR is the faecal egg count reduction test (FECRT). However, alternative diagnosis methods such as bioassays have been designed (Almeida et al., 2013) to provide relevant information to obtain the LD₅₀ (the lethal dose of the drug that prevented 50% of hatching eggs) that enables the discrimination of GIN isolates with or without resistance (Coles et al., 2006). In addition, tools such as PCR tests provide information on the genes that confer resistance to benzimidazole (BZ). Resistance to these compounds has been associated with a single nucleotide polymorphism (SNP) in codons 167 (F167Y) and 200 (F200Y) of the isotype I gene of β -tubulin (Lambert et al., 2017).

The objective of this study was to determine AR to BZ, macrocyclic lactones (ML) and imidazothiazoles (IMZ) in GIN using FECRT and *in vitro* assays in naturally infected hair sheep in farms localised in the sub-humid region known as Huasteca Potosina in Mexico, as well as to use allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) to confirm AR to BZ.

* Corresponding author.

E-mail address: robguardu@hotmail.com (R. González-Garduño).

2. Materials and methods

This study was conducted in the three municipalities (Ciudad Valles, Tamuín and Tanquian) of a sub-humid region in Mexico known as Huasteca Potosina (altitude between 20 and 900 m above sea level), with a temperature of around 20–26 °C and 1000–2000 mm of rainfall annually (INEGI, 2010).

Adult ewes and some rams were selected from farms; they were not treated with anthelmintics (AH) for 2 months before the experimental assay. The selected hair breeds were Dorper, Pelibuey, Kathadin, Blackbelly and their crosses. This study was conducted in June, during the beginning of the rainy season.

A FECRT was conducted (Coles et al., 2006). Three anthelmintics that are commonly used in the region were tested: (1) benzimidazole (BZ, Febendazole, Paradex L 10% Biochem, 5.8 mg kg⁻¹) by an oral route; (2) ivermectin (IVM, Endovet, Rivefarma, 0.2 mg kg⁻¹) by a subcutaneous route; and (3) levamisole (LEV, Ripercol L 12%, Zoetis, 7.5 mg kg⁻¹) by an intramuscular route. Sheep with at least 150 nematode eggs per gram of faeces (EPG) were selected to form the treatment groups. One group of 9–10 sheep without anthelmintic treatment was used as a control and three groups of 9–10 sheep were dewormed. Individual sheep were weighed to determine the correct dose of each anthelmintic drug. The number of EPG was determined using the McMaster technique.

Fourteen days after the anthelmintic treatments, individual faecal samples and FEC were obtained to calculate the arithmetic mean, 95% confidence interval and percentage of reduction of FEC. The GIN population was considered resistant for a given anthelmintic class when the FECRT reduction percentage was < 95% and the lower limit of the 95% confidence interval (CI) was < 90%; a GIN population was considered suspected when one of the two above-mentioned criteria was identified and a GIN population was considered susceptible to any AH when neither of the above-mentioned criteria were observed (Coles et al., 2006).

An *in vitro* egg hatch test (EHT) test was conducted with faecal samples that were positive for GIN. To obtain nematode eggs, the faeces were mixed with saturated saline solution and processed, as described by Muñoz-Lagunes et al. (2015). Populations of nematodes were considered resistant at LD₅₀ ≥ 0.1 µg ml⁻¹ (Coles et al., 2006). One hundred nematode eggs were placed in each well in polystyrene plates (Nunc, Maxisorp™) and incubated at room temperature for 24 h. BZ was used at a minimum concentration of 12.54–0.05 mg ml⁻¹. The control group contained only nematode eggs suspended in distilled water. The reaction was halted at 24 h by placing 10 µl of Lugol's Iodine solution (Hycel, Mexico) into each well. The proportion of unhatched eggs and nematodes in the first larval stage (L₁) were counted. Data were analysed to obtain the LD₅₀ and LD₉₉ using a logistic regression model (PROBIT) in the SAS program (SAS, 2004).

Approximately 50 L₃ GIN were collected from the faecal cultures. Genomic DNA (gDNA) extraction and AS-PCR were performed to determine the polymorphisms at codon 200 of isotype I of the β-tubulin gene of *Haemonchus* spp. (Encalada-Mena et al., 2014). A β-tubulin allele with 250 and 550 bp indicate the presence of a resistant and susceptible nematode population to BZ, respectively. Also, *Haemonchus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Cooperia* spp., and *Trichostrongylus* spp., were genotyped, according to the method of Encalada-Mena et al. (2014).

3. Results

Our results showed a low level of FEC for all sheep naturally infected with GIN from all farms (Table 1). The number of infected sheep with > 150 EPG was < 50%, and 41% of the sheep could not be used (across all the farms) for the three anthelmintic groups.

This study is the first evidence of widespread AR to BZ on sheep farms of a sub-humid region of Mexico, using the FECRT and confirmed

Table 1

Percentage of sheep infected by gastrointestinal nematodes on the tested farms.

Farm	Total Sheep	Positive sheep		Eggs per gram of faeces (EPG)			
		> 150 EPG	Percentage	Mean	SD	SE	Median
1	80	38	47.5	244	405	45	50
2	77	38	49.4	551	1087	124	100
3	80	36	45.0	209	301	34	100
4	31	19	61.3	492	577	104	250
5	79	37	46.8	267	450	51	100
6	80	20	25.0	176	342	38	0
7	55	19	34.5	608	2088	282	0
8	78	19	24.4	129	288	33	0
Mean	70	28.3	41.7	335	692	89	75

EPG = eggs per gram; SD = standard deviation; SE = standard error.

with PCR. The three groups treated with BZ exceeded the number of EPG excreted, in comparison to control sheep after deworming; therefore, there were no reductions in EPG (Table 2). In addition, resistance to BZ was confirmed *via in vitro* assays with the EHT, in which no egg hatching from the treated groups was observed. Also, high anthelmintic doses were required to achieve mortality between 50% and 99% and the PROBIT equation had a non-significant slope (β_1 ; $P > .05$) in most cases (Table 2). The AS-PCR technique for codon 200 (TTC/TAC) was associated with nucleotide changes of the β-tubulin gene, showing a 250 bp allele, confirming resistance to BZ (Fig. 1).

For four sheep farms, a FECRT with IVM, was conducted (Table 3). IVM resistance led to a FEC reduction of around 67% for the four farms, which is a big problem for nematode control. In contrast, treatment with LEV showed high efficacy in two cases; one farm showed resistance and the other showed < 95% effectiveness and was classified as suspect (Table 3).

The blood feeding nematode *Haemonchus* spp. was predominantly on all farms, followed by *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp. and *Oesophagostomum* spp. (Fig. 2).

4. Discussion

BZ is the most widely used anthelmintic to control GIN infections in small ruminants, and the abuse on BZ use is associated with AR (Zanzani et al., 2014). In Mexico, many reports indicate similar results with BZ (Liébano-Hernández et al., 2015). In the present study, the reduction of BZ efficacy was similar to those observed by Herrera-Manzanilla et al. (2017) and Alcalá-Canto et al. (2016), who found a reduction from 0 to 48%, concluding that high resistance occurred in many flocks.

The PCR test is a technique that helps to confirm the results of the FECRT in less time than coproculture. This technique is already widely used for the determination of resistance (Paraud et al., 2016). In the present study, the PCR test confirmed the low efficacy of BZ in the FECRT of nematodes like *Haemonchus* spp., which were observed on all farms.

The lethal doses obtained with the EHT were very high on all farms and exceeded the discriminating dose of 0.1 µg ml⁻¹ (Coles et al., 2006). In many cases, the curve could not be constructed because the product was inefficient at the highest doses used and high concentrations were required to achieve an LD₅₀, which together with the FECRT results, indicate a high resistance to these products in the studied area. This coincides with another study in which the continuous use of anthelmintics caused resistance to BZ (dos Santos et al., 2014).

In Mexico, few studies have been conducted to evaluate levamisole resistance in flocks; however, resistance have been reported in southern Mexico (Herrera-Manzanilla et al., 2017) and in other regions of the Americas (García et al., 2016; Chaparro et al., 2017). This drug has little effect on nematodes in immature stages, which easily leads to the development of resistance if it is used indiscriminately. Because of this,

Table 2

Results of the faecal nematode egg count reduction test (FECRT) and egg hatch test (EHT) to determine anthelmintic resistance in hair sheep using a benzimidazole (febendazole) in a sub-humid tropical climate in Mexico.

