

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE  
AISLAMIENTOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* RESISTENTE Y  
SUSCEPTIBLE A LOS ANTIHELMÍNTICOS EN CORDEROS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE**

Agustín Javier Carosio

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de  
*MAGISTER SCIENTIAE* en SANIDAD ANIMAL

**Área de Producción Animal**

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Unidad Integrada Balcarce  
Facultad de Ciencias Agrarias - UNMDP  
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce - INTA

Balcarce, Argentina  
Agosto 2019

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE  
AISLAMIENTOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* RESISTENTE Y  
SUSCEPTIBLE A LOS ANTIHELMÍNTICOS EN CORDEROS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE**

Agustín Javier Carosio



.....  
Mercedes Lloberas, M.V. M.Sc. Dr.  
Directora de Tesis

.....  
Carlos Rossanigo, M.V. M.Sc. Ph.D.  
Co Director



.....  
Germán Cantón, M.V. M.Sc. Ph.D.  
Asesor

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE  
AISLAMIENTOS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* RESISTENTE Y  
SUSCEPTIBLE A LOS ANTIHELMÍNTICOS EN CORDEROS INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE**

Agustín Javier Carosio

Aprobada por:

p/s



.....  
Víctor Suárez, M.V. M.Sc. Ph.D.



.....  
Silvina Fernández, M.V. Ph.D.

p/s



.....  
Gonzalo Suárez Veirano, DMTV. Dr.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. 1. Producción ovina en Argentina.....	4
3. 2. Helmintos gastrointestinales en ovinos.....	4
3. 3. <i>Haemonchus contortus</i> .....	6
Ciclo biológico.....	6
3. 4. Epidemiología.....	7
3. 5. Cuadros clínicos.....	9
3. 6. Fisiopatología.....	10
3. 7. Hallazgos posmortem.....	14
3. 8. Diagnóstico.....	15
3. 9. Respuesta inmune.....	17
3. 10. Control.....	18
3. 11. Resistencia antihelmíntica.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4. 1. Lugar de realización del ensayo experimental.....	26
4. 2. Animales y formación de grupos.....	26
4. 3. Duración.....	27
4. 4. Instalaciones.....	27
4. 5. Aislamientos utilizados e inoculación experimental.....	27
4. 6. Mediciones en el período de pre inoculación.....	28
4. 6. 1. Estudios fisiológicos.....	28

4. 6. 1. 1. Consumo de alimento y agua.....	28
4. 6. 1. 2. Peso, condición corporal y método FAMACHA®.....	28
4. 6. 2. Estudios hematológicos.....	28
4. 6. 3. Estudios parasitológicos.....	29
4. 7. Mediciones en el período experimental pos inoculación.....	29
4. 7. 1. Estudios fisiológicos.....	29
4. 7. 1. 1. Consumo de alimento y agua.....	29
4. 7. 1. 2. Peso, condición corporal y método FAMACHA®.....	29
4. 7. 2. Estudios hematológicos.....	29
4. 7. 3. Estudios parasitológicos.....	29
4. 7. 3. 1. Oviposición hembra/día.....	30
4. 7. 3. 2. Test de eclosión de huevos <i>in vitro</i> .....	30
4. 8. Mediciones en la necropsia.....	30
4. 8. 1. pH de abomaso.....	31
4. 8. 2. Recuperación y longitud de adultos.....	31
4. 8. 3. Peso relativo de abomaso.....	31
4. 8. 4. Patología macroscópica.....	31
4. 8. 5. Patología microscópica.....	31
4. 8. 6. Digestión de mucosa abomasal.....	32
4. 9. Metodologías analíticas.....	32
4. 9. 1. Determinación de proteínas totales.....	32
4. 9. 2. Determinación de albúmina.....	32
4. 9. 3. Determinación de pepsinógeno.....	33
4. 9. 4. Procesamiento de biopsias abomasaes para histopatología .....	35
4. 9. 5. Técnica McMaster modificada.....	36
4. 9. 6. Recuperación de huevos en materia fecal.....	36

4. 9. 7. Técnica de recuperación de parásitos adultos en abomaso.....	36
4. 9. 8. Técnica de digestión péptica de mucosa abomasal.....	37
4. 10. Análisis estadístico.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5. 1. Estudios fisiológicos.....	39
5. 1. 1. Consumo de alimento y agua.....	39
5. 1. 2. Peso vivo, condición corporal y método FAMACHA® .....	40
5. 2. Estudios hematológicos.....	44
5. 3. Estudios parasitológicos.....	54
5. 3. 1. Conteos diarios de huevos en materia fecal.....	54
5. 3. 2. Oviposición hembra/día.....	55
5. 3. 3. Test de eclosión de huevos <i>in vitro</i> .....	55
5. 4. Estudios a la necropsia parasitológica.....	56
5. 4. 1. pH de abomaso.....	56
5. 4. 2. Peso relativo de abomaso.....	57
5. 4. 3. Ejemplares adultos totales, relación hembra:macho, porcentaje de implantación y longitud .....	57
5. 4. 4. Patología macroscópica.....	57
5. 4. 5. Patología microscópica.....	58
5. 4. 6. Digestión de mucosa.....	58
6. DISCUSIÓN.....	59
7. CONCLUSIONES.....	76
8. BIBLIOGRAFÍA.....	77

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Porcentaje de eclosión de huevos de aislamientos de <i>H. contortus</i> .....	56
Tabla 2: Promedios, errores estándares y valores p de las variables determinadas a la necropsia parasitológica.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resumen de las principales consecuencias patológicas y fisiopatológicas de infección de <i>Haemonchus contortus</i> en ovejas y cabras (Adaptado de Hoste <i>et al.</i> , 2016).....	15
Figura 2: Evolución del consumo de agua promedio y el error estándar por grupo.....	40
Figura 3: Cambio relativo del consumo de agua de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	40
Figura 4: Evolución del peso vivo promedio y el error estándar por grupo.....	41
Figura 5: Cambio relativo del peso vivo de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	41
Figura 6: Evolución de la condición corporal promedio y el error estándar por grupo.....	42
Figura 7: Cambio relativo de la condición corporal de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	42
Figura 8: Evolución de la puntuación FAMACHA® promedio y el error estándar por grupo.....	43
Figura 9: Cambio relativo de la puntuación FAMACHA® de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	44
Figura 10: Evolución del hematocrito promedio y el error estándar por grupo.....	45
Figura 11: Cambio relativo del hematocrito de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	45
Figura 12: Evolución de los glóbulos rojos promedio y el error estándar por grupo.....	46
Figura 13: Cambio relativo de los glóbulos rojos totales de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	46
Figura 14: Evolución de los eosinófilos absolutos promedio y el error estándar por grupo.....	47
Figura 15: Cambio relativo de los eosinófilos absolutos de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	47

Figura 16: Evolución de los eosinófilos relativos promedio y el error estándar por grupo.....	48
Figura 17: Cambio relativo de los eosinófilos relativos de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	48
Figura 18: Evolución de la hemoglobina promedio y el error estándar por grupo.....	49
Figura 19: Cambio relativo de la hemoglobina de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	49
Figura 20: Evolución de las proteínas totales promedio y el error estándar por grupo.....	50
Figura 21: Cambio relativo de las proteínas totales de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	51
Figura 22: Evolución de la albúmina promedio y el error estándar por grupo.....	51
Figura 23: Cambio relativo de la albúmina de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	52
Figura 24: Evolución del pepsinógeno promedio y el error estándar por grupo.....	53
Figura 25: Cambio relativo del pepsinógeno de los corderos inoculados expresado como veces de cambio con respecto al control.....	53
Figura 26: Tendencia/Distribución de HPG promedio por día y por grupo en corderos inoculados.....	54
Figura 27: Oviposición promedio por hembra/día por grupo inoculado.....	55

## RESUMEN

Los parásitos gastrointestinales constituyen una de las principales causas de disminución de productividad en rumiantes. La principal especie parasitaria que afecta a los ovinos, causando importantes pérdidas económicas, es *Haemonchus contortus*. Su control se ha basado principalmente en el uso indiscriminado de antihelmínticos que generó resistencia a la mayoría de los productos comerciales disponibles. Debido a esta problemática, es necesario estudiar el impacto que tiene dicho fenómeno en la aptitud de este nematodo, ya que existe evidencia, de cambios en su patogenicidad y características parasitológicas. Por tales motivos los objetivos de este trabajo fueron evaluar y comparar aspectos fisiopatológicos y parasitológicos de aislamientos resistente y susceptible de *H. contortus* sobre corderos inoculados experimentalmente. El ensayo se realizó en la Unidad Integrada Balcarce, Buenos Aires. Se utilizaron 18 corderos de 4-5 meses de edad alojados en corrales, libres de parásitos y separados en tres grupos (n=6). Un grupo se inoculó con 2000 larvas infectivas (L3) de *H. contortus* resistente (benzimidazoles y lactonas macrocíclicas), otro se inoculó con 2000 L3 de *H. contortus* susceptible, y el otro se mantuvo libre de parásitos. Se realizó un monitoreo diario de los animales durante 68 días, evaluando parámetros fisiopatológicos y parasitológicos. Diariamente se evaluó el consumo de alimento y agua y se determinó el conteo de huevos de nematodos en materia fecal (HPG). Cada 10 días se tomaron muestras de sangre para evaluar indicadores hematológicos, se registró el peso, condición corporal y FAMACHA®. En forma indirecta se calculó la prolificidad parasitaria. Se evaluó el porcentaje de eclosión de huevos de ambos aislamientos mediante una técnica *in vitro*. Al final del período experimental se llevó a cabo la necropsia parasitológica de todos los corderos, realizándose el conteo y clasificación de parásitos adultos abomasales (relación hembra:macho y longitud) y la evaluación histopatológica del abomaso. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el peso vivo ni en la condición corporal entre grupos. No se encontró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre grupos inoculados en FAMACHA®, pero sí con el grupo control. El hematocrito, los glóbulos rojos, la hemoglobina y las proteínas totales mostraron una cinética similar, sus valores cayeron y se diferenciaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en ambos grupos inoculados con respecto al control a partir del día 21 post inoculación. El promedio de HPG fue mayor en el grupo susceptible durante todo el estudio ( $p \leq 0,05$ ) comparado con el grupo resistente. La cantidad de huevos/hembra estimada fue similar entre aislamientos al comienzo de la oviposición (alrededor de 8000 huevos/hembra), sin embargo al final de este periodo, hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con mayor oviposición promedio de hembras resistentes. El peso relativo de abomaso mostró tendencia a ser mayor en grupo susceptible con respecto al control ( $p = 0,06$ ). Se

recuperó mayor cantidad de adultos susceptibles (1516) que resistentes (951) ( $p \leq 0,05$ ), por lo tanto, el porcentaje de implantación fue mayor en el aislamiento susceptible (75,8%). No hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la relación hembra:macho, ni en la longitud promedio de los aislamientos. Se encontraron lesiones macroscópicas y microscópicas muy leves en ambos grupos inoculados. Bajo las condiciones del presente trabajo existió un comportamiento diferencial entre los aislamientos de *H. contortus* utilizados, que podría indicar diferentes estrategias de control según la bionomía particular de cada aislamiento.

**Palabras claves:** *Haemonchus contortus*, ovinos, resistencia antihelmíntica.

## ABSTRACT

Gastrointestinal parasites are one of the main causes of decreased productivity in ruminants. *Haemonchus contortus* is the main parasitic species that affects sheep, causing significant economic losses. Its control has been based mainly on the indiscriminate use of anthelmintics, which has generated resistance to most available commercial products. Given that there is evidence of changes in its pathogenicity and parasitological characteristics of this nematode, it is necessary to study the impact that this phenomenon has on its fitness. For these reasons, the objectives of this work were to evaluate and compare pathophysiological and parasitological aspects of resistant and susceptible isolates of *H. contortus* on experimentally inoculated lambs. The trial was conducted at the Balcarce Integrated Unit, Buenos Aires. Eighteen 4-5 month old, parasite-free lambs housed in pens, and separated into three groups (n = 6). One group was inoculated with 2000 infective larvae (L3) of resistant *H. contortus* (benzimidazoles and macrocyclic lactones), another was inoculated with 2000 L3 of susceptible *H. contortus*, and the third group remained as parasite-free control. Daily monitoring of the animals was carried out during 68 days, evaluating physiopathological and parasitological parameters, such as consumption of food and water, and faecal egg counts (FEC). Every 10 days blood samples were taken to evaluate hematological indicators, and recording of live weight, body condition and FAMACHA<sup>®</sup> was carried out. Indirectly parasite prolificacy was calculated. The percentage of egg hatching of both isolates was evaluated by *in vitro* technique. At the end of the experimental period, the parasitological necropsy of all the lambs was carried out in order to count and classify abomasal adult parasites (female:male relationship and length) and to perform the abomasum histopathological evaluation. No significant differences ( $p > 0,05$ ) were detected in live weight or body condition between the groups. Significant differences ( $p < 0,05$ ) were found for FAMACHA<sup>®</sup> between the control and the inoculated groups but not between the parasitised groups. Hematocrit, red blood cell count, hemoglobin and total proteins showed similar kinetics, their values decreased and they differed significantly ( $p \leq 0,05$ ) in both inoculated groups compared to the control one, from day 21 post inoculation on. Average FEC was higher in the susceptible group throughout the study ( $p \leq 0,05$ ) compared to the resistant group. The estimated number of eggs/female was similar between isolates at the beginning of oviposition period (around 8000 eggs/female), but significant differences ( $p \leq 0,05$ ) were detected at the end, with higher average oviposition by resistant females. The abomasum relative weight showed a tendency to be heavier in the susceptible group with respect to the control one ( $p = 0,06$ ). More susceptible adults (1516) than resistant ones (951) ( $p \leq 0,05$ ) were recovered; therefore, the implantation percentage was higher for the susceptible isolation (75.8%).

There was no significant difference ( $p>0,05$ ) in the female:male ratio, nor in the parasites average length between the two isolates. Very mild macroscopic and microscopic abomasum lesions were found in both inoculated groups. The present work showed a differential behavior between the *H. contortus* isolates, which could indicate that different parasite control strategies could be applied according to the particular bionomic of each isolate.

**Key words:** *Haemonchus contortus*, sheep, anthelmintic resistance.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los parásitos gastrointestinales que afectan a los rumiantes son el problema sanitario más importante en los sistemas productivos con base pastoril (Armour, 1980; Holmes, 1993; Hoste *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2012). Dentro de éstos, *Haemonchus contortus* es el que produce mayores pérdidas económicas por mortandad y bajos niveles de producción (Allonby, 1974; Suárez *et al.*, 1994, 2007; Besier *et al.*, 2016b). Es un nematodo grande que se aloja en el abomaso de pequeños rumiantes, caracterizándose por ser hematófago (Allonby, 1974; Jackson y Coop, 2007; Scott, 2007; Sargison, 2008; Hoste *et al.*, 2016). Esta forma de alimentación genera diferentes cuadros anémicos que, en ocasiones, provoca altas tasas de mortalidad en una majada (Suárez *et al.*, 2007, 2013; Besier *et al.*, 2016b).

*H. contortus* tiene un alto potencial reproductivo con la capacidad de reproducirse por varias generaciones en una misma estación, permitiéndole en muy cortos períodos desarrollar altas tasas de contaminación en las pasturas y consecuentemente grandes infecciones en los animales (Waller y Chandrawathani, 2005; Getachew *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b).

A nivel mundial tiene una alta prevalencia en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Sargison, 2008; Besier *et al.*, 2016b). En la República Argentina se encuentra distribuido prácticamente en todo el país, generando cuadros clínicos hacia fines de verano, otoño y primavera (Romero y Boero, 2002; Suárez *et al.*, 2007; Fiel *et al.*, 2013).

Es un parásito adaptado a zonas de elevada temperatura y humedad, por tal motivo, los cuadros de haemonchosis en regiones endémicas podrían ser previstos (Allonby, 1974; Sargison, 2008). Sin embargo, ante evidencias del cambio climático generado en estos años (Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007; MAyDS, 2016), los brotes de haemonchosis pueden resultar cada vez más probables en regiones no endémicas del parásito (Jackson y Coop, 2007; Besier *et al.*, 2016b; Emery *et al.*, 2016).

El control de los parásitos gastrointestinales y en particular de *H. contortus*, se ha basado casi exclusivamente en el tratamiento antihelmíntico a toda la majada, generando el fenómeno de resistencia antihelmíntica por parte de los parásitos (Prichard *et al.*, 1980; Prichard, 1994; Kotze y Prichard, 2016).

*H. contortus* es uno de los nematodos más implicados en el desarrollo del fenómeno de resistencia, que ha sido detectada en todas las familias de fármacos disponibles en el mercado (Waller y Chandrawathani, 2005; Caracostantogolo *et al.*, 2013). Tal es así que ante la reciente aparición de nuevos fármacos para ovinos (Steffan *et al.*, 2011; Lanusse *et al.*, 2013; Leathwick, 2013), *H. contortus* desarrolló rápidamente resistencia también a estos nuevos productos (Kaminsky *et al.*, 2011; Mederos *et al.*, 2014; Van den Brom *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2017; Cerutti *et al.*, 2018).

Si bien se ha propuesto que aislamientos de *H. contortus* con genotipo resistente tienen una aptitud ecológica inferior comparado con aislamientos susceptibles (Leathwick, 2013; Caracostantogolo *et al.*, 2013), y que, en la fase parásita dentro del hospedador no habría diferencias en cuanto a la patogenicidad producida (Sargison, 2008), los estudios sobre posibles diferencias son escasos.

Además, existen evidencias sobre la ocurrencia intra-especie de cambios en la patogenicidad, morfología, persistencia ambiental y resistencia a las drogas antihelmínticas (Maingi *et al.*, 1990; Aumont *et al.*, 2003; Angulo-Cubillán *et al.*, 2010), por ello es necesario profundizar estos estudios y evaluar su impacto en la epidemiología del parásito.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### **HIPÓTESIS**

Existe un comportamiento biológico y patogenicidad diferencial entre los aislamientos de *Haemonchus contortus* resistente (benzimidazoles y lactonas macrocíclicas) y susceptible a los antihelmínticos, en corderos infectados experimentalmente.

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo general:**

Estudiar comparativamente el comportamiento biológico de un aislamiento de *Haemonchus contortus* resistente (benzimidazoles y lactonas macrocíclicas) y uno susceptible a los antihelmínticos en corderos infectados experimentalmente con respecto a un control no infectado.

#### **Objetivos específicos:**

Evaluar y describir parámetros fisiopatológicos en corderos infectados experimentalmente con ambos aislamientos.

Evaluar y describir parámetros parasitológicos en corderos infectados experimentalmente con ambos aislamientos.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3. 1. Producción ovina en Argentina

Argentina cuenta con un *stock* ovino de 14339908 cabezas. Argentina puede ser dividida geográficamente en 6 regiones productivas, dentro de las cuales las más pobladas son la Patagonia (59%), la llanura pampeana o centro (18%) y el litoral (12%) (De Gea, 2007; Suárez, 2007; SENASA, 2018).

En la región patagónica la producción ovina no tiene casi competencia con otras actividades, mientras que en las demás, comparte el uso de la tierra con ganadería bovina y agricultura en pampa húmeda (centro), también con ganadería bovina en el litoral y con producción caprina en el resto de las regiones. En la región pampeana tiene un rol secundario, y si bien forma parte de la estructura productiva de los establecimientos, las majadas son destinadas mayormente al autoconsumo en el campo (llamadas “majadas de consumo”). En tanto que, en el litoral, la lana es el producto principal y secundariamente la carne. Por último, en el resto de las regiones (Cuyo, noroeste y noreste) el lanar se explota de forma complementaria al caprino con fines de subsistencia, apoyando las economías regionales en explotaciones minifundistas (De Gea, 2007; Suárez, 2007; Fiel *et al.*, 2013; MAGyP, 2015).

#### 3. 2. Helmintos gastrointestinales en ovinos

Los helmintos gastrointestinales representan el problema sanitario más importante en los sistemas pastoriles, ya que producen pérdidas económicas por mortandad de animales, pérdida de corderos, de carne y de lana (Armour, 1980; Holmes, 1993; Hoste *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2012). Pueden ser clasificados en: nematodos (parásitos redondos, cilíndricos y alargados; Phylum Nematelminthos, Clase Nematoda), trematodos (parásitos chatos; Phylum Plathelminthos, Clase Trematoda) y cestodos (parásitos chatos segmentados; Phylum Plathelminthos, Clase Cestoda) (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Jackson y Coop, 2007).

La mayoría de los helmintos son específicos del hospedador, es decir, la transmisión es restringida entre diferentes especies animales, donde los parásitos que afectan al ovino no pasan fácilmente al bovino y viceversa. En cambio, ovinos y caprinos si comparten muchas de las mismas especies parasitas (Romero y Boero, 2002; Sargison, 2008; Miller *et al.*, 2012).

La presentación clínica de la gastroenteritis verminosa en ovinos se caracteriza por diarrea, mala condición o estado general, menor ganancia de peso o crecimiento pobre, anemia y edemas en diferentes partes del cuerpo. Sin embargo, el efecto más importante y común que impacta a nivel económico es la pérdida de producción subclínica derivada de la continua exposición a bajos niveles de infección (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Getachew *et al.*, 2007; Sargison, 2008).

Dentro de una majada, las categorías más susceptibles a padecer este cuadro son: corderos, borregos “dientes de leche” y ovejas durante el parto y la lactancia (Fiel *et al.*, 2013). Castells y Nari *et al.* (2013) señalan que la inmunidad natural en los ovinos se completa al año y medio de edad, pero se debilita en cercanías al parto, principalmente para el caso de *Haemonchus contortus*.

El predominio de las diferentes especies parasitarias varía entre regiones geográficas, donde principalmente el clima y el tipo de explotación determinan la incidencia y la epidemiología de la transmisión (Sykes, 2000; Romero y Boero, 2002; Fiel *et al.*, 2013).

En la pampa húmeda argentina las especies parasitarias que afectan al ovino presentan cierta estacionalidad. Bajo condiciones de elevada temperatura y humedad predominan cuadros de mortalidad asintomática por *H. contortus* caracterizados por anemia aguda; mientras que en condiciones más frías predominan los cuadros de diarrea crónica producidos por *Trichostrongylus colubriformis*. En tanto que *Teladorsagia circumcincta*, *Nematodirus battus* y *N. filicollis*, aparecen en menor proporción que aquellas dos especies. El género *Cooperia* se destaca en sistemas mixtos ovinos-bovinos y está ausente en explotaciones únicamente ovinas. (Suárez *et al.*, 2007; Fiel *et al.*, 2013).

Si bien las parasitosis en los animales son raramente monoespecíficas, la infección por *H. contortus* es la más devastadora, siendo esta especie la de mayor importancia patológica y económica. Tal es así que diferentes autores lo consideran como el parásito que mayor daño ha ocasionado a la ganadería ovina en todo el mundo (Getachew *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2012; Giudici *et al.*, 2013; Fiel *et al.*, 2013; Besier *et al.*, 2016b).

### 3. 3. *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

Es un de nematodo que se aloja en el abomaso principalmente de ovinos y caprinos, pudiendo afectar en ocasiones a otros rumiantes. Pertenece al Orden *Strongylida*, Superfamilia *Trichostrongyloidea*, Familia *Trichostrongylidae*. Es uno de los parásitos más evolucionados, con un marcado polimorfismo que le permite adaptarse a diferentes climas (templados, tropicales y subtropicales) y hospedadores (Allonby, 1974; Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Giudici *et al.*, 2013).

Presenta gran tamaño, las hembras adultas miden entre 18 y 34 mm de longitud y los machos, entre 13 y 22 mm. Estos adultos tienen una pequeña cavidad bucal con una lanceta que le permite desgarrar la mucosa para alimentarse de sangre (Lukovich, 1981; Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Uzal *et al.*, 2016).

El huevo de *H. contortus* es ovalado, con polos desiguales y de tamaño mediano, 70,9  $\mu\text{m}$  x 45,9  $\mu\text{m}$ . Es similar al resto de los huevos de otros trichostrongílidos (Veglia, 1916; Niec, 1968).

La importancia de esta especie puede ser explicada por la capacidad de producir gran cantidad de huevos que contaminan rápidamente las pasturas (una hembra puede producir entre 5000 y 10000 huevos/día). Además, por su acción hematófaga, causa cuadros variables de anemia con pérdidas de producción y altas tasas de mortandad (en infecciones graves pueden superar el 20 o 30% de mortalidad). También tiene la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables a través de la hipobiosis (Getachew *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2007, 2013).

#### **Ciclo biológico**

Es de tipo directo, similar a la mayoría de los nematodos gastrointestinales. Presenta una etapa de vida libre y otra parasitaria. La fase de vida libre comienza tras la salida de huevos puestos por hembras adultas con la materia fecal. Dentro del huevo se desarrolla la larva de primer estadio (L1) que eclosiona, libera la cutícula que la recubre y evoluciona a larva de segundo estadio (L2). Ambas se alimentan de bacterias y hongos presentes en la materia fecal. La L2 muda a larva de tercer estadio (L3, larva infectiva), desarrollando una nueva cutícula y conservando la de su antecesora. Esta característica de doble vaina le otorga

mayor protección contra condiciones ambientales adversas pero impide que se alimente, dependiendo exclusivamente de la energía almacenada durante las etapas anteriores en las células intestinales. En condiciones ambientales óptimas (elevada humedad y temperatura ambiente), *H. contortus* requiere de 4 a 7 días para desarrollarse de huevo a L3. La L3, a diferencia de L1 y L2, tiene activa movilidad y migra a través de las pasturas para quedar disponible y ser consumida por un hospedador (Niec, 1968; Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Sargison, 2008).

Una vez ingerida por el hospedador comienza la fase parásita. La L3 pierde su vaina protectora en retículo-rumen y llega al abomaso, ingresa a la pared del mismo para mudar a larva de cuarto estadio (L4). Posteriormente alcanza el estadio adulto, diferenciándose en machos y hembras cuando regresan a la luz del órgano. Tras la cópula comenzarán con la postura de huevos, reiniciando el ciclo. El período de prepatencia, es decir el periodo que transcurre desde el consumo del estadio infectante por parte del hospedador hasta la aparición de huevos en materia fecal del mismo, es de 15 a 20 días. Sin embargo, como se mencionara anteriormente, tiene la capacidad de detener su ciclo (hipobiosis) por tres o cuatro meses dentro de la mucosa del abomaso en fase L4 (Niec, 1968; Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999).

La alta tasa de producción de huevos y la gran contaminación de las pasturas le permiten, en muy cortos períodos de tiempo, desarrollar altas cargas en los animales mediante reinfecciones frecuentes y rápidas cuando las condiciones ambientales le son favorables (Waller y Chandrawathani, 2005; Getachew *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b).

### **3. 4. Epidemiología**

La epidemiología parasitaria es determinada por la constante interacción entre los parásitos, el sistema de producción en el que se encuentran los animales y las condiciones climáticas. Estas últimas, y en particular la temperatura y humedad, regulan el desarrollo, la migración y la supervivencia de las etapas de vida libre. Puede sumarse la oxigenación, cuya ausencia inhibe el desarrollo (Hansen y Perry, 1994; Stromberg, 1997). Castells y Nari *et al.* (2013) señalan que si bien el riesgo de enfermedad parasitaria puede verse afectado por la nutrición, el sistema

de pastoreo y la carga animal en un potrero, es el clima el que gobierna todos estos procesos.

Las condiciones ambientales que favorecen a las etapas de vida libre difieren entre las especies de nematodos, pero en general son favorables la alta humedad ambiente (85 a 100%) y temperaturas mayores a 22°C. La eclosión y el desarrollo de las larvas en el ambiente pueden hacerlo también a temperaturas más bajas (5°C) pero a un ritmo mucho más lento, y más altas (35°C) pero ocurre mayor mortandad (Hansen y Perry, 1994; Rossanigo y Gruner, 1995; Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Sargison, 2008).

