

Efecto del hipoclorito de sodio y extracto de cítricos en la reducción de la infestación con nematodos gastrointestinales resistentes a antihelmínticos en ovinos de pelo

The effect of sodium hypochlorite and a citric extract on the reduction of anthelmintic-resistant gastrointestinal nematodes in hair sheep

Roberto González Garduño^a, Juan Carlos Cordero Ortega^a, Gláfiro Torres Hernández^b,
Javier Arece García^c, Pedro Mendoza de Gíves^d

RESUMEN

El estudio se realizó en dos experimentos. En el primero el objetivo fue conocer el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y de un extracto de cítricos comercial sobre la sobrevivencia de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales, mediante observación a diferentes tiempos. A concentraciones mayores al 0.05 % de hipoclorito de sodio, las larvas se desvainaron en dos minutos y con concentraciones de 1.3 % las larvas murieron en una hora. Con el extracto de cítricos se observó mortalidad larvaria hasta las 12 h en todas las concentraciones utilizadas. En el segundo estudio el objetivo fue evaluar el efecto de la aplicación de los dos compuestos en los potreros sobre la reinfestación de ovinos en pastoreo. Se utilizaron 11 corderos en cada tratamiento; El grupo I) sin aplicación (testigo); II) aplicación de un litro de hipoclorito de sodio al 0.5 % por cada 20 m²; III) aplicación de extracto de cítricos al 5% en el pasto en la misma proporción que el anterior tratamiento. La información del peso vivo, volumen celular aglomerado (vca) y conteo de huevos de nematodos por gramo de heces (hpg) se analizó con el procedimiento GLM del SAS. El mayor efecto sobre el hpg y vca se obtuvo en el grupo de corderos en el potrero tratado con hipoclorito de sodio con menor hpg y mayor vca respecto al testigo y al extracto de cítricos (1,088 vs 1,997 y 2,891 hpg; 25.6 vs 23.1 y 23.5 %, respectivamente; $P < 0.05$).

PALABRAS CLAVE: Nematodos gastrointestinales, Hipoclorito de sodio, Extracto de cítricos, Volumen celular aglomerado, Ovinos de pelo.

ABSTRACT

The study included two experiments. The objective of experiment one was to learn about the *in vitro* effect of different sodium hypochlorite concentrations and a commercially-available citric extract on the survival of infestant larvae of gastrointestinal nematodes by observation at different time points. With $>0.05\%$ sodium hypochlorite concentrations, larvae lost their sheaths in two minutes, while at 1.3% concentration larvae died within one hour. Larval mortality also occurred as late as 12 h after exposure to the concentrations tested of citric extract. The second study was performed to evaluate the effect of applying both compounds directly on the grasslands on the re-infestation of grazing sheep. Eleven (11) lambs per treatment group were used, i.e.: treatment TI, untreated control; TII, application of one (1) liter 0.5% sodium hypochlorite/20 m²; TIII, application of 5% citric extract on the grass also at the rate of 1 L/20m². Data on live weight, packed cell volume (pcv), and nematode egg counts per gram (epg) of feces was analyzed using the GLM (SAS) procedure. The highest effect on epg and pcv was obtained in the group of lambs grazing the paddock treated with sodium hypochlorite, with the lowest epg and the highest pcv values as compared to both the controls and the group treated with citric extract (1,088 vs 1,997 and 2,891 epg; 25.6 vs 23.1 and 23.5 %, respectively; $P < 0.05$).

KEY WORDS: Gastrointestinal nematodes, Sodium hypochlorite, Citric extract, packed cell volume, Hair sheep.

Recibido el 20 de abril de 2009. Aceptado para su publicación el 21 de enero de 2010.

^a Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario del Sureste, Km 7.5, carretera Teapa-Vicente Guerrero, Apartado Postal 29, Teapa, 86800, Tabasco, México. robgardu@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

^b Programa de Ganadería. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

^c Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Indio, Hatuey, Matanzas. Cuba.

^d Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.

Los nematodos gastrointestinales (ngi) son los principales causantes de pérdidas económicas en la producción ovina del mundo⁽¹⁻⁴⁾. Debido a que su control ha sido mediante el uso de antihelmínticos, el uso frecuente de estos ha originado que con el tiempo los parásitos se hayan vuelto resistentes a los tres principales grupos de antihelmínticos disponibles comercialmente: benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas^(5,6,7), los que a pesar de que poseen diferente mecanismo de acción, a la fecha han perdido su efectividad, generándose graves problemas de resistencia lateral y múltiple a nivel mundial^(8,9).

