

USO DE *Bacillus thuringiensis* EN CONTRA DEL CÉSTODO ZONOSIS *Dipylidium caninum*

Jair Millán Orozco^{1*}, Guadalupe Peña Chora², Virginio Aguirre Flores¹,
Agustín Orihuela Trujillo¹, Reyes Vásquez Rosales¹,
Jaime Solano Vergara³, Fernando Iván Flores Pérez¹

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

²Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

³Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario 154, Huitzilac, Morelos. Bellas Artes 1, Col. Amatitlán, 62410, Cuernavaca, Morelos.

Correo-e: millan.orozco@yahoo.com.mx, ivanfloresperez@yahoo.com.mx, penacg@cib.uaem.mx

*Autor para la correspondencia

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de seis cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre la motilidad de cestodos de *Dipylidium caninum in vitro*. Una concentración de 10mg/ml de esporas y cristales de la cepa GP526 *Bacillus thuringiensis* redujo la motilidad de *Dipylidium caninum* en 100% partir de las 9 horas posteriores a la incubación *in vitro* en comparación con el grupo control (P<0.05). Se concluye que la cepa GP526 de *B. thuringiensis* inhibe la motilidad de *D. caninum*. Una aplicación práctica de estos resultados, podría centrarse en el diseño de fármacos que contengan toxinas de *B. thuringiensis* y sean empleadas como antihelmínticos de amplio espectro en especies animales de compañía como el perro.

Palabras clave: *Dipylidium caninum*, *Bacillus thuringiensis*, Control biológico.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of six strains of *Bacillus thuringiensis* on the motility of cestodes of *Dipylidium caninum in vitro*. Ten mg/ml of spores and crystals of GP526 *Bacillus thuringiensis* strain decreased *Dipylidium caninum* motility 100%, nine hours after *in vitro* incubation in comparison with the control group (P<0.05). It was concluded that GP526 *Bacillus thuringiensis* strain inhibits motility in *Dipylidium caninum*. One practical application from these results could be the development of drugs containing toxins of *Bacillus thuringiensis* used as broad spectrum anthelmintics in company animal species like dogs.

Keywords: *Dipylidium caninum*, *Bacillus thuringiensis*, Biological control.

INTRODUCCIÓN

La Dipilidiasis es una enfermedad parasitaria causada por un céstodo adulto que infecta al perro, gato, y carnívoros silvestres (Molina *et al.*, 2003); además en ocasiones es capaz de infectar al humano, por lo que tiene importancia en salud pública (Bowman, 2004). A nivel mundial se ha referido que existen humanos infectados con *Dipylidium caninum* (*D. caninum*), al respecto es importante considerar que el perro convive de una manera cercana con el hombre y sobre todo con niños, que son los que tienen mayores posibilidades de infectarse (Bowman, 2004; Molina *et al.*, 2003).

En su estado adulto *D. caninum* tiene cuerpo aplanado dorsoventralmente, de color blanco amarillento o gris claro y para su estudio morfológico se puede dividir en tres regiones: escólex, cuello, y proglótidos; los cuales según su estado de desarrollo se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos (Quiroz, 2003; Bowman, 2004). El céstodo adulto puede llegar a medir varios centímetros, alcanzando una longitud de hasta 50cm (Hendrix, 1998)

Los céstodos no poseen aparato digestivo, por lo que su alimentación se realiza a través de su tegumento, o también llamada pared corporal (Hendrix, 1998), por un proceso de absorción del material semidigerido que se localiza en el hábitat intestinal del huésped, del cual extraen los nutrientes necesarios para sobrevivir y reproducirse, el céstodo *D. caninum* es un parásito hermafrodita (Bowman, 2004).

En diversos países como España se han referido frecuencias que van desde el 25% hasta un 38% de (Martínez-Carrasco *et al.*, 2007). En la República Checa, en el periodo 1998-2000, se refirió que la frecuencia de *D. caninum* fue de 0.7% de 26 perros detectados como positivos a parásitos gastrointestinales (Dubná *et al.*, 2007).