Además de proporcionar un ambiente húmedo, la lluvia actúa como el principal factor físico de dispersión de L3 en las pasturas. En cambio, la desecación o sequía afecta gravemente a las etapas de vida libre, y en menor medida a las L3 debido a la presencia de la doble vaina, pero es el principal factor climático letal para todas estas etapas (Hansen y Perry, 1994; Stromberg, 1997; Romero y Boero, 2002; Sargison, 2008; Fiel *et al.*, 2013).

Ante situaciones de adversidad climática (frío o sequía excesiva), *H. contortus* tiene la capacidad de realizar hipobiosis, permitiéndole persistir en el abomaso de su hospedador en estos períodos. Los mecanismos por el cual el parásito ingresa a un estado hipobiótico no se conocen completamente, se ha implicado a las condiciones ambientales (estación y clima), respuesta inmune del hospedador y genética. Tampoco se conocen los mecanismos por los cuales las larvas reanudan el ciclo. En general la maduración se produce de forma gradual cuando las condiciones ambientales son favorables. Independientemente de los factores implicados tanto en su inhibición como en su desinhibición, la hipobiosis tiene una enorme importancia epidemiológica, ya que le permite evadir las condiciones desfavorables y tras la reanudación contaminar el medio y reiniciar su ciclo (Blitz y Gibbs, 1972; Gibbs, 1986; Uzal *et al.*, 2016).

*H. contortus* causa mortalidad significativa en todo el mundo con mayor afección en zonas tropicales, subtropicales y templadas cálidas, debido a que presentan las condiciones climáticas más aptas para su desarrollo (Getachew *et al.*, 2007; Sargison, 2008; Besier *et al.*, 2016b).

En Argentina, *H. contortus* presenta distribución abundante con estacionalidad no tan marcada en el noreste del país, estacionalidad en regiones templadas y semiáridas, y ausencia en Patagonia. En la región pampeana argentina produce

muerres asintomáticas hacia fines de primavera y otoño, principalmente en las categorías de mayor riesgo (Romero y Boero, 2002; Suárez *et al.*, 2007; Fiel *et al.*, 2013; Olaechea, 2013).

Estas características epidemiológicas, sumada a la gran capacidad de producción de huevos con rápida contaminación de potreros, puede generar muerte sobreaguda de animales sin advertencia clínica (Sargison, 2008; Besier *et al.*, 2016b).

Sumado a esto, el período prepatente más corto que otros nematodos gastrointestinales, garantiza que la variación genética en una población de *H. contortus* en un potrero sea suficientemente alta para permitir rápidos cambios adaptativos al clima (Emery *et al.*, 2016).

La epidemiología estacional de *H. contortus* se conoce en la mayoría de zonas endémicas. Fuera de éstas, se presenta por cortos períodos con condiciones climáticas favorables. Pero también, como se mencionara anteriormente, las oportunidades relacionadas con el cambio climático sugieren que brotes de haemonchosis son cada vez más probable en regiones no endémicas (Besier *et al.*, 2016b).

En los últimos años en Argentina se han producido grandes cambios en las formas de producción animal. Esto, sumado al incremento en la frecuencia de resistencia antihelmíntica detectada y el inminente cambio climático, ameritan revisar estrategias de prevención y control parasitario (Olaechea, 2013).

A pesar que los parásitos gastrointestinales son una de las limitantes sanitarias que mayormente impacta en los sistemas pastoriles y que el cambio climático ocasionará modificaciones en los modelos epidemiológicos estudiados, hay un escaso número de trabajos dirigidos a estudiar dichos efectos (Uriarte y Calvete, 2012).

### **3. 5. Cuadros clínicos**

Debido a los hábitos hematófagos de *H. contortus*, el principal signo clínico de la haemonchosis es la anemia. Distintos autores (Allonby, 1974; Suárez *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b) clasifican a la enfermedad causada por este nematodo en tres síndromes: haemonchosis hiperaguda, aguda y crónica, basándose principalmente en la dosis o desafío de L3 ingeridas en un período determinado.

La haemonchosis hiperaguda se caracteriza por la elevada ingestión de L3 en un breve período. Los animales suelen encontrarse muertos sin signos previos y los que sobreviven presentan anemia grave. Los conteos de huevos en materia fecal pueden resultar negativos, pero se encuentran grandes cantidades de estadios juveniles o adultos en el abomaso a la necropsia (> 10000) y gastritis hemorrágicas graves. Este cuadro puede desarrollarse en una semana (Allonby, 1974; Suárez *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b).

En la forma aguda de la haemonchosis, la ingestión de L3 por parte de los animales es de menor cantidad que en la forma hiperaguda, y suele presentarse como un cuadro anémico rápido que se desarrolla en el tiempo. Los signos clínicos son más evidentes (palidez de mucosas, edemas, aletargamiento, heces oscuras sin diarrea). A la necropsia se pueden observar petequias y lesiones en la mucosa con congestión y edema, e importante cantidad de especímenes adultos (3000 a 10000) (Allonby, 1974; Suárez *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b).

Por último, la haemonchosis crónica por lo general se da en animales que ingieren pocas cantidades de L3 de forma sostenida en el tiempo, durante más de 60 días, y asociadas a baja calidad/cantidad nutricional. Los signos clínicos son menos específicos, pero hay anemia ligera, pérdida de peso, debilidad, edemas subcutáneos y anorexia. Si el animal muere suele encontrarse baja cantidad de adultos (< 2000-3000) con engrosamiento de los pliegues abomasales y aumento del pH abomasal (Allonby, 1974; Suárez *et al.*, 2007; Besier *et al.*, 2016b).

### **3. 6. Fisiopatología**

Uno de los efectos sobre la producción animal más importantes de la parasitosis gastrointestinal es la reducción de la ingesta de alimento (anorexia), que puede llegar al 50%, incluso en casos subclínicos (Sykes, 2000). Sin embargo, según Giudici *et al.* (2013) y Hoste *et al.* (2016), este efecto en la infección monoespecífica con *H. contortus* sería más leve y transitoria en comparación con otros géneros, como *Teladorsagia* y/o *Trichostrongylus*, y su magnitud estaría relacionada con la severidad de la infección.

Entre las causas de la anorexia, si bien son poco claras, se citan: disminución del flujo digestivo, alteración de la motilidad intestinal, distensión del retículo-rumen, niveles elevados de hormonas (gastrina, colecistoquinina, secretina) o citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y dolor (Simpson, 2000).

La anorexia disminuye la ingesta de nutrientes. Además, el aumento de la permeabilidad de la mucosa producto del daño en el abomaso permite la pérdida de proteínas, generando una reducción de la eficiencia productiva y pérdida de la condición corporal (Uzal *et al.*, 2016). Es así que las ganancias de peso vivo de corderos inoculados con 11000 L3 de *H. contortus* fueron, en promedio, 38% menor que en corderos sin inocular, durante un período de 8-9 semanas (Albers *et al.*, 1989).

En la provincia de San Luis, Argentina, se encontraron diferencias en la ganancia de peso de 63 y 89% en cabras tratadas mensualmente con respecto a cabras no tratadas y tratadas solo en la parición. *Haemonchus* y *Trichostrongylus* fueron los géneros parasitarios que presentaron mayor prevalencia (Rossanigo y Silva Colomber, 1993). En tanto que en la región de la pampa central argentina y durante un período favorable para *H. contortus* (mayo), se encontraron diferencias en la ganancia de peso de 22% a 40,1% en animales en crecimiento entre lotes de corderos tratados quincenalmente y lotes no tratados, a favor de los primeros (Suárez *et al.*, 2013).

En animales parasitados también se produce retención de agua, por lo que la pérdida de peso a veces puede pasar desapercibida y no son evidentes cambios en las ganancias de peso vivo, pero si en la calidad de la res (Giudici *et al.*, 2013). Si bien la diarrea no es característica en la haemonchosis, puede haber aumento en el consumo de agua por parte de los animales para mantener la volemia producto de la pérdida de sangre. Rowe *et al.* (1988) proponen que tanto la ingestión como la retención estaban aumentadas en animales con infección con *H. contortus*.

La acción patogénica primaria de *H. contortus* sobre su hospedador es el consumo de sangre por parte de etapas juveniles tardías y adultas, y las hemorragias que causan en el abomaso al alimentarse (Allonby, 1974; Dargie y Allonby, 1975; Le Jambre, 1995; Jackson y Coop, 2007; Scott, 2007; Colditz y Le Jambre, 2008; Sargison, 2008). Los adultos pueden succionar sangre durante varios minutos en cualquier sitio de la mucosa abomasal. Luego se mueven hacia otro lugar, permitiendo así que la sangre se pierda en el abomaso debido a la presencia de compuestos anticoagulantes o enzimas secretadas por ellos mismos (Hoste *et al.*, 2016).

El nivel de anemia que sufre un hospedador con haemonchosis básicamente depende de dos factores principales: el número de parásitos presentes en su abomaso, y la capacidad que tiene para reemplazar la sangre que pierde (Dargie y Allonby, 1975). En bajas cargas de infección, los animales pueden resistir la anemia y la hipoproteïnemia durante cierto período de tiempo, duplicando o triplicando la eritropoyesis y aumentando la síntesis hepática de proteína plasmática. Por el contrario, en corderos altamente infectados, diariamente puede perderse una décima a una cuarta parte del volumen de eritrocitos, conjuntamente con la pérdida de plasma y proteínas (Uzal *et al.*, 2016). Le Jambre (1995) encontró una fuerte correlación entre esta pérdida de sangre y el número de *H. contortus* presentes, la biomasa y la producción de huevos. Por estos motivos, la medición del hematocrito, el recuento total de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina, proporcionan una medida de la patología provocada por este parásito (Colditz y Le Jambre, 2008).

Otra forma de valorar el cuadro anémico es mediante la observación del color de las mucosas (Vargas, 2006; Hoste *et al.*, 2016; Uzal *et al.*, 2016). Esta última herramienta, denominada FAMACHA<sup>®</sup>, se desarrolló en Sudáfrica en lucha contra la resistencia antihelmíntica de *H. contortus* en ovinos. Se basa en la correlación entre el color de la mucosa ocular y los valores de hematocrito, con el fin de desparasitar selectivamente a aquellos animales incapaces de hacer frente al desafío por *H. contortus*, mediante el uso de la anemia clínica como determinante (Nari, 2002; Van Wyk y Bath, 2002; Ribeiro Vilela *et al.*, 2012). El grado de coloración de la conjuntiva ocular se compara con una escala de color estandarizada con el hematocrito. Esta escala se divide en 5 categorías, de 1 a 5. Los animales en categorías 1 y 2 se corresponden con valores de hematocrito > 30%, mientras que animales de categorías 4 y 5, < 24%. Estos últimos deben tratarse ya que estas categorías son consideradas de alto riesgo. Sin embargo, los tratamientos individuales pueden instaurarse ya a partir del grado 3 (Van Wyk y Bath, 2002; Castells y Romero *et al.*, 2013). Esta escala fue validada también en caprinos (Vargas, 2006; Suárez *et al.*, 2014; Descarga *et al.*, 2016; Rossanigo y Page, 2017).

Además de este cuadro anémico, *H. contortus* produce inflamación y daño en el abomaso (gastritis/abomasitis hemorrágica). Comienza cuando las L4 en desarrollo emergen de la mucosa con la disociación de las células, generando

cambios en el ambiente abomasal por aumento de la permeabilidad de su mucosa, con mayores pérdidas de proteínas, disminución de la acidez y elevación del pepsinógeno plasmático (Coop, 1971; Kerboeuf, 1977; Hoste *et al.*, 2016).

A la pérdida de proteína endógena debe sumarse el aumento de producción de moco en abomaso como mecanismo de defensa del hospedador (Giudici *et al.*, 2013). Sin embargo, Hoste *et al.* (2016) indican que hay estudios sugiriendo la posibilidad de reabsorción de proteínas en el intestino delgado en presencia solo de *H. contortus* como un proceso compensatorio.

Se asocia el aumento de la actividad del pepsinógeno sanguíneo al daño abomasal con el siguiente pasaje de éste a circulación. Sin embargo, también estarían implicadas sustancias liberadas por parásitos adultos que estimulan la secreción de esta pepsinasa (Giudici *et al.*, 2013). En este sentido también, Fox (1997) postula que la elevación de los valores de pepsinógeno sérico puede ser de origen multifactorial, que implica la estimulación directa de células zimógenas por factores liberados por el parásito, estimulación indirecta a través de concentraciones elevadas de hormonas (gastrina) y por fugas de fluido abomasal entre las células epiteliales poco diferenciadas.

Fisiológicamente, a pH abomasal normal (1,5-3) el pepsinógeno es activado a pepsina, que junto con el ácido clorhídrico producido por las células parietales u oxínticas, producen la hidrólisis de la proteína alimentaria en el abomaso (Uzal *et al.*, 2016). Sin embargo, los cambios estructurales tras el parasitismo abomasal pueden afectar los valores de pH, hasta picos transitorios de 6 según el curso de la infección, disminuyendo la conversión de pepsinógeno en pepsina activa, alterando la digestibilidad del alimento (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Hoste *et al.*, 2016). Según Fox (1997) la reducción en la producción de ácido se debe a la sustitución de células parietales funcionales por otras de actividad reducida. A su vez, Simpson (2000) indica que el pH del abomaso aumenta a las pocas horas de que los parásitos emergen de la mucosa (después de 2-4 días en ovinos inoculados con *H. contortus*) y luego disminuye a valores casi normales alrededor de la patencia después de una sola inoculación, a pesar de la presencia de parásitos adultos. Al mismo tiempo señala que la magnitud y duración de la hipoacidez puede ser muy variable entre animales, y especialmente entre los estudios, debido a la especie parasitaria utilizada y los diferentes protocolos y dosis de inoculación experimental.

### 3. 7. Hallazgos posmortem

Las lesiones macroscópicas del abomaso y demás órganos dependerán de la gravedad y duración de la infección. En animales muertos por elevadas cargas de *H. contortus*, el cadáver está frecuentemente pálido con ascitis y edemas en muchos órganos, tejido subcutáneo y mesenterios, con la sangre acuosa y el hígado pálido y friable. El contenido del abomaso suele ser fluido de color oscuro, con su mucosa pálida, edematosa y cubierta con petequias o áreas focales de hemorragia en su superficie y nódulos (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Jackson y Coop, 2007; Uzal, *et al.*, 2016).

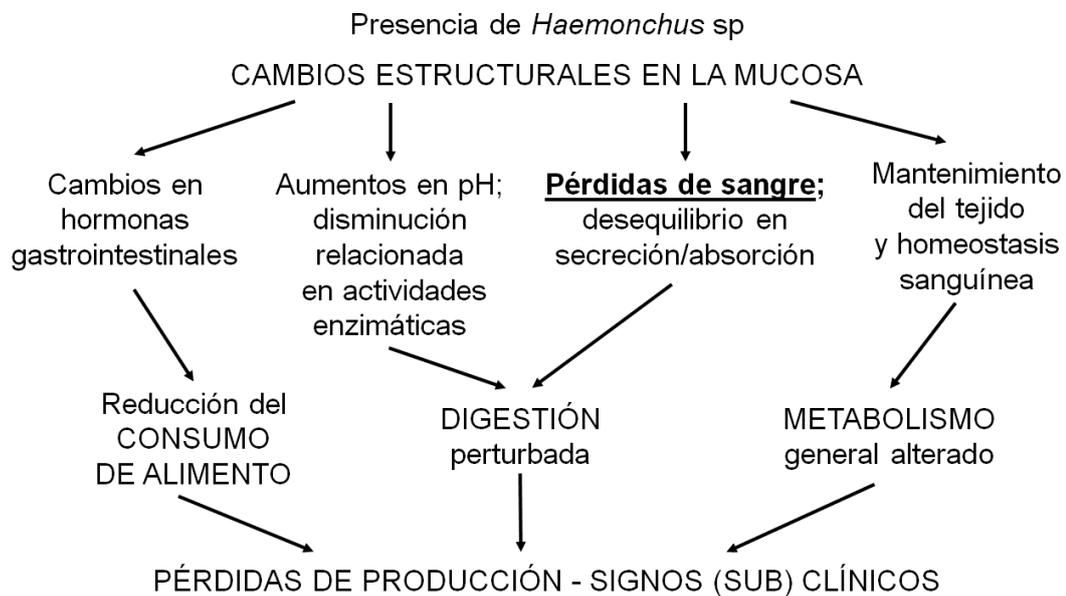
Microscópicamente la abomasitis comienza con infiltración inflamatoria, focal y luego difusa, en mucosa y submucosa de linfocitos, mastocitos y eosinófilos, que puede agravarse según la cantidad de parásitos presentes e infecciones recurrentes. Esta reacción inflamatoria tiene un pico de 5 días pos infección y luego puede disminuir. En general, neutrófilos y eosinófilos a menudo están presentes en la lámina propia, mientras que los linfocitos pueden estar entre las células epiteliales de las glándulas (Giudici *et al.*, 2013; Uzal *et al.*, 2016).

Las glándulas parasitadas suelen estar dilatadas y protruidas, mientras que las circundantes muestran hiperplasia de células mucosas con menor cantidad de células parietales y principales (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Simpson, 2000). En infecciones recurrentes y altas cargas parasitarias se produce una reacción inflamatoria progresiva del abomaso, con hiperemia y mayor producción de moco, mayor profundidad y peso de la mucosa, aumentando consecuentemente el peso del órgano (Simpson, 2000; Giudici *et al.*, 2013). Una mención especial es la presencia en el epitelio glandular de estos leucocitos globulares, principalmente en el abomaso parasitado (Stear y Murray, 1994; Ortolani *et al.*, 2013; Uzal *et al.*, 2016).

Por último, la determinación posmortem de larvas hipobióticas es útil para determinar el desafío parasitario al cual estuvo sometido un animal previamente (Fiel *et al.*, 2011). El porcentaje de larvas que detienen su desarrollo varía principalmente según las zonas geográficas. Romero *et al.* (2013) citan estudios que encontraron hasta un 40% de inhibición en la provincia de Buenos Aires durante el período otoño-invernal, y también durante esta misma época el patrón de inhibición superó el 48% en Uruguay. En la provincia de La Pampa, los porcentajes hallados de L4 fueron del 68% en abril, 70% en mayo, 75% en junio y

20% en julio (Suárez *et al.*, 2007; 2013). En tanto que en la región mesopotámica no se disponen referencias, principalmente debido a que el género *Haemonchus* se lo vincula con esta capacidad a climas con temporadas frías (menos de 10°C) o sequía como se dijo anteriormente, condiciones poco características para esta zona (Romero *et al.*, 2013).

**Figura 1: Resumen de las principales consecuencias patológicas y fisiopatológicas de infección de *Haemonchus contortus* en ovejas y cabras**  
(Adaptado de Hoste *et al.*, 2016)



### 3. 8. Diagnóstico

El diagnóstico antemortem de las parasitosis gastrointestinales usualmente se realiza mediante el conteo de huevos en la materia fecal de los animales por la técnica cuantitativa de McMaster modificada, donde se informa la cantidad de los mismos por gramo de materia fecal (HPG), acompañado por la identificación de géneros por coprocultivo (Sargison, 2008; Miller *et al.*, 2012).

Para evaluar estos resultados, es necesario el conocimiento de los tratamientos antihelmínticos previos, el manejo del pastoreo, y el número de larvas en las pasturas, relacionándolos con los datos epidemiológicos (Meana Mañes y Rojo Vázquez, 1999; Sargison, 2008).

Clínicamente la haemonchosis se diagnostica mediante la detección de anemia asociado al cuadro epidemiológico característico (alta temperatura y humedad ambiente, categoría animal, condiciones de manejo y pastoreo intensivo), y de ser

posible, se confirma por la gran cantidad de parásitos en el abomaso de animales muertos por esta causa, constituyendo una medida del grado de infección (Besier *et al.*, 2016a).

Como se mencionó anteriormente, en casos agudos la enfermedad cursa con anemia grave (hematocrito por debajo de 18%) e hipoalbuminemia. Clínicamente ésta puede ser visualizada por edema general o en porciones ventrales del cuerpo, especialmente edema submandibular característico, pero no patognomónico de haemonchosis (Miller *et al.*, 2012; Castells y Nari *et al.*, 2013; Besier *et al.*, 2016a).

La aparición inminente de esta enfermedad se basa en el monitoreo periódico del cuadro anémico (FAMACHA® y otros procedimientos de laboratorio) y a través del muestreo parasitológico (HPG y coprocultivo). A todo esto es necesario integrar el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y el manejo de los animales (Miller *et al.*, 2012; Castells y Romero *et al.*, 2013; Besier *et al.*, 2016a).

Los hallazgos posmortem descritos anteriormente son de mucha utilidad en el diagnóstico (palidez extrema, edemas en tejidos, contenido de abomaso fluido de color rojo/marrón por la presencia de sangre con áreas focales de hemorragia sobre la superficie y numerosos parásitos evidentes a simple vista). Debe agregarse que, debido al gran tamaño de *H. contortus*, su identificación no ofrece mayores inconvenientes, siempre y cuando la inspección de los órganos se realice rápidamente (Castells y Romero *et al.*, 2013; Uzal *et al.*, 2016).

Según Sargison (2008), las concentraciones de pepsinógeno como diagnóstico, que en algunas ocasiones es útil en bovinos, tiene un valor limitado en ovinos. A su vez también, la medición del pH abomasal a la necropsia, como indicador de la funcionalidad del órgano y ayuda diagnóstica, debe ser medido inmediatamente tras la muerte del animal (Fiel *et al.*, 2011).

La haemonchosis crónica puede pasar desapercibida, sin embargo, una correcta anamnesis y examen clínico puede orientar dicho cuadro (momento del año, manejo del pastoreo, bajos conteos de huevos, mala calidad y cantidad nutricional, anemia ligera en algunos animales, pérdidas de peso o ganancias insuficientes y mal estado general) (Besier *et al.*, 2016a).

### 3. 9. Respuesta inmune

Los nematodos gastrointestinales son organismos multicelulares complejos, por lo cual se sabe que provocan respuestas inmunes también complejas, y parecen depender de la capacidad del hospedador para generar y movilizar efectores celulares y humorales tanto local como sistémicamente (Getachew *et al.*, 2007).

La inmunidad natural a los parásitos gastrointestinales se adquiere y se desarrolla con una exposición creciente de infección, pero por lo general no se expresa hasta que los animales alcanzan su madurez y no parece ser absoluta en ovinos. Además de la edad, el nivel de respuesta está influenciado por la genética, el sexo, el estado fisiológico y nutricional, y el nivel de exposición previa a los antígenos parasitarios (Anderson, 1990; Sykes, 2000; Hoste *et al.*, 2002; Castells y Nari *et al.*, 2013; Nisbet *et al.*, 2016).

Según diferentes autores (Balic *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001; Lacroux *et al.*, 2006; Terefe *et al.*, 2007; Emery *et al.*, 2016; Nisbet *et al.*, 2016) la infección por *H. contortus* en ovinos provoca respuesta inmunitaria que, por medio de las interleuquinas, estimulan y ordenan la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T. Principalmente la respuesta generada es caracterizada como T helper 2 (Th2), con linfocitos T CD4+ sensibilizados que producen y secretan citoquinas como interleuquina-4 (IL4), IL5, IL13 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) que desencadenan la proliferación y activación tanto local como sistémica de células efectoras (eosinófilos, basófilos, mastocitos y leucocitos globulares), de linfocitos B y la producción de anticuerpos (principalmente IgA e IgE). Esta respuesta paraliza la motilidad larvaria, impide el establecimiento de nuevas L3, afecta la producción de huevos y elimina adultos.

Como se mencionó previamente, el desarrollo de la respuesta inmune dependerá de factores genéticos y ambientales. La resistencia genética del hospedador tiene base inmunitaria y heredable; y dentro de los factores ambientales, la edad, el plano nutricional, el nivel y frecuencia de desafío parasitario afectarán la respuesta inmune. Niveles muy bajos de carga parasitaria pueden tener pocos efectos sobre la productividad en la majada o ser difícilmente medidos, permitiendo el desarrollo de inmunidad por parte de los hospedadores. Por ello, los modelos más apropiados para estudiar el desarrollo inmunitario

derivan de estudios a campo (infecciones naturales) o aquellos donde se utilizan inoculaciones bajas y continuas (Sargison, 2008; Emery *et al.*, 2016).

Con respecto al estado nutricional del hospedador y su respuesta inmune, se sabe que el parasitismo gastrointestinal puede interferir con la capacidad del hospedador para utilizar los nutrientes. Los animales bien alimentados pueden responder inmunitariamente de una manera más eficiente en comparación a aquellos sometidos a una dieta inadecuada (Holmes, 1993; Hoste *et al.*, 2002; Nari, 2002).

En resumen, el desarrollo de la inmunidad del hospedador contra los nematodos gastrointestinales tiene varios efectos sobre ellos, pudiendo afectar su implantación y posterior desarrollo, su tamaño y su oviposición o fecundidad (Stear y Murray, 1994; Stear *et al.*, 1997; Claerebout y Vercruysse, 2000; Strain y Stear, 2001; Giudici *et al.*, 2013; Emery *et al.*, 2016).

### **3. 10. Control**

El control exitoso de los parásitos gastrointestinales en general y de *H. contortus* en particular depende en gran medida del conocimiento sólido de la epidemiología parasitaria, limitando el contacto entre los animales susceptibles y las L3, siendo el objetivo final aumentar la producción (Getachew *et al.*, 2007; Jackson y Coop, 2007; Scott, 2007; Sargison, 2008).

En lo que se refiere al control químico, los principales antihelmínticos disponibles para *H. contortus* pueden agruparse de la siguiente manera: benzimidazoles (BZD), imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas, lactonas macrocíclicas (LM), salicilanilidas y derivados del aminoacetónitrilo.

El grupo de fármacos clasificados como BZD actúan ligándose a la proteína tubulina del parásito, modificando su patrón de polimerización para formar microtúbulos. Estos están formados estructuralmente por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, que al ensamblarse los forman. Los BZD se unen a la subunidad  $\beta$  de la tubulina de manera reversible, afectando el transporte y la absorción de la glucosa y pérdida de la homeostasis celular. Como consecuencia los parásitos no pueden mantenerse en su sitio de localización y son eliminados. El tiempo de contacto BZD-tubulina es esencial. Además, son las únicas drogas comercialmente disponibles con actividad ovicida (Sumano y Ocampo, 2006; Sargison, 2008; Lanusse *et al.*, 2013, 2016).

Otro grupo es el de imidazotiazoles y tetrahidropirimidinas. Son agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina (agonistas colinérgicos), provocando la despolarización de las membranas y consecuentemente la contracción muscular (parálisis espástica) del parásito de forma sostenida, quedando paralizados y luego son así desalojados del hospedador. Tienen efecto antihelmíntico de corta duración (Sumano y Ocampo, 2006; Sargison, 2008; Lanusse *et al.*, 2013, 2016).

Las LM actúan incrementando la permeabilidad de la membrana celular de los iones cloruro (Cl<sup>-</sup>), resultando en hiperpolarización y parálisis flácida a nivel de musculatura faríngea y somática de nematodos y artrópodos. Para realizar esta acción se unen a la subunidad  $\alpha$  de canales de cloro ligados al glutamato. También tienen afinidad, aunque menor en relación al glutamato, a canales de cloro relacionados al GABA. Son efectivos contra estados inmaduros y adultos. No tienen efecto ovicida y tienen prolongada permanencia en el organismo animal (Sumano y Ocampo, 2006; Sargison, 2008; Lanusse *et al.*, 2013, 2016).

Los fármacos de la familia de las salicilanilidas (closantel, rafoxanide y oxiclosanida) presentan un espectro reducido y tienen efecto sobre parásitos hematófagos. Interfieren en la generación de energía del parásito por desacople de la fosforilación oxidativa (Anderson, 1990; Lanusse *et al.*, 2016).