La lentitud en la generación de nuevos antihelmínticos con diferente modo de acción hace necesario diseñar diferentes estrategias para el control de los nematodos, ya que la dependencia de un solo método de control ha demostrado ser poco eficaz a largo plazo, por lo que el control integrado ha adquirido gran importancia en las últimas fechas para desestabilizar poblaciones de parásitos resistentes⁽¹⁰⁻¹³⁾.

Uno de los aspectos que se ha dejado de lado por el costo y porque la aplicación se contrapone al contexto de una agricultura sustentable, es el uso de compuestos químicos que destruyan las larvas infestantes en campo⁽¹²⁾. Sin embargo, ante la fuerte problemática de la resistencia antihelmíntica, el uso de agentes como el hipoclorito de sodio que permite el desvenado de las larvas de ngi a dosis bajas, abre la posibilidad de que las larvas se expongan al ambiente y se logre la reducción de las poblaciones de ngi en los potreros, lo cual ayudará a reducir los riesgos de la parasitosis de ovinos en pastoreo. Sin embargo, hacen falta estudios sobre el efecto en las larvas y sobre sus repercusiones en los aspectos fisicoquímicos y microbiológicos, así como los que ocurren en la producción de los forrajes por la acción de este compuesto⁽¹⁴⁾. En la búsqueda de alternativas de control sustentable se ha considerado el uso de productos orgánicos como el extracto de cítricos, el cual es un aceite orgánico de las semillas de toronja (*Citrus máxima*) obtenido por extrusión y compresión, que combinado con ingredientes como ácido cítrico, ácido ascórbico, glicerina, alcohol isopropílico y agua destilada

Gastrointestinal nematodes (GIN), are world's number one cause of economic losses in sheep⁽¹⁻⁴⁾. Given that nematodes have been typically controlled by the use of anthelmintics, the frequent use of these drugs has resulted in the development of resistance by parasites to all three groups of commercially-available anthelmintics, i.e.: benzimidazoles, imidazothiazoles, and macrocyclic lactones^(5,6,7), which despite of having different modes of action, today they have lost effectiveness, causing serious cross, multi-drug resistance worldwide^(8,9).

The slow development of new drugs with different modes of action mandates the need of designing new gin control strategies, since depending on only one method of control has proven limited efficacy in the long range. Therefore, integrated control has become important in recent times to destabilize resistant parasite populations⁽¹⁰⁻¹³⁾.

One aspect that has been overlooked due to its cost and because application contravenes the principles of sustainable agriculture is the use of chemicals to destroy infestant larvae in the field⁽¹²⁾. Nevertheless, in the face of the problems associated with strong parasite resistance, the use of agents such as sodium hypochlorite that leads to the unshedding of larvae at low dose rates, brings about the possibility for larvae to get exposed to the environment thus decreasing GIN populations in the prairies, with the resulting reduced risk of parasite infestation of grazing sheep. Even though, further studies are required to learn about the effect of using sodium hypochlorite on larvae and its repercussions on various physicochemical and microbiological aspects, as well as on forage production⁽¹⁴⁾. The search of sustainable alternatives for the control of nematodes has lead to considering the use of organic products such as citric extracts, including organic oils obtained by extrusion/compression of grapefruit (*Citrus maxima*) seeds, which in combination with ingredients such as citric acid, ascorbic acid, glycerin, isopropyl alcohol and distilled water, act as broad-spectrum organic disinfectant originally designed against bacteria and molds. This product became very popular due to its efficacy in the disinfection of facilities and animal

actúan como desinfectante orgánico de amplio espectro, diseñado para eliminar bacterias y hongos. De manera popular se indicaba gran eficiencia en la desinfección de instalaciones y agua de bebida de animales, por lo que surgió el interés de conocer su efecto sobre *ngi*⁽¹⁵⁾.

Ante este panorama, se planteó como objetivo: conocer el efecto del hipoclorito de sodio y de un extracto de cítricos en la mortalidad de larvas de nematodos gastrointestinales *in vitro*, y observar el comportamiento productivo y la reinfestación con nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo en pastoreo.