En Alemania, se determinó que la frecuencia en exámenes coprológicos para *D. caninum* practicados a perros y gatos fue de 0.4% y 0.1% respectivamente, de un total de 8438 caninos y 3167 felinos (Barutzki y Schaper, 2003). En la República de Irán, en 83 perros analizados en las provincias de Azarbaijan, Kordestan y Kermanshah, ubicadas al Oeste de Irán; la frecuencia de *D. caninum* fue de 38.5% (Dalimi *et al.*, 2006). En China, se ha observado una frecuencia de *D. caninum* del 1%, de un total de 371 perros examinados (Budke *et al.*, 2005).

En el Sur de África en colectas de muestras de sangre, heces, corazón, pulmones, y tracto gastrointestinal completo de 63 perros destinados a la eutanasia. Se concluyó que el céstodo más común fue *D. caninum*, con una frecuencia de 44% (Minnaar *et al.*, 2002).

Las frecuencias referidas anteriormente demuestran que el céstodo adulto se encuentra distribuido en varios países del mundo y que su frecuencia está entre 0.1 a un 44%.

Para México, específicamente en el estado de Yucatán, en 150 perros callejeros capturados de diversas partes de la Ciudad de Mérida, al realizar las respectivas necropsias se refirió que la prevalencia de *D. caninum* fue de 52%, y que en forma general las infecciones con dicho parásito tienen asociación con otras parasitosis (Rodríguez-Vivas *et al.*, 1996), por otra parte; en Querétaro en 201 perros sacrificados en el periodo Mayo-Septiembre de 2000, se refiere que la frecuencia de céstodos fue de 58.2% dentro de los cuales *D. caninum* estuvo presente en un 54.7%, y que las hembras se infectaron en mayor proporción que los machos (Fernández y Cantó, 2002).

En la Ciudad de México, en un estudio llevado a cabo en 120 perros, se encontraron parásitos en 102 perros (85%),

dentro de los cuales el céstodo más frecuente fue *D. caninum*, encontrándose en 72 perros, con una frecuencia del 60% (Eguía *et al.*, 2005).

Las frecuencias existentes justifican el estudiar a este céstodo ya que afecta a animales de compañía y desde luego como ya se mencionó al humano.

Con el propósito de controlar a *D. caninum* se han instituido tratamientos que consisten en el empleo de fármacos como el Prazicuantel en solución tópica, el cual presentó una eficacia del 100% contra *D. caninum* en gatos (Charles *et al.*, 2005).

Es importante considerar que la pulga, al ser el huésped que aloja a la fase de cisticercoide ha sido controlada con diversos métodos, que involucran desde medidas generales de higiene, el empleo de collares anti pulgas y hasta el uso de fármacos (McTier *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta la posibilidad de que *D. caninum* pueda desarrollar resistencia en un futuro a los productos químicos ya existentes utilizados para su control, o bien; que hoy en día ya se haya llevado a cabo tal proceso sin que se encuentre documentado, se planteó el uso de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) para llevar a cabo un control biológico alternativo de dicha parasitosis.

B. thuringiensis es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas, aerobia estricta y ubicua, pues se ha aislado de distintos sistemas como agua, suelo, insectos muertos, hojas de plantas, telarañas, entre otros; la cual es empleada para el control de plagas que afectan a cultivos (Schnepf *et al.*, 1998).

La actividad entomopatógena que *B. thuringiensis* posee se debe a la presencia de inclusiones proteínicas que pueden ser distinguidas como cristales, las cuales tienen propiedades insecticidas (Bravo *et*

al., 1998, Yu *et al.*, 2000), por tal motivo es de gran ayuda la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* para entender el papel de dicha bacteria en el ambiente y la distribución de genes; ya que desde la primera clonación de un gen Cry (Schnepf y Whiteley, 1981), más de 400 genes Cry han sido caracterizados, por lo cual; las proteínas que *B. thuringiensis* produce son un método de los más exitosos para llevar a cabo un control biológico de plagas agrícolas (Schnepf, 1995; Federici, 2005).