Farm	Control group (n = 10)	Faecal egg count reduction test			In vitro test			
		Treated (n = 10)	Reduction (%) (CI)	Result	β_0	β_1	LD ₅₀ (mg ml ⁻¹)	LD ₉₉ (mg ml ⁻¹)
1	1450	2669	0 (0–70)	Resistant	Ns	Ns	0.01	–
2	861	640	26 (0–77.3)	Resistant	Ns	Ns	15.5	27.9
3	533	405	24 (0–67.7)	Resistant	*	Ns	–	–
4	1406	795	43 (0–74.6)	Resistant	Ns	Ns	–	–
5	614	225	63 (8.1–85.4)	Resistant	Ns	Ns	–	–
6	363	650	0 (0–31.2)	Resistant	**	*	40.6	99.7
7	1383	2595	0 (0–58.8)	Resistant	**	*	25.1	–
8	1533	465	70 (0–91.6)	Resistant	Ns	Ns	52.5	88.1

β_0 : intercept; β_1 : slope; Ns: not significant ($P > .05$); *: significant ($P < .05$); **: high significant ($P < .01$). LD₅₀: Lethal doses at 50%; LD₉₉: Lethal doses at 99%. CI: Confidence intervals in brackets.

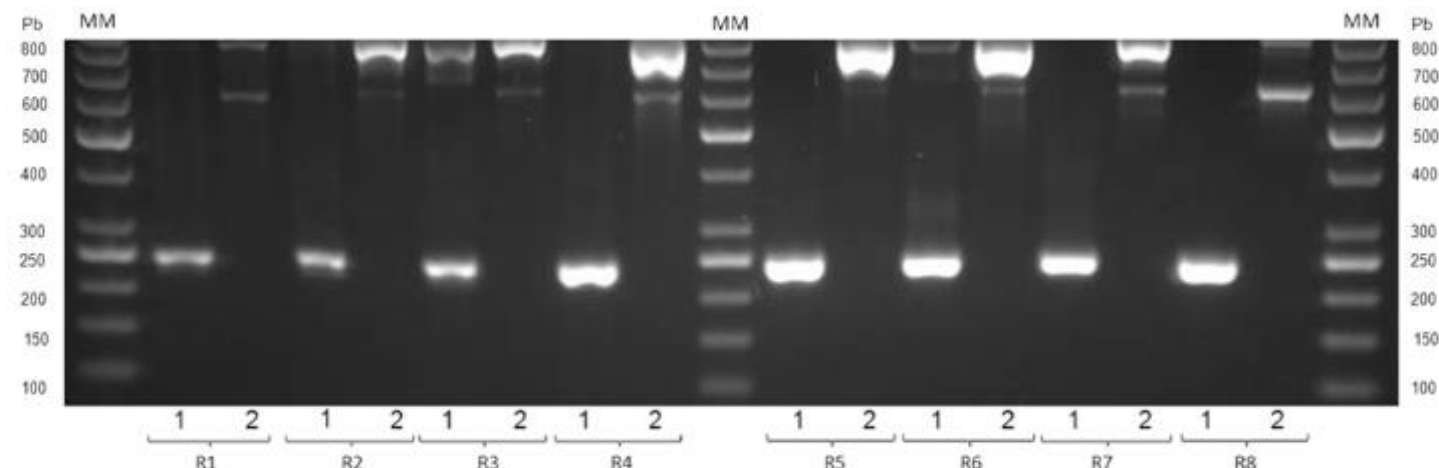


Fig. 1. Amplification of the PCR products by endpoint corresponding to the fragments of susceptibility (550 bp, S) or resistance (250 bp, R). MM: Molecular marker. R1 corresponds to farm 1, R2 to farm 2 and so on for each ranch.

Table 3

Results of faecal nematode egg count reduction tests (FECRT) to determine anthelmintic resistance in hair sheep using a macrocyclic lactone (ivermectin) and an imidazothiazole (levamisole) in a sub-humid tropical climate in Mexico.

Farm	Control group (n = 10)	Faecal egg count reduction test – Ivermectin			Faecal egg count reduction test – Levamisole		
		Treated (n = 10)	Reduction (%) (CI)	Result	Treated (n = 10)	Reduction (%) (CI)	Result
1	1450	2656	0 (0–55.1)	Resistant	640	98 (88.4–99.6)	Suspect
2	861	456	47 (0–79.2)	Resistant	0	100 (100–100)	Susceptible
3	533	417	22 (0–66.9)	Resistant	39	93 (64.4–98.5)	Resistant
5	614	200	67 (0–92.1)	Resistant	10	98 (92.0–99.7)	Susceptible

CI: Confidence intervals in brackets.

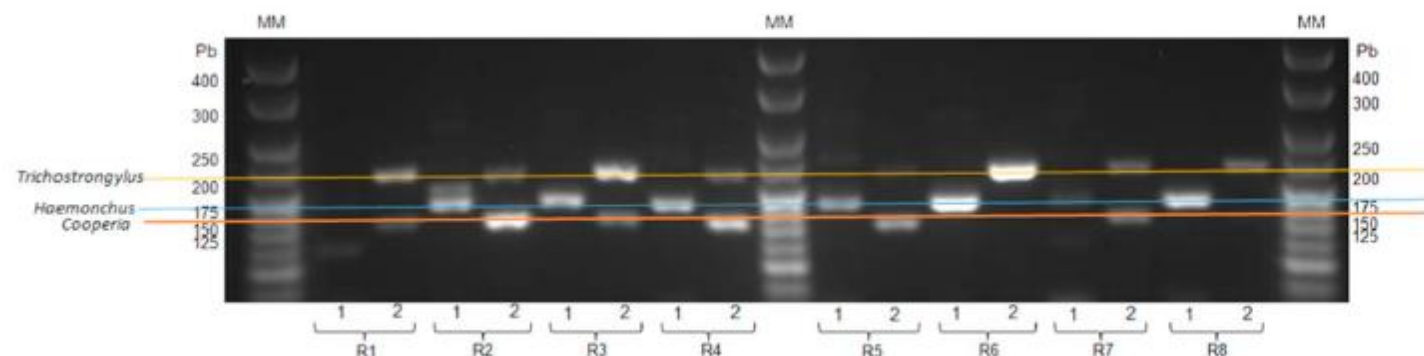


Fig. 2. Genotypes of larvae-infecting gastrointestinal nematodes before anthelmintic treatment. *Ostertagia* spp. 257 bp, *Haemonchus* spp. 176 bp, *Oesophagostomum* spp. 329 bp, *Trichostrongylus* spp. 243 bp, *Cooperia* spp. 151 bp.

it is recommended that anthelmintics, and specifically levamisole, only be used at critical times, and that selective deworming be performed to help reduce the damaging impact of nematodes and decrease the populations of resistant nematodes.

Ivermectin resistance is an international concern due to its endectocide activity, which is highly appreciated by farmers. Among the main GIN, *Haemonchus* spp. and *Cooperia* spp. have shown serious problems to being treated with IVM and BZ. However, the β -tubulin gene is considered a candidate molecular marker for early diagnosis of BZ resistance (Ramünke et al., 2016). In contrast, IVM requires further study because more genes can be used for diagnosis and it is necessary to conserve the toxicity of these anthelmintic drugs.

In conclusion, in the sub-humid region known as Huasteca Potosina, there is a high presence of anthelmintic resistance to both benzimidazole and ivermectin among the gastrointestinal nematodes of hair sheep farms. However, nematodes are still susceptible to levamisole. Therefore, strategic deworming should be performed to avoid the development of levamisole resistance.

Acknowledgments

The authors thank the National Council of Science and Technology (CONACYT) for funding during the main author's Doctorate studies.

Conflict of interest

There were no conflicting interests that could have influenced the conduct and reporting of this study.

Ethical statement

This study considered the international guiding principles for biomedical research involving animals.

