

Diagnóstico de nematodos gastroentéricos con resistencia a antihelmínticos en un rebaño ovino.

Clave de registro del proyecto: CIN2012A10052.

Colegio Indoamericano S. C. 6779.

Autores:

Cuéllar Silva Jorge.

Soberanis Tovar Cristian.

Asesores:

M. en C. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz.

Biól. Ana Lilia Moreno Trejo.

Área: Ciencias Biológicas, Químicas y de la salud.

Disciplina: Biología.

Tipo de investigación: Experimental.

Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México a 12 de Febrero del 2013.



DIAGNÓSTICO DE NEMATODOS GASTROENTÉRICOS CON RESISTENCIA A ANTIHELMÍNTICOS EN UN REBAÑO OVINO

RESUMEN

La infección por nematodos gastroentéricos (NGE) es una de las principales limitantes para la producción ovina en México, el uso indiscriminado de antihelmínticos químicos ha favorecido la aparición de NGE resistentes. El presente trabajo tuvo como objetivo diagnosticar la presencia de NGE con resistencia a antihelmínticos (RA) en un rebaño ovino del Estado de México. La investigación se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Para la detección de RA se empleó la prueba de reducción del recuento de huevos en materia fecal según las recomendaciones de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria. Se emplearon 60 ovinos infectados naturalmente con NGE, se formaron cuatro grupos de 15 animales que recibieron albendazol (grupo I), fenbendazol (grupo II) o closantel (grupo III), el grupo IV no recibió tratamiento y actuó como testigo. Se colectaron muestras de heces fecales y se procesaron con la técnica de Mc Master para conocer la cantidad de huevos por gramo de heces (hgh), por cultivo larvario se identificaron los géneros de NGE involucrados. Con los datos de hgh, se calculó la eficacia antiparasitaria y se procesaron empleando el programa de análisis de la reducción de conteo de huevos (RESO) para diagnosticar la presencia de RA. Los géneros identificados fueron *Haemonchus*, *Teladorsagia* y *Cooperia*. La eficacia antiparasitaria fue moderada o baja, 88.5% para albendazol, 85.8% en el fenbendazol y 77.5% para el closantel. Hubo la presencia de NGE con resistencia múltiple a albendazol, fenbendazol y closantel en los ovinos estudiados.

ABSTRACT

Infection with gastroenterical nematodes (NGE) is one of the main limiting factors for sheep production in Mexico as the indiscriminated use of deworming chemicals has favoured the emergence of resistant



NGE. The present work aimed to diagnose the presence of NGE with anthelmintics (RA) resistance in a sheep herd in the State of Mexico. The research was conducted at the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM. For the detection of RA the egg count reduction test in fecal matter was used according to the recommendations of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Sixty sheep naturally infected with NGE, were tested by forming four groups of 15 animals each which received albendazole (Group I), fenbendazole (Group II) or closantel (Group III), Group IV received no treatment and acted as a control group. Feces samples were collected and they were processed with Mc Master technique to learn the number of eggs per gram of feces (hgh), by larval breeding the NGE genera involved were identified. With the data of hgh, antiparasitic efficacy was calculated and data was processed by using the program of reduction of eggs (RESO) count analysis to diagnose the presence of RA. The genera identified were *Haemonchus*, *Cooperia*, and *Teladorsagia*. The parasite efficacy was moderate or low, 88.5% for albendazole, 85.8% in the fenbendazole and 77.5% for the closantel. There was the presence of NGE with multiple resistance to albendazole, fenbendazole and closantel in studied sheep.

INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los principales problemas sanitarios a nivel mundial en la producción animal son las parasitosis y dentro de estas, la nematodiasis gastroentérica o verminosis gástrica es la más común e importante ya que tiene una gran repercusión económica (Urquhart y col., 2002; Quiroz, 2003).