Los genes de las proteínas insecticidas Cry son clasificados en grupos de *cry1* a *cry28* y los grupos de proteínas Cyt en *cyt1* y *cyt2* (Yu *et al.*, 2000). Dichas proteínas son sintetizadas como protoxinas inactivadas de alrededor de 130 kDa (Bravo *et al.*, 2002), después de ser ingeridas por un insecto susceptible, las proteínas Cry se disuelven en el intestino del insecto donde la mayoría de éstas son activadas por las proteasas intestinales (Letowski *et al.*, 2005).

Por otra parte, *B. thuringiensis* produce un gran número de componentes extracelulares, tales como fosfolipasas, proteasas, quitinasas, y otras toxinas, tales como las β -exotoxinas, y proteínas S-layer, que pueden contribuir para su patogenicidad (Peña *et al.*, 2006).

La idea de emplear toxinas de *B. thuringiensis*, específicamente como método de control en parásitos ha sido ya llevada a cabo con el objetivo de afectar a nemátodos como *Caenorhabditis elegans*, *Pristionchus pacificus*, *Distolabrellus veechi*, *Panagrellus redivivus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Acrobelooides sp.*, y dichos resultados sobre los nemátodos fueron similares a lo referido para insectos (Wei *et al.*, 2003).

Se observó que la proteína Cry5B de *B. thuringiensis* mostró efectividad en contra del nematodo hematófago de humanos *Ancylostoma ceylanicum* de forma *in vitro* e

in vivo, disminuyendo el desarrollo de larvas y una reducción en la excreción de huevos por parte de las hembras adultas (Cappello *et al.*, 2006).

Las toxinas que *B. thuringiensis* produce son ampliamente utilizadas como control biológico (Schnepf *et al.*, 1998), ya que tienen la ventaja de ser inocuas para los humanos, vertebrados, plantas, y además son altamente biodegradables (Gómez *et al.*, 2001); por tal motivo, *B. thuringiensis* pudiera ser el candidato idóneo para realizar un control biológico debido a su baja toxicidad en los mamíferos (Siegel, 2001), y de ésta manera permitir su uso para el control de distintas parasitosis de los animales domésticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Obtención del céstodo adulto de *D. caninum*

Para la obtención del céstodo adulto se acudió al Centro de Control Canino de la Delegación Tláhuac ubicado en el D.F., una vez que el personal autorizado y capacitado sacrificó a los perros callejeros que son capturados, se procedió a obtener los intestinos delgados de cada uno de los perros mediante un corte transversal, además se llevó a cabo del registro del sexo de cada animal.

Los intestinos fueron ligados en cada uno de los extremos, colocados en bolsas de plástico y se identificaron con un número progresivo, y el material biológico fue trasladado a temperatura ambiente al Campo Experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA), para la recuperación del parásito, la cual consistió en diseccionar cada intestino delgado de manera individual y realizar la inspección correspondiente.

Los céstodos adultos de *D. caninum* fueron colocados en cajas de Petri con 30 ml de solución salina fisiológica al momento

de ser recuperados de los intestinos, una vez que se obtuvieron todos los céstodos; fueron lavados y depositados en cajas de Petri con 15 ml de solución salina fisiológica al 0.9% (PiSA) para llevar a cabo la formación de los distintos grupos.

B) Obtención de las cepas de *B. thuringiensis*

Las cepas se obtuvieron de la colección de *B. thuringiensis* del Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM, dichas cepas fueron:

GP123 aislada de un cadáver de larva de escarabajo (*Epilachna varivestis*).

GP139 aislada de un cadáver de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

GP491 aislada de un cadáver de un acaro (*Tetranychus sp.*).

GP525 aislada de un cadáver de nemátodo fitoparásito (*Meloydogine sp.*).

GP526 aislada de otro cadáver de nemátodo fitoparásito (*Meloydogine sp.*).

GP543 aislada de un cadáver de garrapata (*Rhipicephalus boophilus microplus*).

