

PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN OVINOS DE CASTILLA Y LEÓN NATURALMENTE INFECTADOS POR TRICOSTRONGÍLIDOS

Martínez-Valladares, M.^{1*}, Álvarez-Sánchez, M.², Famularo, M.R.², Cordero-Pérez, C.², Fernández-Pato, N.², Castañón-Ordóñez, L.², Rojo-Vázquez, F.A.^{1,2}

¹ Departamento de Sanidad Animal del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Grulleros, 24346. León. ² Facultad de Veterinaria de León, Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Sanidad Animal, 24071. León.

*E-mail: mmarva@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales en ganado ovino son las parasitosis más frecuentes en animales en pastoreo. El método de control más utilizado es la utilización de fármacos antihelmínticos; sin embargo, el inadecuado uso de los mismos ha dado lugar a la aparición de resistencia antihelmíntica (RA) frente a los más utilizados. Uno de los métodos de detección de RA en rebaños, es el ensayo de reducción de huevos en heces o Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) mediante el cual los animales se tratan con un determinado fármaco para posteriormente determinar la disminución de la excreción fecal de huevos. Por otra parte, actualmente se están poniendo a punto otros métodos *in vitro* más sensibles y que permiten la detección de resistencias de forma más rápida. Para la detección de la RA a los fármacos de la familia de los benzimidazoles se ha descrito el ensayo de eclosión de huevos o EHA (Egg Hatch Assay) que se basa en las propiedades ovicidas de estos antihelmínticos y en la capacidad de los huevos de cepas resistentes de embrionar y eclosionar a concentraciones más altas que los de las cepas susceptibles. Para detectar RA frente a lactonas macrocíclicas (LM) e imidazotiazoles (IM) se ha utilizado el ensayo de inhibición de la ingestión larvaria o LFIA (Larval Feeding Inhibition Assay) que trata de ver la inhibición – por parte de los antihelmínticos – de la ingestión de alimentos por las larvas de primer estadio (L1) de nematodos gastrointestinales (NGI). La prueba consiste en medir el nivel de ingestión de *Escherichia coli* marcada con un compuesto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína-FITC), por L1 incubadas en diferentes concentraciones de antihelmíntico. Para determinar la dosis que inhibe el 50% de la ingestión, se lleva a cabo una valoración de la fluorescencia en el intestino de la L1. Con objeto de conocer la prevalencia de la RA en benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas en rebaños de la CCAA de Castilla y León, hemos realizado este estudio, utilizando métodos *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante los años 2006-09 se tomaron muestras de heces en explotaciones de ganado ovino de Castilla y León con el fin de conocer la incidencia de las infecciones por NGI en aquellos rebaños que practicaban el pastoreo. De cada explotación se analizaron 20 muestras de diferentes animales mediante la técnica de flotación. Con el fin de determinar la prevalencia de la RA a los fármacos más utilizados se realizaron pruebas *in vivo* e *in vitro* en aquellas explotaciones positivas a la infección.

In vivo: Ensayo de Reducción de Huevos en Heces o FECRT

Se realizó en aquellos rebaños donde la media de huevos de tricostrongídeos por gramo de heces (hgh) fue igual o mayor a 150. En cada una de las explotaciones se seleccionaron 45 animales divididos en 3 grupos y cada uno de ellos tratado con un fármaco antihelmíntico diferente: G1 – albendazol (ABZ) (7,5 mg/kg p.v.), vía oral; G2 – levamisol (LEV) (7,5 mg/kg p.v.), vía oral; G3 – ivermectina (IV) (0,2 mg/kg p.v.), vía subcutánea. Cada oveja se pesó, se determinó su estado físico y condición corporal antes de realizar el tratamiento. Se tomaron muestras de heces a todos los animales el día de la desparasitación, día 0, y posteriormente entre 10-14 días post-tratamiento (p.t.). Todas las muestras se analizaron por flotación y el número de hgh en cada

grupo se estimó mediante el cálculo de la media aritmética. El porcentaje de reducción de huevos en heces para cada uno de los fármacos se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{FECRT (\%)} = (\text{hgh día 0} - \text{hgh día 10-14 p.t.}) / \text{hgh día 0} \times 100$$

Si el porcentaje de reducción de huevos en heces es mayor al 95%, es indicativo de que el fármaco ha sido eficaz. En caso de que la reducción sea entre el 90-95%, hay sospecha de resistencia y si es menor al 90% existe resistencia a dicho fármaco.

In vitro: EHA y LFIA

Los test in vitro se realizaron cuando la media de hgh en los rebaños fue menor a 150. En primer lugar se concentraron todos los huevos de las heces procedentes de cada una de las explotaciones.

Para poder llevar a cabo el EHA se siguió la técnica descrita por Coles et al. (1992). Los huevos se incubaron con 7 concentraciones seriadas de tiabendazol (TBZ) (0,01 – 0,7 µg/ml) durante 48 horas a 23°C. Tras este periodo de tiempo se calculó el porcentaje de huevos no embrionados para cada concentración y se estableció la dosis eficaz 50 (DE50), concentración de antihelmíntico necesaria para inhibir la eclosión del 50% de los huevos. En aquellos casos en que la DE50 fue superior a 0,1 µg/ml de TBZ la explotación se consideró resistente a los bencimidazoles.