En los últimos años han aparecido nuevos fármacos para el control de nematodos gastrointestinales en ovinos. Entre ellos un derivado del aminoacetonitrilo (que se une a subunidad del receptor colinérgico específico, generando parálisis espástica), y otro perteneciente a los espiroindoles (que bloquea la transmisión de impulso colinérgico, dando parálisis flácida) combinado con abamectina. Estos, pertenecen a nuevas familias químicas con mecanismos de acción diferente a los anteriormente citados (Steffan *et al.*, 2011; Lanusse *et al.*, 2013; Leathwick, 2013).

Un concepto importante a tener en cuenta a la hora de aplicar cualquiera de estos fármacos, es que en todo sistema productivo la población parásita que se encuentra dentro de los hospedadores es mínima, y que la mayor parte habita en deposiciones fecales y pasturas (población parasitaria conocida como “refugio”). En tal sentido, la aplicación de un antihelmíntico a un animal afecta mínimamente el número total de parásitos presentes en el sistema. La conservación de esta población en refugio se considera imprescindible en cualquier programa de control parasitario sostenible, como factor clave para disminuir la presión de selección y

el desarrollo de resistencia antihelmíntica (Fiel *et al.*, 2001; Singh y Swarnkar, 2008; Besier *et al.*, 2016a), ya que, según Sargison (2008), la tasa de selección de resistencia antihelmíntica es inversamente proporcional a la cantidad de huevos y larvas en desarrollo en la pastura en el momento del tratamiento antihelmíntico.

No hay duda de que los antihelmínticos representan la principal herramienta para el control, pero su uso es necesario que dependa cada vez más del diagnóstico, conocimientos sobre el manejo, la epidemiología y la farmacología. Sin embargo, la gran eficacia, buena tolerabilidad, el amplio espectro de acción de la mayoría de ellos y el bajo costo, han llevado a que los programas de control parasitario se basen casi de forma exclusiva en el uso masivo de antihelmínticos. Además, se han usado sin tener en cuenta un diagnóstico previo de situación parasitológica, sin considerar las condiciones epidemiológicas y de manejo de cada sistema, trayendo aparejado lamentablemente el desarrollo de resistencia antihelmíntica por parte de los parásitos (Miller *et al.*, 2012; Castells y Romero *et al.*, 2013; Lanusse *et al.*, 2013).

Además de la problemática de resistencia antihelmíntica, pueden sumarse dos problemas derivados del uso indiscriminado de fármacos: residuos en productos animales y ecotoxicidad (Iezzi *et al.*, 2014). Los mejor caracterizados son los endectocidas que son eliminados como droga activa con elevada persistencia en el ambiente, pudiendo afectar microorganismos e insectos de la materia fecal y del ambiente (Lanusse *et al.*, 2013).

Bajo este marco de resistencia antihelmíntica creciente, el control parasitario sustentable (CPS) o control integrado de parásitos (CIP) combina adecuadamente varias herramientas enmarcadas todas en el contexto de la sostenibilidad, aplicando métodos químicos y no químicos, sin suprimir el empleo de los antihelmínticos, pero usándolos racionalmente y considerándolos como un recurso no renovable en la medida que se incrementa dicha resistencia (Fiel *et al.*, 2001; Nari, 2002; Rossanigo, 2005; Miller *et al.*, 2012; Castells y Romero *et al.*, 2013; Caracostantogolo *et al.*, 2013).

Entre las alternativas no químicas de control de las parasitosis gastrointestinales, la mayoría en investigación creciente, se pueden citar: el manejo del pastoreo, la vacunación, el control biológico, mejorar la resiliencia o resistencia del hospedador mediante selección genética, suplementación

nutricional y el uso de forrajes con actividad antihelmíntica (Anderson, 1990; Hoste *et al.*, 2002; Nari, 2002; Gómez, 2006; Jackson y Coop, 2007; Sargison, 2008; Nisbet *et al.*, 2016; Besier *et al.*, 2016a). Ninguno de estos métodos presenta potencial para la erradicación, por lo que el objetivo a seguir debe apuntar a un control compatible con la producción y económicamente competitivo con otras alternativas productivas (Castells y Romero *et al.*, 2013). Es importante, además, tener en cuenta el constante avance y demanda de los consumidores en la producción de alimentos orgánicos y el cuidado del medio ambiente (Getachew *et al.*, 2007; Scott, 2007).

### **3. 11. Resistencia antihelmíntica**

La resistencia generalmente se define como la capacidad de un organismo para sobrevivir a la dosis de droga que normalmente mataría organismos de la misma especie y etapa. Se considera resistencia antihelmíntica (RA) cuando existe una mayor frecuencia de individuos dentro de una población de helmintos que puede tolerar la dosis de un compuesto que en una población normal de la misma especie. Además, esta capacidad es hereditaria transmitiéndose de generación a generación, por lo tanto, el tratamiento antihelmíntico repetido seleccionará para una proporción creciente de individuos resistentes (Prichard *et al.*, 1980; Prichard, 1990, 1994; Jackson y Coop, 2007; Sargison, 2008; Kotze y Prichard, 2016). Es necesario tener en cuenta que ningún fármaco presenta una efectividad del 100%. Por ello el uso continuo de un grupo químico ejerce una fuerte presión de selección a favor de la población resistente, que inicialmente es minoritaria, pero que tras varias generaciones será la más frecuente en el sistema productivo (Nari, 2002; Caracostantogolo *et al.*, 2013). Esta definición surge partiendo de la base de que los parásitos exhiben diversidad biológica, y esto puede conducir a individuos que son capaces de tolerar los efectos de una dosis de antihelmíntico que continuarán reproduciéndose, mientras que sus pares más susceptibles en un animal tratado morirán (Prichard, 1990).

Las principales causas que inducen el desarrollo de RA son: la alta frecuencia de tratamientos, la falta de rotación de los principios activos y la falta de refugio. Este manejo irracional es la base principal del desarrollo de la RA, especialmente cuando los niveles de infectividad de las pasturas son bajos. Este fenómeno se ha desarrollado con mayor rapidez en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y

Sudamérica, regiones donde las condiciones climáticas y los sistemas pastoriles permiten reinfecciones continuas y donde los programas de control se basan en la frecuente utilización de antihelmínticos (Fiel *et al.*, 2001; Van Wyk, 2001; Suarez y Cristel, 2014; Besier *et al.*, 2016a).

Además, el aumento de la frecuencia de parásitos resistentes a un fármaco traerá aparejado un aumento en la frecuencia de aplicación con el fin de mantener los niveles productivos. Como consecuencia, se aumentan los costos, se reducen la eficacia del sistema y la calidad de los productos animales y se incrementa el riesgo potencial para la salud pública y el medio ambiente. Hoy se considera a este fenómeno como una de las mayores amenazas para explotaciones de pequeños rumiantes en todo el mundo, afectando la sostenibilidad de las prácticas actuales de control (Hoste *et al.*, 2002; Caracostantogolo *et al.*, 2013).

La base genética de la RA no se entiende completamente y puede resultar de manera inevitable por el control de nematodos debido al uso de antihelmínticos, tratándose de un fenómeno de adaptación y evolución genética, dinámica e irreversible (Anderson, 1990; Prichard, 1994; Sargison, 2008).

Los mecanismos de resistencia a BZD en *H. contortus* está asociado a mutaciones en los genes que codifican para  $\beta$ -tubulina, causando pérdida de afinidad del receptor, disminuyendo de esta manera la unión del fármaco con su blanco. En cambio, existe escaso conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a las LM y al levamisol. Para las primeras se han propuesto alteraciones en los canales de cloro ligados a glutamato y sobreexpresión de glicoproteína-P. Mientras que la resistencia al levamisol podría estar relacionada con la ausencia de receptores o modificaciones en las subunidades de éstos (Caracostantogolo *et al.*, 2013; Lloberas *et al.*, 2013; Kotze y Prichard, 2016).

Se puede describir al desarrollo de RA en tres etapas: primero se establecen los genes de resistencia producto de mutaciones y otras alteraciones genéticas. Luego estos parásitos se propagan postratamiento. Por último, el problema clínico emerge, pudiendo diagnosticarse por los métodos de rutina recién cuando el 25% de la población de parásitos ya es resistente (Coles *et al.*, 1992; Caracostantogolo *et al.*, 2013).

Es importante la determinación emergente de la RA en un establecimiento, dado que una vez establecida la misma, la reversión a la susceptibilidad es muy poca o no ocurre (Romero y Boero, 2002; Jackson y Coop, 2007; Sargison, 2008;

Miller *et al.*, 2012); sin embargo, existen trabajos que apuntan a refutar esta aseveración mediante la reincorporación de parásitos susceptibles y el manejo del refugio (Van Wyk y Van Schalkwyk, 1990; Bird *et al.*, 2001; Muchiut *et al.*, 2016).

Según Miller *et al.* (2012), tras una desparasitación, el número de parásitos que sobreviven tienen poco o ningún efecto notable sobre la salud o producción en una majada hasta que aproximadamente el 25 % de la población de nematodos sea resistente. Como se mencionara anteriormente, esta misma proporción de genotipos resistentes presentes en un establecimiento, es la mínima necesaria para detectar resistencia a un antihelmíntico particular mediante las pruebas *in vivo* de reducción de conteo de huevos fecales y el test de eficacia controlada (Anderson, 1990; Caracostantogolo *et al.*, 2013).

Dentro de las técnicas diagnósticas *in vivo* para la detección de RA, la más utilizada es el test de reducción del conteo de huevo (TRCH) tras la desparasitación, sumado al coprocultivo pre y pos tratamiento para la identificación de géneros parasitarios. Tiene la desventaja de que detecta resistencia si los genes que la confieren están presentes en el 25% de la población. Sin embargo, la técnica *in vivo* más confiable, considerada prueba de oro, es el test de eficacia controlada (TEC), la cual compara la cantidad de parásitos adultos e inmaduros obtenidos a la necropsia en animales tratados y controles. La principal desventaja de esta prueba es su alto costo (Martin *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1995).

Como técnicas *in vitro* más utilizadas para el diagnóstico de resistencia se pueden citar el test de eclosión de huevos (TEH) para detectar resistencia a BZD, y el test de desarrollo larval (TDL), útil para la detección de resistencia en las tres familias principales de antihelmínticos. La desventaja de estas técnicas es que su resultado no considera la respuesta del hospedador al parasitismo ni la farmacodinamia, y requieren mayor equipamiento e insumos de laboratorio (Cutullé *et al.*, 1999; Várady *et al.*, 2007; Demeler *et al.*, 2010; Kotze y Prichard, 2016).

Más allá de todas estas técnicas, es imprescindible la correcta anamnesis, principalmente información en busca de categoría animal, manejo del pastoreo, plan sanitario, pero fundamentalmente el historial de desparasitaciones detallando la frecuencia de uso, principios activos, nombre comercial y dosis (Caracostantogolo *et al.*, 2013).

Como se mencionó, este fenómeno representa un problema serio para el control del parasitismo gastrointestinal en pequeños rumiantes, y donde mundialmente *H. contortus* lidera los casos de RA a las tres principales familias de antiparasitarios de amplio espectro (Hoste *et al.*, 2002). En un primer estudio sobre la prevalencia de RA en Argentina, Eddi *et al.* (1996), detectaron mediante TRCH un nivel general de RA de 40% para BZD, 22% para levamisol, 11% para la combinación levamisol + BZD y 6% para avermectinas, donde *H. contortus* fue uno de los principales géneros involucrados.

En la provincia de Corrientes, Argentina, utilizando el TRCH se halló que el 100% de los establecimientos tenía resistencia a ivermectina y a los BZD, mientras que el 55% de ellos tenía resistencia a levamisol y closantel. *H. contortus* fue uno de los géneros involucrados en dicha resistencia (Caracostantogolo *et al.*, 2005).

Según Romero *et al.* (2013), en la región del noreste argentino también existe una elevada frecuencia de establecimientos con aislamientos de *H. contortus* resistentes al closantel y una frecuencia aún más importante de resistencia a ivermectina.

En la provincia de Santa Fe se encontró resistencia múltiple de *H. contortus* a ivermectina, febendazol y closantel en una majada de ovinos lecheros (Muchiut *et al.*, 2013) y también resistencia múltiple a estos mismos antiparasitarios y al levamisol (Anziani y Muchiut, 2014).

Además, comenzaron a citarse mundialmente casos de RA por parte de *H. contortus* a los nuevos antihelmínticos disponibles para ovinos. La combinación derquantel-abamectina presentó baja eficacia sobre L4 de un aislamiento resistente de *H. contortus* a LM, BZD y levamisol en Australia (Kaminsky *et al.*, 2011). En Argentina, esta misma combinación mostró eficacias de 76 a 83% en majadas ovinas y caprinas con antecedentes de RA a LM (Cerutti *et al.*, 2018). En tanto que para monepantel, Mederos *et al.* (2014) encontraron RA por parte del género *Haemonchus* spp en ovinos en Uruguay; Van den Brom *et al.* (2015) encontraron que este fármaco mostró una eficacia del 0% para *H. contortus* en los Países Bajos; Martins *et al.* (2017) demostraron clara evidencia de RA de *H. contortus* a monepantel, que solo alcanzó eficacia terapéutica máxima del 32,89% a los 14 días pos tratamiento en Brasil; y en Australia, Lamb *et al.* (2017) y Sales y Love (2016) hicieron un TRCH y encontraron eficacias del monepantel entre

21,3% y 31%, respectivamente, *H. contortus* fue la única especie identificada pos tratamiento.

No caben dudas que la RA es un fenómeno creciente. Resulta imprescindible diagnosticarlo en cada establecimiento ya que cada uno tiene su propia problemática (Fiel *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2013). Tampoco hay dudas de que *H. contortus* es el parásito más importante de los pequeños rumiantes, y además tiene altos niveles de RA a fármacos de espectro amplio y reducido (Waller y Chandrawathani, 2005).

En cuanto a diferencias en la aptitud entre aislamientos parasitarios, según presenten susceptibilidad o resistencia a algún/os fármaco/s, Leathwick (2013) plantea que los parásitos con genotipo resistente tienen una aptitud ecológica inferior que los susceptibles, al menos en las primeras etapas de selección. Es por esta misma razón que se recomienda aumentar la población de parásitos en refugio para ralentizar el desarrollo de la RA. Caracostantogolo *et al.* (2013), en este mismo sentido, señalan que las alteraciones/mutaciones genéticas por parte de individuos resistentes tendrían un costo de adecuación que inicialmente se traduciría en un bajo éxito reproductivo respecto de parásitos susceptibles. Donde los primeros serían más afectados por heladas, sequías y altas temperaturas al dejar menor descendencia.

Contrariamente, Sargison (2008) propone que los nematodos que expresan genes de RA probablemente no tengan una ventaja en cuanto a la supervivencia en comparación con susceptibles, y que tampoco habría diferencias entre ellos en cuanto a la patogenicidad sobre el hospedador. Kotze y Prichard (2016) señalan que es difícil evaluar cualquier costo de aptitud que pueda estar asociado con la RA, y si bien se han documentado variaciones en el grado de infectividad de aislamientos de *H. contortus* de diferentes zonas geográficas (Aumont *et al.*, 2003; Angulo-Cubillán *et al.*, 2010), el número de estudios sobre estas posibles diferencias en la patogenicidad son escasos. Sin embargo, existen evidencias de la ocurrencia intra-especie de cambios en la patogenicidad, morfología, persistencia ambiental y resistencia a las drogas antihelmínticas de *H. contortus* (Maingi *et al.*, 1990) y de otros parásitos gastrointestinales (MacLean *et al.*, 1987; Barrett *et al.*, 1998; Elard *et al.*, 1998). Por ello es necesario profundizar estos estudios y también evaluar su impacto en la epidemiología del parásito.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4. 1. Lugar de realización del ensayo experimental

El estudio se llevó a cabo en la Unidad Integrada Balcarce (UIB), conformada por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP) y la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA Balcarce), ubicada en Ruta Nacional 226 km 73,5, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires, Argentina (latitud 37° 50' 47" S; longitud 58° 15' 20" O).

Todo el estudio fue avalado y se realizó siguiendo las pautas sugeridas por el Comité de Bienestar Animal (101/2016) del Centro Regional Buenos Aires Sur (CeRBAS).

### 4. 2. Animales y formación de grupos

Se utilizaron 18 corderos, de ambos sexos debido a la disponibilidad, cruza Texel, de aproximadamente 4-5 meses de edad con 25,11 kg promedio ( $\pm$  2,58 kg). Estos se encontraban recién destetados en la Reserva Ganadera N° 8, campo experimental de la EEA Balcarce.

Desde el destete (2 de enero de 2017) hasta el ingreso al ensayo los corderos permanecieron en un potrero de la reserva previamente manejado para disminuir al máximo la carga de parásitos de dicho potrero. Además, se desparasitaron desde el destete, alternadamente con monepantel 2,5 mg/kg PV y derquantel 2 mg/kg PV + abamectina 0,2 mg/kg PV, cada 10 y 15 días respectivamente. Se realizó el conteo de HPG semanalmente para asegurar la condición de libre de parásitos gastrointestinales hasta su traslado a los corrales experimentales.

Una semana antes de la inoculación, en los corrales individuales, un animal presentó 20 de HPG, por lo que se procedió a desparasitar a todos los animales con levamisol a razón de 5 mg/kg PV. Un día previo a la inoculación, se volvió a realizar el conteo de HPG y todos los animales presentaron valor de 0.

Se conformaron tres grupos homogéneos de 6 animales cada uno (n=6), denominados: resistente, susceptible y control (sin inoculación). La formación de los mismos se realizó mediante la estratificación y división de los corderos según su peso, independientemente del sexo.

#### **4. 3. Duración**

El ensayo tuvo una duración total de 100 días, desde el 27 de marzo hasta el 4 de julio de 2017. Se dividió en un período de acostumbramiento (o pre inoculación) de 32 días y uno de pos inoculación (PI) experimental de 68 días.

#### **4. 4. Instalaciones**

Durante el ensayo, los animales se alojaron en un galpón techado, que disponía de 18 corrales individuales, semicerrados, con piso de concreto a fin de evitar la exposición a larvas infectivas. Cada corral disponía de un comedero y un bebedero.

#### **4. 5. Aislamientos utilizados e inoculación experimental**

El aislamiento de *H. contortus* R8 presenta resistencia comprobada a antihelmínticos de la familia de los BZD (eficacia de 0% para fenbendazol) (Muchiut *et al.*, 2016) y las LM (eficacia de 20,1% para ivermectina, 39,7% para abamectina y 89,6% para moxidectina) (Lloberas *et al.*, 2013). Mientras que el aislamiento de *H. contortus* Cedive es susceptible a todos los grupos químicos disponibles.

Las L3 se obtuvieron a partir de cultivos fecales (22°C durante 15 días) de 2 corderos dadores. Éstos fueron monoespecíficamente inoculados con aislamiento resistente o susceptible.

Las larvas de *H. contortus* de cada aislamiento se recolectaron mediante la técnica de Baermann y fueron conservadas por un período de 3 meses en agua destilada a 4°C, a una concentración de 2000 L3/3,5 ml para el aislamiento resistente y de 2000 L3/21,3 ml para el susceptible, hasta la inoculación experimental de los corderos.

Luego del período de acostumbramiento, en el día 0 se realizó la inoculación experimental por vía oral, mediante la sujeción manual y utilizando jeringa de modo que los animales recibieron el inóculo completo (2000 L3/animal).

Los animales del grupo resistente recibieron el inóculo del aislamiento R8, el grupo susceptible el inóculo de Cedive y 6 animales no recibieron inóculo (control).

#### **4. 6. Mediciones en el período de pre inoculación (acostumbramiento)**

Estas mediciones previas a la inoculación se determinaron una vez y corresponden al día cero.

##### **4. 6. 1. Estudios fisiológicos**

###### **4. 6. 1. 1. Consumo de alimento y agua**

Cada animal recibió una dieta a base de alfalfa en cubos (Equidiet<sup>®</sup>) a razón del 2% de su peso vivo por día. El agua se suministró en baldes graduados a fin de registrar el correspondiente consumo diario (l).

###### **4. 6. 1. 2. Peso, condición corporal y método FAMACHA<sup>®</sup>**

Se determinó el peso de cada uno de los animales mediante balanza electrónica (sensibilidad 100 g), conjuntamente con la palpación de la zona lumbar para registrar su condición corporal en escala 1 a 5 (Russel *et al.*, 1969), y la aplicación del método FAMACHA<sup>®</sup>, también en escala 1 a 5 (Malan *et al.*, 2001).

##### **4. 6. 2. Estudios hematológicos**

Estos se llevaron a cabo a partir de muestras de sangre obtenidas por la punción de la vena yugular (entre 5 y 8 ml de sangre), con jeringa de 10 ml y aguja (21G 0,8 x 40 mm) en 2 tubos, uno con heparina para hemograma y el otro sin anticoagulante para el análisis de proteínas totales (g/100 ml), albúmina (g/100 ml) y pepsinógeno (mU Tirosina/ml) en suero.

En el hemograma se midió hematocrito (%), glóbulos rojos (por mm<sup>3</sup>), eosinófilos (% y fórmula absoluta) y hemoglobina (g/100 ml). Las muestras para la determinación de estos índices fueron enviadas a un laboratorio privado.

Los análisis de proteínas totales y albúmina se realizaron mediante los métodos colorimétricos descritos en metodologías analíticas (ver sección 4.9). La determinación del pepsinógeno sérico se realizó según el protocolo utilizado en el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la EEA Balcarce.

Los valores de referencia de estos parámetros fueron tenidos en cuenta según el trabajo de Jones y Allison (2007).

#### **4. 6. 3. Estudios parasitológicos**

Se tomó de cada animal una muestra de materia fecal directamente del recto para realizar el conteo de HPG mediante la técnica McMaster modificada (Roberts y O'Sullivan, 1949), asegurándose carga insignificante de nematodos gastrointestinales confirmados por el resultado de HPG cero, teniendo en cuenta que la sensibilidad de la técnica es de 1/20, antes de la inoculación.

#### **4. 7. Mediciones en el período experimental pos inoculación**

Luego de la inoculación de los animales pertenecientes a los grupos resistente y susceptible, como así también en el grupo libre de parásitos (control), se registraron los siguientes indicadores:

##### **4. 7. 1. Estudios fisiológicos**

###### **4. 7. 1. 1. Consumo de alimento y agua**

Se realizó un monitoreo y registro diario por un período de 68 días donde los animales recibieron durante este tiempo la misma dieta y cantidad que durante el período de acostumbramiento. El agua se suministró en baldes graduados donde diariamente se registró el consumo de agua de cada animal.

###### **4. 7. 1. 2. Peso, condición corporal y método FAMACHA®**

Estos registros se tomaron de la misma forma que en el período de acostumbramiento a intervalo de entre 10 y 11 días, a excepción del peso que se determinó periódicamente entre un lapso de 11 y 22 días.

##### **4. 7. 2. Estudios hematológicos**

También se midieron de igual forma que en el período de acostumbramiento a intervalos de entre 10 y 11 días, excepto la determinación de pepsinógeno que se hizo periódicamente entre un lapso de 11 y 22 días.

##### **4. 7. 3. Estudios parasitológicos**

Se tomaron diariamente muestras individuales de materia fecal directamente del recto de cada animal inoculado para realizar el conteo de HPG mediante la técnica McMaster modificada (sensibilidad 1/20).

#### **4. 7. 3. 1. Oviposición hembra/día**

En los días 33, 51 y 67 pos inoculación se colocó en 4 animales de cada grupo parasitado un arnés para la recolección de la materia fecal de 24 horas. Pasado este tiempo se retiró y se pesó la materia fecal producida por cada uno de ellos. De esta producción total individual se tomaron 5 submuestras para la medición de los HPG obteniendo un promedio, para luego determinar la oviposición/día expresada en la cantidad de huevos que eliminó cada hembra parásita en estos tres momentos, al recuperar dichas hembras en la finalización del ensayo, y considerando que todas ellas llegaron vivas a la finalización del mismo.

Los días establecidos para la medición de esta variable (33, 51 y 67), fueron teniendo en cuenta según un período de inicio, intermedio y finalización del ensayo. A su vez, fueron 4 animales de cada grupo inoculado debido a que solo se contó con material para esta cantidad de animales.

#### **4. 7. 3. 2. Test de eclosión de huevos *in vitro***

Una vez obtenida la solución de huevos mediante la técnica de recuperación de los mismos en materia fecal (ver sección 4. 9. 6.), se determinó la concentración y luego se sembraron en placas de cultivo celular de 24 pocillos.

Cada placa fue sembrada en 2 filas por aislamiento con 150 huevos aproximadamente por pocillo, con la adición posterior de agua destilada hasta completar un volumen final de 2000 µl. Luego se llevaron a estufa a 25°C.

A las 25 horas pos siembra fueron retiradas de la estufa, adicionándose 1 gota de lugol por pocillo para cortar la incubación. Se contó la cantidad de huevos y L1 presentes por pocillo con el uso de un microscopio óptico invertido, determinando así el porcentaje de eclosión a las 25 horas para cada aislamiento.

Se realizaron 3 repeticiones de la técnica completa para cada aislamiento.

#### **4. 8. Mediciones en la necropsia**

A los 68 días pos inoculación se realizó la eutanasia con bala cautiva penetrante y posterior desangrado de los 4 animales que se utilizaron para la medición de la oviposición/hembra/día mediante la colocación de arnés.

#### **4. 8. 1. pH de abomaso**

De cada abomaso aislado de la forma detallada anteriormente, se le realizó una incisión sobre la curvatura menor del órgano con posterior colocación inmediata de tiras reactivas para la medición de su pH.

Al momento de la eutanasia, los animales tenían aproximadamente 18 horas de ayuno sólido y el tiempo transcurrido desde la eutanasia hasta la medición del pH abomasal fue de alrededor de 3 minutos.

#### **4. 8. 2. Recuperación y longitud de adultos**

Se realizó el conteo total de parásitos adultos presentes de los abomasos de animales inoculados, clasificándolos según el sexo, la relación hembra/macho, el porcentaje de implantación, y la longitud de 2 ejemplares promedio (mm) de cada sexo por hospedador. Todos los especímenes recuperados fueron conservados en alcohol 70°.

#### **4. 8. 3. Peso relativo de abomaso**

Una vez que se realizó el lavado de cada abomaso, se pesó el órgano completo y sin contenido en balanza electrónica (sensibilidad 1 g) para establecer la relación con el peso final del animal a la necropsia.

#### **4. 8. 4. Patología macroscópica**

Los abomasos obtenidos a la necropsia fueron inspeccionados minuciosamente, analizándose de forma descriptiva, en busca de posibles lesiones evidentes causadas directa o indirectamente por los parásitos de ambos aislamientos, en comparación con abomasos normales (grupo control).

#### **4. 8. 5. Patología microscópica**

De cada abomaso de los animales que se realizó la necropsia parasitológica se obtuvieron 6 muestras para análisis histopatológico: 2 de la región anterior del órgano, 2 de la porción media y 2 de la región posterior. También se realizó un análisis descriptivo de dichas muestras.

#### 4. 8. 6. Digestión de mucosa abomasal

Cada mucosa abomasal fue separada de su órgano para realizar la técnica de digestión péptica en busca de larvas inhibidas.

#### 4. 9. Metodologías analíticas

A continuación se desarrollarán las metodologías analíticas utilizadas en esta tesis.

##### 4. 9. 1. Determinación de proteínas totales

###### Procedimiento

Se utilizó el kit Proti 2<sup>®</sup> (Wiener Lab., Rosario, Argentina). En tres tubos marcados blanco (B), standard (S) y desconocido (D), se colocó:

	B	S	D
Agua destilada	50 µl	-	-
Standard	-	50 µl	-
Muestra	-	-	50 µl
Reactivo A	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Se mezcló con varilla, incubándose luego 15 minutos a 37°C. Se leyó en un espectrofotómetro (T80 UV/VIS) a 540 nm llevando a cero con el blanco de reactivo.