Además de evaluarse dos cepas obtenidas de la colección de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales fueron proporcionadas por la Dra. Alejandra Bravo de la Parra (IB16 e IB61) y que han mostrado tener efectividad en contra de nemátodos.

C) Producción de proteínas

Las cepas de *B. thuringiensis* se tienen guardadas en glicerol al 60 % y a -4 °C. Se tomó una asada de cultivo y se estrió en medio Luria Bertoni sólido, y se dejó crecer por 24 h a 28 °C para reactivar la cepa, enseguida se tomó una asada y se sembró nuevamente en medio sólido y se dejó esporular a durante 72 h a 27 °C. Se procedió a recuperar el cultivo en 1.0 ml de

agua estéril con una asa bacteriológica y se le agregó un inhibidor de proteasas, el cual fue fenil metanosulfonil fluoruro (PMSF), a una concentración final de 100 mM, para que no se degradará la proteína.

Posteriormente se cuantificó el contenido de proteína total por medio de la Técnica de Bradford (Bradford, 1976), se evaluó 1-10mg de proteína total.

D) Evaluación de motilidad

La prueba de motilidad se llevó a cabo mediante observación directa con una lámpara y una lupa en todos los grupos cada hora, durante 12 h. La evaluación fue realizada por tres operadores distintos y los datos obtenidos fueron registrados en una bitácora para su posterior análisis.

E) Ensayo *In vitro* para determinar la cepa a emplear

Se realizó un ensayo preliminar para evaluar la toxicidad de las cepas candidatas GP123, GP139, GP491, GP525, GP526, GP543, IB16 e IB61, a una concentración de 1 y 10 mg de proteína total/ml, además de un grupo testigo (sin proteína). Para éste ensayo se muestrearon 45 perros y para cada cepa se emplearon cinco segmentos de *Dipylidium caninum*.

F) Evaluación de distintas concentraciones de proteína de la cepa GP526

De las ocho cepas evaluadas, la cepa GP526 mostró mayor actividad, por lo que se seleccionó para realizar evaluaciones posteriores.

Para evaluar la cepa GP526 se obtuvieron 371 céstodos adultos, de un total de 229 perros adultos muestreados, en todos los casos se emplearon céstodos que tuvieran motilidad, con el número de

parásitos obtenidos se llevaron a cabo cinco bioensayos en los cuales se formaron los siguientes grupos.

G) Experimento 1

- 1) El primer Bioensayo estuvo constituido por las dosis de 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.25 mg/ml de la cepa GP526 de *B. thuringiensis*.

Para cada dosis se empleó un total de 42 segmentos de *D. caninum* que cuando menos midieran 3cm y en todos los casos presentaran motilidad al inicio de los experimentos, el número total de los parásitos empleados para cada dosis fueron obtenidos de cinco muestreos.

Para los bioensayos se emplearon cajas de Petri estériles y desechables de 100x15. En cada caja se colocaron los segmentos y después se le agregó las esporas y la proteína para cada dosis, posteriormente se aforó con solución salina Fisiológica a un volumen final de 20 ml. La motilidad se evaluó a las 0 y 12 h, post incubación, y además de manera simultánea se fijaron segmentos de *D. caninum* con formalina amortiguada al 10 %.

- 2) El segundo grupo fue empleado como testigo y se destinaron un total de 42 segmentos de *D. caninum* que cumplieran con las condiciones descritas para el primer grupo y en los cinco Bioensayos se incluyó este grupo. Así mismo, también se evaluó la motilidad y se llevó a cabo el proceso de fijación ya mencionado en el grupo 1.
- 3) En el tercer grupo, se llevaron a cabo los mismos procedimientos descritos para el grupo dos, pero con la variante de ser tratados con el principio activo comercial (Pyrantel/Oxantel) a una dosis de una tableta en 20 ml de solución salina fisiológica.

Los resultados experimentales se analizaron con una prueba de Z para la diferencia entre dos proporciones (Wayne, 2006).

