

SELECCIÓN PARA LA RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS DE ALGUNAS ESPECIES DE TRICOSTRONGÍLIDOS OVINOS EN CONDICIONES EXPERIMENTALES. IMPLICACIONES EN EL CONTROL ANTIPARASITARIO

Álvarez-Sánchez, M.A., Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M.A. y Rojo-Vázquez, F.A.*
Dptº. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León
[*francisco.rojo@unileon.es](mailto:francisco.rojo@unileon.es)

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, uno de los problemas parasitarios que tiene mayor trascendencia económica y sanitaria en los pequeños rumiantes es la tricostrongilidosis, que afecta al 80-95% de los rebaños. Con independencia de datos puntuales, en general estas infecciones son responsables del 30% de las pérdidas en las producciones animales, asociadas a una disminución de la ganancia de peso y de la producción de leche.

Su control debe apoyarse en el conocimiento de la epidemiología, la administración de antihelmínticos y un manejo adecuado. En la práctica, se basa en la aplicación estratégica de antihelmínticos de amplio espectro, ya sea solos o combinados con los de espectro reducido para controlar otros procesos parasitarios, como la fasciolosis (Sangster, 1999; Jackson y Coop, 2000).

Sin embargo, el uso inadecuado de los antihelmínticos ha favorecido la aparición y el desarrollo de poblaciones de parásitos resistentes, lo que constituye un serio problema porque limita las posibilidades de uso de muchos antiparasitarios. En la práctica, la resistencia antihelmíntica (RA) aparece cuando una parte de la población parásita tolera dosis terapéuticas de un antihelmíntico que es eficaz contra otras poblaciones de la misma especie.

La RA en tricostrongílicos es un fenómeno mundial y afecta a las tres familias de antihelmínticos de amplio espectro estando implicados los principales géneros de tricostrongílicos: *Haemonchus*, *Teladorsagia* y *Trichostrongylus*. En otros países existe mucha información al respecto (Sangster, 1999; Jackson y Coop, 2000); los niveles de prevalencia más elevados se han denunciado en Sudamérica, Sudáfrica, Australia, pero también en algunos países de nuestro entorno, como UK, donde comprometen la viabilidad de las propias explotaciones.

En España se necesitan estudios en todo el país para determinar la extensión del problema. No obstante, diversos trabajos realizados por nosotros han puesto de manifiesto que más del 15% de los rebaños que hemos estudiado presentan resistencia a los benzimidazoles o a las lactonas macrocíclicas; y que en el caso de los imidazotiazoles, las cifras se aproximan al 35%.

Por tanto, actualmente el control de la tricostrongilidosis debe ser integrado, con objetivos bien definidos destacando entre ellos evitar la aparición y el desarrollo de la RA. Entre las repercusiones de la aparición de RA hay que señalar que una vez que se ha seleccionado una población resistente a un fármaco, en la mayoría de los casos no hay retorno a la susceptibilidad, aunque se utilicen fármacos con distinto mecanismo de acción en los siguientes tratamientos (Jackson y Coop, 2000).

Con objeto de mejorar el control de las tricostrongilidosis, hemos realizado -en condiciones experimentales y durante varias generaciones- la selección de una cepa de nematodos gastrointestinales resistente a ivermectina y levamisol para conocer la evolución de la RA y la posible reversión de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de las especies parásitas recuperadas en el coprocultivo post-tratamiento de una explotación con resistencia a la ivermectina y al levamisol mediante el método de reducción de huevos en las heces -FECRT- (Coles *et al.*, 1992) y el ensayo de inhibición de la

ingestión larvaria –LFIA– (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2005), se ha llevado a cabo, paralelamente, una selección *in vitro* e *in vivo* frente a ivermectina y levamisol.

En la **selección *in vitro*** se utilizó el ensayo de motilidad larvaria (LMA). Esta técnica se basa en la capacidad de las larvas 3 (L3) de migrar a través de una malla cuando se incuban en un medio con antihelmíntico. Para ello, se añadieron unas 5.000 L3 sobre una malla de nylon de 3 cm y un diámetro de poro de 30 μm que se colocó dentro de uno de los 6 pocillos de una placa microtiter. Se incubaron durante 2,5 horas a 23°C en una dilución de ivermectina (Merial) o levamisol (Sigma). La dilución de ivermectina y levamisol utilizada en el proceso de selección se calculó a partir de la DE_{50} obtenida en el LFIA. Finalmente, se recogieron las L3 que migraron al fondo de la placa.

Con las larvas recuperadas en el LMA, se infectaron corderos donadores. A los 30 días post-infección se procedió a realizar la **selección *in vivo***, para lo cual se trataron los corderos donadores con un 25% de la dosis recomendada de ivermectina (IVOMECS[®], Merial) y levamisol (ENDEX[®], Novartis) durante los tres primeros tratamientos. En los dos siguientes se utilizó el 40% de la dosis recomendada para ambos fármacos. Se realizó el recuento de huevos antes y después del tratamiento y un coprocultivo post-tratamiento para recuperar las L3 que se emplearon en la siguiente fase de selección. Con el fin de hacer un seguimiento de las cepas seleccionadas se realizaron varios LFIA para cada antihelmíntico en cada generación y se calculó el porcentaje de eficacia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de eficacia del levamisol y la ivermectina frente a la cepa utilizada en el estudio, mediante la realización del FECRT, fue del 86,54% y del 94,23%, respectivamente. Además, la DE_{50} observada en el LFIA fue de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ para el levamisol y de 0,0063 $\mu\text{g/ml}$ para la ivermectina, ambas por encima de los valores descritos en las cepas susceptibles (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2005).