###### Condiciones de la reacción

- Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 15 minutos
- Volumen de muestra: 50 µl
- Volumen de Reactivo A: 3,5 ml
- Volumen final de reacción: 3,55 ml

##### 4. 9. 2. Determinación de albúmina

###### Procedimiento

Se utilizó el kit Proti 2<sup>®</sup> (Wiener Lab., Rosario, Argentina). En tres tubos marcados blanco (B), standard (S) y desconocido (D), se colocó:

	B	S	D
Standard	-	10 µl	-
Muestra	-	-	10 µl
Reactivo B	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml

Se mezcló con varilla, manteniéndose luego los tubos entre 15 y 28°C durante 10 minutos. Se leyó en un espectrofotómetro (T80 UV/VIS) a 625 nm llevando a cero con el blanco de reactivo.

#### Condiciones de la reacción

- Longitud de onda: 625 nm en espectrofotómetro
- Temperatura de reacción: 15 y 28°C
- Tiempo de reacción: 10 minutos
- Volumen de muestra: 10 µl
- Volumen de Reactivo B: 3,5 ml
- Volumen final de reacción: 3,51 ml

#### **4. 9. 3. Determinación de pepsinógeno**

##### Procedimiento

En sendos tubos de centrifuga rotulados como MUESTRA, BLANCO MUESTRA, ESTANDAR Y BLANCO ESTANDAR, se colocaron los siguientes reactivos:

TUBO MUESTRA (TM):

500 µl de suero, 1,5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N y 1 ml de agua desionizada, incubándose 180 minutos en baño María a 37°C. Posteriormente se desproteinizó agregando 2 ml de tricloroacético (TCA) 10 % y luego de 10 minutos se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) (durante 10 minutos).

TUBO BLANCO MUESTRA (TBM):

1,5 ml de HCl y 1 ml de agua desionizada, incubándose 180 minutos en baño María a 37°C. Posteriormente se agregó 500 µl de muestra y desproteinizó agregando 2 ml de TCA 10 % y luego de 10 minutos se centrifugó a 2500 rpm (durante 10 minutos).

De cada tubo se recogieron 2 ml de sobrenadante (en sendos tubos de ensayo) para la realización de la reacción colorimétrica.

**TUBOS ESTANDAR (TS):**

Para el cálculo se realizó la lectura de dos estándares (0,1 mM y 0,2 mM) preparados de la siguiente manera:

- 0,2 ml de agua desionizada      •0,2 ml de agua desionizada
- 0,8 ml de TCA 10%                •0,8 ml de TCA 10%
- 1 ml de estándar St 1              •1 ml de estándar St 2

**TUBO BLANCO ESTANDAR (TBS):**

En un tubo de ensayo se colocaron 1,2 ml de agua desionizada y 0,8 de TCA 10%.

**REACCION COLORIMETRICA:**

A cada uno de los tubos (tubo muestra, tubo blanco muestra, tubos estándar y tubo blanco estándar) se le agregaron 4 ml de hidróxido de sodio 0,5 N y 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteau.

Lectura

Después de 15 minutos (para el completo desarrollo de color azulado) se realizó la lectura de absorbancia, en espectrofotómetro (T80 UV/VIS) a 608 nm.

	BLANCO SUERO	SUERO	BLANCO	ST1	ST2
SOBRENADANTE	2 ml	2 ml	-----	-----	-----
ESTANDAR	-----	-----	1,2 ml H <sub>2</sub> O 0,8 ml TCA 10%	0,2 ml H <sub>2</sub> O 0,8 ml TCA 10% 1ml St 1	0,2 ml H <sub>2</sub> O 0,8 ml TCA 10% 1ml St 2
NaOH 0,5 N	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
RVO. FOLIN- CIOCALTEAU	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Cálculos:

Después de realizadas las lecturas se obtuvieron los siguientes datos de absorbancias: Abs (TM), Abs (TBM), Abs (TS) y Abs (TBS)

Con estos datos se realizaron los siguientes cálculos:

- $\text{Abs (TM)} - \text{Abs (TBM)} = \text{Abs 1}$
- $[\text{Abs (TS1)} + \text{Abs (TS2)} / 2] - \text{Abs (TBS)} = \text{Abs 2}$
- $(\text{Abs 1} / \text{Abs 2}) * 5,55 = \text{UI tirosina/litro (mUI/ml)}$

#### **4. 9. 4. Procesamiento de biopsias abomasales para histopatología**

##### Deshidratación, aclaramiento e infiltración

Para deshidratar el tejido se utilizaron alcoholes de graduación creciente. Luego para el aclaramiento se usó tolueno como solvente de parafina. Estos procesos se realizaron con un procesador automático (Leica TP 1020) en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la EEA Balcarce.

Los tiempos del procesador automático fueron: 30 minutos en alcohol 50°, luego 60 minutos en alcoholes con graduación creciente (70°, 80°, 96° y 100°), posteriormente en tolueno durante 60 minutos (3 pasadas) y por último en parafina 60 y 90 minutos. El tejido embebido en parafina fue luego incluido en un cassette plástico para lograr un taco para su posterior corte.

##### Corte

Inicialmente se realizó un desgaste de los tacos de parafina que incluía el tejido con un micrótopo (Leica) a 30  $\mu\text{m}$ . Luego, utilizando el mismo micrótopo, se realizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Las secciones se colocaron en un baño de agua tibia para ponerlos en el portaobjetos. Previo a la coloración, los portaobjetos se pusieron en estufa a 60°C durante 30 minutos.

##### Coloración: hematoxilina – eosina

Para realizar la tinción de hematoxilina-eosina los portaobjetos fueron sumergidos en xilol 5 minutos (para desparafinar), sumergidos en alcohol 100° y 96° y luego lavados con agua corriente y destilada para rehidratar los tejidos. Seguidamente se sumergieron en hematoxilina por 10 minutos con posterior lavado en agua corriente. Luego se sumergieron en alcohol ácido, agua amoniacal y nuevamente lavado con agua. Por último, se sumergieron en eosina durante 5 minutos, agua acetificada, alcoholes 96° y 100° para finalizar con una última pasada en xilol.

##### Montaje

Se cubrieron los portaobjetos con bálsamo de Canadá y se les colocaron cubreobjetos. Se limpiaron con un paño y xilol, y se esperó a que se secaran para posterior visualización.

#### **4. 9. 5. Técnica McMaster modificada para realizar conteo de HPG**

Se pesaron 3 g de materia fecal y se diluyeron en 57 cm<sup>3</sup> de solución sobresaturada de cloruro de sodio. Posteriormente se realizó el conteo de huevos de *H. contortus* bajo microscopio óptico. De cada muestra individual se determinó la cantidad de HPG diario contando la cantidad de huevos presentes en 2 retículos o piletas, de la conocida “cámara INTA”, y multiplicando por el factor 20 y el factor de corrección de 1 a 3 por contenido de humedad de la materia fecal para determinar el valor final de HPG (Skerman y Hillard, 1966).

#### **4. 9. 6. Recuperación de huevos en materia fecal**

Se recuperaron huevos de *H. contortus* de los aislamientos resistente y susceptible mediante la técnica descrita por Várady *et al.* (2007).

La materia fecal de cada grupo se maceró por separado con agua destilada. Se realizaron pasajes de cada una de ellas por colador común y sucesivamente por diferentes filtros de 105 µm, 53 µm y 25 µm, quedando retenidos en este último los huevos de *H. contortus*.

Posteriormente fueron lavados con agua destilada y se traspasaron a tubos Falcon para centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante completando el tubo con solución sobresaturada de cloruro de sodio para realizar otra centrifugación al mismo tiempo y velocidad. Tras esta última centrifugación, el sobrenadante fue pasado por el filtro de 25 µm, lavándose con agua destilada. Estos pasos fueron realizados por segunda vez para obtener una solución de huevos más limpia.

#### **4. 9. 7. Técnica de recuperación de parásitos adultos en abomaso**

Se realizaron las necropsias parasitológicas y el lavado de los abomasos según la técnica descrita por Fiel *et al.* (2011). Inmediatamente luego de la eutanasia, de cada animal se extrajo el abomaso completo mediante la colocación de 2 ligaduras (una en el orificio omaso-abomasal y la otra en el píloro) y seccionándolo. Una vez aislado se realizó una incisión sobre su curvatura menor

e inmediatamente se midió el pH del contenido abomasal. Se hizo la apertura total del abomaso para la recuperación de todo el contenido mediante el lavado de los pliegues abomasales, colocándose luego en recipientes identificados. Todo el contenido recuperado de cada uno de ellos fue congelado en freezer de forma individual para posterior procesado.

#### **4. 9. 8. Técnica de digestión péptica de mucosa abomasal**

La mucosa de cada abomaso se separó raspando con el filo de un cuchillo colocado en forma perpendicular a su superficie. Luego, a cada mucosa abomasal se les adicionó el líquido de digestión, elaborado con agua tibia (500 cm<sup>3</sup>), ácido clorhídrico (11 cm<sup>3</sup>) y pepsina (5 g). Este preparado se agitó y se llevó a baño maría a 37°C durante 1 hora. Luego fue filtrado por un tamiz de 37 $\mu$  (400 meshes), y se observó bajo lupa estereoscópica con el agregado de unas gotas de solución yodurada (Fiel *et al.*, 2011).

#### **4. 10. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de las variables medidas en los estudios fisiológicos y en los hematológicos se realizó sobre el cálculo del cambio relativo o veces de cambio (VC o “fold change”) de cada grupo inoculado con respecto a la media del grupo control.

Para los análisis de las variables de los estudios fisiológicos (peso vivo, condición corporal, FAMACHA<sup>®</sup>) y hematológicos (hematocrito, glóbulos rojos, eosinófilos, hemoglobina, proteínas totales, albúmina y pepsinógeno) se emplearon modelos lineales mixtos (Proc. MIXED, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El grupo, el tiempo y su interacción fueron incluidos como efectos fijos, mientras que los animales fueron considerados como efectos aleatorios. Se asumió una estructura de covarianza autorregresiva de primer orden entre las observaciones realizadas sobre un mismo animal. La simetría y la homocedasticidad de los residuales fueron chequeados por métodos gráficos, modelándose la heterogeneidad de varianza cuando fue necesario. Para cada tiempo evaluado, se consideró que los grupos inoculados difirieron significativamente del grupo control cuando la media de mínimos cuadrados estimada para las veces de cambio fue significativamente distinta de 1 ( $p \leq 0,05$ )

luego de realizarse una prueba T de Student a dos colas. A su vez, se realizó la comparación entre los dos grupos inoculados.

Para el análisis de la oviposición hembra/día se empleó un modelo lineal generalizado (Proc. MIXED, SAS Studio v3.6). Se incluyeron grupo, día de muestreo, la interacción entre ambas variables y la producción individual de materia fecal (covariable) como efectos fijos. La estructura de covarianza entre las observaciones de un mismo animal y el chequeo de supuestos se realizó de forma similar que para los análisis previos.

Para el conteo diario de HPG, se empleó un modelo lineal generalizado mixto (Proc. GLIMMIX, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) asumiéndose una distribución de Poisson y función de ligadura logarítmica. Como efectos fijos se incluyeron al grupo, un spline cúbico para el día de muestreo y su interacción. Se incluyó al animal como efecto aleatorio. Se empleó la misma estructura de covarianza que para los análisis previos. Un análisis similar se empleó para el análisis del consumo diario de agua, pero asumiéndose una distribución normal, una función de ligadura de identidad e incorporándose al peso inicial de los animales como covariable del modelo.

Los datos recolectados de la necropsia (pH abomasal, peso relativo de abomaso, número de adultos, relación hembra/macho, porcentaje de implantación y longitud de machos y hembras) y del test de eclosión *in vitro* fueron analizados empleando modelos lineales (Proc. GLM, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), incluyéndose al grupo como efecto fijo. Cuando fue necesario, las comparaciones múltiples post-hoc fueron ajustadas mediante el método HSD de Tukey. La normalidad y la homocedasticidad de los residuales fueron chequeados empleando la prueba de Shapiro-Wilk y de Brown-Forsythe, respectivamente.

## 5. RESULTADOS

Los resultados del análisis estadístico de los estudios fisiológicos y hematológicos se muestran conjuntamente con los valores descriptivos de las variables de dichos estudios, ya que se observaron en los animales controles cambios en algunos de los parámetros estudiados. Considerando que estos factores también pudieron haber afectado a los grupos inoculados, para evitar que el efecto de las inoculaciones parasitarias se encuentre confundido (sobre o subestimado), el análisis estadístico de las variables de estos estudios se realizó, como se mencionó anteriormente, sobre el cálculo del cambio relativo o veces de cambio (VC o “fold change”) de cada grupo inoculado con respecto a la media del grupo control.

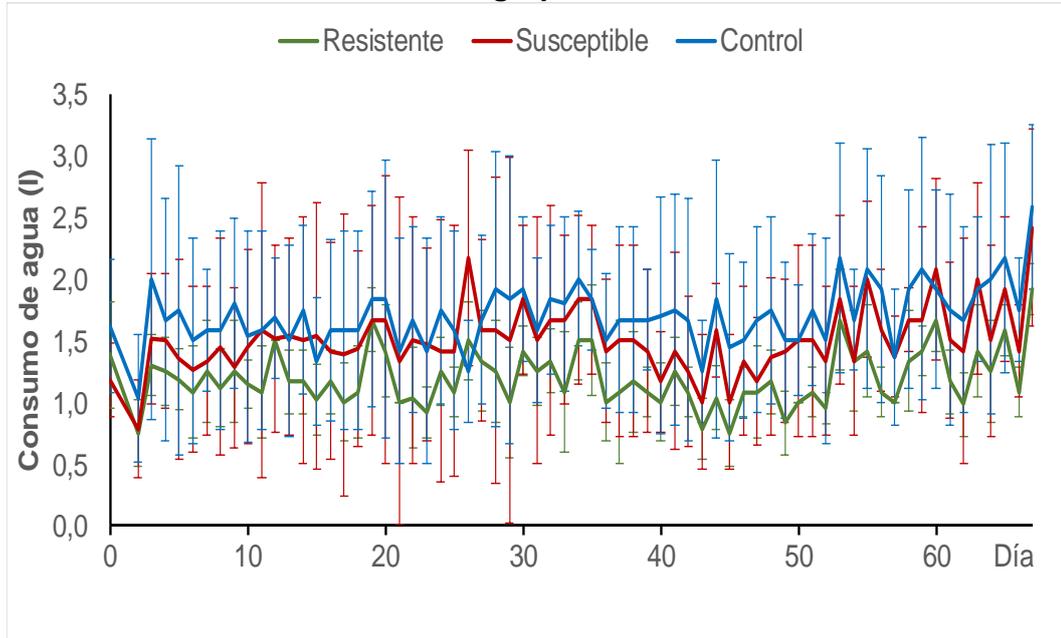
### 5. 1. Estudios fisiológicos

#### 5. 1. 1. Consumo de alimento y agua

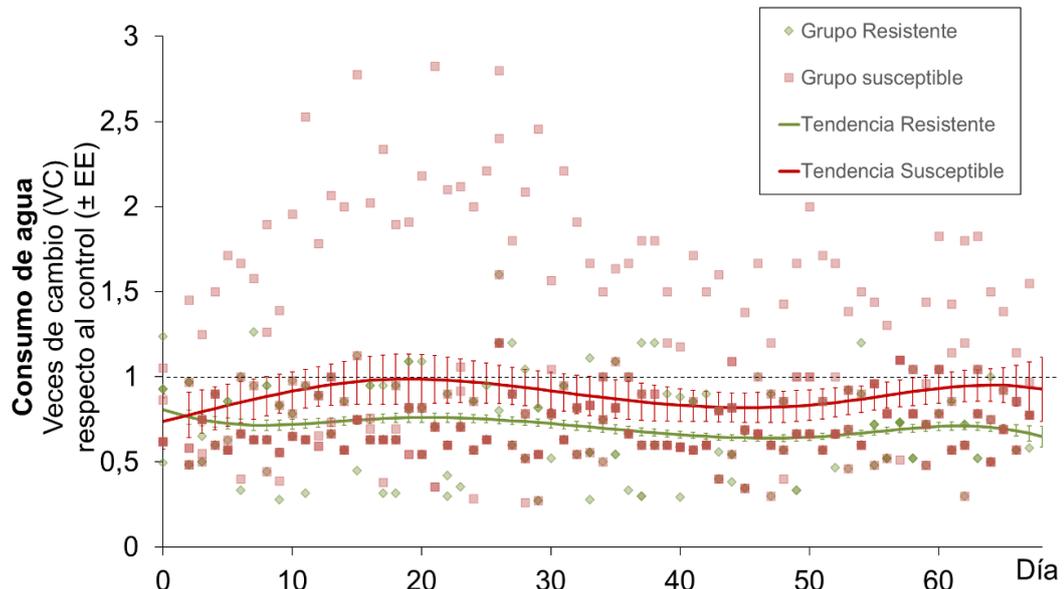
Todos los animales de los 3 grupos consumieron diariamente la ración completa de alimento por lo que el consumo diario no revistió análisis estadístico.

El grupo resistente consumió significativamente menos agua que el grupo control durante todo el estudio ( $p \leq 0,05$ ). No se observó diferencia significativa en el cambio relativo del consumo de agua entre el grupo resistente y susceptible, y tampoco entre el susceptible y el control ( $p > 0,05$ ) (figuras 2 y 3).

**Figura 2: Evolución del consumo de agua promedio y el error estándar por grupo.**



**Figura 3: Cambio relativo del consumo de agua de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE). Los valores son expresados para un peso de 25,33 kg.**



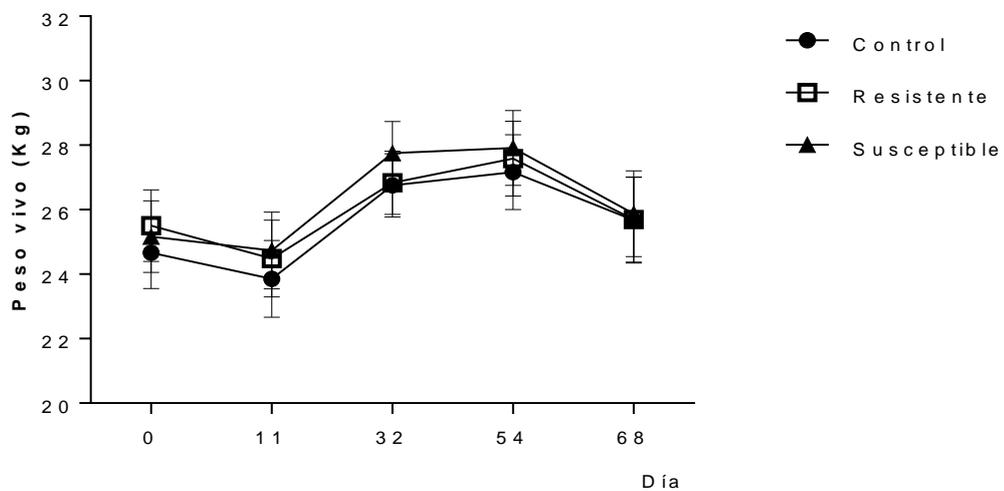
### 5. 1. 2. Peso vivo, condición corporal y método FAMACHA®

El peso vivo promedio y la condición corporal promedio por grupo se muestran en las figuras 4 y 6 respectivamente. Todos los animales se mantuvieron dentro

de un rango promedio de peso vivo entre 24 y 28 kg, con una condición corporal promedio de 2,5 a 3.

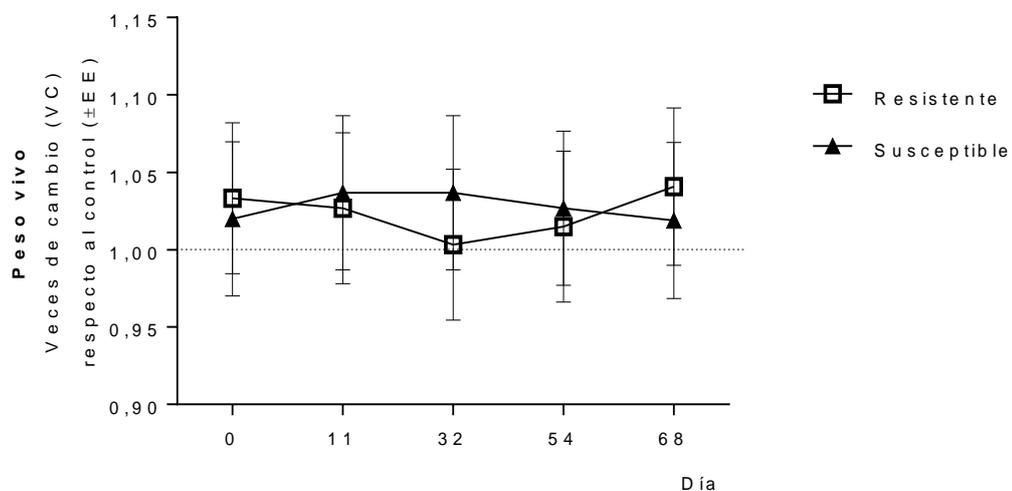
El análisis estadístico de ambos parámetros sobre el cálculo del cambio relativo de cada grupo inoculado con respecto a la media del grupo control no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos a lo largo del todo el estudio ( $p > 0,05$ ) (figuras 5 y 7).

**Figura 4: Evolución del peso vivo promedio y el error estándar por grupo.**

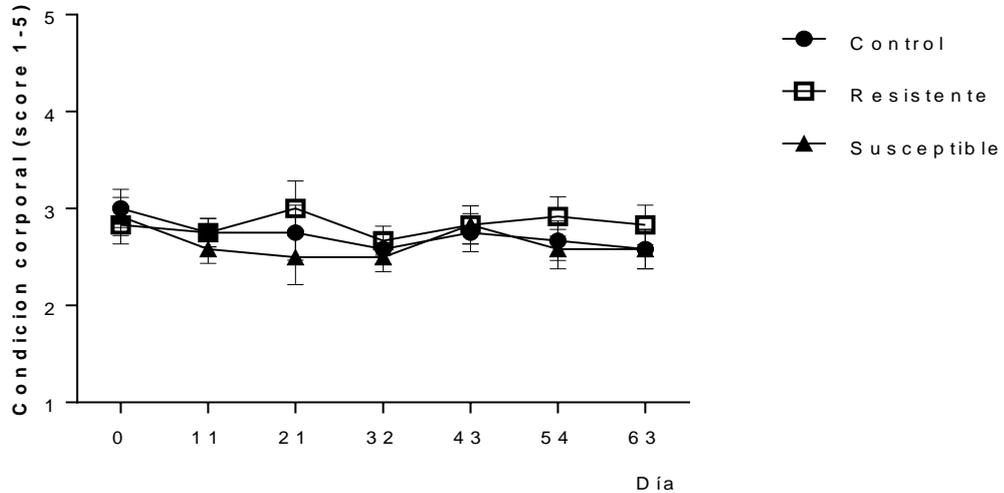


**Figura 5: Cambio relativo del peso vivo de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

(Efecto día = 0,99; efecto grupo = 0,76; interacción = 0,99)

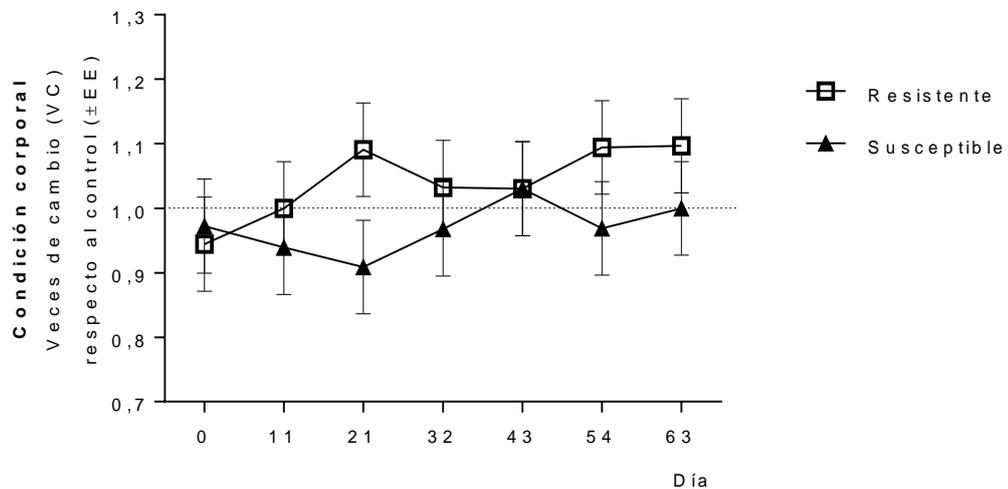


**Figura 6: Evolución de la condición corporal promedio y el error estándar por grupo.**



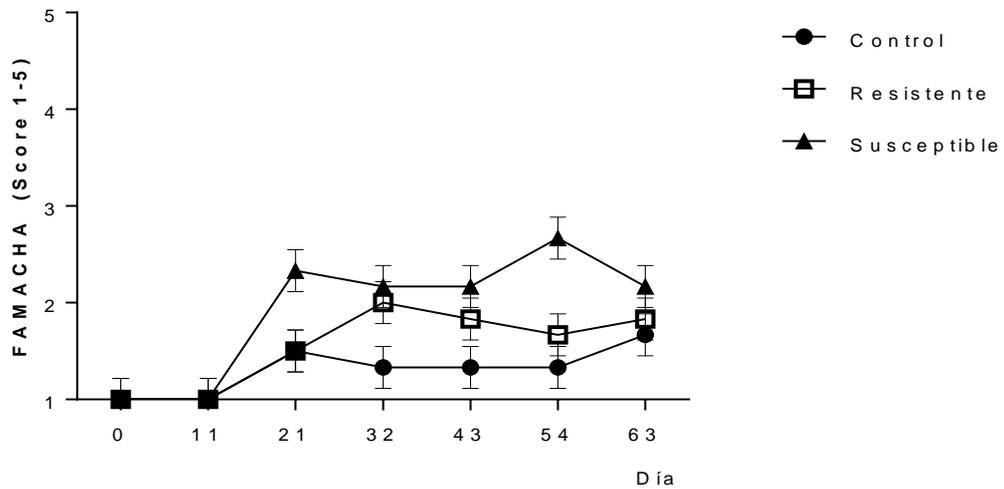
**Figura 7: Cambio relativo de la condición corporal de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

(Efecto día = 0,82; efecto grupo = 0,10; interacción = 0,87)



Las puntuaciones promedio de FAMACHA® de los tres grupos durante el transcurso del estudio se muestran en la figura 8. Individualmente, ningún animal inoculado presentó una puntuación > 3 a lo largo de todo el estudio, con valores promedio de 1 al día 11 PI y de 1,5 a 2,5 desde el día 11 hasta la finalización del mismo.

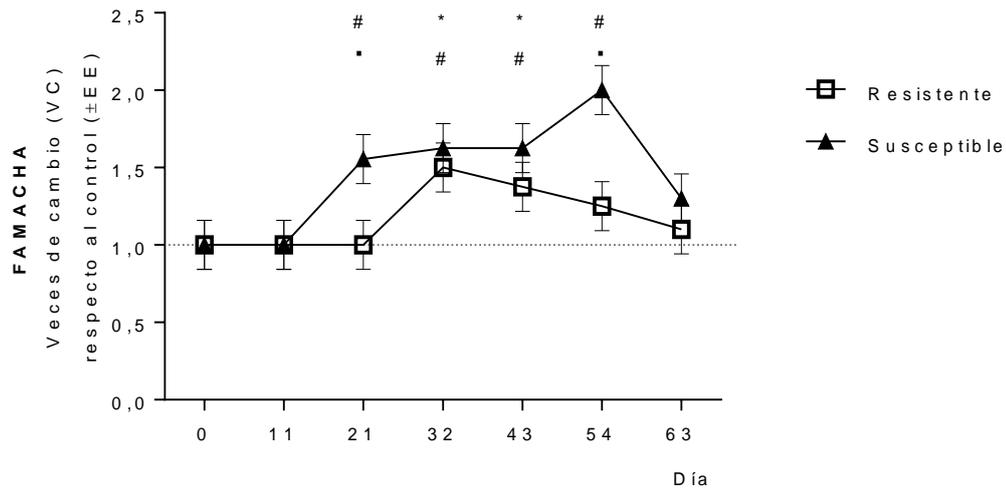
**Figura 8: Evolución de la puntuación FAMACHA® promedio y el error estándar por grupo.**



El análisis estadístico sobre el cambio relativo de los grupos inoculados respecto a la media del grupo control mostró que a partir del día 21 PI, el grupo susceptible se diferenció significativamente tanto con el grupo resistente como con el grupo control, con mayor puntuación promedio ( $p \leq 0,05$ ). En el día 32 el grupo resistente también se diferenció significativamente con este último grupo ( $p \leq 0,05$ ). A partir este momento, las diferencias significativas de ambos grupos inoculados con el control se mantuvieron hasta prácticamente la finalización del ensayo, siempre con puntuaciones promedio más altas que en el grupo control. No se observó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los grupos resistente y susceptible, salvo en los días 21 y 54 PI. Al día 63, tampoco la hubo entre ninguno de los 3 grupos (figura 9).