H) Experimento 2

a) El primer grupo fue conformado por 20 segmentos del céstodo *D. caninum* con 10 mg/ml de la cepa GP526 y 20 ml de solución salina fisiológica, este experimento se llevó a cabo por duplicado.

b) El segundo grupo fue el testigo, en el cual se colocaron 20 segmentos de *D. caninum* con solo 20 ml de solución salina fisiológica.

c) En el tercer grupo se emplearon 20 segmentos de *D. caninum* a los cuales se les administró el principio activo comercial (Pyrantel/Oxantel) a una dosis de una tableta en 20 ml de solución salina fisiológica.

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba de Z para la diferencia entre dos proporciones (Wayne, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1

Se evaluaron las concentraciones de 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.25 mg/ml de la cepa GP526, el testigo y el tratamiento comercial, y se observó que únicamente el tratamiento comercial presentó la capacidad de reducir de manera significativa el número de parásitos *D. caninum* con motilidad, siendo capaz de reducir a cero la motilidad 12 h pos incubación. Se presenta un resumen de cinco ensayos llevados a cabo, en los que se empleo un número total de 42 parásitos por grupo (Cuadro 1).

Experimento 2

Al incrementar la concentración de la cepa GP526 de *B. thuringiensis* y compararla con el grupo testigo y comercial, se observa que la concentración de 10 mg/ml, es capaz de reducir de manera similar la motilidad en relación al tratamiento comercial, sin embargo, el tratamiento comercial lo lleva a cabo 5 h post-incubación, en tanto que el tratamiento con la toxina es capaz de llevarlo a cabo hasta las 9 h (Figura 1).

En el presente estudio se observó que la cepa GP526 de *B. thuringiensis* inhibió al 100% la motilidad del céstodo *D. caninum* de manera *in vitro*, este hallazgo coincide con un trabajo previo en el que 6 nemátodos distintos mostraron ser susceptibles a proteínas de *B. thuringiensis*, empleando los criterios de disminución de la motilidad, disminución en el crecimiento y cambios en la coloración de los parásitos (Wei *et al.*, 2003).

La utilidad de cepas de *B. thuringiensis* en contra de nemátodos de importancia veterinaria ha sido ya evaluada de manera *in vitro* en los géneros *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, y *Ostertagia circumcincta*, en los cuales se observaron efectos larvicidas y toxicidad al estadio en la fase adulta (Kotze *et al.*, 2005). Las observaciones emanadas de este estudio con *D. caninum* indican que la proteína producida por la cepa GP526 de *B. thuringiensis* posee un efecto negativo sobre el céstodo adulto al inhibir su viabilidad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman lo ya descrito para el nemátodo *Haemonchus contortus*, ya que las proteínas de la cepa GP526 de *B. thuringiensis* inhibieron al 100% la motilidad del céstodo adulto *D. caninum* en un tiempo de 9 horas de manera *in vitro*.

En otro estudio se llevo a cabo la caracterización de la actividad

antihelmíntica *in vitro* de la proteína recombinante purificada Cry5B de *B. thuringiensis* en contra de *Ancylostoma ceylanicum*, un parásito gastrointestinal hematófago de humanos, el cual mostró una toxicidad significativa en la fase adulta (Cappello *et al.*, 2006), estas observaciones coinciden con el efecto observado en la inhibición de la motilidad en *D. caninum* con la cepa GP526.

La efectividad del 100% para inhibir la motilidad observada en el presente estudio puede ser atribuida a la manera que tienen los céstodos de nutrirse (Hendrix, 1998) ya que a diferencia de los nematodos, éstos lo llevan a cabo por todo el tegumento, por lo que la superficie de absorción de la proteína podría ser mayor y más accesible en este sitio anatómico.

Otro factor importante es que la cepa empleada en este estudio fue asilada de un cadáver perteneciente a un nemátodo por lo que probablemente sea la razón o eso presente un mayor grado de patogenicidad para *D. caninum*.