References

- Alcalá-Canto, Y., Ocampo-Camberos, L., Sumano-López, H., Gutiérrez-Olvera, L., Tapia-Pérez, G., 2016. Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Vet. México*. 3, 1–11.
- Almeida, G.D., Feliz, D.C., Heckler, R.P., Borges, D.G.L., Onizuka, M.K.V., Tavares, L.E.R., Palva, F., Borges, F.A., 2013. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia* spp. in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Parasitol.* 191, 59–65.
- Chaparro, J.J., Villara, D., Zapata, J.D., López, S., Howell, S.B., López, A., Storey, B.E., 2017. Multi-drug resistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in Antioquia, Colombia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 10, 29–34.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Pritchard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
- dos Santos, J.M.L., Monteiro, J.P., Rubeiro, W.L.C., Macedo, I.T.F., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., da Silva Vieira, L., Bevilacqua, C.M.L., 2014. Identification and quantification of benzimidazole resistance polymorphisms in *Haemonchus contortus* isolated in Northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 199, 160–164.
- Encalada-Mena, L.A., Tuyub-Solis, H., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gíves, P., Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M.E., 2014. Phenotypic and genotypic characterisation of *Haemonchus* spp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche state, Mexico. *Vet. Parasitol.* 205, 246–254.
- García, M.B.C., Sprenger, K.L., Ortiz, B.E., Molento, B.M., 2016. First report of multiple anthelmintic resistance in nematodes of sheep in Colombia. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 397–402.
- Goolsby, M.K., Leite-Browning, M.L., Browning, J.R., 2017. Evaluation of parasite resistance to commonly used commercial anthelmintics in meat goats on humid subtropical pasture. *Small Rumin. Res.* 146, 37–40.
- Herrera-Manzanilla, F.A., Ojeda-Robertos, N.F., González-Garduño, R., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J.F.J., 2017. Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 9, 29–33.
- INEGI, 2010. Censo de Población y Vivienda. Available in: <http://www.inegi.org.mx>.
- Lambert, S.M., Nishi, S.M., Mendonça, L.R., da Silva Souza, B.M.P., da Silva Julião, F., da Silva Gusmão, P., de Almeida, M.A.O., 2017. Genotypic profile of benzimidazole resistance associated with SNP F167Y and F200Y beta-tubulin gene in Brazilian populations of *Haemonchus contortus* of goats. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 8, 28–34.
- Liébano-Hernández, E., González-Olvera, M., Vázquez-Peláez, C., Mendoza-de Gíves, P., Ramírez-Vargas, G., Peralta-Lailson, M., Reyes-García, M.E., Osorio, J., Sánchez-Pineda, H., López-Arellano, M.E., 2015. Benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in indigenous Chiapas and Pelibuey sheep breeds from Chiapas, Mexico. *J. Helminthol.* 89, 80–85.
- Muñiz-Lagunes, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Ramírez-Valverde, R., Ruiz-Flores, A., García-Muñiz, J.G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gíves, P., Torres-Hernández, G., 2015. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, México. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0826-3>.
- Paraud, C., Marcotty, T., Lespine, A., Sutra, J.F., Pors, I., Devos, I., 2016. Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France. *Vet. Parasitol.* 226, 88–92.
- Ramünke, S., Melville, L., Rinaldi, L., Hertzberg, H., de Waal, T., von Samson-Himmelstjerna, G., Cringoli, G., Mavrot, F., Skuce, P., Krücken, J., Demeler, J., 2016. Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6 (3), 230–240.
- SAS Institute, 2004. The SAS System for Windows. Version 9. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de Gíves, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuellar-Ordaz, J.A., 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89–96.
- Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* 209, 278–280.
- Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Di Cerbo, A., Varady, M., Manfredi, M.T., 2014. Gastrointestinal nematodes of dairy goats, anthelmintic resistance and practices of parasite control in Northern Italy. *BMC Vet. Res.* 10, 114.

4 ANTHELMINTIC ASSESSMENT OF FOUR FODDER TREES AGAINST *Haemonchus contortus* UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Santiago-Figueroa I.,¹ Olmedo-Juárez A.,^{2*} González-Garduño R.,³ Mendoza de Gives P.,² Delgado-Núñez E.J.,² Lara-Bueno A.¹ García-Muñiz J.G.,¹ Maldonado-Simán E.J.¹

¹ Posgrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco, Km 38.5, CP 56230, Chapingo, Estado de México.

² Centro Nacional de Investigación, Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos. A.P. 206 CIVAC.

³ Unidad Regional Universitaria Sur Sureste. Universidad autónoma Chapingo. Carretera Teapa-Vicente Guerrero, 86800, Teapa, Tabasco.

*Corresponding author: aolmedoj@gmail.com ORCID:

SUMMARY

Control of gastrointestinal nematodes in sheep using chemical products increasingly faces problems of helminthic resistance. This control type is particularly important with *Haemonchus contortus*, the main nematode that affects the productive performance of sheep. Alternative methods for sheep gastrointestinal parasite control using plant extracts are becoming increasingly important. The objective of the study was to evaluate the anthelmintic effect of hydroalcoholic extracts (EHA) from *Brosimum alicastrum*, *Guazuma ulmifolia*, *Erythrina americana* and *Leucaena leucocephala*. *In vitro* bioassays were carried out with eggs and infective larvae (L3) of *H. contortus*, and the EHAs were analyzed to identify the presence of secondary metabolites. Different concentrations of EHAs were used for the foliage of each tree species (50, 25, 12.5, 6.25 mg ml⁻¹ for eggs, and 100, 75, 50 and 25 mg ml⁻¹ for L3). Survival means of larvae and eggs by EHA concentration category were compared with the Tukey test, and the lethal doses 50 (LC50) and 90 (LC90) were estimated for each type of foliage, adjusting a PROBIT model. The EHA of the four trees evaluated showed an important anthelmintic effect (p <0.05), reducing the viability of both infective

larvae (L3) and eggs. However, the EHAs of *G. ulmifolia* and *E. Americana* were the most effective ($p < 0.05$), and, for eggs, they showed similar anthelmintic effect as ivermectin. In contrast, for infective larvae (L3) of *H. contortus*, the anthelmintic response of the four EHAs compared showed a variable and lower response than that achieved with ivermectin. At a concentration of 100 mg ml^{-1} , the EHA of *G. ulmifolia* achieved a mortality rate of 85% for infective larvae (L3). The EHA from *E. americana* achieved LC50 and LC90 for an egg at a concentration of 0.16 mg ml^{-1} , while for infective larvae (L3), the EHA of *G. ulmifolia* achieved LC50 and LC90 at a concentration of 64 mg ml^{-1} . Tannins, coumarins, flavonoids, and triterpenes were the most common compounds present in the plant extracts. It is concluded that the EHAs of both *G. ulmifolia* and *E. americana* have anthelmintic activity similar to compounds of chemical syntheses, such as ivermectin; therefore, it is recommended to continue their study.

Key words: bioactive forages, secondary metabolites, larvae mortality, egg hatching inhibition.

INTRODUCTION

The effect of gastrointestinal nematodes (NGI) in sheep is directly related to animal health problems and reduced farmer's income. This is particularly true for the *Haemonchus* genus due to its hematophagous capacity that can cause severe anemias, diarrhea, weight losses, and in some extremes cases, even death (Quiroz-Romero *et al.*, 2011). Inadequate use of anthelmintics for treatment of GIN on small ruminants has resulted in anthelmintic resistance worldwide (Kaplan, 2004). On the other hand, consumers worldwide are increasingly demanding chemical-free animal food products (Beyene, 2016). Because of that, there is a need for finding new strategies to control internal parasites in sheep. One such strategy is the use of forage plants rich in secondary metabolites with nematicide capabilities. Forage plants with such characteristics could be an integral part of sheep production systems to reduce the deleterious effects of NGI on grazing sheep. Their use could also lower the flock's anthelmintic resistance in sheep farms with a history of chemical control of internal parasites and well established anthelmintic resistance (Sandoval-Castro *et al.*, 2012).

Some forage plants, in addition to high contents of energy, protein, and minerals, they also contain secondary metabolites. These compounds can act as anti-nutritional factors, or they can also interfere with NGI's metabolism, and act as anthelmintics (Athanasiadou and Kyriazakis, 2004). López et al. (2005) obtained encouraging results in the control of *Haemonchus contortus* in sheep when they used purified tannins from *Leucaena leucocephala* and *Guazuma ulmifolia*.