Las parasitosis tienen gran importancia económica e higiénica, muchas de ellas pueden manifestarse con tasas significativas de morbilidad y mortalidad e incluso, las que cursan de modo subclínico, determinan mermas en la producción animal, tanto en las explotaciones extensivas, como en las intensivas (Balic y col., 2000; Cuéllar, 2009).

La nematodiasis gastroentérica es una parasitosis multietiológica ocasionada por la acción conjunta de varios géneros y especies de parásitos que comparten los bovinos, ovinos y caprinos y puede considerarse un complejo parasitario causante del síndrome de mala digestión y mala absorción



(Aguilar y col., 2009). Entre esos parásitos sobresale el género *Haemonchus* prácticamente en todo el país (http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=144&Itemid=2).

Desgraciadamente uno de los problemas que se han generado por el uso masivo e indiscriminado de los antihelmínticos, es la resistencia hacia los mismos, situación que ya es un problema de grandes dimensiones en aquellos países donde la producción ovina es una de las principales actividades económicas (Nari, 2001; Cuéllar, 2002; Aguilar y col., 2009).

OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar la presencia de nematodos gastroentéricos con resistencia a antihelmínticos en un rebaño ovino del Estado de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de nematodos gastroentéricos con resistencia al albendazol, fenbendazol y closantel en un rebaño ovino del Estado de México por medio de la prueba de reducción del conteo de huevos en heces.
2. Identificar los géneros de los parásitos involucrados con ese problema.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La resistencia antihelmíntica (RA) se define como el aumento significativo de los individuos de una población parasitaria, capaz de tolerar niveles de droga que ha probado ser letal para la mayoría de los individuos de la misma especie (Nari, 2001). La RA es el resultado de la selección activa hecha por los propios antihelmínticos, de los genes que regulan los mecanismos fisiológicos y bioquímicos responsables de evadir el efecto letal de estos fármacos (Torres, 2001).

Existen distintos tipos de RA dependiendo de la cantidad y modo de acción de las drogas involucradas (Nari, 2001):



- a) La resistencia única. Se presenta cuando hay resistencia a un sólo antihelmíntico.
- b) La resistencia colateral. Se da cuando la selección a un antihelmíntico es el resultado de la selección de otra droga con un modo de acción similar.
- c) La resistencia múltiple. Se presenta hacia dos o más grupos de antihelmínticos, ya sea como consecuencia de la selección de individuos dentro de un mismo grupo de drogas o como resultado de la resistencia colateral.

Los grupos de antihelmínticos dónde se ha reportado la RA son los bencimidazoles (tiabendazol, oxfendazol, albendazol y mebendazol); probencimidazoles (tiofanato y febantel); imidazotiazoles (morantel y levamisol); derivados salicilanílicos (closantel) y las lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectina).

Los factores que favorecen la selección de nematodos gastroentéricos (NGE) resistentes a antihelmínticos son (Nari, 2001; Torres, 2001):

1. Subdosificación.
2. Dosificación muy frecuente.
3. Usar solamente desparasitantes de una familia.
4. Usar desparasitantes con eficacia reducida.
5. Movimiento de animales.
6. Desparasitación en épocas críticas para los NGE.
7. Factores del parásito (potencial biótico).

En la resistencia antihelmíntica se deben evaluar los medicamentos usados para comprobar realmente su eficacia por medio de pruebas como la prueba de reducción del recuento de huevos en materia fecal (FECRT= *fecal egg count reduction test*), cultivo larvario para identificar los géneros de nematodos gastroentéricos (Cuéllar, 2009).