El LFIA se realizó según el protocolo descrito por Álvarez-Sánchez et al. (2005) aunque con ligeras modificaciones tanto en la técnica como en las concentraciones utilizadas. A partir de la incubación de huevos a 23°C durante una noche se recuperaron las L1. Éstas se incubaron con 6 concentraciones de LEV (0,04–1,29 µg/ml) y/o IV (0,1–20ng/ml) conjuntamente con E. coli marcada con isotiocianato de fluoresceína como fuente de alimento para las larvas. Tras un periodo de incubación de 2 horas se determinó el porcentaje de L1 no fluorescentes para cada concentración y se determinó la DE50, concentración de antihelmíntico necesaria para inhibir la ingestión en el 50% de las L1. Valores de la DE50 por encima de 0,2 µg de LEV/ml y de 2,5 ng de IV/ml se asocian con la resistencia a los imidazotiazoles y a las lactonas macrocíclicas, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de tres años se analizaron muestras de heces de más de 150 explotaciones de ganado ovino de Castilla y León con el fin de detectar la incidencia de la infección por nematodos gastrointestinales y las posibles resistencias a fármacos antihelmínticos. De entre todos los rebaños, en 24 de éstos la media de hgh superó los 150 por lo que se realizó el FECRT y los resultados se muestran en la Tabla 1. Teniendo en cuenta las explotaciones resistentes y sospechosas de resistencia conjuntamente en el 40,8% de los rebaños se describió un fallo terapéutico del LEV, en el 20,8% de la IV y en el 9,6% del ABZ. En algunas de estas explotaciones se describieron resistencias a más de un fármaco. Una de las 24 explotaciones fue resistente al ABZ y LEV (4%), dos explotaciones resistentes al LEV e IV (8%) y otra sospechosa de resistencia también a estos dos últimos fármacos (4%).

En un estudio preliminar durante los años 1999-2003 (Álvarez-Sánchez et al., 2006) llevado a cabo en la misma zona geográfica se determinó que el 38,5% de los rebaños fueron resistentes (34,6%) o sospechosos (3,9%) al LEV, el 23,5% fueron resistentes (15,7%) o sospechosos (7,8%) a la IV y que el 14,3% fueron resistentes (12,7%) o sospechosos (1,6%) al ABZ. Al comparar los resultados a lo largo de un periodo de tiempo de 10 años (1999-2009) se observa que se ha mantenido constante la prevalencia de la RA en los tres grupos de antihelmínticos mediante el FECRT. Sin embargo, al realizar las pruebas in vitro se demuestra un incremento significativo en los índices de prevalencia sobre todo para el ABZ y LEV (Tabla 2).

El incremento de la prevalencia de la RA mediante los ensayos in vitro puede ser debido a una mayor sensibilidad de éstos, aunque son necesarios más estudios comparativos entre métodos in vivo e in vitro.

Tabla 1. Número de rebaños resistentes y sospechosos según el FECRT

FÁRMACOS	REBAÑOS	RESISTENTE	SOSPECHOSO
LEV	22	7 (31,8%)	2 (9%)
IV	24	2 (8,3%)	3 (12,5%)
ABZ	21	1 (4,8%)	1 (4,8%)

Tabla 2. Número de rebaños resistentes según las pruebas in vitro (EHA y LFIA)

FÁRMACOS	ENSAYOS	RESISTENTE
LEV	13 LFIA	8 (61,5%)
IV	17 LFIA	4 (23,5%)
ABZ	17 EHA	6 (35,3%)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez-Sánchez, M.A., Pérez-García, J., Bartley, D., Jackson, F. & Rojo-Vázquez, F.A. 2005. Exp. Parasitol. 110. 56-61.
- Alvarez-Sánchez, M.A, Pérez-García, J., Cruz-Rojo, M.A & Rojo-Vázquez, F.A. 2006. Parasitol Res. 99, 78-83.
- 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 (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol. 44, 35-44.

Agradecimientos: Estudio financiado por el INIA (Ref. RTA2006-00183-C03-02). Trabajo de M. Martínez-Valladares financiado con un contrato Jae-Doctor del CSIC.

ANTHELMINTIC RESISTANCE PREVALENCE IN NATURALLY INFECTED OVINE BY TRICOSTRONGYLIDAE IN CASTILLA Y LEÓN

ABSTRACT: Gastrointestinal nematode infections in sheep are the most common parasites found in grazing animals. The most widely control method is the use of anthelmintic drugs, but the inappropriate use of them has led to the emergence of anthelmintic resistance (AR) against the most common. The aim of this study is to determine the prevalence of AR in drugs belonging to the families of benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in farms of Castilla y León by in vivo and in vitro methods. With this objective the Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) was carried out in farms when the eggs per gram in faeces were higher than 150. Taking into account jointly the resistant flocks and the flocks borderlines between resistance and susceptibility, we found a treatment failure of levamisole (LEV) in 40.8% of farms, of ivermectine (IV) in 20.8% and of albendazole (ABZ) in 9.6%. When the average in a flock was less than 150 eggs per gram in faeces the in vitro Egg Hatch Assay (EHA), for the detection of benzimidazole resistance, and the Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA), for imidazothiazole and the macrocyclic lactone resistances, were carried out. According to these assays, 61.5% of flocks were LEV resistant, 35.3% IV resistant and 23.5% ABZ resistant. The increase of AR prevalence by in vitro techniques may be due to the greater sensitivity of these methods although we need more studies to compare in vivo and in vitro results.

Keywords: trichostrongylidae; anthelmintic resistance; FECRT; EHA; LFIA.