Moreover, *Erythrina americana*, with alkaloids that act as immobilizers, has been studied on fish parasites. Specifically, *E. Americana* contains the highly toxic compound β -erythroidin. Indeed, seed methanolic extracts of this compound have resulted very toxic for nematodes such as *Panagrellus redivivus* and insects such as mosquitos (*Anopheles sp.*) (Auró de Ocampo and Jiménez, 1993; García et al., 2000; Govindarajan and Sivakumar, 2014). The leguminous forage tree *Brosimum alicastrum* has been widely used as forage resources in tropical regions of Mexico (Peter and Tejeda, 1982; Pérez et al., 1995) and for that reason, it is of interest to know its nematicidal potential. The objective of the study was to evaluate the anthelmintic effect of hydroalcoholic extracts from *Brosimum alicastrum*, *Guazuma ulmifolia*, *Erythrina americana* and *Leucaena leucocephala* on eggs and larvae of *H. contortus*.

MATERIALS AND METHODS

Forage samples

The foliage collection of *B. alicastrum*, *G. ulmifolia* and *L. leucocephala* was done at the Huasteca Potosina region in Mexico. More specifically, the study plants were collected at the Tamuin municipally, located in the state of San Luis Potosí, México. The site has a warm subhumid climate with a rainy season in summer (INEGI, 2009). Foliage samples came from well-grown mature trees and were collected from June to October 2017. The foliage samples were dehydrated using a forced air stove, and later they were finely ground using a 0.5 cm sieve mill.

Hydroalcoholic extracts

For each forage plant, the hydroalcoholic extracts (EHA's) were obtained by collecting 300 g of representative plant material. The foliage collected was macerated using 4 L of a hydroalcoholic solution (70% water: 30% methanol), and the mixture was left to rest for 24 hours. The EHA's free from vegetal matter were obtained by filtering the macerated material through a system of several filters (gauze, cotton and filter paper). After obtaining the liquid part of the macerate, the solvents were evaporated by using a low-pressure distillation evaporator R-300 (BUCHI Switzerland). The concentrate obtained was frozen at -80°C and later lyophilized using a Labconco FreeZone45 Plus equipment. The lyophilized powder was refrigerated and stored until final use.

Secondary metabolites identification

Phytochemical techniques (Wagner and Bladt, 1996) were used to identify the qualitative phytochemical profile of hydroalcoholic extracts from the plants studied. The analysis aimed to identify the presence of alkaloids, coumarins, flavonoids, tannins, terpenes, and saponins.

Biological material

Both, eggs and larvae were obtained from a mature Pelibuey ewe, which was artificially infected with a *H. contortus* strain (INIFAP, México). The animal was kept on an elevated pen for feces collection, and fecal samples were used for coprocultures. Feeding during the experimental phase was with alfalfa and a commercial supplement.

H. contortus eggs collection

Feces were directly collected from the animal's rectum. After collection, feces were washed down with tap water and filtered on mesh sieves of 240, 150, 120 and 30 µm diameter. The leftover from the last sieve (30 µm) was collected on a saline solution tube graduated to 11 mL (6 ml saline solution: 5 ml filtered water). Graduated tubes with the solution were centrifuged to 3000 rpm by 5 minutes. The ring formed with nematode eggs was recovered from all the tubes. To clean the feces scraps, the saline solution was washed down and the

leftover was centrifuged three more times. Subsequently, egg counting was done by quantifying of 5 µl aliquots, hoping that each aliquot had from 10 to 15 eggs.

Egg hatching inhibition test

Bioassays were performed in microtiter plates with 96 holes. The treatments compared were each of the EHA concentrations (50, 25, 12.5 and 6.25 mg ml⁻¹), ivermectin 5 mg ml⁻¹ (positive control), and distilled water (negative control). Each bioassay was done in triplicate at different days, using four repetitions by replication (n = 12). Each hole in the microtiter plate received 50 µl of an egg concentrate containing approximately 100±15 eggs, plus 50 µl of water with different concentrations of EHA, and controls. The plates were incubated at room temperature (25-30 °C) for 48 hours. Total egg and larvae counts were done for each hole, using optic microscopy at 10x (Motic®). The egg hatching inhibition percent (%EHI) was estimated by the following expression:

$$\%EHI = [(eggs\ number)/(larvae\ number + egg\ number)] * 100$$

Obtention of infective larvae of *H. contortus*

Infective L3 larvae were obtained from a coproculture made with feces from an infected animal. Feces were watered with a small amount of water to maintain moisture and were then incubated for seven days. After incubation, larvae were recovered following the Baermann technique (Lumbreras, 1961). Larvae were thoroughly cleaned and stored in cell culture containers at 4 °C. The *in vitro* bioassay to assess larvae mortality, larvae without pods were used. Larvae were treated with 186 µl of commercial sodium hypochlorite for exsheathment it; after that, larvae were washed three times by centrifugation (3500 rpm) to remove the sodium hypochlorite, then aquantification was made to obtain an emulsion with 100 to 150 larvae in 50 µl of water.

Larvae mortality

The treatments compared were 100, 75, 50 and 25 mg ml⁻¹ of EHA from each of the four plant species. Each plant species was located on a different plate, and as positive and negative controls, ivermectin and distilled water were used, respectively. Treatments had four

repetitions each; a repetition consisted of a hole in the microtiter plate with 50 µl of EHA and 50 µl of larvae. The microtiter plates were incubated for 48 hours. After incubation, live and dead larvae were quantified in each hole by withdrawing all the content and observing at microscopy. Larvae mortality percent was calculated as follows:

$$\%ML = [(dead\ larvae\ number)/(live\ larvae\ number + dead\ larvae\ number)] * 100$$

Statistical analysis

The data on percentages of EHI and ML were analyzed by ANOVA with a completely randomized design. For EHI percent, treatments were distilled water, ivermectin, 50, 25, 12.5 and 6.25 mg ml⁻¹ of each HAE. For ML percent, treatments were distilled water, ivermectin, 100, 75, 50 and 25 mg ml⁻¹ of each HAE. A general linear model (PROC GLM) was also used (SAS, 2004). Multiple comparisons of means for both EHI and ML was performed by Tukey's test, at a 95% confidence level. For each forage species, both the 50 and 90 lethal concentrations (CL₅₀ and CL₉₀) were estimated using only the numeric equally-spaced concentrations of the treatment levels. To this end, a regression model was fitted using PROC PROBIT (SAS, 2004).

RESULTS

Table 1 shows the results of the ovicidal and larvicidal activity of the HA extract of *B. allicastrum* on the nematode *H. contortus*. It is observed that in the IEH test, there are significant differences (p<0.05) in all the concentrations used, with 50 mg/ml having the highest ovicidal activity. While in larvicidal activity, this plant species only achieved mortality of 29.0% with the maximum concentration (100 mg ml⁻¹).

The *G. ulmifolia* HA extract exhibited an ovicidal effect of close to 100% with the lowest concentration evaluated (6.25 mg ml⁻¹). Statistically, it turned out to be just as effective as the reference anthelmintic (ivermectin), obtaining values close to 100% IEH. This same ovicidal effect was observed in the HA extract of *E. americana*, using concentrations 50, 25 and 12.5 mg ml⁻¹ (Tables 2 and 3).

Table 1. Percentage of egg hatching inhibition (EHI) and infective larvae (L3) mortality ($\pm$ S.E) of *Haemonchus contortus*, caused by a *Brosimum alicastrum* hydroalcoholic extract.

Treatments	Eggs and larvae average		EHI $\pm$ S.E.	Alive and dead larvae average		Mortality $\pm$ S.E.
	Eggs	Larvae		Dead	Alive	
Distilled water	2.9	138.2	2.07 ± 1.0^f	2.8	74.5	4.6 ± 4.3^c
Ivermectin (0.5%)	127.2	0.8	99.9 ± 0.28^a	139.3	0	100 ^a
Hydroalcoholic extract mg/mL						
100.0	---	---	---	34.8	87.7	29.0 ± 11.1^b
75.0	---	---	---	32.3	94.1	26.1 ± 7.6^b
50.0	92.8	21.1	81.4 ± 3.5^b	14.3	103.6	14.4 ± 14.4^b
25.0	82.0	36.6	69.1 ± 5.1^c	11.3	121.6	8.5 ± 5.2^c
12.5	75.5	43	63.8 ± 2.4^d	---	---	---
6.25	70.0	56.1	55.5 ± 1.7^e	---	---	---
Coefficient of variation (%)		5.3			23.1	
R ²		0.99			0.95	

Within column and attribute, means with different superscript are different ($P < 0.05$).