La resistencia a los antihelmínticos ha sido reportada en algunos de los ecosistemas mexicanos donde hay cría de ovinos. (Campos y col. 1990) informan el primer hallazgo de una cepa de *H. contortus*



resistente a bencimidazoles, particularmente el albendazol. Dicha cepa fue aislada de una explotación ovina de raza Pelibuey en Hueytamalco, Puebla con un clima tropical subhúmedo. Otros reportes de nematodos con resistencia a antihelmínticos incluyen la detección de *H. contortus* con resistencia a sulfóxido de albendazol en borregos de Tlapacoyan, Veracruz (Figueroa y col., 2000). También se ha diagnosticado nematodos gastroentéricos con resistencia a netobimín e ivermectina en rebaños ovinos del Estado de Tabasco (González y col., 2003) y a la ivermectina en Tlaxcala (Montalvo y col., 2006). De igual manera a bencimidazoles e ivermentina en ovinos de Yucatán (Torres y col., 2003a; Torres y col., 2003b).

En otros estudios efectuados en la FES-Cuautitlán (Cuéllar, 2002), se han detectado casos de resistencia a albendazol y ligera resistencia en rebaños de Veracruz, resistencia a albendazol e ivermectina en Tamaulipas, específicamente en un rebaño ovino de Altamira. En Campeche se identificaron nematodos resistentes a albendazol y sulfóxido de albendazol y ligera resistencia a ivermectina y sólo susceptibilidad a levamisol. En los rebaños ovinos del Estado de México la situación es muy variable, por ejemplo en Ixtapaluca, con un clima templado frío se ha encontrado resistencia ligera a levamisol; en Teoloyucan con clima templado con lluvias en verano, se ha diagnosticado resistencia a albendazol e ivermentina, mientras que en San Felipe del Progreso no se han detectado nematodos resistentes a los antihelmínticos. Finalmente, después de varios muestreos, no se han diagnosticado NGE en los ovinos de los Estados de Hidalgo y Jalisco.

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Localización:

El presente trabajo se llevó a cabo en el Módulo de Ovinos del Centro de Enseñanza Agropecuaria y el Laboratorio de Parasitología de la FES Cuautitlán, UNAM.

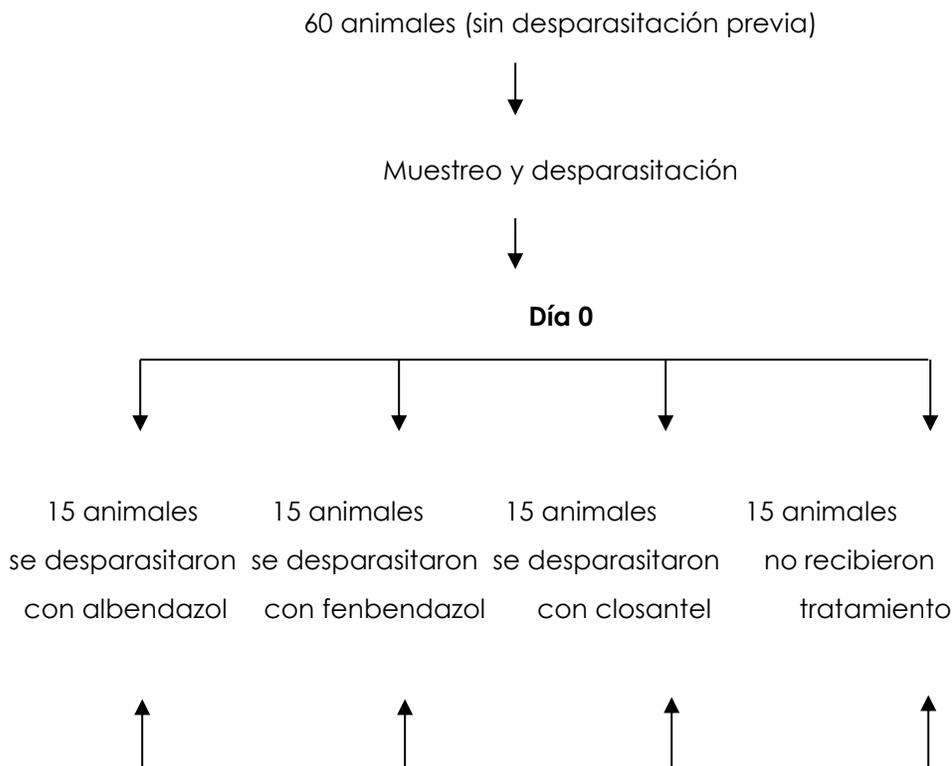


Animales:

Se emplearon 60 ovinos hembras de raza Columbia, que se alimentaban en una pradera de grama nativa y en el corral recibían suplementación alimenticia con heno de avena. Estaban identificados individualmente por medio de un arete de plástico.