**Figura 9: Cambio relativo de la puntuación FAMACHA® de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

- \*Grupo resistente difiere significativamente del control (VC≠1,  $p \leq 0,05$ )
- #Grupo susceptible difiere significativamente del control (VC≠1,  $p \leq 0,05$ )
- Diferencias significativas entre grupo resistente y susceptible ( $p < 0,05$ )  
(Efecto día = 0,01; efecto grupo = 0,07; interacción = 0,02)

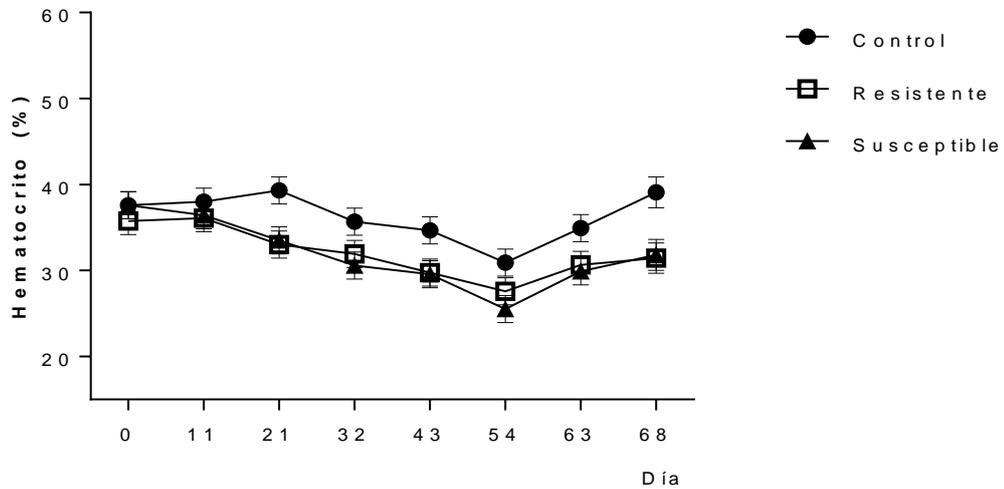


## 5. 2. Estudios hematológicos

Los valores de hematocrito (principalmente) y glóbulos rojos totales (figuras 10 y 12 respectivamente) disminuyeron a partir del día 11 PI (promedio del hematocrito para ambos grupos inoculados de 36%), registrándose los valores más bajos el día 54 PI con promedio de 27,6% para el grupo resistente y de 25,5% para el susceptible. Luego se observó una leve recuperación hacia el día 68, con valores promedio de alrededor del 31% para ambos grupos inoculados.

El hematocrito en el grupo control también disminuyó, pero a partir del día 21 que presentó un promedio de 39%, registrándose, al igual que en los grupos inoculados, el menor valor al día 54 (promedio 31%). Hacia el día 68, hubo una recuperación del hematocrito también en este grupo (39%).

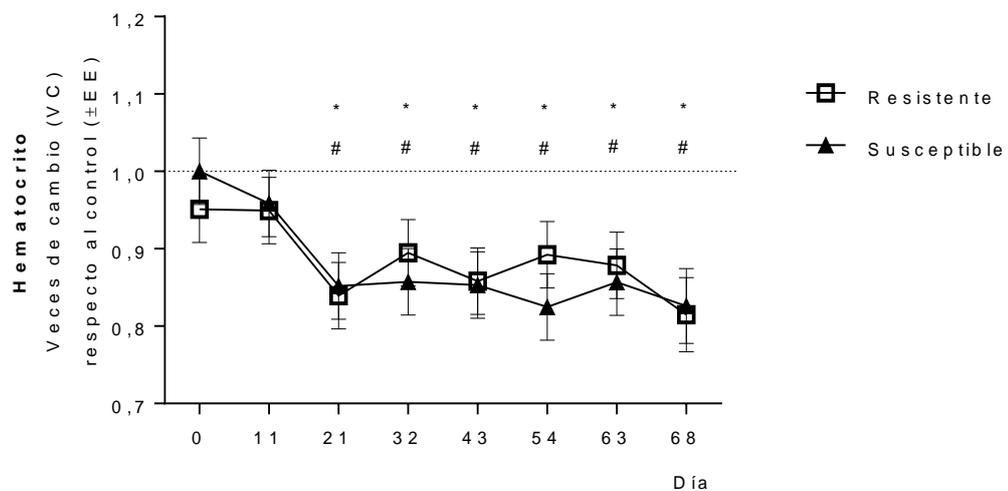
**Figura 10: Evolución del hematocrito promedio y el error estándar por grupo.**



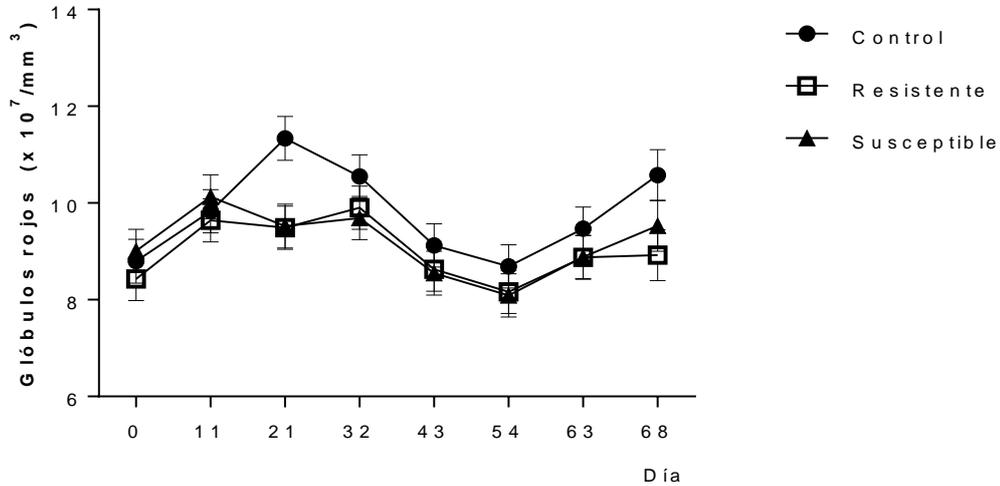
Los grupos inoculados se diferenciaron significativamente del control el día 21 PI, manteniéndose esta diferencia hasta el final del estudio ( $p \leq 0,05$ ). Entre el grupo resistente y susceptible no se observaron diferencias significativas (figura 11).

**Figura 11: Cambio relativo del hematocrito de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

\*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 #Grupo susceptible difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 (Efecto día = 0,01; efecto grupo = 0,02; interacción = 0,34)



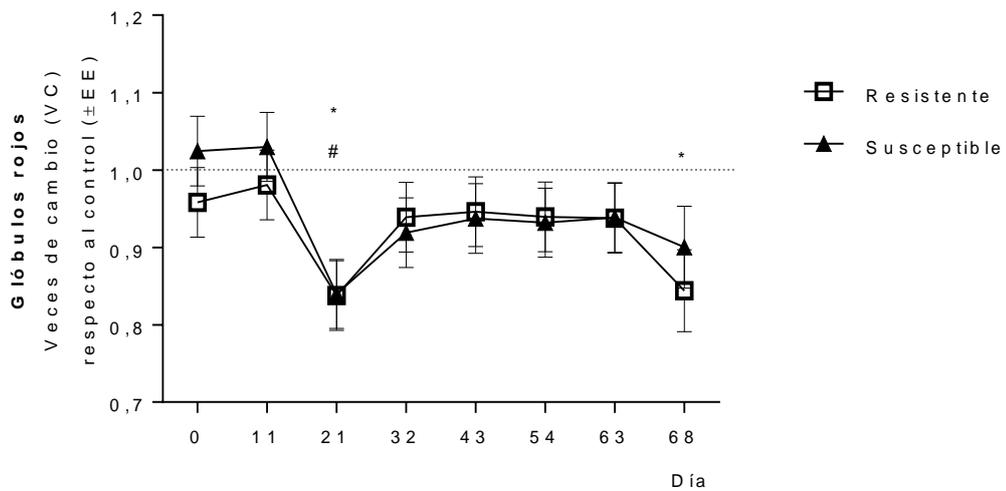
**Figura 12: Evolución de los glóbulos rojos promedio y el error estándar por grupo.**



El recuento de glóbulos rojos totales solo evidenció diferencia significativa entre el grupo control y ambos grupos inoculados el día 21 ( $p \leq 0,05$ ). El día 68 el grupo resistente se diferenció significativamente del control ( $p \leq 0,05$ ) (figura 13).

**Figura 13: Cambio relativo de los glóbulos rojos totales de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

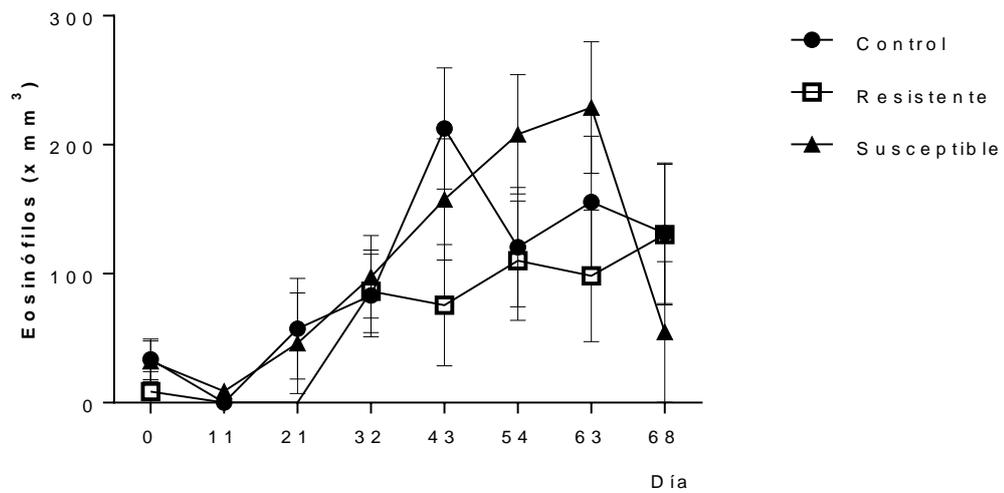
\*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 #Grupo susceptible difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 (Efecto día = 0,01; efecto grupo = 0,62; interacción = 0,97)



El recuento de eosinófilos, tanto absolutos como relativos, mostró importante variación entre individuos. Los valores promedio para ambos parámetros oscilaron

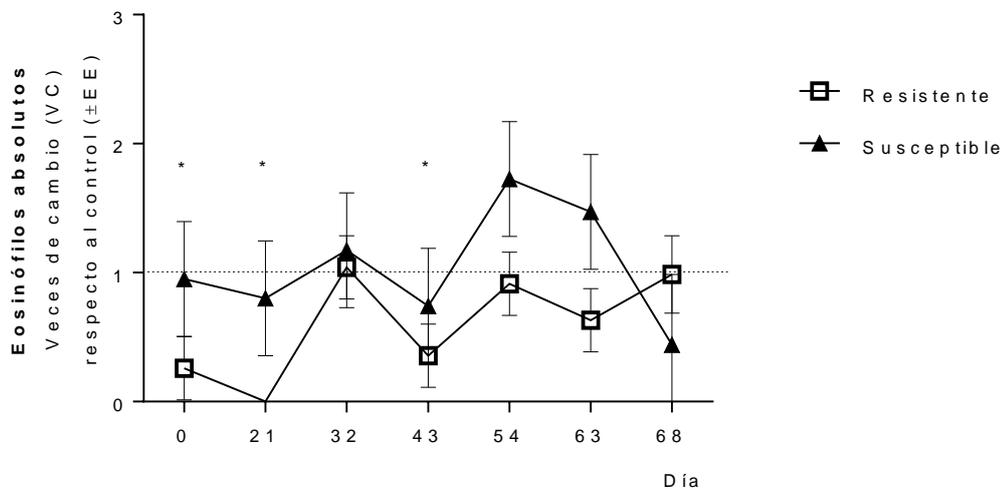
entre 0 y 200/ $\mu$ l y entre 0 y 5% respectivamente, a lo largo de todo el estudio (figuras 14 y 16 respectivamente). Existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) del grupo resistente con el control en los días 0, 21 y 43, pero más bajos con respecto a este último grupo (figuras 15 y 17).

**Figura 14: Evolución de los eosinófilos absolutos promedio y el error estándar por grupo.**

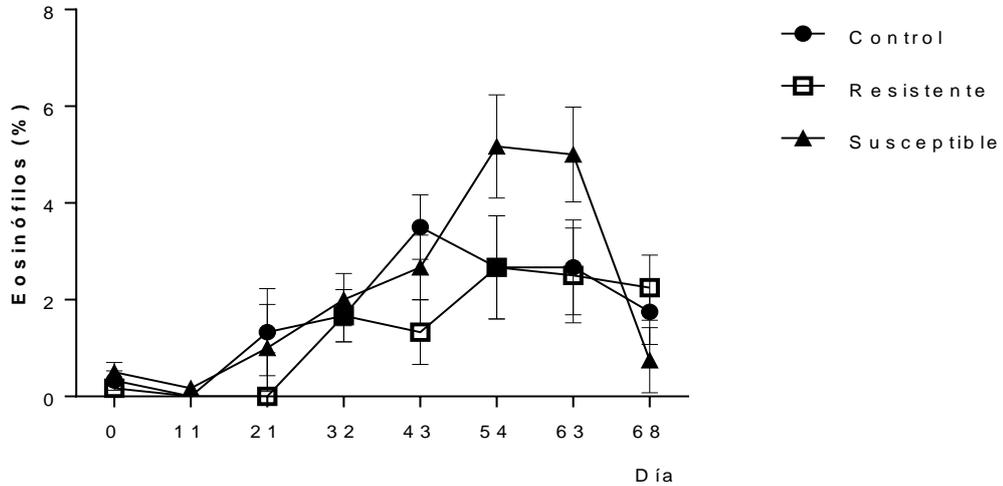


**Figura 15: Cambio relativo de los eosinófilos absolutos de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

\*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 (Efecto día = 0,12; efecto grupo = 0,05; interacción = 0,31)

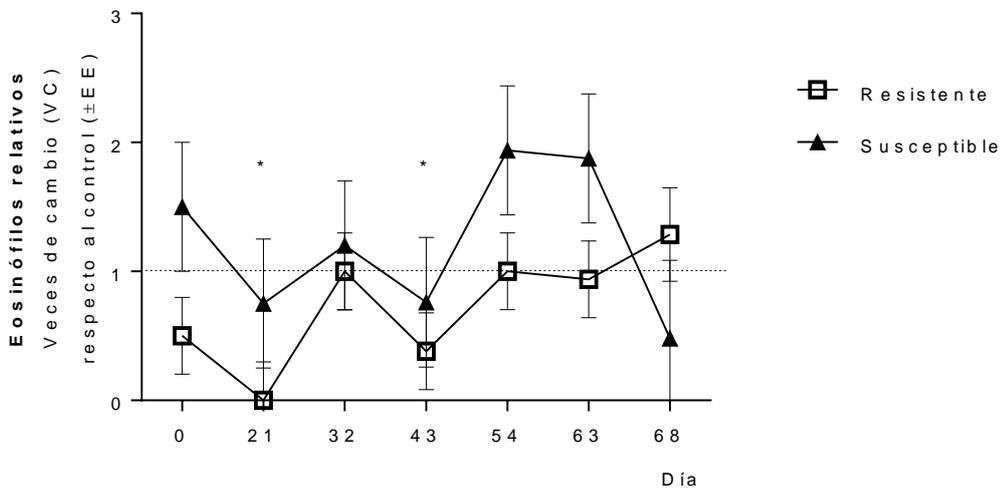


**Figura 16: Evolución de los eosinófilos relativos promedio y el error estándar por grupo.**



**Figura 17: Cambio relativo de los eosinófilos relativos de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

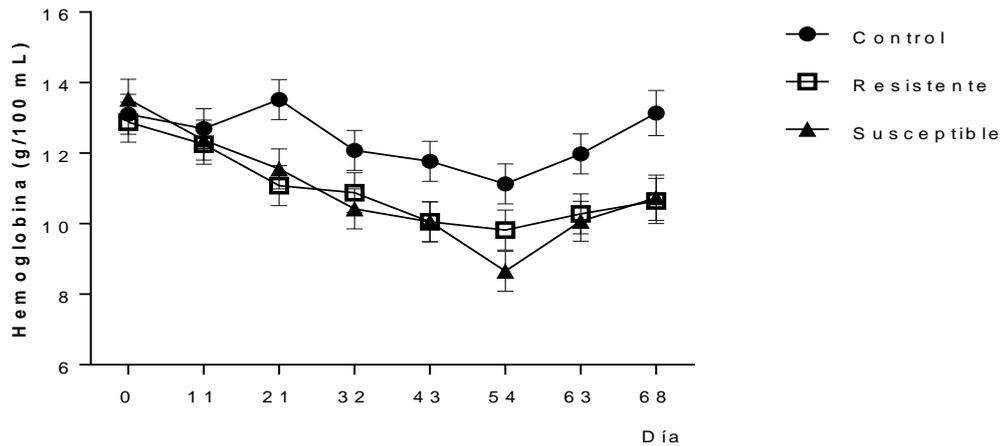
\*Grupo resistente difiere significativamente del control (VC≠1, p≤0,05)  
(Efecto día = 0,02; efecto grupo = 0,05; interacción = 0,21)



La hemoglobina mostró un comportamiento similar al hematocrito y a los glóbulos rojos. El promedio en los tres grupos al día 0 fue de alrededor de 13 g/dl. En las sucesivas mediciones los niveles disminuyeron, también en los tres grupos, registrándose los valores más bajos el día 54 PI (valor promedio: grupo resistente, 9,8 g/dl, grupo susceptible, 8,6 g/dl y grupo control, 11,1 g/dl), con una leve

recuperación hacia el día 68 (grupo resistente, 10,6 g/dl, grupo susceptible, 10,7 g/dl y grupo control, 13,1 g/dl) (figura 18).

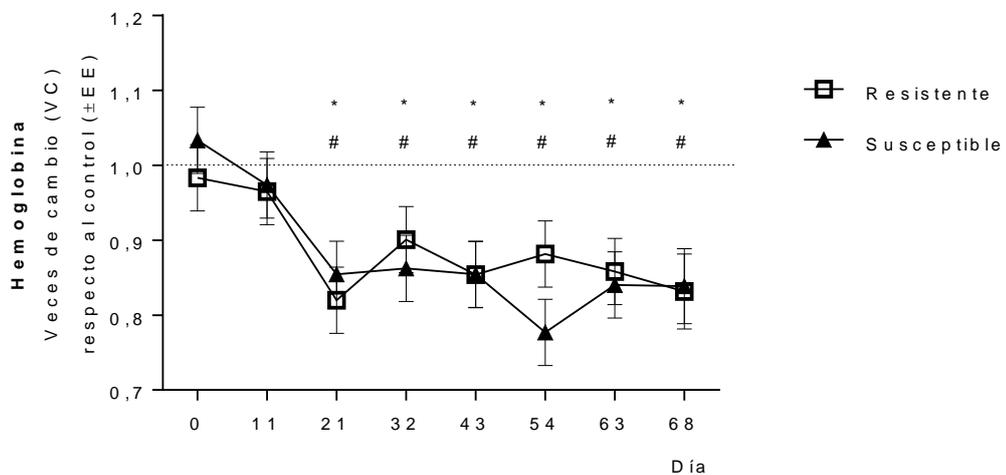
**Figura 18: Evolución de la hemoglobina promedio y el error estándar por grupo.**



Se encontró en los grupos inoculados diferencia significativa con el grupo control a partir del día 21 PI, y manteniéndose hasta el final del estudio ( $p \leq 0,05$ ). No se observó diferencias significativas entre el grupo resistente y susceptible ( $p > 0,05$ ) (figura 19).

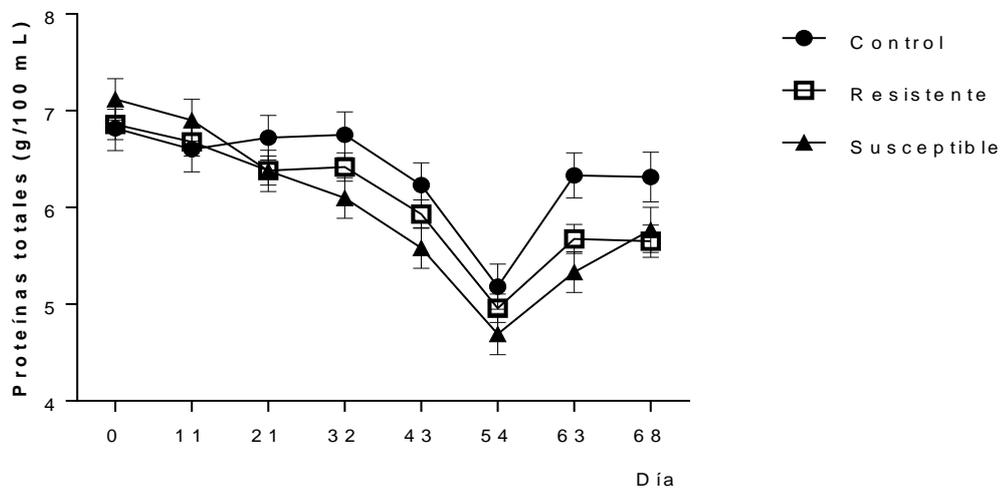
**Figura 19: Cambio relativo de la hemoglobina de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

\*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 #Grupo susceptible difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )  
 (Efecto día = 0,02; efecto grupo = 0,05; interacción = 0,21)



Los valores de proteínas totales disminuyeron a partir del día 11 en los grupos inoculados. Al día 54 PI se registraron los valores más bajos (valor promedio: grupo resistente, 4,9 g/dl, grupo susceptible, 4,7 g/dl y grupo control, 5,2 g/dl) de este parámetro que a lo largo de todo el ensayo. Los más altos se obtuvieron previo a la inoculación con promedios de alrededor de 7 g/dl para los tres grupos (figura 20).

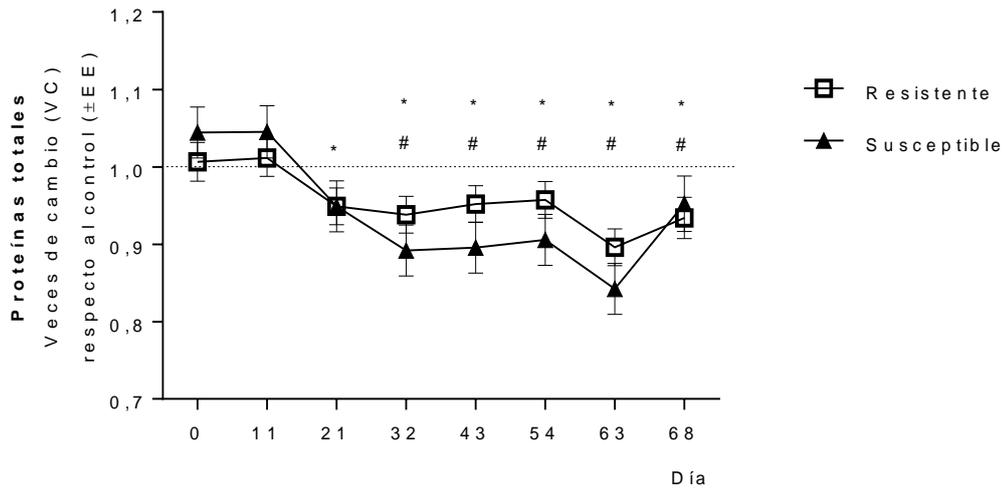
**Figura 20: Evolución de las proteínas totales promedio y el error estándar por grupo.**



El grupo resistente se diferenció significativamente al grupo control en el día 21 PI ( $p \leq 0,05$ ). Al día 32 el grupo susceptible mostró diferencia significativa al grupo control ( $p \leq 0,05$ ). Posteriormente estas diferencias se mantuvieron durante todo el ensayo, pero sin diferencia significativa entre los grupos susceptible y resistente ( $p > 0,05$ ) (figura 21).

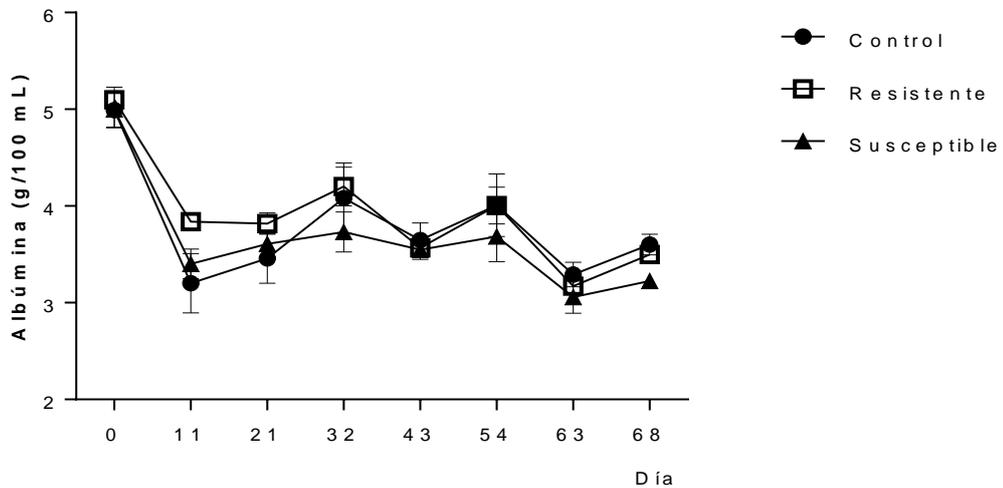
**Figura 21: Cambio relativo de las proteínas totales de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

\*Grupo resistente difiere significativamente del control (VC≠1, p≤0,05)  
 #Grupo susceptible difiere significativamente del control (VC≠1, p≤0,05)  
 (Efecto día = 0,01; efecto grupo = 0,63; interacción = 0,27)



Los valores promedio de albúmina por grupo se muestran en la figura 22. Pevio a la inoculación, todos los grupos presentaron valores promedio de 5 g/dl. Luego, desde el día 11 al 68 PI se registraron valores de entre 3 a 4 g/dl en los grupos resistente, susceptible y control. Dichos valores se mantuvieron dentro de los de referencia en los tres grupos, no encontrándose disminución marcada en este parámetro (figura 22).