El estudio constó de dos experimentos: uno *in vitro* y el otro de campo. El experimento *in vitro* se realizó en el laboratorio de Parasitología del Centro Regional Universitario del Sureste (CRUSE) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Teapa, Tabasco. Las larvas infestantes se obtuvieron de la localidad (*Haemonchus contortus* y *Cooperia curticei*) a partir de muestras fecales obtenidas directamente del recto de ovinos en pastoreo, en las cuales inicialmente se determinó la presencia de huevos de *ngi* con el método de McMaster, y aquellas muestras con el mayor conteo de huevos de nematodos por gramo de heces (hpg), se cultivaron en cajas de Petri durante ocho días para recuperar las larvas al noveno día mediante el método de migración larvaria con el aparato de Baermann⁽¹⁶⁾.

Se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (0.003, 0.05, 0.26 0.53 y 1.3 %) a partir de la dilución de hipoclorito de sodio comercial con agua destilada. También del extracto de cítricos se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (0.05, 5, 10 o 20 %), con la finalidad de llevar a cabo una confrontación *in vitro* entre las larvas infestantes de nematodos gastrointestinales y dichas soluciones, para observar en un microscopio compuesto (10X) y determinar su posible efecto nematicida.

Para esta prueba se colocó una gota de 100 μ l con un promedio de 25 larvas de *ngi*, obtenidas de los cultivos fecales, en una caja de Petri y a cada gota se le agregó otra gota de 100 μ l con una de las concentraciones de los productos indicados

drinking water, so that interest rose to learn about its effect on GINs⁽¹⁵⁾.

In view of the above, the purpose of this research was to study the effect of both sodium hypochlorite and citric extract on GIN larval mortality *in vitro*, and to observe the productive performance and nematodes re-infestation of grazing hair sheep.

The study included two experiments: one *in vitro* and one in the field.

The *in vitro* experiment was performed in the Parasitology Laboratory, South East University Regional Center (Laboratorio de Parasitología del Centro Regional Universitario del Sureste, CRUSE), Autonomous University of Chapingo. Infesting larvae (*Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*) were locally obtained from fecal samples taken directly from the rectum of grazing sheep. First, the presence of GIN eggs was determined using McMaster's method. Samples with the largest numbers of GIN eggs per gram (epg) of feces were cultured in Petri dishes for 8 d. Larvae were harvested on d 9 using the larval migration technique with Baermann's device⁽¹⁶⁾.

Different concentrations (0.003, 0.05, 0.26 0.53, and 1.3%) of sodium hypochlorite were prepared, starting with the commercially-available sodium hypochlorite solution in distilled water. Citric extract solutions were also prepared at different concentrations (0.05, 5, 10, and 20%), in order to perform the direct *in vitro* exposure of GIN infestant larvae to these solutions. Larvae were then observed in the microscope (10X) for any potential nematicide effect.

For the test, one 100 μ l drop was used to expose an average of 25 larvae obtained from fecal cultures in a Petri dish. To each drop, one additional 100 μ l drop of the above-mentioned product concentrations was added. Three repetitions were performed with each concentration and the average was obtained.

Observations were performed at 15-min intervals for the first 3 h after exposure, then at 6 and 12 h in order to visually observe the effect of sodium hypochlorite on larval motility/mortality (destruction).

anteriormente. De cada concentración se realizaron tres repeticiones y se obtuvo el promedio.

Una vez aplicados los tratamientos, se procedió a revisar las cajas de Petri cada 15 min en las primeras tres horas y posteriormente se revisaron a las 6 y 12 h, con lo cual se comprobó de manera visual el efecto del hipoclorito de sodio sobre la movilidad y mortalidad (destrucción) de las larvas.

A una concentración de 1.3 %, el hipoclorito de sodio fue capaz de provocar la muerte y destrucción de todas las larvas en tan solo una hora. A una concentración de 0.53 % las larvas aparecieron completamente destruidas a las dos y tres horas, mientras que con concentraciones menores a 0.26 %, las larvas permanecían vivas hasta después de 12 h. Tanto a las concentraciones antes mencionadas como a otras más bajas (0.05 %), el total de las larvas se desvainaron (Cuadro 1), con lo que se logró confirmar lo indicado en otro estudio⁽¹⁷⁾ en el que se observó el desvainado de las larvas a concentraciones cercanas al 0.05 %; y también se corroboró la mortalidad en las larvas de ngi a