Durante muchos años se han utilizado tratamientos químicos con la finalidad de controlar las diversas parasitosis de los animales domésticos, entre ellos se encuentran las lactonas macrocíclicas y los benzimidazoles, los cuales han mostrado una efectividad de 100% en algunos casos (Entrocasso *et al.*, 2008; Demeler *et al.*, 2009) y en otros han provocado resistencia (Howell *et al.*, 2008; Kumsa y Abebe, 2008).

No se ha referido resistencia para las toxinas que *B. thuringiensis* sintetiza en parásitos de importancia veterinaria, por lo que estrategias de control basadas en el empleo de *B. thuringiensis* son una opción viable y útil para poder llevar a cabo un control biológico o como tratamientos alternativos con las drogas terapéuticas ya existentes para evitar generar resistencia (Encalada-Mena *et al.*, 2008; Montalvo-Aguilar *et al.*, 2006).

En este estudio se observó que las proteínas totales de la cepa GP526 empleadas a una concentración de 10 mg/ml mostraron una efectividad similar al producto comercial (Pyrantel/Oxantel), ya que ambos tratamientos disminuyeron al 100% la motilidad del céstodo *D. caninum*, sin embargo el principio activo comercial causo este efecto a las 5 horas post incubación y la cepa GP526 a las 9 horas.

Con la proteína Cry5B se ha tratado al nematodo *Caenorhabditis elegans* y se observaron a nivel intestinal cambios morfológicos tales como formación de vacuolas en las células intestinales, constricciones a lo largo del intestino y degeneración intestinal evidente (Marroquin *et al.*, 2000). Lo que concuerda con los hallazgos obtenidos en el presente estudio ya que la toxina de *B. thuringiensis* de la cepa GP526 a una concentración de 10mg/ml fue capaz de alterar la morfología de *D. caninum* al disminuir el grosor del tegumento en cestodos adultos a las 9 horas post incubación.

CONCLUSIONES

Cabe mencionar que este estudio es pionero en evaluar las potencialidades de *B. thuringiensis* para el control de los céstodos. Futuras investigaciones serán necesarias para valorar el efecto *in vivo* que las proteínas puedan tener en perros parasitados, con el fin de evaluar la disminución de la parasitosis y el efecto que las toxinas pudieran tener sobre los animales tratados con *B. thuringiensis*. Así mismo serán necesarios estudios que involucren biología molecular para caracterizar los mecanismos de acción que las toxinas de *B. thuringiensis* tiene sobre *D. caninum*.

Una de las aplicaciones prácticas de los resultados obtenidos en el presente estudio podría centrarse en el diseño de fármacos que contengan proteínas de *B. thuringiensis* y sean empleadas como

antihelmínticos de amplio espectro en especies animales de compañía como el perro.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que una concentración de 10 mg/ml de esporas y cristales de la cepa

GP526 de *B. thuringiensis* reduce la motilidad del céstodo *D. caninum* en un 100 % a partir de las 9 horas posteriores a la incubación de forma *in vitro*, además de disminuir el grosor del tegumento y que estos efectos son comparables a los inducidos con el tratamiento comercial (Pyrantel/Oxantel).

Cuadro 1. Promedios obtenidos de la evaluación de motilidad *in vitro* de céstodos de *D. caninum* con distintas concentraciones de la cepa GP526 de *B. thuringiensis*.

Tiempo (horas)	Concentraciones de toxina de la cepa GP526 (mg/ml)					Testigo	Pyrantel - Oxantel 7.5 mg/ml
	2	1.5	1	0.5	0.25		
0	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}	8.4 ^{a1}
12	2.6 ^{a2}	2.2 ^{a2}	2.8 ^{a2}	2.2 ^{a2}	2.2 ^{a2}	4.2 ^{a2}	0 ^{b2}

Las literales indican diferencia (P<0.05) entre tratamientos.

Los números indican diferencia (P<0.05) entre horas en cada tratamiento.

Prueba de Z.