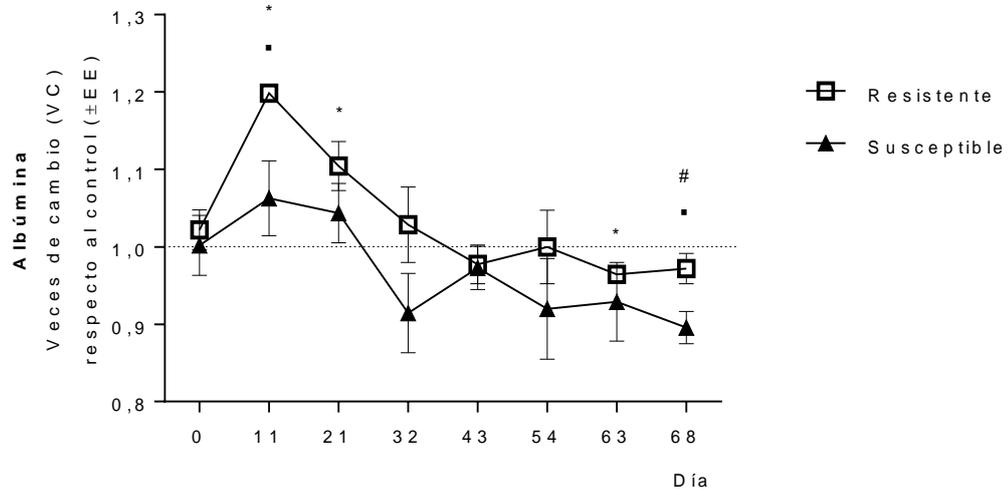
**Figura 22: Evolución de la albúmina promedio y el error estándar por grupo.**



El análisis estadístico sobre el cambio relativo de los grupos inoculados respecto a la media del grupo control mostraron diferencias significativas entre grupos los días 11, 21, 63 y 68 (figura 23).

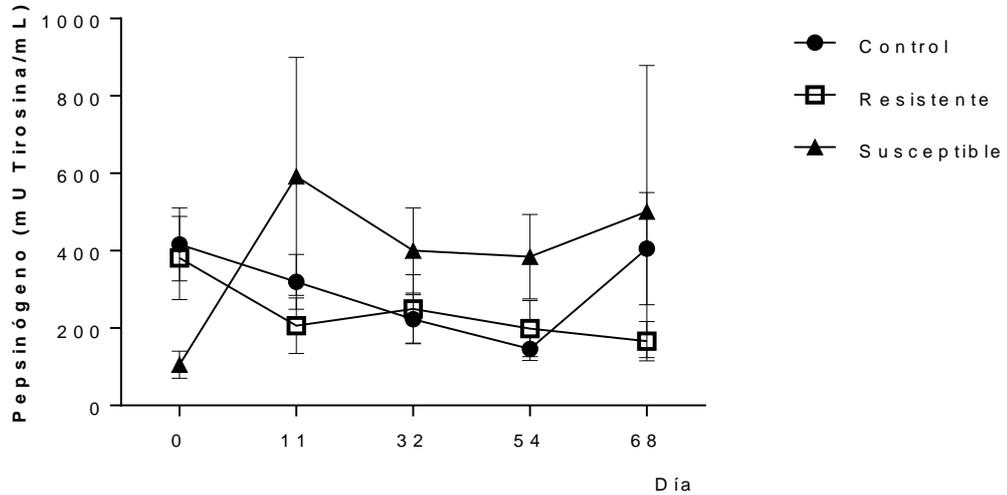
**Figura 23: Cambio relativo de la albúmina de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

- \*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )
- #Grupo susceptible difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )
- Diferencias significativas entre grupo resistente y susceptible ( $p < \leq 0,05$ )  
(Efecto día = 0,01; efecto grupo = 0,01; interacción = 0,50)



Los valores promedio de pepsinógeno por grupo se muestran en la figura 24. En las diferentes determinaciones dichos valores oscilaron en rango de 150 a 400 mU tirosina/ml para el grupo resistente, de 100 a 600 mU tirosina/ml para el susceptible y de 150 a 400 mU tirosina/ml en el grupo control.

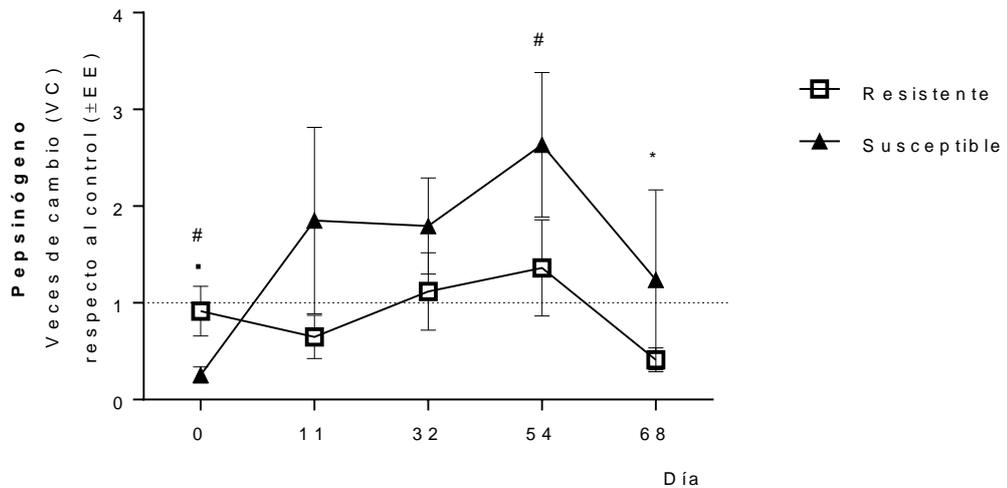
**Figura 24: Evolución del pepsinógeno promedio y el error estándar por grupo.**



En el día 0 existió diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo susceptible con respecto al control y al resistente, pero con valor promedio más bajo que en este último (figura 25).

**Figura 25: Cambio relativo del pepsinógeno de los corderos inoculados expresado como veces de cambio (VC) con respecto al control. Error estándar (EE).**

- \*Grupo resistente difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )
- #Grupo susceptible difiere significativamente del control ( $VC \neq 1$ ,  $p \leq 0,05$ )
- Diferencias significativas entre grupo resistente y susceptible ( $p \leq 0,05$ )  
(Efecto día = 0,03; efecto grupo = 0,20; interacción = 0,15)

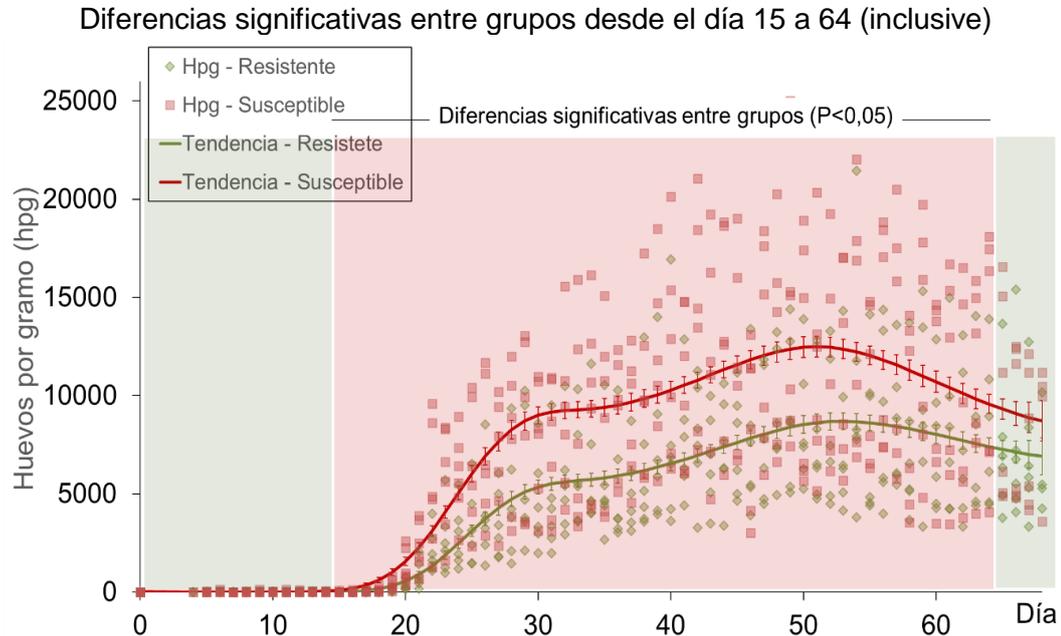


### 5. 3. Estudios parasitológicos

#### 5. 3. 1. HPG diario

Los valores de HPG promedio por grupo se muestran en la figura 26. Hubo diferencia significativa prácticamente durante todo el ensayo (desde día 15 al 64 PI), con valor promedio superior en el grupo inoculado con el aislamiento susceptible ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 26: Tendencia/Distribución de HPG promedio por día y por grupo en corderos inoculados.**



En ambos grupos estos promedios de HPG comenzaron a aumentar rápidamente alrededor del día 19 PI, día en el que todos los animales inoculados presentaron huevos de *H. contortus*. Los valores promedio máximos se observaron alrededor del día 50 PI, tanto para el aislamiento resistente como para el susceptible. Luego descendieron levemente hacia el final del estudio.

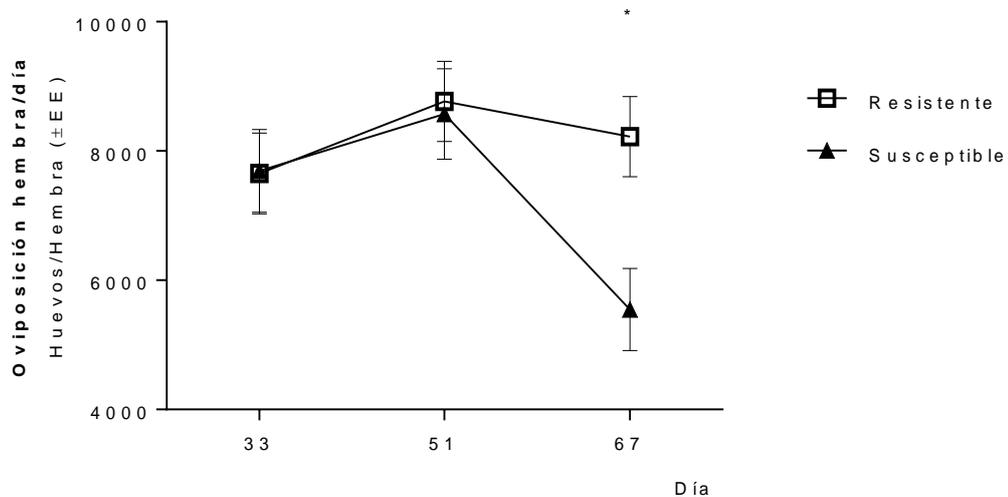
Se alcanzaron valores individuales altos de HPG, de 20000 a 25000, principalmente en corderos que recibieron el aislamiento susceptible. Se observó gran variación entre valores individuales dentro de un mismo grupo.

### 5. 3. 2. Oviposición hembra/día

En los corderos inoculados con el aislamiento resistente se registró un promedio de producción de huevos/hembra/día similar en los tres momentos determinados (7654 al día 33, 8770 al 51 y 8222 al 67 PI). Si bien en los corderos inoculados con el aislamiento susceptible se registraron valores que no difirieron significativamente con respecto a los inoculados con el resistente en las primeras dos determinaciones ( $p>0,05$ ), si disminuyó de forma considerable en la última medición (7692 al día 33, 8571 al día 51 y 5548 al día 67 PI). Es en esta última determinación donde se observó diferencia significativa con mayor promedio de oviposición/hembra en aquellas pertenecientes al aislamiento resistente ( $p\leq 0,05$ ) (figura 27).

**Figura 27: Oviposición promedio por hembra/día por grupo inoculado. Error estándar (EE).**

\*Diferencia significativa entre grupo resistente y susceptible ( $p\leq 0,05$ )  
Valores estimados para 500 g de materia fecal



### 5. 3. 3. Test de eclosión de huevos *in vitro*

En la tabla 1 se observa el resultado del TEH para los aislamientos resistente y susceptible de *H. contortus*. No se encontró diferencia significativa entre los aislamientos utilizados ( $p>0,05$ ).

**Tabla 1: Porcentaje de eclosión de huevos de aislamientos de *H. contortus*. Error estándar (EE).**

Eclosión		EE	Valor p
Resistente	Susceptible		
83,4	87,1	2,3	0,31

#### 5. 4. Estudios a la necropsia parasitológica

La tabla 2 muestra los resultados del pH de abomaso, peso relativo del abomaso, total de especímenes de *H. contortus* adultos recuperados, relación hembra:macho, porcentaje de implantación y la longitud promedio de 2 ejemplares representativos de hembras y machos, analizadas a la necropsia del promedio de los animales de cada grupo.

**Tabla 2: Promedios, errores estándares (EE) y valores p de las variables determinadas a la necropsia parasitológica.**

<sup>ab</sup> Letras diferentes en una misma fila hay diferencia estadística ( $p < 0,05$ )

<sup>cd</sup> Letras diferentes en una misma fila difieren en  $p = 0,06$

Variable	Grupo			EE	Valor p
	Resistente	Susceptible	Control		
pH abomaso	4,00	3,50	3,00	0,29	0,10
Peso relativo de abomaso	0,70 <sup>cd</sup>	0,76 <sup>c</sup>	0,56 <sup>d</sup>	0,05	0,06
Total de especímenes adultos	951 <sup>a</sup>	1516 <sup>b</sup>	ND	150,39	0,04
Relación H:M	1,02	1,00	ND	0,04	0,90
Porcentaje de implantación	45,54 <sup>a</sup>	75,79 <sup>b</sup>	ND	7,52	0,04
Longitud hembras	27,13	28,13	ND	0,57	0,26
Longitud machos	18,00	18,38	ND	0,39	0,52

ND: no determinado

##### 5. 4. 1. pH de abomaso

Si bien no se observaron diferencias significativas entre grupos ( $p > 0,05$ ), en ambos grupos inoculados se encontraron valores promedio de pH abomasal superior a los que se observó en animales control, con rangos de 3 a 5 en abomasos de animales que recibieron el aislamiento resistente, y de 3 a 4 en los que se inoculó con el susceptible. Todos los abomasos de animales del grupo control presentaron pH = 3.

#### **5. 4. 2. Peso relativo de abomaso**

El promedio del peso relativo de abomaso de animales inoculados con el aislamiento susceptible mostró tendencia a diferir significativamente al promedio del peso relativo de abomaso de animales control (valor  $p=0,06$ ). No así entre el de animales inoculados con aislamiento resistente y control, ni tampoco entre los aislamientos de *H. contortus* utilizados en este estudio ( $p>0,05$ ). Se obtuvieron rangos de 0,57 a 0,85 en el grupo resistente, de 0,67 a 0,91 en el susceptible, y de 0,42 a 0,63 en el control.

#### **5. 4. 3. Ejemplares adultos totales, relación hembra:macho, porcentaje de implantación y longitud**

El promedio de ejemplares adultos recuperados difirió significativamente entre el grupo susceptible y el resistente ( $p<0,05$ ). Los corderos del grupo susceptible presentaron mayor cantidad promedio de *H. contortus* que los pertenecientes al grupo resistente, 1516 y 951 respectivamente (rango de ejemplares adultos grupo susceptible: 1229 a 1746, resistente: 640 a 1402).

No se encontró diferencia significativa en la relación hembra:macho promedio de cada aislamiento ( $p>0,05$ ), donde aproximadamente fue 1:1 en ambos casos.

El porcentaje de implantación promedio de ambos grupos mostró diferencia significativa ( $p<0,05$ ). El aislamiento susceptible tuvo mayor tasa de implantación (75,8%, rango: 61,5 a 87,3%) que el aislamiento resistente (45,5%, rango: 32 a 70,1%).

La longitud promedio tanto de hembras como de machos adultos de ambos aislamientos no difirió significativamente entre ejemplares de *H. contortus* susceptible y resistente ( $p>0,05$ ).

#### **5. 4. 4. Patología macroscópica**

No se encontraron evidencias de daño (hiperemia, petequias, coágulos de sangre) en los abomasos de los animales inoculados. Sin embargo, se observaron “pinchazos” o pequeños nódulos de la mucosa, no muy evidentes, tanto en los animales del grupo resistente como en los del susceptible. Los animales inoculados presentaron pliegues abomasales levemente más engrosados y con mayor mucosidad con respecto a los abomasos de animales del grupo control.

#### **5. 4. 5. Patología microscópica**

Se observó un infiltrado difuso leve principalmente en la lámina propia de los abomasos de los 3 grupos de corderos, pero más evidente en aquellos que fueron inoculados. El tipo celular predominante en esta región fueron linfocitos.

A su vez, también en la lámina propia, se encontraron células compatibles con eosinófilos y/o leucocitos globulares. Estos tipos celulares se observaron principalmente en los corderos inoculados. En estos animales, dichas células infiltraron el espacio inter glandular, abarcando toda la mucosa del abomaso. Este infiltrado de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y/o leucocitos globulares fue más evidente en las muestras recolectadas en la porción media del abomaso y hacia posterior en cercanías a la región pilórica, donde el infiltrado fue más notorio que en las regiones anteriores. Además, infiltraban porciones de la submucosa, principalmente en animales inoculados.

#### **5. 4. 6. Digestión de mucosa**

No se hallaron estadios inmaduros mediante esta técnica, por lo que no revistió análisis estadístico.

## 6. DISCUSIÓN

Los parásitos gastrointestinales representan una de las principales limitantes sanitarias en los sistemas ganaderos pastoriles disminuyendo su productividad. El control de estas parasitosis se ha basado fundamentalmente en el uso de fármacos antihelmínticos y como consecuencia, se ha producido un avance de la resistencia antihelmíntica a los fármacos comercialmente disponibles. En este contexto, *H. contortus* es uno de los nematodos gastrointestinales que mayormente desarrolló dicho fenómeno. Además, es el que mayor daño produce en majadas de pequeños rumiantes.

Ante el avance de las poblaciones parasitarias resistentes sobre las susceptibles, es necesario evaluar las posibles consecuencias e impactos que tiene la resistencia antihelmíntica en la bionomía de aislamientos resistentes y susceptibles. Basándonos en estos antecedentes, se estudió el comportamiento biológico de dichos aislamientos, sus efectos sobre la fisiopatología provocada en corderos inoculados experimentalmente y sus características parasitológicas.

Unos de los efectos más importantes del parasitismo gastrointestinal es la reducción del consumo de alimento del hospedador (Rossanigo *et al.*, 1986), generándole menores ganancias de peso, y consecuentemente pérdida de su condición corporal (Rossanigo *et al.*, 1992). Además, la haemonchosis puede provocar el aumento en el consumo de agua del animal para mantener la volemia (Rowe *et al.*, 1988). Sin embargo, en las variables fisiológicas del presente estudio no se pudo realizar análisis estadístico sobre el consumo de alimento ya que no se observó rechazo del mismo o anorexia en ninguno de los grupos experimentales, muy posiblemente debido a que la alimentación no se realizó ofreciendo alimento *ad libitum* (Rossanigo *et al.*, 1986). En contrapartida, el consumo de agua promedio del grupo resistente fue significativamente menor que el del grupo control, pero éste fue similar al del grupo susceptible. Rowe *et al.* (1988) tampoco obtuvieron diferencia significativa en la ingesta de alimento, pero si en la de agua, donde corderos de 9 meses de edad inoculados con aproximadamente 7500 L3 de *H. contortus*/animal, consumieron más agua que un grupo de corderos control. Estos resultados contrapuestos se explicarían porque en el grupo control (como así también en el susceptible) había un animal que diariamente consumía mucho más agua que sus compañeros, y que la dosis

infectiva utilizada fue aproximadamente tres veces menor (2000 L3/animal) que en el trabajo de Rowe *et al.* (1988).

Bajo las condiciones establecidas en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso promedio entre grupos experimentales. Mainigi *et al.* (1990) tampoco observaron diferencias significativas en la ganancia de peso en corderos de 5 a 12 meses de edad alimentados con heno de alta calidad *ad libitum* y un concentrado de granos y minerales, inoculados con 10000 L3 de *H. contortus* por animal al utilizar distintos aislamientos, uno susceptible a tiabendazol y otros con diferentes grados de resistencia a dicho fármaco. Contrariamente, Abbott *et al.* (1984) observaron pérdidas de peso de 3 a 4 kg en corderos de 6 a 8 meses destetados alimentados con heno bajo en proteínas *ad libitum*, inoculados con 1250 L3 de *H. contortus* por animal. Los corderos utilizados en el presente ensayo mantuvieron una condición corporal promedio entre 2,5 y 3 durante todo el período de observación, compatible con la ración ofrecida y el grado de parasitosis generado. Por estos motivos se infiere que los animales no perdieron peso y/o estado general debido a la buena calidad nutricional, a la baja dosis de inoculación utilizada y a la no administración *ad libitum* de alimento.

Los cuadros anémicos generados producto de la actividad hematófaga de *H. contortus* pueden evaluarse, además de los análisis sanguíneos, mediante el examen del color de las mucosas. En este sentido, el método FAMACHA® demostró ser, como en reportes anteriores (Van Wyk y Bath, 2002; Kaplan *et al.*, 2004; Getachew *et al.*, 2015), una metodología apropiada para monitorear el efecto hematófago de *H. contortus*. A partir de los 21 días PI, se evidenció un leve aumento en el promedio de la puntuación FAMACHA® en ambos grupos de corderos inoculados. Alba-Hurtado *et al.* (2010) observaron diferencias significativas en el resultado de FAMACHA® entre corderos inoculados con *H. contortus* y corderos no inoculados en la semana 11 PI. La diferencia en el momento de aparición de este signo con el presente ensayo puede ser atribuible a que los animales del citado trabajo recibieron una inoculación semanal de 1000 L3/cordero durante 6 semanas. Solo en los días 21 y 54 PI del presente estudio se encontraron diferencias significativas en los resultados de FAMACHA® entre los corderos inoculados con aislamientos resistente y susceptible. Esto se relaciona a la mayor implantación y desarrollo de adultos que presentó este último

aislamiento. En el día 63 PI no se encontraron diferencias significativas entre grupos, debido probablemente a una estimulación de la médula ósea para la producción de células sanguíneas (Jones y Allison 2007; Besier *et al.*, 2016b).

Además del método FAMACHA<sup>®</sup>, los cuadros anémicos que causa este parásito puede evaluarse mediante el análisis de los componentes sanguíneos. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, tanto en plasma como en suero, no se encontraron alteraciones importantes en los componentes analizados. En ningún momento hubo valores que pusieran en riesgo la vida de los corderos. Estos resultados pueden atribuirse a los bajos niveles de inoculación utilizados. Existen trabajos que inocularon experimentalmente mayor cantidad de L3/animal y los menores valores promedio de hematocrito rondaron entre 24 y 30% (Zajac *et al.*, 1990; Aumont *et al.*, 2003 Angulo-Cubillán *et al.*, 2010; Guzmán, 2014). Los motivos por el cual el valor promedio del hematocrito disminuyó también en el grupo control es difícil de explicar. Esto pudo deberse a: estrés crónico de los corderos producto de la adaptación al nuevo ambiente y a las condiciones del ensayo. Otra alternativa sería por valores altos de molibdeno hallados tras el análisis bioquímico del alimento utilizado (5,6 ppm; relación cobre:molibdeno 2:1). Este oligoelemento puede interferir con la absorción de cobre, necesario para la eritropoyesis. Una última opción surge del sangrado regular al que se sometieron los animales. Esta posibilidad fue propuesta en el trabajo de Abbott *et al.* (1984) donde también observaron una caída en el hematocrito en el grupo de corderos control sin inoculación.

La sangre del hospedador representa la fuente de alimentación necesaria para el desarrollo, supervivencia y reproducción de *H. contortus* dentro de éste. Como se mencionó anteriormente, la medición de los componentes sanguíneos es un reflejo del efecto hematófago y consiguiente patología provocada por este parásito. Al realizar el hemograma de los corderos, tanto el hematocrito como los conteos de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina mostraron una cinética similar. Hubo una caída en sus valores tras el establecimiento y posterior desarrollo de los parásitos que continuó hasta el día 54 PI. Hacia la finalización del estudio se observó una leve recuperación de estos valores, posiblemente debido al estímulo sobre la médula ósea para la producción de hematíes. Esto concuerda con otros trabajos de inoculación experimental con *H. contortus* (Hunter y Mackenzie, 1982; Albers *et al.*, 1989; Pralomkarn *et al.*, 1997; Aumont *et al.*,

2003; Angulo-Cubillán *et al.*, 2010; Bordoloi *et al.*, 2012; Rouatbi *et al.*, 2016) donde a partir de los 21-25 días PI estos índices hematológicos cayeron y se diferenciaron significativamente de un grupo control no inoculado. En el estudio de Bordoloi *et al.* (2012) los valores se restablecieron y no difirieron con este último grupo a los 42 días PI, a excepción de la concentración de hemoglobina que mantuvo su diferencia. Al igual que el presente trabajo, Angulo-Cubillán *et al.* (2010) encontraron los menores valores de hemoglobina alrededor del día 52-54 PI. En ambos estudios hubo leves recuperaciones hematológicas hacia el final. Contrariamente, también se ha reportado la falla en la recuperación de los dichos valores luego de 27 semanas de observación (Abbott *et al.*, 1984) o 90 días (Rouatbi *et al.*, 2016). En líneas generales esta cinética de los valores hematológicos se repite en los diferentes trabajos de inoculación experimental con *H. contortus*. Al hacer la comparación entre los aislamientos de *H. contortus* utilizados en este trabajo, el efecto provocado fue similar entre ellos. Estos hallazgos tienen similitud con los de Maingi *et al.* (1990), quienes utilizaron distintos aislamientos de *H. contortus* con diferentes grados de resistencia a tiabendazol y otro susceptible, donde no se observaron diferencias en el hematocrito. Aumont *et al.* (2003) tampoco encontraron diferencias en el hematocrito al comparar aislamientos de *H. contortus* de diferente origen geográfico, a diferencia de lo reportado por Angulo-Cubillán *et al.* (2010).

Los eosinófilos han sido implicados en la compleja respuesta inmune de tipo Th2 montada contra los nematodos gastrointestinales, actuando como células efectoras en conjunto con basófilos, mastocitos y linfocitos B, con la consiguiente producción de anticuerpos. En el presente estudio el recuento de eosinófilos mostró importante variación entre individuos. Llamativamente existieron diferencias significativas del grupo resistente con el control en los días 0, 21 y 43, pero más bajos con respecto a este último grupo, siendo esto difícil de explicar. Se encontraron valores de eosinófilos que nunca superaron a los de referencia en ningún animal, independientemente del aislamiento de *H. contortus* que recibió. Estos hallazgos pueden atribuirse a múltiples causas. Quizás, la única inoculación con una baja cantidad de larvas infectivas de *H. contortus* o el escaso contacto que se establece entre este parásito y el hospedador podría no ser suficiente para generar una respuesta inmune celular detectable. Además, la pobre o nula experiencia inmunológica de la categoría animal utilizada y el contacto frecuente

con los parásitos, necesario para lograr un mejor estímulo, podrían también explicar esta ausencia de respuesta. Sin embargo, y a pesar de que no hubo diferencias significativas entre aislamientos, los animales inoculados con *H. contortus* susceptible tuvieron valores promedio más elevados que el grupo de animales que recibió *H. contortus* resistente en todas las determinaciones, excepto en el último muestreo (día 68 PI). Estas diferencias, aunque no significativas, podrían estar relacionadas a la mayor cantidad de adultos promedio que se encontraron en los corderos del grupo susceptible. Resultados similares fueron obtenidos por Aumont *et al.* (2003), quienes tampoco encontraron efecto en el recuento de eosinófilos entre aislamientos de *H. contortus* de diferente origen geográfico en una inoculación experimental única. Sin embargo, obtuvieron diferencias entre razas, evidenciando la Black Belly de origen tropical un aumento en los eosinófilos al compararla con la raza europea INRA 401, pero rescatando que esto es poco común en casos de inoculaciones únicas, ya que una reacción eosinofílica más pronunciada solo se vio tras una estimulación previa. Zajac *et al.* (1990) tras una primera inoculación con 20000 L3 de *H. contortus*, tampoco observaron eosinofilia en tres razas diferentes de ovinos, St. Croix, Nativo de la Florida y Dorset/Rambouillet. Sin embargo, tras un segundo desafío, el número de eosinófilos aumentó bruscamente en las tres razas. Alba-Hurtado *et al.* (2010) reportaron un aumento en el recuento de eosinófilos en corderos inoculados en comparación con corderos control. Sin embargo, su protocolo de inoculación consistió en dosificaciones semanales de 1000 L3 de *H. contortus* durante 6 semanas. Estos trabajos demuestran que la estimulación antigénica frecuente es necesaria para un mejor desarrollo de la respuesta inmunitaria.