Larval observation showed that 1.3% sodium hypochlorite killed and destroyed all GIN larvae in only one hour. At a 0.53% concentration, larvae were completely destroyed at 2 and 3 h, while the 0.26% concentration allowed larvae to survive for up to 12+ h. These and even lower sodium (0.05%) hypochlorite concentrations made larvae to lose their sheaths (Table 1) thus confirming the findings published elsewhere⁽¹⁷⁾, where larvae were naked at concentrations of nearly 0.05%. GIN larval mortality was also corroborated at >0.05% sodium hypochlorite concentrations, as shown in a different study⁽¹⁴⁾.

No larval sheath loss was observed with any of citric extract applications *in vitro*, but citric extract killing effectiveness was confirmed as late as 12 h post exposure. Given that citric extracts had not been used in the past, we should notice that larvae were not killed before 12 h, so that higher concentrations should be assayed.

The field experiment was performed in Pueblo Nuevo, Salto de Agua Municipality, Chiapas, Mexico, at an altitude of 85 m asl, coordinates:

Cuadro 1. Efecto del hipoclorito de sodio y extracto de cítricos en la mortalidad y eliminación de la vaina de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales de ovinos (%)

Table 1. Effect of sodium hypochlorite and citric extract on gastrointestinal nematode larval mortality and unsheathing in hair sheep (%)

| Product concentration | Unsheathing (%) | * Time post-treatment | | | | |
|------------------------|-----------------|-----------------------|---------|---------|---------|----------|
| | | 1 hour | 2 hours | 3 hours | 6 hours | 12 hours |
| Sodium hypochlorite, % | | | | | | |
| 1.3 | 100 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0.53 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0.26 | 100 | 0 | 0 | 10 | 100 | 100 |
| 0.05 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Citric extract, % | | | | | | |
| 20.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 5.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 0.05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Controls (water) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |

* Unsheathing occurred in all cases within an average of 2 min.

concentraciones mayores a 0.5 % de hipoclorito de sodio tal como se indica en otro estudio⁽¹⁴⁾.

En todas las aplicaciones de extracto de cítricos *in vitro*, no se observaron larvas desenvainadas y la efectividad del producto se pudo confirmar sólo hasta las 12 h de aplicado, momento en que las larvas aparecieron muertas. Debido a que este producto no se había utilizado con anterioridad, resulta notable que las larvas hayan aparecido muertas hasta las doce horas, por lo que sería recomendable estudiar otras concentraciones de dicho extracto.

El experimento de campo se realizó en Pueblo Nuevo, Municipio de Salto de Agua, Chiapas, a 85 msnm y 17° 34' N y 92° 29' O, clima Af (m) w" (i') g, cálido húmedo con lluvias todo el año. La temperatura promedio anual es 26.6 °C y la precipitación de 3,289 mm⁽¹⁸⁾.

Se utilizaron 11 corderos Pelibuey comercial (tamaño de muestra para obtener un nivel de confianza de 92 %) por tratamiento. En cada uno de los tres tratamientos se tuvieron tres hembras de cuatro meses (10.8 ± 2.3 kg) y ocho machos de siete meses de edad (19.3 ± 7.3 kg). Los animales se mantuvieron en pastoreo continuo en potreros (promedio de 900 m²) de pasto remolino (*Paspalum notatum*) y grama amarga (*P. conjugatum*). En la mañana los corderos salían a pastoreo a su potrero asignado y por las tardes se encerraban en una galera para protegerlos de las inclemencias del tiempo. Todos los grupos recibieron sales minerales y agua a libertad.

El experimento se realizó en tres etapas, cada una con una duración de sólo 20 días. Quince días antes de comenzar el experimento, los animales se desparasitaron con levamisol, pero a pesar de esto, se presentó eliminación de huevos, por lo que nuevamente se desparasitaron todos los corderos al inicio de la etapa I (11 de mayo de 2008) con closantel (10 mg kg⁻¹) + albendazol (10 mg kg⁻¹) con el fin de que al inicio del experimento no tuvieran nematodos gastrointestinales y por lo tanto conocer la infestación en los potreros. Sin embargo, debido a la alta eliminación de hpg durante primera

17° 34' N and 92° 29' W. Region's weather is Af (m) w" (i') g; i.e.: hot/humid with year-round rains, average annual temperature is 26.6 °C and rainfall 3,289 mm⁽¹⁸⁾.