The maximum larvicidal activity (85.9%) of the HA extract of *G. ulmifolia* was achieved with 100 mg ml⁻¹ (Table 2). At this same concentration, the extract of *E. americana* only caused 60.0% mortality.

Table 2. Percentage of egg hatching inhibition (EHI) and infective larvae (L3) mortality ($\pm$ S.E) of *Haemonchus contortus*, caused by a *Guazuma ulmifolia* hydroalcoholic extract.

Treatments	Eggs and larvae average		EHI $\pm$ S.E	Alive and dead larvae average		Mortality $\pm$ S.E.
	Eggs	Larvae		Dead	Alive	
Distilled water	5.5	135.3	2.07 ± 1.0^f	1.9	153.8	1.1 ± 1.8^e
Ivermectin (0.5%)	127.3	0	99.9 ± 0.28^a	158.1	0	100 ^a
Hydroalcoholic extract or (E-AH) mg/mL						
100.0	---	---	---	109.7	18.5	85.9 ± 7.4^b
75.0	---	---	---	85.3	60.5	57.2 ± 15.5^c
50.0	118.8	0.4	99.5 ± 0.7^{ab}	43.5	103.8	26.8 ± 15^d
25.0	112.5	2.3	97.8 ± 2.8^{ab}	11.3	138	7.7 ± 4.9^e
12.5	120.8	0.75	99.4 ± 0.9^{ab}	---	---	---
6.25	113.4	3.9	96.78 ± 5.3^b	---	---	---
Coefficient of variation (%)		3.12			21.3	
R ²		0.99			0.95	

Within column and attribute, means with different superscript are different ($P < 0.05$).

The ovicidal effect of *L. leucocephala* was greater (83.2% IEH) when the highest concentration was used (50 mg ml⁻¹). While in the mortality test, the extract of this plant species caused a larvicidal effect of 63.0% with 100 mg ml⁻¹ (Table 4).

Table 3. Percentage of hatching eggs and infective larvae mortality (L3) of *Haemonchus contortus* caused by a *Erythrina americana* hydroalcoholic extract.

Treatments	Eggs and larvae average		EHI ± S.E	Alive and dead larvae average		Mortality ± S.E.
	Eggs	Larvae		Dead	Alive	
Distilled water	5.9	134.0	4.1 ± 2.0 ^c	3.0	96.3	3.6 ± 2.9 ^d
Ivermectin (0.5%)	111.5	0.2	99.7 ± 0.6 ^a	145.4	0	100 ^a
Hydroalcoholic extract or (E-AH) mg/mL						
100.0	---	---	---	93.4	49.1	60.0 ± 13.5 ^b
75.0	---	---	---	102.7	50.1	58.0 ± 24.8 ^b
50.0	111.4	2.6	97.0 ± 7.5 ^{ab}	86.8	49.2	62.6 ± 10.2 ^b
25.0	86.4	0.5	99.5 ± 0.7 ^a	50.3	93.3	35.8 ± 7.3 ^c
12.5	91.3	2.0	97.7 ± 2.6 ^a	---	---	---
6.25	94.0	9.3	88.8 ± 19.0 ^{ab}	---	---	---
Coefficient of variation (%)		10.7			21.4	
R ²		0.94			0.89	

Within column and attribute, means with different superscript are different (P<0.05).

Lethal concentrations (CL)

The CL₅₀ calculated for IEH in the four plants showed activity at low concentrations, ranging from 0.2 to 5 mg ml⁻¹, except for *L. leucocephala*, which exceeded 15 mg ml⁻¹. In this case, the highest concentration was for the legume *L. leucocephala*. On the other hand, when calculating the CL₉₀, the values turned out to be up to 200 mg ml⁻¹ in the case of *B. alicastrum* and *L. leucocephala*. The opposite case occurred with *G. ulmifolia* and *E. americana*, which showed good activity at low concentrations. The CL₅₀ and CL₉₀ of *G. ulmifolia* were 64 and 125 mg ml⁻¹, respectively. These results show lower values for inhibition of egg hatching than for larval mortality (Table 5).

Table 4. Percentage of egg hatching inhibition (EHI) and infective larvae (L3) mortality ($\pm$ S.E) of *Haemonchus contortus*, caused by a *Leucaena leucocephala* hydroalcoholic extract.

Treatments	Eggs and larvae average		EHI $\pm$ S.E	Alive and dead larvae average		Mortality $\pm$ S.E.
	Eggs	Larvae		Dead	Alive	
Distilled water	7.7	131.3	5.6 $\pm$ 3.5 ^c	4.7	122.0	5.2 $\pm$ 2.9 ^d
Ivermectin (0.5%)	112.5	0.1	99.9 $\pm$ 0.2 ^a	145.4	0	100 ^a
Hydroalcoholic extract or (E-AH) mg/mL						
100.0	---	---	---	75.7	40.0	63.0 $\pm$ 22.9 ^b
75.0	---	---	---	27.6	99.5	21.7 $\pm$ 8.4 ^c
50.0	97.0	20.4	83.2 $\pm$ 12.4 ^a	13.0	95.2	12.0 $\pm$ 2.1 ^{cd}
25.0	53.9	66.8	48.9 $\pm$ 31.7 ^b	7.5	114.2	6.2 $\pm$ 2.9 ^d
12.5	50.5	65.9	48.4 $\pm$ 35.3 ^b	---	---	---
6.25	44.4	65.9	45.9 $\pm$ 38.6 ^b	---	---	---
Coefficient of variation (%)		46.1			29.2	
R ²		0.59			0.93	

Within column and attribute, means with different superscript are different (P<0.05).

Identification of secondary metabolites

The main groups of compounds that were identified in all the plant species of the present study were tannins, coumarins, saponins, alkaloids and flavonoids (Table 6).

DISCUSSION

The results of the present study show an important nematicidal activity of the HA extracts of the four plant species. *Guazuma ulmifolia* was the one that showed the best anthelmintic activity, followed by *E. americana* (Table 5). There are reports of aqueous and acetone extracts of *G. ulmifolia* with ovicidal activity against *Cooperia punctata*, where it was possible to inhibit about 70% of the hatching of eggs using a concentration of 9.6 mg ml⁻¹ (von Son-de Fernex et al., 2016). On the other hand, no reports were found of the use of *B. allicastrum* in *in vitro* tests on hatching of nematode eggs. However, on *H. contortus* larvae, it has been observed that the use of extract (70:30) acetone: water from *B. allicastrum*, at a concentration of 1.2 mg ml⁻¹ it achieved 95% inhibition of larvae unsheathing (Alonso -Díaz et al., 2011).

Table 5. Hydroalcoholic extract lethal concentrations 50 and 90 from four forage trees, required to egg hatching inhibition and infective larvae killing (L3) from *Haemonchus contortus* at 48 hours.

Plant (HAE)	Egg hatching inhibition (%)				Infective larvae (L3) mortality (%)			
	CL ₅₀	IC limits 95% (lower- upper)	CL ₉₀	IC limits 95% (lower- upper)	CL ₅₀	IC limits 95% (lower-upper)	CL ₉₀	IC limits 95% (lower-upper)
<i>Brosimum alicastrum</i>	4.8	(3.88-5.70)	197	(145.6-293.1)	187.8	(156.67-270.6)	---	---
<i>Guazuma ulmifolia</i>	2.7	(2.6-2.8)	4.4	(2.62-2.80)	64.0	(62.45-65.66)	125.2	(119.6-132.0)
<i>Erythrina americana</i>	0.16	(0.04-0.38)	4.1	(2.8-5.4)	---	---	---	---
<i>Leucaena leucocephala</i>	17.9	(16.8-19.1)	201.9	(167.6-251.0)	93.12	(91.61-94.71)	124.5	(119.6-131.36)

HAE= Hydroalcoholic extract CL= Confidence interval

Table 6. Results of hydroalcoholic extract qualitative phytochemical analysis using Wagner and Bladt (1996) technique.