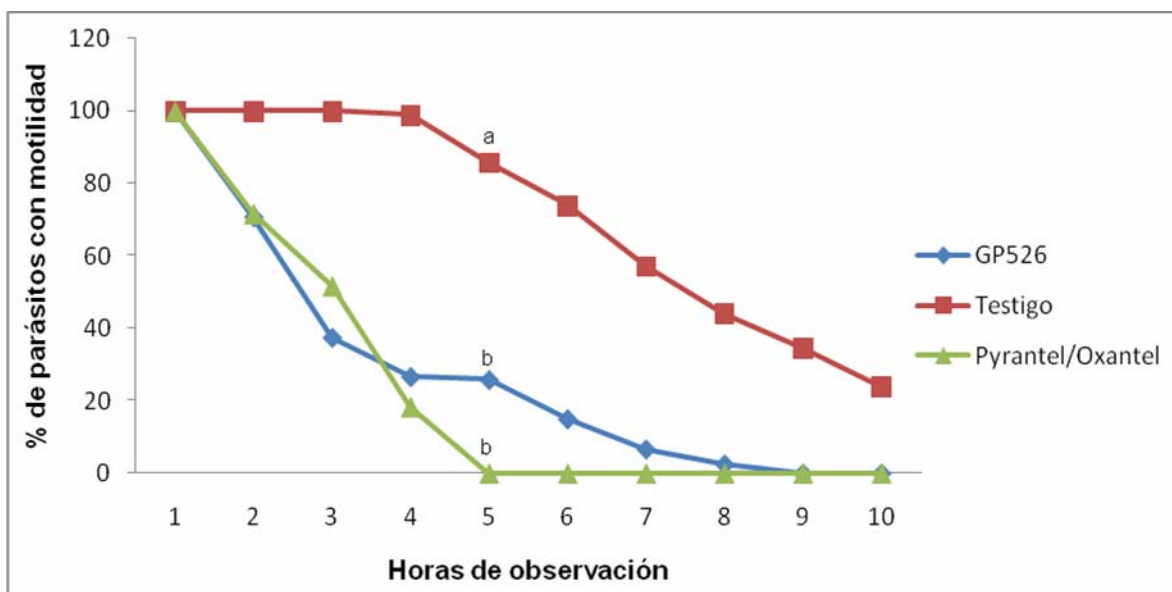


Figura 1. Motilidad *in vitro* de céstodos de *D. caninum* tratados con una concentración de 10 mg/ml de esporas y cristales de la cepa GP526 de *B. thuringiensis*.

Las literales indican diferencia estadística (P<0.05) entre tratamientos. Prueba de Z.

LITERATURA CITADA

- Barutzki D, Schaper R. 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitol. Res.* 90:148-150.
- Bowman DD. 2004. *Georgis' Parasitología para Veterinarios*. Elsevier. España. 155-156 pp.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4965-4972.
- Budke CM, Campos-Ponce M, Qian W, Torgerson PR. 2005. A canine purgation study and risk factor analysis for echinococcosis in a high endemic region of the Tibetan plateau. *Vet. Parasitol.* 127:43-49.
- Cappello M, Bungiro RD, Harrison LM, Bischof LJ, Griffiths JS, Barrows BD, Aroian RV. 2006. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma caninum*. *PNAS. USA.* 103:15154-15159.
- Charles SD., Altreuther G, Reinemeyer CR, Buch J, Settje T, Cruthers L, Kok DJ, Bowman DD, Kazacos KR, Jenkins DJ, Schein E. 2005. Evaluation of the efficacy of emodepside+praziquantel topical solution against cestode (*Dipylidium caninum*, *Taenia taeniaeformis*, and *Echinococcus multilocularis*) infection in cats. *Parasitol. Res.* 97:33-40.
- Dalimi A, Sattari A, Motamedi GH. 2006. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet. Parasitol.* 142:129-133.
- Demeler J, Van Zeveren AM, Kleinschmidt N, Vercruyse J, Höglund J, Koopmann R, Cabaret J, Claerebout E, Areskog M, von Samson-Himmelstjerna G. 2009. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet. Parasitol.* 160:109-115.
- Dubná S, Langrová I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J. 2007. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 145:120-128.
- Eguía P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet. Parasitol.* 127:139-146.
- Encalada-Mena LA, López-Arellano ME, Mendoza de Gives P, Liébano-Hernández E, Vázquez-Prats V, Vera-Ycuspinera G. 2008. Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Veterinaria México* 39:423-428.
- Entrocasso C, Alvarez L, Manazza J, Lifschitz A, Borda B, Virkel G, Mottier L, Lanusse C. 2008. Clinical efficacy assessment of the albendazole-ivermectin combination in lambs parasitized with resistant nematodes. *Vet. Parasitol.* 155:249-256.
- Federici BA. 2005. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invert. Pathol.* 89:30-38.
- Fernández F, Cantó GJ. Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. *Veterinaria México* 2002; 33:247-253.
- Gómez I, Oltean DI, Sánchez J, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using display. *J. Biol. Chem.* 276:28906-28912.
- Hendrix, C.M. 1998. *Diagnostic Veterinary Parasitology*. Mosby. USA. 83-87pp.
- Howell SB, Burke JM, Miller JE, Terrill TH, Valencia E, Williams MJ, Williamson LH, Zajac AM, Kaplan RM. 2008. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233:1913-1919.
- Kotze AC, O'Grady J, Gough JM, Pearson R, Bagnall NH, Kemp DH, Akhurst RJ. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living