Eleven (11) commercial hair Pelibuey lambs were used (a sample size to obtain a 92% confidence) per treatment group. In each of the three treatment groups, three 4-mo-old females (10.8 ± 2.3 kg) and eight 7-mo-old males (19.3 ± 7.3 kg) were used. Animals were kept on continuous grazing (average paddock size: 900 m²) on remolino (*Paspalum notatum*) and bitter (*P. conjugatum*) grass. Every morning, the lambs were taken out for grazing in their corresponding grasslands, and every evening they were returned to a weather-protected barn. All groups were given minerals and drinking water *ad libitum*.

The experiment included three stages, 20 d each. Fifteen (15) days prior to experiment start, lambs were dewormed with levamisole. Despite of this treatment, nematode eggs continued to be shed, so that all animals were dewormed again at the beginning of experimental stage 1 (May 11, 2008), with closantel (10 mg/kg⁻¹) + albendazole (10 mg/kg⁻¹) for them to be GIN-free at experiment start, leading us to discover grassland infestation. Nonetheless, due to the high numbers of eggs shed per gram of feces during stage 1, animals were dewormed again during stage 2 (June 2, 2008) with a different drug (ivermectin). GIN eggs continued to be shed, so that lambs were dewormed again in stage 3 (June 24, 2008), using nitroxinyl.

Treatment groups were: 1) 11 lambs grazing on an untreated paddock (control); 2) grazed on a paddock treated with 0.53% sodium hypochlorite sprayed at the rate of 1 L solution/20 m², concentration determined considering that dew and soil moisture would dilute the original concentration, in the hope that, at least, larvae would be unsheathed; 3) lambs grazed on a paddock treated with 5% citric extract also sprayed at the rate of 1 L/20 m²).

Animals in all treatment groups remained in the barn the day when paddocks were treated, in order to allow larval contact with the products for at

etapa, en la etapa II (2 de junio de 2008) se decidió cambiar de desparasitante (ivermectina) y por la misma situación, en la etapa III (24 de junio de 2008) se desparasitó con nitroxinil.

Los tratamientos fueron: los 11 corderos pastorearon en un potrero que no recibió ningún tratamiento (Testigo). El grupo 2 pastoreó en un potrero tratado con hipoclorito de sodio a una concentración de 0.53 % que se asperjó a razón de un litro de solución por cada 20 m²; el uso de esta concentración se determinó considerando que la humedad del rocío y del suelo diluiría la concentración original, y que como resultado al menos se pudiera lograr desenvainar a las larvas. Los corderos del grupo 3 pastorearon un potrero tratado con una solución de extracto de cítricos al 5% que se aplicó en la misma proporción que el hipoclorito de sodio (1 L por 20 m²).

Los animales de todos los tratamientos se mantuvieron en la galera el día en que se aplicó el producto a los potreros, esto para permitir el contacto del producto con las larvas al menos durante el día, y por otro lado que ocurriera la disipación del hipoclorito de sodio. Durante ese día los corderos se alimentaron con pasto picado y pasta de coco como suplemento.

Se realizó el pesaje de los corderos y se tomaron muestras de heces a los 8 y 20 días después de la desparasitación de los corderos para su análisis coproparasitológico por medio de la técnica de McMaster⁽¹⁶⁾. También se tomaron muestras de sangre para determinar el volumen celular aglomerado (vca) o microhematocrito⁽¹⁹⁾.

least one day, and also for sodium hypochlorite to dissipate. During that day, lambs were fed chopped grass supplemented with coconut meal.

Lambs were weighed and fecal samples were collected on d 8 and 20 after deworming, for a McMaster⁽¹⁶⁾ coprological analysis. Blood samples were also collected as to determine packed cell volumes (pcv)⁽¹⁹⁾.

The following variables were recorded: pcv, lamb live weight (kg), lamb gender (males/females), and egg numbers per gram of feces (epg). Epg results Log+1 – transformed in order to reduce the variance, approach normal distribution, and allow for treatment comparisons using Tukey's test, as published in a different paper⁽⁴⁾. Results were analyzed using the least-squares method (GLM, SAS)⁽²⁰⁾ to analyze the independent variables lamb gender, study stage, treatment, and their interactions.