Metabolite	Colorimetric reaction	Hydroalcoholic extract (E-HA)			
		<i>Brosimum alicastrum</i>	<i>Guazuma ulmifolia</i>	<i>Erythrina americana</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
Alkaloids	Dragendorff	-	-	-	+
	Mayer	-	-	-	+
	Wagner	-	-	+	++
Coumarins	Borntraeguen	-	+	+	+
Flavonoids	Mg ²⁺ y HCL	-	-	+	+
Tannins	Ferric chloride	+++	+++	+++	+++
	Gelatine solution	-	-	-	-
	Ferric chloride, Gelatin and saline solution	+++	+++	+++	+++
	Saline solution	-	-	-	-
Triterpenes/steroids	Liebermann-Burchard	-	+	-	+
	Salkowski	+	+	+	+
	Foam formation	+	-	+	++
Saponins					

(-) No detected (+) positive light reaction (++) positive reaction (+++) strong positive reaction

In the present study, a concentration of 187.8 mg ml⁻¹ was required to cause 50% mortality in the larvae. On the other hand, there are few studies carried out with extracts of *G. ulmifolia* on the nematode *H. contortus*, and none carried out with the hydroalcoholic extract of this forage plant. In a study carried out with kids artificially infected with 350 larvae per kg of *H. contortus* no differences were obtained for those fed diets without foliage from those fed 10% *G. ulmifolia* in the reduction of eggs per gram in feces (HPG) (León et al., 2015). On the other hand, the acetone: water extract of *G. ulmifolia* on *Cooperia punctata* eggs was shown to reduce egg hatching by around 50% using a concentration of 9.6 mg ml⁻¹ (von-Son-de-Fernex et al., 2016). Shekhawat and Vijayvergia (2011) used *G. ulmifolia* ethanolic extract on the nematode *Pheritima posthuma* and with a concentration of 100 mg ml⁻¹, it achieved mortality in 82 minutes; however, other plants showed an effect more quickly.

The extract of *L. leucocephala* has been used on larvae, managing to inhibit 91.2% of unsheathing using a concentration of 1.2 mg ml⁻¹ (Alonso-Díaz, 2008). Other studies with *L. leucocephala* seed extracts reported very low concentrations (1.99 mg ml⁻¹) to inhibit the survival of *H. contortus* L3 (Ademola and Idowu, 2006). The larvicidal effect of this arboreal legume has been attributed to its tannin content, which reduces the ability of infective larvae to draw (Alonso-Díaz, 2008). Furthermore, ethanolic extract of *L. leucocephala* has been tested on *Rhipicephalus microplus* larvae, and 91.7% mortality was found using a concentration of 50 mg ml⁻¹ (González-López et al., 2019).

Rivero-Pérez et al. (2019) used a hydroalcoholic extract of *L. leucocephala* pod and reported lower efficacy in the percentage of IEH using 50 mg ml⁻¹ than in the present study (20 vs 83.5) as well as in the percentage of ML since the dose that had greater efficacy was 25, 12.5 and 6.25 mg ml⁻¹, close to 20% against 6.2% that was obtained in this work using concentrations of 25 mg ml⁻¹. It is known that the species of the genus *Erythrina* contain a large amount of alkaloids themselves that have a neuromuscular blocking effect, according to Auro de Ocampo and Jiménez (1993) and that the extracts with released alkaloids (methanolic extract) on *Daphnia magna* turned out to be more toxic (García et al., 2000) so the anthelmintic effect found in the present study could be explained; among which the extracts of some species such as *E. variegata* have been tested on crustacean species of the genus *Artemia*, earthworms (*Eisenia foetida*) and helminths that are parasites of birds such as *Ascaridia galli* and *Raillietina spiralis*, finding mortality in these using concentrations from 10 mg ml⁻¹ of the methanolic extract (Satish and Ravindra, 2009; Shahriar et al., 2016).

The CL₅₀ and CL₉₀ of *B. alicastrum* in NGI larvae reported by Alonso-Díaz et al. (2011) was 291.6 and 666.6, respectively, which are similar to that found in the present research of 187.8 and 608.7, respectively. The extract 70:30 acetone: water from *G. ulmifolia* reported by von-Son-de-Fernex et al. (2016) was 8.84 mg ml⁻¹ higher than the CL₅₀ found in the present study (2.2 mg ml⁻¹) for IEH. The same 70:30 acetone: water extract had a CL₅₀ of 11.77 mg ml⁻¹ lower than that found in this study (17.7 mg ml⁻¹). In *H. contortus* a CL₅₀ for *Erythrina americana* has not been reported; however, the CL₅₀ for *E. variegata* on the crustacean of the genus *Artemia* was 3.99 mg ml⁻¹ (Shahriar et al., 2016), results that are superior to those

found for *H. contortus* using *E. americana* in the present research (0.19 mg ml⁻¹). Regarding the phytochemical analysis of *B. allicastrum*, García et al. (2006) analyzed the cortex and found the same secondary metabolites as in the extract analyzed in this study, except for coumarins, the same as in this study if they were present, whereas Tení et al. (2008) reported the presence of coumarins in the methanolic extract of leaves of *B. allicastrum*, which confirms these results. López-Herrera et al. (2008) analyzed the secondary metabolites of *G. ulmifolia* qualitatively and reported the presence of saponins, cyanogenic glycosides, phenols and steroids, these results are similar to those found in this study, except that no saponins were found.

Identification of secondary metabolites of another *Erythrina species* showed results similar to those found in *Erythrina americana*. For *Erythrina variegata*, the presence of alkaloids, saponins and flavonoids was found, but no tannins or terpenes were detected as in *E. americana* (Shahriar et al., 2016). On the other hand, the *L. leucocephala* extract contents differ compounds solvents, depending in ethanolic and aqueous extracts, there are flavonoids, saponins, phenols, tannins, terpenoids, among others, whereas in the hydroalcoholic extract obtained in this work just were founded alkaloids, triterpenes, saponins, coumarins, tannins, and flavonoids, similar results to those reported by Deivasigamani (2018).

CONCLUSION

It is concluded that the hydroalcoholic extracts of the four forage species tested could be an option to help control *Haemonchus contortus*, with *G. ulmifolia* and *E. americana* being the most effective. However, monitoring is recommended to determine the compounds responsible for its ovicidal and nematicidal action.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author's acknowledgment to CONACyT for the economic aidment during the Doctoral studies of the first author.

REFERENCES

- Alonso-Díaz A, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H (2008) *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. Vet Parasitol 153: 3113-319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.011>.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta J F.J, Sandoval-Castro CA, Hoste H (2011) Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 181: 360-364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.052>
- Ademola IO, Idowu SO (2006) Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. Vet Record 158: 485-486. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.158.14.485>
- Athanasiadou S, Kyriazakis I (2004) Plant secondary metabolites: Antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. Proc Nutr Soc 63: 631-639. <https://doi.org/10.1079/PNS2004396>
- Auró OA, Jiménez ME (1993) La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. Vet Mex 24: 291-295. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1993/vm934b.pdf>
- Beyene T (2016) Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. Veterinar Sci Technol 7: <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285>
- Deivasigamani R. (2018). Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. Journal of Phytopharmacology 7: 480-482. http://www.phytopharmajournal.com/Vol7_Issue6_05.pdf
- García MR, Soto HM, Martínez VM (2000) Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. Ciencia Ergo Sum 7: 166-170. <https://cienciaergosum.uaemex.mx/article/view/7598>

García CH, Martell DO, Guyat DMA, Capote PV, Aguirre DB (2006) Caracterización química del follaje, la corteza y la madera de cinco especies forestales de la Sierra Maestra. *Revista Forestal Baracoa* 25: 57-64.

González LG, Ojeda CMM, Casanova LF, Oros OI, Hernández CLI, Piñeiro VAT, Rodríguez VRI (2019) Actividad acaricida de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp. sobre *Rhipicephalus microplus* en condiciones *in vitro*. *Rev Mex Cienc Pecu* 10: 692-704. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4822>

Govindarajan M, Sivakumar R (2014) Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 113: 777-791. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3709-4>

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tamaulipas, San Luis Potosí. <http://www3.inegi.org.mx/>

Kaplan M (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends in Parasitol* 20: 477-481. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>

León CY, Olivares PJ, Rojas HS, Villa MA, Valencia AMT, Hernández CE, Córdova IA, Jiménez GR (2015) Effect of three fodder trees on *H. contortus* control and weight variations in kids. *Ecos Rec Agropec* 2: 193-201. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000200007&lng=es&nrm=iso

López J, Ibarra FO, Cantó JG, Vásquez GC, Tejada IZ, Shimada A (2005) *In vitro* effect of condensed tannins from tropical fodder crops against egg and larvae of the nematode *Haemonchus contortus*. *J Food Agric Environ* 3: 191-194. <https://doi.org/10.1234/4.2005.598>

López HMA, Rivera LJA, Ortega RL, Escobedo MJG, Magaña MMA, Sanginés GJR, Sierra VAC (2008) Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Tec Pecu* 46: 205-215. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/1810>

Lumbreras H (1961) Aplicación de la “Técnica de Baermann modificada en copa” en el diagnóstico y control terapéutico de la Balantidiosis. Rev Med Per 30: 21-25.