En el coprocultivo realizado antes del tratamiento, se observaron las siguientes especies: *T. circumcincta* (6%), *Trichostrongylus* spp. (41%), *Chabertia ovina* (49%) y *H. contortus* (4%). Los resultados del coprocultivo tras el tratamiento con ivermectina fueron: 75% *Trichostrongylus* spp, 14% *T. circumcincta* y 11% *H. contortus*; mientras que tras el tratamiento con levamisol: 47% *T. circumcincta*, 49% *Trichostrongylus* spp y 4% *Nematodirus* spp.

Selección de resistencia frente a ivermectina.

Las larvas obtenidas de los coprocultivos post-tratamiento con ivermectina, se seleccionaron durante cinco generaciones sucesivas. En cada una, se llevaron a cabo diez LFIA para la detección de la resistencia a lactonas macrocíclicas e imidazotiazoles, además de la FECRT. Después del tratamiento con ivermectina (0,2 mg/Kg), se observó un descenso en los porcentajes de reducción desde la población inicial -generación 0- (94,23%) hasta la 5ª generación (60,70%). La reducción fue más marcada entre la 1ª y la 3ª generación, descendiendo de 90,50% a 70,35%. La especie más resistente a ivermectina fue *H. contortus*.

En el LFIA con ivermectina se produce un incremento estadísticamente significativo de las DE_{50} desde la 1ª a la 5ª generación. Además, las DE_{50} presentan diferencias significativas con las especies susceptibles de referencia y a medida que transcurre el proceso de selección, se aproximan los valores de las cepas resistentes de laboratorio.

En el LFIA con levamisol, también hay diferencias significativas en las DE_{50} a medida que avanza el proceso de selección. Sin embargo, en este caso descienden las DE_{50} desde la 1ª a la 5ª generación, siendo más marcado entre la 1ª y la 3ª generación. Además, las DE_{50} de la generación 0, 1 y 2 presentan diferencias significativas con las cepas susceptibles de referencia, mientras que no se observan estas diferencias con las DE_{50} de las generaciones 3, 4 y 5. Por tanto, se produce una reversión a la susceptibilidad al levamisol tras la

selección de resistencia a la ivermectina, no observándose diferencias significativas en la DE₅₀ a partir de la 3^o generación.

Selección de resistencia frente a levamisol

Como en el caso anterior, las larvas obtenidas de los coprocultivos post-tratamiento con levamisol se seleccionaron durante cinco generaciones sucesivas. Así, tras el tratamiento con levamisol (7,5 mg/Kg), se observó un descenso en los porcentajes de reducción desde la generación 0 (86,54%) hasta la 5^o (46,30%). Esta reducción era más marcada entre la 1^o y la 3^o generación, descendiendo de 79,50% a 57,50%. La especie más resistente a levamisol fue *T. circumcincta*.

En el LFIA con ivermectina, se produce un descenso de las DE₅₀ desde la 1^o a la 5^o generación y se observan diferencias significativas con las especies susceptibles de referencia, mientras que a medida que transcurre el proceso de selección, la diferencia con las DE₅₀ de las cepas resistentes de laboratorio aumenta. Por tanto, no se produce una completa reversión a la susceptibilidad.

En el LFIA con levamisol, hay diferencias significativas entre la 1^o y la 5^o generación. Sin embargo, entre la 1^o y la 2^o generación no hay estas diferencias. Estos resultados indican que el proceso de selección de resistencia frente al levamisol es más lento que frente a la ivermectina, donde sí se observan diferencias significativas entre las DE₅₀ de cada generación.

Es difícil explicar las razones por las que no ha habido reversión de la resistencia a ivermectina en el proceso de selección con levamisol, mientras que al contrario sí se ha producido. Sin embargo, la naturaleza multifactorial del proceso de selección y el tipo de mecanismo de resistencia condicionan que los genes que confieren resistencia se acumulen en mayor o en menor medida en la población, pudiendo ser ésta una de las posibles causas (Waller *et al.*, 1988).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Sánchez, M.A., Pérez García, J., Rojo-Vázquez, F.A. (2005). *Experimental Parasitology*, 110, 56-61.
- Coles, G.C.; Bauer, C.; Borgsteede, F.H.M.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. (1992). *Veterinary Parasitology*, 44, 35-44.
- Jackson, F.; Coop, R.L., (2000). *Parasitology*, 120, S95-S107.
- Sangster, N.C. (1999). *International Journal of Parasitology*, 29, 115-138.
- Waller, P.J.; Dobson, R.J., Axelsen, A. (1988). *Australian Veterinary Journal*, 65, 376-379.