Diseño experimental:

Para la detección de NGE con resistencia a antihelmínticos se tomó como referencia el protocolo de trabajo para la evaluación en campo de cepas potencialmente resistentes a los antihelmínticos, empleando la prueba de reducción del recuento de huevos en materia fecal (FECRT= *fecal egg count reduction test*) según las recomendaciones de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP por sus siglas en inglés) (Cuéllar, 2009). A continuación se esquematiza el procedimiento seguido:



Mc Master y cultivo larvario



Día 14

Muestreo

Mc Master y cultivo larvario



Procesamiento de datos por medio del RESO



Diagnóstico de resistencia

TÉCNICA DE REDUCCIÓN DE CONTEO DE HUEVOS.

a) Formación de grupos.

Se formaron cuatro grupos de 15 ovinos positivos a NGE los cuales recibieron el siguiente tratamiento:

Grupo	Tratamiento	Dosis mg/kg	Vía de administración
I	Albendazol	5	Oral
II	Fenbendazol	5	Oral
III	Closantel	10	Oral
IV	Testigo	-	-

b) Toma y procesamiento de la muestra (día 0).



Las muestras de heces se obtuvieron directamente del recto utilizando bolsas de polietileno, se identificaron con el número de cada animal y se mantuvieron en refrigeración. Fueron procesadas por medio de la técnica de Mc Master para conocer la cantidad de huevos de NGE eliminados por gramo de heces y por medio de cultivo larvario para identificar los géneros de los parásitos involucrados (Alba, 2007).

c) Pesaje de animales.

Para calcular la dosis del antihelmíntico utilizado, cada animal se pesó utilizando una báscula de jaula integrada a la manga de manejo.

d) Desparasitación de grupos de animales con el antihelmíntico a evaluar.

Se desparasitaron calculando la dosis de antihelmíntico por peso vivo del animal, el grupo I recibió albendazol, grupo II fenbendazol, el grupo III closantel y el grupo IV fue el testigo, el cual no se le administró ningún fármaco.

e) Toma y procesamiento de la muestra (día 14).

Quince días después de la desparasitación se volvieron a tomar muestras de heces, se identificaron, conservaron y procesaron de la misma manera que se mencionó anteriormente.

f) Análisis de datos.

Los datos de hgh obtenidos el día 14 se procesaron empleando el programa de análisis de la reducción de conteo de huevos (RESO) desarrollado por la División de Salud Animal de CSIRO de Australia. Para que un resultado se considere indicativo de resistencia deberán cumplirse dos condiciones:

- Que la reducción en la media aritmética de hgh en el grupo tratado sea menor de 95% en comparación con el grupo control.
- Que el límite inferior del intervalo de confianza del 95% para el porcentaje de reducción, sea menor de 90%.

El análisis estadístico indica que si el verdadero porcentaje de reducción estimado es 95%, la probabilidad de declarar resistencia empleando sólo el primero de los dos criterios es 50-50. Por ejemplo, empleando sólo el primer criterio, si el verdadero porcentaje de reducción es de 95%, la



mitad de las veces de estimación puede llegar a ser un poco mayor por lo que se llegará a diagnosticar susceptibilidad de la cepa al antiparasitario y la otra mitad de las veces la estimación será un poco menor por lo que se declarará resistencia. Sin embargo, si se toma en consideración ambos criterios, el diagnóstico de resistencia, se efectúa con seguridad.