Quiroz RH, Figueroa CJA, Ibarra VF, López AME (2011) Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. (1 ed.) Limusa.

Peter MC, Tejeda PE (1982) *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and potencial in México. Econ Bot 36: 166-175. <https://doi.org/10.1007/BF02858712>

Pérez RJD, Zapata BGJ, Sosa REE (1995) Utilización del ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) como forraje en la alimentación de ovinos de crecimiento. Agrofor Am 7: 17-21. <http://hdl.handle.net/11554/6901>

Rivero PN, Jaramillo CA, Peláez AA, Rivas JM, Ballesteros RG, Zaragoza BA (2019) Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*). Abanico Vet 9. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.95>

Sandoval CCA, Torres Acosta JFJ, Hoste H, Salem AZM, Chan PJI (2012) Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. Anim Feed Sci Technol 176: 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.023>

SAS (2004) The SAS System for Windows. Version 9. SAS Institute. Inc., Cary, NC, USA.

Satish BK, Ravindra AF (2009) Investigation of anthelmintic potential of some plants claimed by trials of satpuda hills. International Journal of Pharm Tech Research 1: 68-72. <http://www.sphinxssai.com/pdf/pt/PT-pdf>

Shahriar M, Khair NZ, Sheikh Z, Chowdhury SF, Kamruzzaman, Bakhtiar SI, Chisty SJ, Narjish SN, Akhter R, Akter N (2016) Phytochemical analysis, cytotoxic and *in vitro* antioxidant activity of *Erythrina variegata* Bark. Eur J Med Plants 11: 1-5. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/18866>

Shekhawat N, Vijayvergia R (2011) Anthelmintic of extracts of some medicinal plants. Int J Comp Sci Math 3: 183-187. <http://www.irphouse.com>

Tení MDM (2008) Tamizaje Fitoquímico Fraccionado y Evaluación Biocida del Extracto de Diclorometano y Metanólico de *Brosimum alicastrum* Swartz (Ramón) Fruto, Semilla y Hojas. (Undergraduate Thesis). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 84 p.

Von-Son-de-Fernex E, Alonso DMA, Mendoza GP, Valles MB, Zamilpa A, González CM (2016) Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*. Vet Méx 3. <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.2.365>

Wagner H, Bladt S (1996) Plants drug analysis. A thin layer chromatography Atlas. 2nd ed. Munich, Alemania. Springer.

5 DISCUSIÓN GENERAL

La resistencia antihelmíntica (RA) que se presenta en el ganado ovino, como ya se ha mencionado a lo largo del presente documento, es un problema que afecta a muchos rebaños en todo el mundo, y cada vez hay nuevos reportes de RA en zonas que antes no había. Por lo tanto, es necesario conocer el estado de susceptibilidad o resistencia en los rebaños para ejercer programas de control que se adapten a las necesidades para lograr la adecuada producción, salud y rentabilidad de los sistemas de producción de ovinos (Kaplan, 2020). En la presente investigación se realizó el diagnóstico de RA en una zona dónde no se había realizado antes, a pesar del clima con el que cuenta y de la importancia en la producción ganadera que tiene esta zona. Se realizó mediante el uso de técnicas tanto en campo como *in vitro* para confirmar los resultados. El clima con el que cuenta esta zona es cálido subhúmedo, lo que favorece la ploriferación de estos organismos (Morgan & van Dijik, 2012). Algunos investigadores han realizado estudios similares en México, aunque la mayoría de los trabajos fueron realizados en el sureste del país. Torres-Acosta, Dzul-Canche, Aguilar-Caballero, y Rodríguez-Vivas (2003) usaron la prueba de reducción de huevos en heces, FECRT, por sus siglas en inglés (Fecal Egg Count Reduction Test) en rebaños de Yucatán, encontrando 15.8% de rebaños resistentes a bencimidazol. Posteriormente, en cabras se reportó 58% de RA a bencimidazol en esa misma zona (Torres-Acosta, 2005); ambos trabajos reportan menor porcentaje de RA que en la presente investigación. Sin embargo, nuestro estudio coincide con reportes recientes donde se reportaron 100% de rebaños resistentes a bencimidazol (Alcalá, Ocampo, Sumano, Gutiérrez, & Tapia, 2016; Herrera, Ojeda, González, Cámara, & Torres, 2017). La RA a ivermectina es bien conocida, debido a que ha sido ampliamente usada para el control de garrapatas, sobre todo en bovinos (Fernández-Salas, Rodríguez-Vivas, Alonso-Díaz, & Basurto-Camberos, 2012). Sin embargo, la resistencia en nematodos gastrointestinales se ha estudiado poco en México, aunque, en los estudios realizados se ha encontrado alta resistencia antihelmíntica, tanto a bencimidazol como a ivermectina (Herrera, Ojeda,

González, Cámara y Torres, 2017; Mondragón-Anselmo et al., 2019). Por otro lado, resistencia antihelmíntica a levamisol no se encontró en los rebaños de este estudio, a diferencia de lo reportado por Herrera et al. (2017), donde se encontró resistencia a levamisoles en Tabasco, México.

En las pruebas *in vitro* que se realizaron se confirma esa resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos comunes, ya que en algunos casos no fue posible realizar la curva debido a la alta concentración de febendazol requerida para lograr LD₅₀. En un estudio realizado en Chiapas, Liébano-Hernández et al. (2015) encontraron cepas resistentes de *H. contortus* empleando esta misma técnica. Cuando los rebaños presentan incidencia elevada de RA, es necesario adoptar estrategias para retardar el desarrollo o intensificación de este fenómeno (Kaplan, 2020). Existen algunas opciones para romper la RA, varias de éstas ya se discutieron en la primera parte de este documento, por lo que el objetivo de la presente investigación fue documentar el potencial antihelmíntico de algunas arbóreas forrajeras establecidas en los sistemas silvopastoriles (Palma, 2006). De este modo, es más fácil implementar acciones para el uso de extractos antihelmínticos arbóreos o directamente a través del forraje que consumen los animales en los potreros. Las investigaciones de la acción antihelmíntica de arbóreas y arbustivas forrajeras son escasas y difieren en sus resultados. En el presente estudio se observó acción antihelmíntica del follaje de la arbórea *B. alicastrum*, tanto en larvas como en huevos; sin embargo, otros autores reportan al *B. alicastrum* con contenido bajo de taninos, y, por lo tanto, se asume que no presenta actividad antihelmíntica (Brunet et al., 2008). Por otro lado, Alonso-Díaz, Torres-Acosta, Sandoval-Castro, y Hoste (2011) encontraron 60% de inhibición del desenvaine de larvas 3 de *H. contortus* con extracto 70:30 acetona:agua usando 300 mg ml⁻¹ de extracto hidroalcohólico de la misma arbórea; este efecto concuerda con los resultados de la presente investigación, aunque es recomendable desarrollar más estudios. El uso de *L. leucocephala* es ampliamente conocido por su valor nutrimental como forraje en los sistemas silvopastoriles (Santiago-Figueroa, Lara-Bueno, Miranda-Romero, Huerta-Bravo, Krishnamurty, & Muñoz-González, 2016); además de que es bien conocido que contiene taninos condensados (Zarin,