Coproparasitoscopic results showed that lambs in the sodium hypochlorite-treated grassland (Table 2) had lower GIN egg counts ($P<0.05$) than the other two treatment groups. This result shows that spraying sodium hypochlorite on the grass leads to lower animal infestation levels, as suggested in another study⁽¹⁴⁾, where the chemical was seen to kill larvae and promote unsheathing, resulting in direct larval exposure to the environment. This leads increased larval vulnerability and reduced infestant larval populations in the field.

Despite of the differences between the lambs in the sodium hypochlorite-treated paddock and the other treatment groups, the average number of nematode

Cuadro 2. Eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de heces en los 3 grupos de ovinos

Table 2. Gastrointestinal nematode egg shedding per gram of feces in all 3 sheep groups

| Treatment | Number of observations | Average (epg) | Standard deviation |
|---|------------------------|---------------------|--------------------|
| Citric extract application on paddocks | 28 | 2891.1 ^b | 3461.4 |
| Controls | 30 | 1996.7 ^b | 2270.3 |
| Sodium hypochlorite application on paddocks | 33 | 1087.9 ^a | 868.6 |

Epg= Average number of gastrointestinal nematode eggs per gram of feces.

^{ab} Values with different superscripts are different ($P<0.05$).

Las variables registradas fueron: volumen celular aglomerado (vca), peso vivo de los animales (kg), sexo de los corderos (hembras y machos) y número de huevos por gramo de heces (hpg). Éste último fue transformado a $\text{Log} + 1$ para reducir la varianza, obtener una aproximación a la distribución normal y permitir la comparación de los tratamientos con la prueba de Tukey, tal como se ha realizado en otro estudio⁽⁴⁾. El análisis de la información se realizó con el método de mínimos cuadrados con el procedimiento GLM del SAS⁽²⁰⁾ en el que se analizaron las variables independientes sexo de los corderos, etapa de estudio y los tratamientos en sus diferentes interacciones.

Los resultados del estudio coproparasitoscópico indican que los corderos que pastoreaban en el potrero asperjado con hipoclorito de sodio (Cuadro 2) tuvieron menores conteos de huevos de nematodos gastrointestinales ($P < 0.05$) en comparación con los otros tratamientos. Este resultado indica que la aspersión de hipoclorito al pasto permitió una menor reinfestación de los animales, tal como lo ha sugerido otro estudio⁽¹⁴⁾, en el que se encontró que el hipoclorito provoca la muerte de las larvas y además promueve la liberación de la vaina, por lo tanto queda expuesta a las condiciones ambientales, y es posible reducir las poblaciones de larvas infestantes en campo al hacerlas vulnerables.

A pesar de las diferencias existentes entre el grupo de corderos pastoreando en potreros con hipoclorito de sodio y los otros grupos, el promedio de la eliminación de huevos de nematodos a los 20 días después de la desparasitación fue muy alto en los tres tratamientos, lo cual da idea de la gravedad de la parasitosis en condiciones de clima cálido, por lo que es necesario estudiar el efecto de un mayor número de aplicaciones para permitir disminuir las poblaciones en campo, ya que las larvas cuentan con hábitos de vida que hacen muy compleja la epidemiología de estas infecciones⁽²¹⁾ y además falta conocer el efecto en el suelo y sus repercusiones en los aspectos fisicoquímicos y microbiológicos, así como en la producción de los forrajes por la acción de este compuesto⁽¹⁴⁾.

eggs shed by d 20 after deworming was extremely high in all three treatment groups, which shows how serious infestations can be under hot weather conditions. It is thus necessary to study the effect of higher numbers of applications in order to decrease field nematode populations, since larval life habits make the epidemiology of these infections extremely complex⁽²¹⁾. In addition, further studies are needed to learn about the effect of sodium hypochlorite application on the soil, various physicochemical/microbiological and forage production repercussions⁽¹⁴⁾.

The low effect of sodium hypochlorite in the grassland might have been due to the continued reinfestation resulting from the constant GIN egg shedding, as shown by epg counts 8 d after deworming, suggesting that the anthelmintics used (closanthel + albendazole, ivermectin and nitroxinyl) were not effective. Given that the pre-patent period is 21 d, no GIN eggs were supposed to be seen within 21 d after deworming. We therefore conclude that nematodes have some level of resistance to the drugs used^(22,23,24). Results obtained using low efficacy drugs had an important impact, since four lambs died (one in the citric extract paddock, one in the sodium hypochlorite paddock, and two controls). Nevertheless, some specific technique⁽¹⁰⁾ would be needed to clarify the actual level of resistance.