La hipoproteïnemia en ovinos con cuadros de haemonchosis no solo se debe al hábito hematófago del parásito, sino además a las pérdidas de proteína sérica por el aumento de la permeabilidad de la mucosa abomasal inflamada, a la mayor producción de moco y focos hemorrágicos tras su alimentación. En este experimento, la concentración sérica de proteínas totales disminuyó a partir del establecimiento de los parásitos, diferenciándose significativamente en ambos grupos inoculados en comparación con el control en el día 32 PI y manteniéndose así hasta la finalización del estudio. Resultados similares fueron observados por otros autores (Abbott *et al.*, 1984; Maingi *et al.*, 1990; Zajac *et al.*, 1990; Angulo-Cubillán *et al.*, 2010; Bordoloi *et al.*, 2012) luego de inoculaciones experimentales

con *H. contortus* y comparándolos con un grupo de corderos control sin inocular. En el presente ensayo no se registraron diferencias significativas en la proteinemia de los corderos inoculados con aislamientos resistente y susceptible. Contrariamente, Maingi *et al.* (1990) obtuvieron diferencias significativas en los valores de proteínas totales, con los corderos inoculados con el aislamiento susceptible a tiabendazol presentando menores valores que aquellos corderos que recibieron los aislamientos resistentes a este fármaco.

Si bien los valores promedio de albúmina sérica en los animales inoculados en el inicio de este trabajo (días 11 y 21) presentaron inexplicablemente mayores valores promedio con respecto al control, hacia final del mismo cayeron significativamente en los grupos parasitados producto posiblemente del progreso de la infección parasitaria. Sin embargo, la albuminemia sérica promedio de los diferentes grupos experimentales se mantuvo siempre dentro de los parámetros de referencia, no evidenciándose importante variación entre ellos. Gennari *et al.* (1991) no encontraron hipoalbuminemia en terneros inoculados experimentalmente con *H. placei* a una dosis de 500 L3/kg de peso. Según estos autores esta dosis es equivalente a 125 L3/kg de peso en corderos inoculados con *H. contortus*. Por lo tanto, es posible que las bajas dosis inoculadas en este estudio no hayan sido suficientes para provocar variaciones de este parámetro.

El aumento de los valores de pepsinógeno sérico es un indicativo indirecto de daño en la pared abomasal y utilizado también como ayuda diagnóstica para las parasitosis gástricas, entre otras patologías de este órgano. En el presente trabajo, los valores promedio de pepsinógeno sérico previo a la inoculación fue menor al valor promedio en el grupo susceptible, diferenciándose significativamente con los otros grupos. En el día 54 PI, el valor promedio en el grupo susceptible se diferenció significativamente del de los grupos resistente y control, pero con valor promedio superior. Estas diferencias pudieron ser causadas por la actividad registrada en un solo animal del grupo susceptible que presentó durante todas las determinaciones valores por encima de los de referencia. Si bien Kataria *et al.* (2008) encontraron una correlación significativa positiva entre valores de pepsinógeno sérico y ovinos parasitados naturalmente con *H. contortus*, el presente estudio no reveló aumento del primero, en concordancia con lo mencionado por Kerboeuf (1977), quien manifiesta que el aumento depende de la dosis de larvas administradas. Por ejemplo, Coop (1971)

encontró aumentos del pepsinógeno 3 a 5 días después de la administración de una gran cantidad de *H. contortus* (1000000 de L3), coincidiendo con la aparición de larvas L4 en las glándulas gástricas. Contrariamente, en una inoculación experimental con 12000 L3 de *H. contortus* en corderos, utilizando aislamientos de diferente origen geográfico, los animales tuvieron valores significativamente más altos de pepsinógeno sérico que los corderos sin inocular. Sin embargo, los niveles máximos se alcanzaron al final del período prepatente (día 14) y fueron de 300 mUTyr, valor que está dentro de los de referencia para esta especie. Además, no encontraron efecto del aislamiento de *H. contortus* utilizado (Angulo-Cubillán *et al.*, 2010). Las diferencias entre los ciclos histotróficos de los distintos nematodos abomasales también puede influir en esta variable. Cuando se utilizaron aislamientos de *T. circumcincta*, se detectó una elevación de la actividad de pepsinógeno en corderos inoculados por goteo durante 8 semanas, en comparación con corderos no inoculados (Barrett *et al.*, 1998). De esta manera, estos autores justificaron que los incrementos de los valores de pepsinógeno sérico no fueron marcados en su estudio, y podría ser la razón por la cual este parámetro no varió en el presente trabajo.

Si bien el recuento de HPG presenta gran variabilidad entre animales, es una técnica útil y práctica para el seguimiento y control de animales parasitados. La observación de huevos de nematodos en la materia fecal demuestra invariablemente la presencia de parásitos gastrointestinales en el hospedador y es una estimación indirecta de la carga parasitaria (Fiel *et al.*, 2011). En este trabajo, todos los corderos previamente a ser inoculados mostraron una carga insignificante de nematodos gastrointestinales confirmados por el resultado de HPG cero, teniendo en cuenta que la sensibilidad de la técnica es de 1/20. El día 19 PI todos los corderos presentaron huevos en su materia fecal, y esto es similar con lo citado en la bibliografía para corderos inoculados con *H. contortus* (Hunter y Mackenzie, 1982; Guzmán, 2014). Esto demostró que la inoculación con ambos aislamientos provocó un período prepatente dentro de lo citado para esta especie. Sin embargo, un estudio mostró diferencias del comienzo de este período entre aislamientos de diferentes regiones geográficas de *H. contortus* (Angulo-Cubillán *et al.*, 2010). Pasado el período de prepatencia en el presente trabajo, el promedio de este parámetro fue mayor en el grupo de corderos inoculados con el parásito susceptible durante todo el estudio. Además, se encontró gran variación de estos

valores entre individuos de un mismo grupo, evidenciado por el error estándar de 293,06 y de 359,81 para el aislamiento resistente y susceptible respectivamente. Esta variación fue mayor a medida que avanzó el ensayo. Sin embargo, tanto en los animales inoculados con el aislamiento susceptible como el resistente se registró un patrón de eliminación similar. Hubo una elevación constante de HPG promedio por grupo que hicieron un pico de eliminación alrededor del día 50 PI, con valores promedio de 8497 y 11610 para el aislamiento resistente y susceptible, respectivamente. Luego hubo un leve descenso en ambos grupos de animales hacia la finalización. Al analizar otros trabajos en los que se inoculó experimentalmente *H. contortus*, se observaron picos de eliminación de huevos entre la 4ta y 6ta semana PI (Dineen *et al.*, 1965; Abbott *et al.*, 1984; Zajac *et al.*, 1990; Idris *et al.*, 2011; Guzmán, 2014). Al comparar el promedio de HPG entre aislamientos de *H. contortus*, como en el presente trabajo, también se encontraron diferencias. Por ejemplo, Maingi *et al.* (1990) tuvieron resultados similares cuando compararon aislamientos de *H. contortus* con diferentes grados de resistencia a tiabendazol y otro susceptible. Este último mostró valores mayores de HPG promedio que el aislamiento con mayor grado de resistencia a este fármaco, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellos, pero sí las hubo entre el susceptible con el aislamiento menos resistente. Aumont *et al.* (2003) encontraron que un aislamiento de *H. contortus* originario de la isla de Guadalupe presentó mayor recuento de huevos que uno de Francia, en corderos de 5 meses de edad. Estos trabajos demuestran como *H. contortus* de diferentes aislamientos, sean resistentes o susceptibles a distintos fármacos, o de diversos orígenes geográficos, exhiben variaciones en los patrones parasitológicos y en los promedios de HPG. Sin embargo, está claro que las características parasitológicas que se miden dependen, además, de numerosos factores (dependientes del animal, del aislamiento, nutricionales, momento del año, o del ciclo) que varían entre los estudios, haciendo muchas veces difícil la extrapolación y comparación de resultados entre estos trabajos de investigación.

Dentro de las especies de nematodos gastrointestinales que afectan al ovino, *H. contortus* es considerada una de las más prolíficas, con capacidad de eliminar entre 5000 y 10000 huevos/hembra/día. Coincidentemente, las tres determinaciones de oviposición promedio por hembra evaluadas en este trabajo resultaron en una producción de huevos de 5500 a 9000 huevos por hembra y por

determinación. La mayor prolificidad se observó para ambos aislamientos de *H. contortus* evaluados, en correspondencia con los valores más altos de HPG promedio por grupo, en la segunda determinación (día 51 PI). Estos resultados difieren con los de Dineen *et al.* (1965), quienes al inocular *H. contortus* en corderos de 3 meses de edad, obtuvieron una producción de 40 huevos/hembra/día a los 48 días PI, con una producción de materia fecal de 300 g, por lo que estimaron una eliminación diaria de alrededor de 12000 huevos por hembra. Si en el presente trabajo no se tiene en cuenta a la materia fecal como covariable en el análisis estadístico, la cantidad de huevos por gramo/hembra que produjeron en dichas determinaciones es de un poco menos de la mitad (16 a 18) a los 51 días PI, para ambos aislamientos, susceptible y resistente, respectivamente. Los valores estimados para 500 g de materia fecal resultaron en una oviposición superior a 8000 huevos producidos por hembra en este período (51 días PI). Sin embargo, Dineen *et al.* (1965), manifiestan y citan que sus estimaciones están de acuerdo con la capacidad de producción máxima de huevos para *H. contortus* que registró Gordon (1948). En cuanto a la comparación entre aislamientos, Angulo-Cubillán *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas en la fertilidad relativa de hembras de *H. contortus* de diferente origen geográfico. Sin embargo, solo evaluaron este parámetro a los 85 días PI. Contrariamente, Aumont *et al.* (2003) estimaron una producción de huevos diaria mayor del aislamiento de *H. contortus* de la isla de Guadalupe en comparación con el de Francia. Por otro lado, al estudiar diferentes aspectos de aptitud entre aislamientos resistente y susceptible de *T. circumcincta*, Elard *et al.* (1998) tampoco encontraron diferencias significativas en la producción de huevos por parte de las hembras de este parásito. En el presente trabajo, en las dos primeras mediciones no hubo diferencias significativas entre aislamientos de este parámetro. Sin embargo, es destacable que el aislamiento resistente mantuvo valores similares de oviposición por hembra en las tres mediciones (alrededor de 8000 huevos/hembra), en tanto que el susceptible cayó significativamente en la última (alrededor de 5500 huevos/hembra). Una hipótesis que surge de este hallazgo es que exista una afección diferencial de la respuesta inmunitaria por parte del hospedador hacia cada aislamiento, como se propone más adelante.

Los huevos eliminados con las heces en condiciones ambientales ideales requieren un mínimo de 15 horas aproximadamente para eclosionar y

transformarse en L1 (Giudici *et al.*, 2013). Si bien esta fase del ciclo se midió en condiciones de laboratorio en el presente ensayo, el resultado de la técnica in vitro de eclosión de huevos mostró que el aislamiento de *H. contortus* susceptible tenía mayor porcentaje de huevos eclosionados que el resistente luego de 25 horas de incubación a 25°C (87,1% y 83,4% respectivamente), sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Resultados similares fueron reportados por Maingi *et al.* (1990) quienes no encontraron diferencias significativas entre los diferentes aislamientos de *H. contortus* resistentes a tiabendazol y el susceptible luego de 12, 24 o 36 hs de incubación, tanto a 18°C como 27°C.

La cantidad de especímenes de *H. contortus* adultos recuperados del abomaso luego de la realización de la necropsia permitió evaluar con exactitud la carga parasitaria y las lesiones provocadas por los parásitos. Los parásitos adultos recuperados (promedio grupo resistente, 951 y grupo susceptible, 1516) y el correspondiente porcentaje de implantación hallados en este ensayo fueron elevados para ambos aislamientos, 45,5 y 75,8% para el resistente y el susceptible respectivamente. En otros trabajos, *H. contortus* presentó menor establecimiento o tasa de implantación, en el orden del 20 a 43% (Maingi *et al.*, 1990; Zajac *et al.*, 1990; Lacroux *et al.*, 2006; Angulo-Cubillán *et al.*, 2010; Idris *et al.*, 2011; Guzmán, 2014). Si se estima que no hubo mortandad de parásitos adultos hasta el final ensayo, la comparación entre estos aislamientos resultó en una notable y alta capacidad mostrada por parte del aislamiento susceptible para desarrollarse sobre su hospedador. De forma análoga, MacLean *et al.* (1987) también encontraron que un aislamiento de *T. colubriformis* susceptible a BZD presentó mayor implantación, diferenciándose significativamente de uno resistente (44 y 23% respectivamente), en jerbos inoculados experimentalmente. En cambio, Elard *et al.* (1998) no encontraron diferencias significativas en la implantación de *T. circumcincta* resistente y susceptible en corderos (42% en promedio). También Maingi *et al.* (1990) reportaron que el aislamiento de *H. contortus* más resistente se implantó de forma similar al susceptible con porcentajes de alrededor del 40% para ambos. A medida que el aislamiento presentó mayor grado de resistencia a tiabendazol, éste estuvo acompañado por una mayor tasa de implantación, ya que al comparar entre el aislamiento de menor resistencia y el susceptible, encontraron diferencias significativas a favor de este último (22,8 y 40,8% respectivamente). Al analizar estos resultados, los autores propusieron que la selección inicial de

resistencia está asociada con una disminución en el éxito la tasa de implantación del parásito en el hospedador, y concluyeron que, con cada generación de presión de selección continua en un aislamiento parcialmente resistente, el éxito de su implantación o establecimiento de la población de parásitos mejora. En el presente trabajo, la mayor implantación por parte del aislamiento susceptible, podría haberse estado asociada a los valores más altos de HPG promedio que presentó este aislamiento.

La relación hembra:macho obtenida (alrededor de 1:1 para ambos casos) concuerdan con los trabajos de Idris *et al.* (2011) y Angulo-Cubillán *et al.* (2010). Estos últimos autores encontraron poca variación en la relación hembra:macho de los aislamientos de *H. contortus* de diferente origen geográfico (1:1,19 en promedio). En cambio, contrastan con el de Roberts y Swan (1981), que reportaron una relación 1:0,83. Sin embargo, la comparación con este último trabajo debe hacerse con cautela debido a que el tamaño de muestra para determinarla fue mucho mayor que el presente ensayo (un total de casi 90000 adultos en 61 animales).

*H. contortus* es el parásito de mayor longitud que se aloja en el abomaso de pequeños rumiantes. En el trabajo de Veglia (1916), el tamaño promedio de machos adultos se estableció entre 15 a 18 mm; y el de las hembras, entre 25 a 29 mm. En el presente estudio, si bien la longitud de las hembras adultas del aislamiento susceptible resultó algo mayor en comparación con las del resistente (28,13 y 27,13 mm respectivamente), esta diferencia no fue significativa, y ambas medidas estaban dentro del rango normal. Este hallazgo no significativo pudo deberse al escaso número de ejemplares medidos. Sin embargo, y a pesar de esta menor longitud promedio que se encontró en las hembras del aislamiento resistente, la oviposición promedio determinada en los tres momentos durante el ensayo (días 33, 51 y 67 PI), siempre fue mayor a favor de estas últimas, con diferencia significativa en la última determinación como se mencionó anteriormente. En cuanto a la comparación entre machos, la diferencia fue menos evidente. Estos resultados concuerdan con los de Angulo-Cubillán *et al.* (2010) donde los diferentes aislamientos de *H. contortus* con diferente origen geográfico tuvieron similares longitudes promedio.

Los cambios estructurales que puede sufrir el abomaso tras el daño generado por la presencia de parásitos puede resultar en la alteración del pH de su

contenido. El contenido abomasal a la necropsia de corderos inoculados con ambos aislamientos de *H. contortus* presentaban un pH promedio mayor al de los corderos no inoculados, con valores de 4 y 3,5 para el aislamiento resistente y susceptible, respectivamente. Sin embargo, al igual que el pepsinógeno sérico, las alteraciones significativas en los valores de pH de abomaso se han observado luego de la inoculación de grandes dosis de L3 de *H. contortus* o en inoculaciones por goteo (Christie; 1970; Coop, 1971; Nicholls *et al.*, 1987). Al inocular 40000 L3 de *H. contortus* en cabritos, Rahman y Collins (1991) registraron un pH abomasal promedio de 5,43, mientras que en animales que permanecieron no inoculados, el pH fue 3,3. Estas mediciones se realizaron a no más de los 21 días PI al realizar necropsias secuenciales. Se ha sugerido que la emergencia de las L4 de la mucosa abomasal es la responsable del aumento del pH abomasal, disminuyendo a valores casi normales luego de una sola inoculación a pesar de la presencia de los adultos (Simpson, 2000). A su vez, Scott *et al.* (1999) mencionaron que el hábito ambulatorio de *H. contortus* en comparación con aquellos nematodos que se circunscriben a nódulos en la mucosa abomasal, puede no afectar necesariamente las células parietales y principales del abomaso, no provocando cambios bruscos en el pH abomasal. La mono-inoculación, la baja cantidad de L3 administradas, el bajo número de muestras analizadas, la especie parasitaria utilizada y la medición del pH abomasal tras 68 días PI, podrían explicar la ausencia de grandes cambios en el pH abomasal en el presente ensayo.

Los parásitos que se localizan en el abomaso son considerados los más importantes desde el punto de vista económico debido a las consecuencias que provocan en el órgano parasitado, pudiendo afectar el normal proceso digestivo. Además, un abomaso más pesado producto del proceso inflamatorio tiene implicancia en el rendimiento de la res al momento de la faena de corderos con infecciones naturales. El peso relativo promedio de abomasos del grupo susceptible en este trabajo tendió a ser mayor con respecto al de los abomasos del grupo control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los pesos relativos de los corderos inoculados con los dos aislamientos resistente y susceptible. Si bien esta variable no fue exactamente la misma determinada en el trabajo de Angulo-Cubillán *et al.* (2010), éstos observaron diferencias importantes en el peso de la canal entre corderos inoculados con 12000 L3 de *H. contortus* y controles. Resultados aún más contradictorios observaron al medir el rendimiento

de la canal, ya que, al hacer la comparación entre aislamientos de orígenes geográficos diferentes, uno de estos grupos presentó mayor rendimiento de canal que los respectivos controles.

Como se mencionó anteriormente, las lesiones provocadas por *H. contortus* en el abomaso traen aparejada la inflamación del órgano. Estas lesiones consisten principalmente en coágulos y sangre libre en el contenido abomasal, petequias o focos hemorrágicos, formación de nódulos, edema y aumento de la mucosidad. Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente estudio no se observaron lesiones macroscópicas evidentes en los abomasos de los animales inoculados. Se observaron “pinchazos” pequeños muy sutiles y nódulos apenas visibles. Los pliegues abomasales de los animales inoculados con *H. contortus* se observaron levemente más engrosados y con cierto edema con respecto a los abomasos de animales controles. Resultados similares obtuvieron Scott *et al.* (1999), que utilizando un protocolo de inoculación inicial y luego por goteo mencionado anteriormente, describieron que el tejido fúndico de animales inoculados parecía más grueso que animales controles no inoculados, generando una hiperplasia generalizada solo en las capas superficiales del epitelio; a diferencia de otros parásitos abomasales donde los nódulos resultaron más evidentes. También Rahman y Collins (1991) tras una inoculación experimental en cabritos de 3 meses de edad con *H. contortus*, encontraron abomasos con paredes engrosadas y pliegues edematosos. En este último trabajo, la dosis que utilizaron fue mayor (40000 L3) al presente ensayo y las últimas observaciones las hicieron a los 21 días PI.

A nivel microscópico, las lesiones descritas en haemonchosis corresponden con la presencia de infiltrado inflamatorio focal o difuso en la mucosa y submucosa abomasal, principalmente caracterizado por la presencia de linfocitos, mastocitos, eosinófilos y leucocitos globulares (Stear y Murray, 1994; Giudici *et al.*, 2013; Ortolani *et al.*, 2013; Uzal *et al.*, 2016). En el presente estudio, el análisis microscópico de porciones de la mucosa de abomasos de corderos inoculados mostró, al igual que durante el examen macroscópico, leves indicios de lesión del órgano. Las características histológicas que se encontraron tales como, infiltrado linfocitario, eosinófilico y de leucocitos globulares, también fue descrito por Sommerville (1956). En su trabajo, describe la presencia de leucocitos globulares asociados a infiltración linfocitaria en ovejas parasitadas y en menor frecuencia en

animales libres de parásitos. Balic *et al.* (2000) inocularon experimentalmente *H. contortus* (de 10000 a 50000 L3) y describieron también infiltrado linfocitario, eosinofílico y de leucocitos globulares en las mucosas abomasales de corderos. En dicho trabajo se concluyó que la inoculación primaria no da lugar al desarrollo de una inmunidad protectora a nivel mucosal y que son necesarias múltiples inoculaciones con dosificación semanal para que ocurran. Es posible, que los resultados del presente trabajo, se deba a la única inoculación efectuada. En este sentido, Charleston (1965) mencionó que el número de eosinófilos en la mucosa abomasal de corderos inoculados diariamente con L3 fue el doble al de los corderos inoculados con una dosis única. Hunter y Mackenzie (1982) hicieron una evaluación histopatológica secuenciada tras una inoculación única de 10000 L3 de *H. contortus* a corderos de 6 meses de edad, describiendo un aumento progresivo del número de eosinófilos en la mucosa los primeros 12 días PI, que luego disminuyó hasta alcanzar a los 35 días niveles de pre inoculación. Además, no describieron leucocitos globulares en las mucosas abomasales y propusieron que su aparición requeriría de un período de más de 35 días. Si bien en los animales control utilizados en el presente ensayo también se encontraron algunos de estos tipos celulares en sus mucosas abomasales, aunque aparentemente en menor cantidad, es probable que haya sido el resultado de algún contacto previo que hayan tenido con parásitos gastrointestinales antes de ser trasladados al sitio de ensayo con estabulación a piso de concreto, a pesar del tratamiento antihelmíntico supresivo que recibieron.

También es importante remarcar que, al comparar los aislamientos de *H. contortus* utilizados con respecto a estas sutiles alteraciones macroscópicas y microscópicas abomasales, no hubo indicio de que alguno de ellos haya provocado efecto patológico más considerable que el otro, a pesar del mayor establecimiento que presentó el susceptible. Teniendo en cuenta la relación existente entre los pesos relativos y los hallazgos macroscópicos y microscópicos de los abomasos estudiados, es posible inferir que *H. contortus* en los causó una alteración patológica, independientemente de que las lesiones no hayan sido muy marcadas. Trabajos de Hunter y Mackenzie (1982), Rahman y Collins (1991) y Balic *et al.* (2000), que describen mejor estas lesiones, surgen de evaluaciones secuenciales y a mayores dosis de inoculación.

La hipobiosis es un fenómeno que le permite al parásito sobrevivir en circunstancias que naturalmente le son desfavorables. La ausencia de larvas de *H. contortus* inhibidas en el abomaso de los corderos del presente estudio puede ser producto de la única inoculación experimental realizada, la categoría de animales utilizada y/o la época en la cual se realizó el trabajo. En otro estudio se encontró solo 2% de L4 tras la administración de 3000 L3 de *H. contortus* a corderos más jóvenes (2 a 3,5 meses), considerando que el retraso en el desarrollo a L4 ocurrió en inoculaciones de otro grupo de animales que dosificaron diariamente 100 L3 durante 30 días (Dineen *et al.*, 1965).

Si bien la capacidad de un parásito de implantarse y desarrollarse en su hospedador representa una característica de importancia fisiopatológica, ya que a una mayor carga parasitaria, mayores son los efectos perjudiciales sobre el hospedador, ante la menor implantación que mostró el aislamiento resistente en este trabajo los efectos fisiopatológicos provocados sobre los corderos fueron similares entre los dos aislamientos utilizados. Según Albers *et al.* (1989), el grado de anemia que desarrollan los ovinos parasitados con *H. contortus* es el mejor predictor del nivel de producción en una majada; además agregan que la pérdida de sangre está más relacionada con la carga parasitaria que con la cantidad de huevos en la materia fecal. En este sentido, se podría suponer que el aislamiento de *H. contortus* resistente utilizado en el presente estudio tuvo mayor capacidad patogénica que el susceptible por lo antes mencionado. Además, y pese a la menor longitud promedio por parte de las hembras resistentes, la oviposición siempre fue mayor en éstas; teniendo en cuenta que una mayor longitud se relaciona con una mayor capacidad de ovipostura de una hembra (Stear *et al.*, 1997; Lacroux *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 2008). Otra posible explicación, como se mencionó anteriormente, sería la mortandad de hembras resistentes hacia el final del período de estudio con mantenimiento de su prolificidad de aquellas que permanecieron. Sin embargo, esto no pudo ser demostrado, dado que no se establecieron recuperaciones parasitarias periódicas. Esto está en relación con lo mencionado por distintos autores (Stear y Murray; 1994; Stear *et al.*, 1997; Claerebout y Vercruysse, 2000; Strain y Stear, 2001; Giudici *et al.*, 2013; Emery *et al.*, 2016) donde la respuesta inmunitaria puede expresarse prolongando el período prepatente, acortando la vida media del nematodo, disminuyendo la excreción de huevos y/o reduciendo el tamaño de los adultos.

Además, la cantidad promedio de eosinófilos fue mayor en la sangre de corderos que recibieron el aislamiento susceptible, a pesar de no haberse encontrado diferencia significativa. La incógnita quedará en saber si diferentes aislamientos pueden generar una respuesta inmune diferencial, o si la respuesta inmune que pudo haberse generado en el presente estudio fue suficiente como para afectar la vida media de las hembras resistentes y/o la fertilidad de las hembras susceptibles, a pesar de su mayor longitud promedio. Esto resulta difícil de explicar mediante el recuento de eosinófilos. Debe tenerse en cuenta, además, que los protocolos de inoculación para entender mejor la respuesta inmunológica deben simular infecciones frecuentes, como lo que ocurre en el pastoreo continuo, así como la medición de otros componentes celulares y humorales involucrados en la compleja respuesta inmune.

Parece evidente que existe un comportamiento diferencial intra-especie de *H. contortus*, ya sea al comparar aislamientos de diferente origen geográfico, o con diferentes grados de resistencia antihelmíntica y susceptibilidad a algún/os fármaco/s en particular. También se sabe que el desarrollo de resistencia antihelmíntica implica mecanismos diferentes en el genoma del parásito según el fármaco al cual se genera dicha resistencia. Probablemente esto también determina diferentes grados de aptitud parasitológica tanto en la relación parásito-hospedador como parásito-ambiente. La escasez de trabajos donde se compara esta aptitud entre aislamientos, sea en cuanto a la resistencia antihelmíntica o de variación geográfica, hace que los resultados no sean contundentes. Además, muchas variables contribuyen a la aptitud de un organismo. Otro problema es que las pequeñas diferencias en la aptitud de diferentes aislamientos pueden no detectarse debido a tamaño de muestras insuficiente.

Es necesario seguir profundizando estudios sobre estos comportamientos diferenciales entre aislamientos de los nematodos gastrointestinales en general, y de *H. contortus* en particular, en un contexto de mayor frecuencia de resistencia antihelmíntica reportada en la región y en el mundo. Los mismos deben abarcar no solo las características de las fases parasitarias dentro del hospedador sino, además, estudios epidemiológicos en las formas de vida libre, donde el cambio climático evidente y la intensificación ganadera de los sistemas productivos en nuestra región generan una constante co-evolución de la bionomía parasitaria. El mayor entendimiento de estos aspectos, sin duda traerá aparejado medidas de

control parasitario más eficientes, con usos racionales de antihelmínticos en combinación con alternativas no químicas para lograr un control parasitario sustentable, tanto con los niveles productivos de los animales como con el medio ambiente.