Wan, Isha, & Armania, 2016), por lo que se han obtenido resultados positivos en el control de nematodos gastrointestinales. En este sentido, Mejía, Salem, Elghandour, Cipriano-Salazar, Cruz-Lagunas, & Camacho (2014) determinaron que el suministro de 30 ml de extracto de etanol, metano y agua de *L. leucocephala* redujo el conteo de huevos de nematodos gastrointestinales en corderos. *Guazuma ulmifolia*, es otra planta con potencial forrajero en rumiantes (Izaguirre, Martínez, Jiménez, Posada, García, & Martínez, 2011; Manríquez-Mendoza, López-Ortiz, Olguín-Palacios, Pérez-Hernández, Díaz-Rivera, & López-Tecpoyotl, 2011), y se han reportado efectos antihelmínticos usando el extracto etanólico del follaje de esta arbórea en la sobrevivencia de *Pheritima posthuma* provocando parálisis de las larvas en 18 min, usando concentraciones del extracto de 100 mg ml⁻¹ (Shekhawat & Vijayvergia, 2011). Asimismo, en nematodos *Cooperia punctata*, endoparásito que afecta tanto a bovinos como a ovinos, la eclosión de huevos se redujo en casi 50% cuando se suministró extracto acetona:agua proveniente del follaje de la guácima (Von-Son-de-Fernex, Alonso, Mendoza, Valles, Zamilpa, & González, 2016). Estos resultados respaldan lo encontrado en el presente estudio, en el cual, el extracto hidroalcohólico de guácima mostró igual efectividad para inhibir la eclosión de huevos que el uso de ivermectina. Para finalizar, *Erythrina americana* es quizá la planta menos estudiada en cuanto a su potencial antihelmíntico, y los pocos resultados reportados en la literatura son diversos y con efectos inconsistentes. Así, el extracto acuoso de *E. variegata*, en concentraciones de 10 mg ml⁻¹, causó parálisis y mortalidad del parásito gastrointestinal *Eisenia fetida*, al mismo tiempo que el citrato de piperazina en la misma concentración (Satish & Ravindra, 2009). Sin embargo, otros investigadores no encontraron ningún efecto del suministro del extracto antiparasitario de la arbórea *E. indica* en contra de *Fasciola gigantica* y de *F. grossly* (Jeyathilakan, Muralf, Anandaraj, & Batish, 2010), así como en el HPG de corderos alimentados durante 28 días con 100% de follaje de *E. americana* (Hernández-Espinoza, 2020). No obstante, se ha reportando que *E. americana* posee como metabolitos bioactivos a los alcaloides, especialmente β -eritroidina (Fahmy, Al-Sayed, El-Shazly, & Singab, 2019), lo cual ayuda a explicar

el efecto antihelmíntico que mostró esta arbórea como resultado de la presente investigación.

Se concluye que, en la región de la Huasteca Potosina, los rebaños ovinos presentan resistencia antihelmíntica a ivermectina y a bencimidazol, pero no a levamisoles. Asimismo, en esa misma region existen los recursos forrajeros con potencial bioactivo que puede usarse para el control de los nematodos que afectan a los rebaños ovinos, donde los antihelmínticos comerciales son ya poco efectivos. Se recomienda continuar la investigación en el estudio de arbóreas y arbustivas con potencial antihelmíntico, para elaborar estrategias funcionales en el control de párasitos gastrointestinales haciendo uso de los recursos vegetales existentes.

Literatura citada

- Alcalá, C. Y., Ocampo, C. L., Sumano, L. H., Gutiérrez, O. L., & Tapia, P. G. (2016). Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Veterinaria México*, 3, 1-11. doi: 10.21753/vmoa.3.4.374.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., & Hoste, H. (2011). Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extract *against Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 181, 2-4, 360-364.
- Brunet, S., Martinez-Ortiz, M. C., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C. & Hoste, H. (2008). Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 157, 1-2, 81-88.
- Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., & Singab, N. A. (2019). Alkaloides of genus *Erythrina*: An updated review. *Natural Product Research*, 1-22. doi:10.1080/14786419.2018.1564300.
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A. & Basurto-Camberos, H. (2012). Ivermectin resistance status and factors associated in

- Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 190, 1-2, 210-215.
- Hernández-Espinoza, D. F., Ramos-Juárez, J. A., González-Garduño, R., Lagunes-Espinoza, L. C., López-Herrera, M. A., & Oliva-Hernández J. (2020). *Erythrina americana* Miller foliage intake in Blackbelly x Pelibuey ewes. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11, 1, 70-88.
- Herrera, M. F. A., Ojeda, R. N. F., González, G. R., Cámara, S. R., & Torres, A. J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid trópics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9, 29-33.
- Izaguirre, F., Martínez, T. J. J., Jiménez, F. J. G. O., Posada, C. S., García, C. C. G. & Martínez, P. G. (2011). Respuesta reproductiva y productiva de borregas Pelibuey a la suplementación con hojas de Caulote (*Guazuma ulmifolia*), Guaje (*Leucaena leucocephala*) y Yaite (*Gliricidia sepium*) en condiciones de trópico húmedo. *Livestock Research for Rural Development*, 23(10), 1-10.
- Jeyathilakan, N., Murali, K., Anandaraj, A., & Batish, S. A. (2010). *In vitro* evaluation of anthelmintic property of herbal plants against *Fasciola gigantica*. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80, 11, 1070-1074.
- Kaplan, M. R. (2020). Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36, 1, 17-30.
- Liébano-Hernández, E., González-Olvera, M., Vázquez-Peláez, C., Mendoza-de-Gives, P., Ramírez-Vargas G., Peralta-Lailson, M..., & López-arellano, M. E. (2015). Benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in indigenous Chiapas and Pelibuey sheep breeds from Chiapas, Mexico. *Journal of Helminthology*, 89, 01, 80-85.
- Manríquez-Mendoza, L. Y., López-Ortiz, S., Olguín-Palacios, C., Pérez-Hernández, P., Díaz-Rivera, P., & López-Tecpoyotl, Z. G. (2011). Productividad de un

- sistema silvopastoril intensivo bajo pastoreo simultáneo de bovinos y ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 573-584.
- Mejía, H. P., Salem, A. Z. M., Elghandour M. M. M., Cipriano-Salazar, M., Cruz-Lagunas, B., & Camacho, L.M. (2014). Anthelmintic effects of *Salix babylonica* L. and *Leucaena leucocephala* Lam. extracts in growing lambs. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 173-178.
- Mondragón-Anselmo, J., Olmedo-Juárez, A., Reyes-Guerrero, D. E., Ramírez-Vargas G., Ariza-Román, A. E., López-Arellano, M. E., ..., & Napolitano F. (2019). Detection of gastrointestinal nematode populations resistant to albendazole and ivermectin in sheep. *Animals*, 9, 10, 775.
- Morgan, E. R., & Van Dijk, J. (2012). Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*, 189, 1, 8-14.
- Palma, J. M. (2006). Los sistemas silvopastoriles en el trópico seco mexicano. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 14, 3, 95-104.
- Santiago-Figueroa, I., Lara-Bueno, A., Miranda-Romero, L. A., Huerta-Bravo, M., Krishnamurty, L., & Muñoz-González J. C. (2016). Composición química y mineral de leucaena asociada con pasto estrella durante la estación de lluvias. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 16, 3173-3183.
- Satish, B. K., & Ravindra, A. F. (2009). Investigation of anthelmintic potential of some plants claimed by trials of satpuda hills. *International Journal of Pharm Tech Research* 1, 1, 68-72.
- Shekhawat, N., & Vijayvergia, R. (2011). Anthelmintic activity of extracts of some medicinal plants. *International Journal of Computational Science and Mathematics*, 3, 2, 183-187.
- Torres-Acosta J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., Le Bigot, C., Hoste, H., Canul-Ku, H. L., Santos-Ricalde, R., & Gutiérrez-Segura, I. (2005). Comparing different formulae to test for gastrointestinal nematode resistance to benzimidazoles

in smallholder goat farms in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 134, 3-4, 241-248.

Torres-Acosta, J. F., Dzúl-Canche, U., Aguilar-Caballero, A., & Rodríguez-Vivas, R. (2003). Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 114, 1, 33-42.

Von-Son-de-Fernex, E., Alonso, D. M. A., Mendoza, G. P., Valles, M. B., Zamilpa, A., & González, C. M. (2016) Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*. *Veterinaria México* 3, 2, doi.org/10.21753/vmoa.3.2.365.

Zarin, M. A., Wan, H. Y., Isha, A., & Armania, N. (2016). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. *Food Science and Human Wellness*, 5, 2, 65-75.