Regarding pcv as an indicator of anemia, only a stage effect was found ($P < 0.05$). The general pcv average was 24.6 ± 4.0 at d 20 after treatment with closanthel + albendazole, and values were incrementally decreased with the time, so that at experiment end pcv values were 22.4 ± 6.0 %. This makes sense due to the continued effect of parasites throughout study stages, particularly because the nematode found was *H. contortus*.

Lambs in the sodium hypochlorite-treated paddock showed a trend ($P < 0.06$) for a higher pcv than lambs in both the citric extract-treated paddock and the controls (25.6 vs 23.5 and 23.1 ± 5.2 , respectively).

As far as daily weight gain is concerned, a significant effect ($P < 0.01$) was only found regarding study

El bajo efecto del hipoclorito de sodio en los potreros quizá se debió a la continua reinfestación por la constante eliminación de hpg, lo que se observó en su conteo en los muestreos a los ocho días después de la desparasitación, lo cual sugiere que los antihelmínticos que se utilizaron no fueron efectivos (closantel + albendazol, ivermectina y nitroxinil), ya que el periodo prepatente es de 21 días y por lo tanto desde la desparasitación e infestación inicial hasta los 21 días no se debería obtener eliminación de huevos, por lo que seguramente los nematodos presentaron algún grado de resistencia antihelmíntica hacia los productos utilizados^(22,23,24). Los resultados obtenidos por el uso de fármacos con baja efectividad llegaron a tener un impacto importante, ya que cuatro corderos fallecieron, uno del tratamiento con extracto de cítricos, uno del tratamiento con hipoclorito de sodio y dos del testigo. Sin embargo para dar a conocer el grado de resistencia debe comprobarse con alguna técnica específica⁽¹⁰⁾.

Respecto al volumen celular aglomerado o microhematocrito como indicador del grado de anemia en los animales, sólo se encontró efecto de la etapa ($P < 0.05$). El promedio general para el vca fue de 24.6 ± 4.0 a los 20 días después de la aplicación del closantel + albendazol y los valores se redujeron conforme pasó el tiempo hasta obtenerse al final del experimento 22.4 ± 6.0 %, lo cual lógicamente se debió al continuo efecto de los parásitos durante las etapas de estudio y especialmente porque el nematodo encontrado fue *H. contortus*.

Los corderos en el potrero de hipoclorito de sodio mostraron una tendencia ($P < 0.06$) a presentar mayor vca que los animales en los potreros con extracto y aquéllos en los potreros sin tratamiento (25.6 vs 23.5 y 23.1 ± 5.2 , respectivamente).

En lo que respecta a la ganancia diaria de peso sólo se encontró un efecto significativo ($P < 0.01$) en la etapa de estudio. En la primera y segunda etapa hubo ganancias de peso (38 y 44 g), mientras que durante la última etapa hubo una pérdida de peso de 80 g por animal. A pesar de que los conteos de hpg no fueron tan altos como en la

stage. In study stages 1 and 2, daily weight gains (38 and 44 g) were seen, while in stage 3 a weight loss of 80 g/animal was observed. Even though epg counts were not as high as those in stage 1, lamb damage was reflected in terms of both pcv and health status, since at experiment end four animals had died, giving an idea of how serious the infestation was⁽²⁵⁾.

Observations showed no apparent effect of sodium hypochlorite on the grass at the concentration used (0.53 %). Nevertheless, further studies are required to learn about the effect of this chemical on plants, and soil microflora/fauna, as a continuation of the study of applying sodium hypochlorite for the control of GINs.

From the above-mentioned results, we conclude that 0.05 % sodium hypochlorite has an unshedding *in vitro* effect on GIN infestant larvae, thus decreasing the re-infestation of grazing lambs, as shown in our field trial with decreased nematodes egg counts in the feces of lambs grazing sodium hypochlorite-treated paddocks.

End of english version

primera etapa, el daño a los corderos si se reflejó tanto en el vca como en el estado de salud de estos, ya que al final del experimento fallecieron cuatro animales, lo que da idea de la gravedad de la parasitosis⁽²⁵⁾.