- life-stages of nematode parasites of livestock. Int. J. Parasitol. 2005; 35:1013-1022.
- Kumsa B, Abebe G. 2008. Multiple anthelmintic resistance on a goat farm in Hawassa (southern Ethiopia). Trop. Anim. Health Prod. 41:655:662.
- Letowski J, Bravo A, Brousseau R, Masson L. 2005. Assessment of Cry1 Gene Contents of *Bacillus thuringiensis* Strains by Use of DNA Microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 71:5391-5398.
- Marroquin LD, Elyassnia D, Griffiths JS, Feitelson JL, Aroian RV. 2000. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation of Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics 155:1693-1699.
- Martínez-Carrasco C, Berriatua E, Garijo M, Martínez J, Alonso FD, Ruiz de Ybáñez R. 2007. Epidemiological Study of Non-systemic Parasitism in Dogs in Southeast Mediterranean Spain Assessed by Coprological and Post-mortem Examination. Zoonoses and Public Health 54:195-203.
- McTier TL, Jones RL, Holbert MS, Murphy MG, Watson P, Sun F, Smith DG, Rowan TG, Jernigan AD. 2000. Efficacy of selamectin against adult flea infestations (*Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis*) on dogs and cats. Vet. Parasitol. 91:187-199.
- Minnaar WN, Krecek RC, Fourie LJ. 2002. Helminths in dogs in peri-urban resource-limited community in Free State Province, South Africa. Vet. Parasitol. 107:343-349.
- Molina CP, Ogburn J, Adegboyega P. 2003. Infection by *Dipylidium caninum* in an Infant. Arch. Pathol. Lab. Med 127:157-159.
- Montalvo-Aguilar X, López-Arellano ME, Vázquez-Prats V, Liébano-Hernández E, Mendoza de Gives P. 2006. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. Técnica Pecuaria en México. 44:81-90.
- Peña G, Miranda-Rios, de la Riva G, Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Appl. Environ. Microbiol. 72:353-360.
- Quiroz-Romero H. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa. México. D.F. 311-312 pp.
- Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Domínguez-Alpizar JL, Aguilar-Flores JA, Cob-Galera LA. 1996. Prevalencia de *Dipylidium caninum* en perros callejeros de la Ciudad de Mérida, Yucatán, México. Rev. Biomed. 7:205-210.
- Schnepf HE, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.
- Schnepf HE, Whiteley HR. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78:2893-2897.
- Siegel JP. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. J. Invertebr. Pathol. 77:13-21.
- Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México, D.F. 2006. Wei J, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang S, Aroian RV. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:2760-2765.
- Yu J, Zhang Y, Pang Y, Xu M. 2000. A replication origin of *Bacillus thuringiensis*. Curr. Microbiol. 40:123-127.