## 7. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones del presente ensayo se puede concluir que:

- ✓ Los caracteres fisiopatológicos evaluados mostraron leves alteraciones y escasas diferencias entre los aislamientos utilizados, pese a la mayor implantación promedio del aislamiento susceptible en los corderos. Estas leves alteraciones fisiopatológicas se debió a la poca cantidad de L3 administradas.
- ✓ Los caracteres parasitológicos evidenciaron un comportamiento diferencial, observado en los HPG, en la última determinación de oviposición/hembra/día y en la tasa de implantación.
- ✓ Es necesario continuar los estudios que abarquen tanto la fase parasítica de *H. contortus* en particular, y de los parásitos gastrointestinales en general, que afectan en mayor grado a los animales de producción, como también la fase de vida libre de los mismos, en un contexto de intensificación de los sistemas de producción y de cambio climático evidente.
- ✓ Es esperable que los cambios en la composición genética de una población de parásitos producto del desarrollo de resistencia antihelmíntica, provoquen alteraciones también en la aptitud de los diferentes aislamientos, y que esto provoque modificaciones en la adaptación por parte del hospedador.
- ✓ Comprender mejor estos aspectos de cambios de aptitud parasitaria consecuentemente traerá aparejado medidas de control complementarias al uso de antihelmínticos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, E.M.; PARKINS, J.J.; HOLMES, P.H. 1984. Studies on the pathophysiology of chronic ovine haemonchosis in Merino and Scottish Blackface lambs. *Parasitology*, 89: 585-596.
- ALBA-HURTADO, F.; ROMERO-ESCOBEDO, E.; MUÑOZ-GUZMÁN, M.A.; TORRES-HERNÁNDEZ, G.; BECERRIL-PÉREZ, C.M. 2010. Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 172: 277–282
- ALBERS, G.A.A.; GRAY, G.D.; LE JAMBRE, L.F.; PIPER, L.R.; BARGER, I. A.; BARKER, J.S.F. 1989. The effect of *Haemonchus contortus* on liveweight gain and wool growth in young merino sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 40: 419-432.
- ALLONBY, E.W. 1974. Studies on *Haemonchus contortus* infections in Merino sheep. PhD thesis. Veterinary School, University of Glasgow, Scotland. 166 p.
- ANDERSON, N. 1990. The challenge of endoparasitism: developments in the control of nematode infections of sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 50: 215-227.
- ANGULO-CUBILLÁN, F.J.; GARCÍA COIRADAS, L.; ALUNDA, J.M.; CUQUERELLA M.; DE LA FUENTE, C. 2010. Biological characterization and pathogenicity of three *Haemonchus contortus* isolates in primary infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 171: 99–105.
- ANZIANI, O.S.; MUCHIUT, S. 2014. Resistencia antihelmíntica múltiple (closantel, febendazol, ivermectina y levamisol) en *Haemonchus* spp parasitando ovinos en la provincia de Santa Fe. Ineficacia de una triple combinación de estas drogas para su control. *Revista de Medicina Veterinaria*, 95: 23-27.
- ARMOUR, J. 1980. The epidemiology of helminth disease in farm animals. *Veterinary Parasitology* 6: 7-46.
- AUMONT, G.; GRUNER, L.; HOSTACHE, G. 2003. Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Veterinary Parasitology*, 116: 139-150.
- BALIC, A.; BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N. T. 2000. Cellular profiles in the abomasal mucosa and lymph node during primary infection with *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 75: 109-120.

- BARRET, M.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J.F. 1998. Pathogenicity and immunogenicity of different isolates of *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, 76: 95–104.
- BESIER, R.B.; KAHN, L.P.; SARGISON, N.D.; VAN WYK, J.A. 2016a. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93: 181-238.
- BESIER, R.B.; KAHN, L.P.; SARGISON, N.D.; VAN WYK, J.A. 2016b. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93: 95-143.
- BIRD, J.; SHULAWB, W.P.; POPE, W.F.; BREMER, C.A. 2001. Control of anthelmintic resistant endoparasites in a commercial sheep flock through parasite community replacement. *Veterinary Parasitology* 97: 219-225.
- BLITZ, N. M.; GIBBS H. C. 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep - I. The induction of arrested development. *International Journal for Parasitology*. 2: 5-12.
- BORDOLOI, G.; JAS, R.; GHOSH, J.D. 2012. Changes in the haemato-biochemical pattern due to experimentally induced haemonchosis in Sahabadi sheep. *Journal of Parasitic Diseases*. 36 (1):101–105.
- CARACOSTANTOGOLO, J. CASTAÑO, R.; CUTULLÉ, CH.; CETRÁ, B.; LAMBERTI, R.; OLAECHEA, F.; ...; MORICI, G. 2005. Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. INTA. EEA Bariloche Comunicación Técnica PA N°484, pp.7-34.
- CARACOSTANTOGOLO, J.; ANZIANI, O.; ROMERO, J.; SUÁREZ, V.; FIEL, C. 2013. Resistencia a los antihelmínticos en Argentina. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay. pp. 256-282.
- CASTELLS, D.; NARI, A.; GAYO, V.; MEDEROS, A.; PEREIRA, D. 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos en Uruguay. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 149-174.
- CASTELLS, D.; ROMERO, J.; MEDEROS, A.; NARI, A. 2013. Control de nematodos gastrointestinales en ovinos. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 201-222.
- CERUTTI, J.; COOPER, L.; TORRENTS, J.; SUÁREZ, G.; ANZIANI, O.S. 2018. Eficacia reducida de derquantel y abamectina en ovinos y caprinos con *Haemonchus sp* resistentes a lactonas macrocíclicas. *Revista Veterinaria*, 29 (1): 22-25.

- CHARLESTON, W.A.G. 1965. Pathogenesis of experimental haemonchosis in sheep, with special reference to the development of resistance. *Journal of Comparative Pathology*, 75: 55-67.
- CHRISTIE, M.G. 1970. The fate of very large doses of *Haemonchus contortus* and their effect on conditions in the ovine abomasum. *Journal of Comparative Pathology*, 80: 89-100.
- CLAEREBOUT, E.; VERCRUYSSSE, J. 2000. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology*, 120 (Suppl.): 25-42.
- COLDITZ, I.G.; LE JAMBRE, L.F. 2008. Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 153: 93-99.
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44: 35-44.
- CONDE-ÁLVAREZ, C.; SALDAÑA-ZORRILLA, S.O. 2007. Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos, vulnerabilidad y adaptación. *Revista Ambiente y Desarrollo*. 23: 23-30.
- COOP, R.L. 1971. The effect of large doses of *Haemonchus contortus* on the level of plasma pepsinogen and the concentration of electrolytes in the abomasal fluid of sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 81: 213-219.
- CUTULLÉ, C.; EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; CASTAÑO ZUBIETA, R.; SCHAPIRO, J. 1999. Métodos *in vitro* para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica. *Veterinaria Argentina*, XVI (157): 514-521.
- DARGIE, J.D.; ALLONBY, E.W. 1975. Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in merino sheep: studies on red cell kinetics and the 'self-cure' phenomenon. *International Journal for Parasitology*, 5: 147-157.
- DEMELER, J.; KÜTTLER, U.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. 2010. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, 170: 61-70.
- DESCARGA, C.O.; MARGINEDA, C.A.; CONDE, B. 2016. Control de la helmintiasis gastrointestinal mediante FAMACHA® en un tambo caprino con resistencia a ivermectina, fenbendazole y levamisol. *Revista de Medicina Veterinaria*, 97(2): 8-13.

- DE GEA, G. 2007. El ganado lanar en Argentina. 2ª ed. Universidad Nacional de Río Cuarto: Córdoba, Argentina. 245 p.
- DINEEN, J.K.; DONALD, A.D.; WAGLAND, B.M.; JAN OFFNER. 1965. The dynamics of the host-parasite relationship III. The response of sheep to primary Infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 55: 515-525.
- EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; PEÑA, M.; SCHAPIRO, J.; MARANGUNICH, L.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Veterinary Parasitology*, 62: 189-197.
- ELARD, L.; SAUVE, C.; HUMBERT, J.F. 1998. Fitness of benzimidazole-resistant and -susceptible worms of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology*, 117: 571-578.
- EMERY, D.; HUNT, P.W.; LE JAMBRE, L.F. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? Invited Review. *International Journal for Parasitology*, 46: 755–769.
- FIEL, C.; ANZIANI, O.; SUÁREZ, V.; VÁZQUEZ, R.; EDDI, C.; ROMERO, J.; STEFFAN, P. 2001. Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis. *Veterinaria Argentina*. XVIII (171): 21-33.
- FIEL, C.A.; STEFFAN P.E.; FERREYRA, D.A. 2011. Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes. Técnicas de laboratorio e interpretación de los resultados. Abad Benjamín: Tandil. 143 p.
- FIEL, C.; STEFFAN, P.; ENTROCASSO, C. 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la pampa húmeda. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 29-58.
- FOX, M. T. 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology*, 72: 285-308.
- GENNARI, S.M.; VIEIRA BRESSAN, M.C.R.; ROGERO, J.R.; MACLEAN, J.M.; DUNCAN, J.L. 1991. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. *Veterinary Parasitology*, 38:163-172.
- GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. 2007. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Review. Parasite*, 14: 3-14.
- GETACHEW, T.; ALEMU, B.; SÖLKNER, J.; GIZAW, S.; HAILE, A.; GOSHEME, S.; NOTTER, D.R. 2015. Relative resistance of Menz and Washera sheep breeds to artificial infection with *Haemonchus contortus* in Highlands of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 47: 961–968.

- GIBBS, H. C. 1986. Hypobiosis in parasitic nematodes - an update. *Advances in Parasitology*, 25: 129-174.
- GIUDICI, C.; ENTROCASSO, C.; STEFFAN, P. 2013. Biología, fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel, C.; Nari, A. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control*. Hemisferio Sur. Uruguay, pp. 1-28.
- GÓMEZ, R.C.F. 2006. Valoración del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* como agente de control biológico de los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Tesis PhD. Facultad de Veterinaria; Universidad de Zaragoza. España. 203 p.
- GUZMÁN, M. 2014. Transmisión de *Haemonchus contortus* de ovino a bovino. Estudio de relaciones interespecíficas parásito-hospedador aplicando métodos epidemiológicos y moleculares en cepas resistentes y sensibles a benzimidazoles. Tesis PhD en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina. 95 p.
- HANSEN, J.; PERRY, B. 1994. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants: A Handbook. International Livestock Research Institute: Nairobi. 171p.
- HOLMES, P.H. 1993. Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52: 113-120.
- HOSTE, H.; CHARTIER, C.; LE FRILEUX, Y. 2002. Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk. *Veterinary Research*, 33: 531–545.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; QUIJADA, J.; CHAN-PEREZ, I.; DAKHEEL, M.M.; KOMMURU, D.S.; MUELLER-HARVEY, I.; TERRILL, T.H. 2016. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93: 239-351.
- HUNTER, A.R.; MACKENZIE, G. 1982. The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. *Journal of Helminthology*, 56: 135-144.
- IDRIS, A.; MOORS, E.; BUDNICK, C.; HERRMANN, A.; ERHARDT, G.; GAULY, M. 2011. Is the establishment rate and fecundity of *Haemonchus contortus* related to body or abomasal measurements in sheep?. *Animal*, 5(8):1276–1282
- IEZZI, S.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; NEJAMKIN, P.; LLOBERAS, M.; MANAZZA, J.; LANUSSE, C.; IMPERIALE, F. 2014. Closantel plasma and milk disposition in dairy goats: assessment of drug residues in cheese and ricotta *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37: 589–594.

- JACKSON, F.; COOP, R.L. 2007. Gastrointestinal helminthosis. In: Aitken, I.D. Diseases of sheep. Blackwell: Edimburgo, Escocia. pp. 185-195.
- JONES, M.L.; ALLISON, R.W. 2007. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 23: 377–402.
- KAMINSKY, R.; BAPST, B.; STEIN, P.A.; STREHLAU, G.A.; ALLAN, B.A.; HOSKING, B.C.; ROLFE, P.F.; SAGER, H. 2011. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 109:19–23.
- KAPLAN, R.M.; BURKE, J.M.; TERRILL, T.H.; MILLER, J.E.; GETZ, W.R.; MOBINI, S.; VATTA, A.F. 2004. Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Veterinary Parasitology*, 123: 105–120.
- KATARIA, N.; KATARIA, A.K.; GAHLOT A.K. 2008. Use of plasma gastrin and pepsinogen levels as diagnostic markers of abomasal dysfunction in Marwari sheep of arid tract. *Slovenian Veterinary Research*, 45 (4): 121-126
- KERBOEUF, D. 1977. Changes in pepsinogen, proteins and lipids in the serum during experimental haemoncosis in sheep. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 8 (3): 257-266.
- KOTZE, A.C.; PRICHARD, R.K. 2016. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Advances in Parasitology*, 93: 397-428.
- LACROUX, C.; NGUYEN, T.H.C.; ANDREOLETTI, O.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J.P.; JACQUIET, P. 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*, 37: 607-622.
- LAMB, J.; ELLIOTT, T.; CHAMBERS, M.; CHICK, B. 2017. Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Veterinary Parasitology*, 241: 48-51.
- LANUSSE, C.; ÁLVAREZ, L.; LIFSCHITZ, A.; SUÁREZ, G. 2013. Bases farmacológicas de la terapéutica antihelmíntica. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay; pp. 223-254.
- LANUSSE, C.E.; ALVAREZ, L.I.; LIFSCHITZ, A.L. 2016. Gaining insights into the pharmacology of anthelmintics using *Haemonchus contortus* as a model nematode. *Advances in Parasitology*, 93: 465-518.

- LEATHWICK, D.M. 2013. Managing anthelmintic resistance – Parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility. *Veterinary Parasitology*, 198: 145-153.
- LE JAMBRE, L.F., 1995. Relationship of blood loss to worms number, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *International Journal for Parasitology*, 25(3): 269-273.
- LLOBERAS, M.; ALVAREZ, L.; ENTROCASSO, C.; VIRKEL, G.; BALLENT, M.; MATE, L.; LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A. 2013. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 3: 20–27.
- LUKOVICH, R. 1981. Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los rumiantes en la República Argentina. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe, INTA: Argentina. 33 p.
- MACLEAN, J.M.; LEWIS, D.; HOLMES, P.H. 1987. The pathogenesis of benzimidazole-resistant and benzimidazole-susceptible strains of *Trichostrongylus colubriformis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Helminthology*, 61: 179-189.
- MAINGI, N.; SCOTT, M.E.; PRICHARD, R.K. 1990. Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology*, 100: 327-335.
- MALAN, F.S.; VAN WYK, J.A.; WESSELS, C.D. 2001. Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68: 165-174.
- MARTIN, P.J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R.G. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. *Australian Veterinary Journal*, 66(8): 236-240.
- MARTINS, A.C.; FORMIGONI BERGAMASCO, P.L.; FELIPPELLI, G.; TEBALDI, J.H.; FIGUEREDO DUARTE MORAES, M.; PEREIRA TESTI, A.J.; IVAN MOURA LAPERA, I.M.; LUX HOPPE, E.G. 2017. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep: fecal egg count reduction tests and randomized controlled trials. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 38(1):231-238.
- MEANA MAÑES, A.; ROJO VÁZQUEZ, F.A. 1999. Trichostrongilidosis y otras nematodosis. En: Cordero del Campillo, A. et al. *Parasitología Veterinaria*. Interamericana: Madrid, pp. 237-253.
- MEDEROS, A.E.; RAMOS, Z.; BANCHERO, G.E. 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors* 7(598): 1-4.

- MILLER, J.E.; KAPLAN, R.M.; PUGH, D.G. 2012. Internal parasites. In: Pugh, D.H.; Baird, A.N. Sheep and goat medicine. Elsevier: Maryland Heights, Missouri. pp. 106-125.
- MINISTERIO de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). 2015. Complejo ovino. Plan estratégico, agroalimentario y agroindustrial, participativo y federal. PEA<sup>2</sup> 2010-2020. 76 p.
- MINISTERIO de Ambiente y Desarrollo Sustentable (MAyDS). 2016. Informe del estado del ambiente. 454 p.
- MUCHIUT, S.; MILDENBERGER, M.; PUJATO, A.; ANZIANI, O.S. 2013. *Haemonchus contortus* con resistencia múltiple a los antihelmínticos de corta y larga acción y consideraciones sobre el impacto sanitario-productivo de este fenómeno en una majada de ovinos lecheros de la provincia de Santa Fé. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 12 (1-2): 77-85.
- MUCHIUT, S.; FERNÁNDEZ, S.; STEFFAN, P.; LLOBERAS, M.; LUQUE, S.; CARDOZO, P.; BERNAT, G.; RIVA, E.; FIEL, C. 2016. The recovery of fenbendazole efficacy on *Haemonchus contortus* by refugia management and worm population replacement. 8th Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock, 4–10 August, Belém, Brazil.
- NARI, A. 2002. Control de la resistencia a los antiparasitarios a la luz de los conocimientos actuales. [en línea] [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/parasitarias\\_bovinos/16-control\\_resistencia.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/16-control_resistencia.pdf) [consulta: julio 2019]
- NICHOLLS, C.D.; HAYES, P.R.; LEE, D.L. 1987. Physiological and microbiological changes in the abomasum of sheep infected with large doses of *Haemonchus contortus*. Journal of Comparative Pathology, 97: 299-308.
- NIEC, R. 1968. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. [en línea] Red de Helminología Para America Latina y el Caribe. FAO-INTA. <http://helminto.inta.gob.ar/Niec/Cultivo%20e%20Identificaci%C3%B3n%20de%20Larvas%20Infectantes%20de.pdf> [consulta: julio 2019]
- NISBET, A.J.; MEEUSEN, E.N.; GONZÁLEZ, J.F.; PIEDRAFITA, D.M. 2016. Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. Advances in Parasitology, 93: 353-396.
- OLAECHEA, F. 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la región patagónica Argentina. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 131-148.

- ORTOLANI, E.L.; DO RÊGO LEAL, M.L.; MINERVINO, A.H.H.; AIRES, A.R.; COOP, R.L.; JACKSON, F.; SUTTLE, N.F. 2013. Effects of parasitism on cellular immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 196: 230– 234.
- PÉREZ, J.; GARCIA, P. M.; HERNANDEZ, S.; MARTINEZ-MORENO, A.; MARTIN DE LAS MULAS, J.; CAMARA, S. 2001. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research*, 32: 463–473.
- PRALOMKARN, W.; PANDEY, V.S.; NGAMPONGSAI, W.; CHOLDUMRONGKUL, S.; SAITHANOO, S.; RATTANACHON, L.; VERHULST, A. 1997. Genetic resistance of three genotypes of goats to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 68: 79-90.
- PRICHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D.; MARTIN, I.C.A.; DONALD, A.D. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56: 239-250.
- PRICHARD, R.K. 1990. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *International Journal for Parasitology*. 20(4): 515-523.
- PRICHARD, R. 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54: 259-268.
- RAHMAN, W.A.; COLLINS, G.H. 1991. Infection of goats with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* histopathology and pH changes. *British Veterinary Journal*, 147: 569-574.
- RIBEIRO VILELA, V. L.; FERREIRA FEITOSA, T.; FIGUEIREDO LINHARES, E.; RODRIGUES ATHAYDE, A.C.; BELTRÃO MOLENTO, M.; SANTOS AZEVEDO, S. 2012. FAMACHA® method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions Northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 190: 281– 284.
- ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. 1949. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1: 99-102.
- ROBERTS, J.L.; SWAN, R.A. 1981. Quantitative studies of ovine haemonchosis. I. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. *Veterinary Parasitology*, 8: 165-171.
- ROMERO, J.R.; BOERO, C.A. 2002. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. *Analecta Veterinaria*. 21(1): 21-37.

- ROMERO, J.; ANZIANI, O.; CETRÁ, B.; FIEL, C. 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la región del NEA. En: Fiel, C.; Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 89-112.
- ROSSANIGO, C.E.; AVILA, J.D.; SAGER, R.L.; VÁSQUEZ, R.; POLI, M.A. 1986. Efecto de las cargas de helmintos gastrointestinales sobre el consumo y digestibilidad en terneros de destete. *Veterinaria Argentina* III (24): 345-353.
- ROSSANIGO, C.E.; AVILA, J.D.; SAGER, R.L. 1992. Parasitismo gastrointestinal subclínico en terneros de destete: sus efectos sobre el consumo, la digestibilidad y la ganancia de peso. *Revista de Medicina Veterinaria* 73(2): 88-93.
- ROSSANIGO, C.; SILVA COLOMBER, J. 1993. Nematodos gastrointestinales: efecto sobre la producción en cabras criollas de San Luis (Argentina). Estrategia de control. *Revista Argentina de Producción Animal* 13(3-4): 283-293.
- ROSSANIGO, C.E.; GRUNER, L. 1995. Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastro-intestinal nematodes of sheeps, cattle and deer. *Journal of Helminthology*, 69 (4): 357-362.
- ROSSANIGO, C. 2005. Control integrado de parásitos como herramienta para prevenir la resistencia antiparasitaria: evaluación de un sistema de bajo riesgo en invernada. *Revista FAO Producción y Sanidad Animal. Estudio. Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina.* 74: 79-87.
- ROSSANIGO, C.; PAGE, W. 2017. Evaluación de FAMACHA® en el control de nematodos gastrointestinales en cabras de San Luis (Argentina). *Revista de Investigaciones Agropecuarias.* 43(3): 239-246.
- ROUATBI, M.; GHARBI, M.; RJEIBI, M.R.; BEN SALEM, I.; AKKARI, H.; LASSOUED, N.; REKIK, M. 2016. Effect of the infection with the nematode *Haemonchus contortus* (Strongylida: Trichostrongylidae) on the haematological, biochemical, clinical and reproductive traits in rams. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.*, 83 (1): 1-8.
- ROWE, J.B.; NOLAN, J.V.; DE CHANEET, G.; TELENI, E.; HOLMES, P.H. 1988. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal of Nutrition*, 59: 125-139.
- ROWE, A.; MCMASTER, K.; EMERY D.; SANGSTER, N. 2008. *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Veterinary Parasitology*, 153: 285–293.
- RUSSEL, J.F.; DONEY, J.M.; GUNN, R. G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 72: 451-454.

- SALES, N.; LOVE, S. 2016. Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*, 228: 193-196.
- SARGISON, N. 2008. Parasitic gastroenteritis. In: Sargison N. *Sheep flock health. A planned approach*. John Wiley & Sons: New York, NY, pp. 149-191.
- SCOTT, I.; DICK, A.; IRVINE, J.; STEAR, M.J.; MCKELLAR, Q.A. 1999. The distribution of pepsinogen within the abomasa of cattle and sheep infected with *Ostertagia* spp. and sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 82: 145-159.
- SCOTT, P.R. 2007. Parasitic diseases. In: *Sheep Medicine..* Manson: Lonfon, UK. pp. 297-302.
- SERVICIO Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2018. Distribución de existencias ovinas por categoría - Marzo 2018. [en línea] <<https://www.argentina.gob.ar/files/existenciasovinasporprovinciamarzo2018xlsx-1>> [consulta: 05 junio 2019]
- SIMPSON. H.V. 2000. Pathophysiology of abomasal parasitism: is the host or parasite responsible? *Veterinary Journal*, 160: 177-191.
- SINGH, D.; SWARNKAR, C.P. 2008. Role of refugia in management of anthelmintic resistance in nematodes of small ruminants - a review. *Indian Journal of Small Ruminants*, 14: 141–80.
- SKERMAN, K.; HILLARD, J. 1966. *A handbook for studies of helminth parasites of ruminants*, FAO: Roma, IT. 196 p.
- SOMMERVILLE, R.I. 1956. The histology of tee ovine abomasum, and the relation of the globule leucocyte to nematode infestations. *Australian Veterinary Journal*, 237-240.
- STEAR, M.J.; MURRAY, M. 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 54: 161-176.
- STEAR, M.J.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; HOLMES, P.H.; MCKELLAR, Q. A.; PARK, M.; GETTINBY, G. 1997. How hosts control worms. *Nature* 389: 27.
- STEFFAN, P.; SÁNCHEZ, E.; ENTROCASSO, C.; FIEL, C.; LLOBERAS, M.; RIVA, E.; GUZMÁN, M. 2011. Eficacia de monepantel contra nematodos de ovinos con resistencia antihelmíntica múltiple en la región templada de Argentina. *Veterinaria Argentina*. 273 (18): 12-16.
- STRAIN, S.A.J.; STEAR, M. J. 2001. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*, 23: 527-531.

- STROMBERG, B.E. 1997. Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, 72: 247-264.
- SUMANO, L.H.S.; OCAMPO, C.L. 2006. En: Sumano López, H S.; Ocampo Camberos, L. *Farmacología Veterinaria*. MacGraw-Hill Interamericana: México, D.F. pp. 451-526.
- SUÁREZ, V.H.; BUSETTI, M.R.; BEDOTTI, D.O.; FORT, M.C. 1994. Parasitosis internas de los ovinos en la prov. de La Pampa. *Revista de la Facultad de Agronomía – UNLPam*, 7(2): 35-42.
- SUÁREZ, V.H.; OLAECHEA, F.V.; ROMERO, J.R.; ROSSANIGO, C.E. 2007. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA. EEA Anguil. Publicación Técnica N° 70, 296 p.
- SUÁREZ, V.; ROSSANIGO, C.; DESCARGA, C. 2013. Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la pampa central de Argentina. En: Fiel, C.; Nari, A. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control*. Hemisferio Sur: Uruguay, pp. 59-88.
- SUÁREZ, V.H.; CRISTEL, S.L. 2014. Risk factors for anthelmintic resistance development in cattle gastrointestinal nematodes in Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23 (2): 129-135.
- SUÁREZ, V.H.; FONDRAZ, M.; VIÑABAL, A.E.; SALATIN, A.O. 2014. Validación del método FAMACHA® para detectar anemia en caprinos lecheros en los valles templados del noroeste argentino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 95 (2): 4-11.
- SYKES, A. R. 2000. Environmental effects on animal production: the nutritional demands of nematode parasite exposure in sheep. *Asian-Aus. Journal of Animal Science*, 13 (Suppl A): 343-350.
- TEREFE, G.; GRISEZ, G.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J.P.; DORCHIES, P.; BRUNEL, J.P.; JACQUIET, P. 2007. *In vitro* pre-exposure of *Haemonchus contortus* L3 to blood eosinophils reduces their establishment potential in sheep. *Veterinary Research*, 38: 647-654.
- URIARTE, J.; CALVETE, C. 2012. El cambio climático modifica la epidemiología de los nematodos gastrointestinales. *Albéitar*, 158: 6-8.
- UZAL, F.A.; PLATTNER, B.L.; HOSTETTER, J.M. 2016. Alimentary system. In: Grant Maxie, M. (ed.) *Jubb, Kennedy, and Palmer's. Pathology of domestic animals v.2., 6th. ed.* University of Guelph: Ontario, Canada, pp 2-257.
- VAN WYK, J. A.; VAN SCHALKWYK, P.C. 1990. A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 35: 61-69.

- VAN WYK, J.A. 2001. Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68 (1): 55-67.
- VAN WYK, J.A.; BATH, G.F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*, 33: 509–529.
- VAN DEN BROM, R.; MOLL, L.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209: 278-280.
- VÁRADY, M.; CUDEKOVÁ, P.; CORBA, J. 2007. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. *Veterinary Parasitology*, 149: 104-110.
- VARGAS R.C.F. 2006. FAMACHA® control de la haemonchosis en caprinos. *Agronomía Mesoamericana*, 17: 79-88.
- VEGLIA, F. 1916. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud). *Veterinary Research Laboratories: Onderstepoort*, pp.351-465.
- WALLER, P.J.; CHANDRAWATHANI, P. 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22: 131-137.
- WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, Jr., J.B.; VERCRUYSE, J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58: 181-213.
- ZAJAC, A.M.; KRAKOWKA, S.; HERD, R.P.; MCCLURE, K. E. 1990. Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology*, 36: 221-235.