Las observaciones realizadas del efecto del hipoclorito de sodio en el pasto a la concentración utilizada (0.53 %), no mostraron efecto aparente en el pasto. Sin embargo, es necesario realizar los estudios correspondientes para observar tanto el efecto sobre las plantas como en la microflora y fauna del suelo, lo cual será parte de la continuidad en el estudio de la aplicación de hipoclorito de sodio para el control de nematodos gastrointestinales.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el hipoclorito de sodio a una concentración de 0.05 % ejerce un efecto *in vitro* de desvainamiento

de larvas infestantes de ngi, lo que permite menor reinfestación de los ovinos en pastoreo, tal como se observó en la prueba de campo donde hubo una reducción del conteo de huevos de nematodos gastrointestinales en heces en los animales que pastorearon en los potreros tratados con hipoclorito de sodio.

LITERATURA CITADA

- Hooda V, Yadav CL, Chaudhri S, Rajpurohit BS. Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J Helminthol* 1999;(73):137-142.
- FAO. Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper. 2001.
- Amarante AFT, Bricarello PA, Huntley JF, Mazzolin LP, Gomes JC. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol* 2005;(128):99-107.
- Morteo-Gómez R, González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa G, Becerril-Pérez CM, Gallegos-Sánchez J, Aranda-Ibañez E. Efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia* 2004;(38):395-404.
- Torres-Acosta JFJ, Dzul-Canche U, Aguilar-Caballero AJ, Rodríguez-Vivas RI. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2003;(114):33-42.
- Montalvo-Aguilar X, López-Arellano ME, Vázquez-Prats VM, Liébano Hernández E, Mendoza de Gíves P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a Febendazol e Ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala, México. *Téc Pecú Méx* 2006;(44):81-90.
- Encalada-Mena LA, López-Arellano ME, Mendoza-de Gíves P, Liébano-Hernández E, Vázquez-Prats VM, Vera-Ycuspinera G. Primer reporte en México sobre la presencia de resistencia a Ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Vet Méx* 2008;39(4):423-428.
- Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M. Mini review. Anthelmintic resistance: The state of play revisited. *Life Sci* 2006;(79):2413-2431.
- Papadopoulos E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rum Res* 2008;(76):99-103.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006;(136):167-185.
- López-Aroche U, Salinas-Sánchez OD, Mendoza-de Gíves P, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Valladares-Cisneros G, Arias DM, Hernández-Velázquez V. *In vitro* nematicidal effect of medicinal plants from "Sierra de Huautla", Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. *J Helminthol* 2008;(81):1-8.
- Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rum Res* 2008;(77):159-173.
- Waller PJ. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Sci Technol* 2006;(126):277-289.
- Howell JM, Luginbuhl JM, Grice MJ, Anderson KL, Arau P, Flowers JR. Control of gastrointestinal parasite larvae of ruminant using nitrogen fertilizer, limestone and sodium hypochlorite solutions. *Small Rum Res* 1999;(32):197-204.
- Solusan. Productos Orgánicos [en línea]. <http://organicitrus.s5.com/>
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica. 1986.
- Campbell LR, Gaugler R. Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Int J Parasitol* 1991;(21):210-224.
- García, E. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Cuarta ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 1988.
- Coffin DL. Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. Trad. Santibáñez J, Urrusti J. Tercera ed. México: Ed. La Prensa Médica Mexicana; 1986.
- SAS. The SAS System for Windows. Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute. Inc.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Pennacchio S, Morgoglione ME, Santaniello M, Schioppi M, Fedel V. Gastrointestinal strongyle faecal egg count in goats: circadian rhythm and relationship with worm burden. *Vet Res Com* 2008;32(1):S191-S193.
- Van Wyk JA, Malan FS, Randles JL. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* with any of the anthelmintics? *Vet Parasitol* 1997;(70):111-112.
- Coles GC, Rhodes AC, Wolstenholme AJ. Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2005;(129):345-347.
- Sissay MM, Asefa A, Uggla A, Waller PJ. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. *Vet Parasitol* 2006;(135):337-346.
- González GR, Arece GJ, Morteo GR, Torres HG. Manejo de antihelmínticos para ovinos de pelo en el trópico. Centro Regional Universitario del Sureste. Universidad Autónoma Chapingo. Fundación Produce Tabasco, AC. 2006.