El análisis de los datos experimentales en pruebas llevadas a cabo en Australia (CSIRO, 1989), indica que si ambos criterios se tiene en cuenta, se debe declarar resistencia presente. Si se cumple solo uno de los dos criterios, entonces debe sospecharse resistencia.

La eficacia antiparasitaria para cada uno de los principios activos empleados se calculó con la siguiente fórmula (Soulsby, 1988):

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{Promedio de hgh* día 0} - \text{promedio de hgh día 14}}{\text{Promedio de hgh día 0}} \times 100$$

*hgh= huevos por gramo de heces

RESULTADOS OBTENIDOS

Para la detección de nematodos gastroentéricos (NGE) con resistencia a antihelmínticos (RA) en ovinos de un rebaño del Estado de México, se efectuó la evaluación parasitológica de acuerdo al protocolo para tal propósito y 58 de los 60 animales cumplieron con los criterios de inclusión para ser tomados en cuenta en el estudio, fueron positivos a NGE, en promedio excretaban más de 4,000 huevos por gramo de heces (hgh). Sólo dos animales del grupo II (albendazol) no eliminaban huevos y no fueron considerados.



Los promedios iniciales de eliminación de huevos de NGE fueron para el grupo I (albendazol) 3,654 hgh; el grupo II (fenbendazol) 2,010 hgh; grupo III (closantel) 3,780 hgh y para el grupo IV (testigo) 5,783 hgh. Lo anterior demuestra la alta frecuencia y las elevadas eliminaciones de huevos de NGE en los rebaños ovinos mexicanos, que se traduce en alto riesgo para la salud y producción de esos animales (Aguilar y col., 2009).

En lo que respecta a los géneros de NGE encontrados en los animales evaluados para la detección de RA, se encontró como el género más frecuente el *Haemonchus* (cuadro 1), con 55%, le siguieron *Teladorsagia* (22%) y *Cooperia* (17%). Sólo el 6% tuvo *Trichostrongylus* y no se observó la presencia de *Chabertia* y *Oesophagostomum*. Los géneros de NGE presentes en el rebaño evaluado para RA fueron los que ya se han reportado para los rebaños ovinos de México. La mayor proporción la tuvo *H. contortus*, situación similar a la mayoría de los países donde se crían ovinos (Cuéllar, 2002).

Cuadro 1. Géneros de nematodos gastroentéricos en un rebaño ovino del Estado de México evaluado para la detección de resistencia a antihelmínticos.

Géneros de NGE	(%)
<i>Chabertia</i>	0
<i>Cooperia</i>	17
<i>Haemonchus</i>	55
<i>Oesophagostomum</i>	0
<i>Teladorsagia</i>	22
<i>Trichostrongylus</i>	6



El porcentaje de eficacia antiparasitaria calculada para los tres antihelmínticos usados se expone en el cuadro 2. Se puede observar que en ninguno de los productos hubo una eficacia superior al 90%, la mejor (>88%) correspondió al albendazol y la peor (77.5%) al closantel. Es conocido el efecto que tienen los tres medicamentos contra los NGE, sin embargo, su eficacia debe ser cercana al 100% (Sumano y Ocampo, 1997), cuando este parámetro disminuye, hay la sospecha de la existencia de parásitos resistentes. En el caso del closantel, está demostrada su buena acción contra NGE hematófagos, en especial el *Haemonchus*. La baja eficacia detectada para este principio activo, es indicativo de la pobre o nula actividad contra NGE no hematófagos (*Cooperia* y *Trichostrongylus*) (Cuéllar, 2008) que evidentemente no fueron atacados.

Cuadro 2. Porcentaje de eficacia del albendazol, fenbendazol y closantel en un rebaño ovino del Estado de México evaluado para la detección de resistencia a antihelmínticos.

Principio activo	(%)
Albendazol	88.5
Fenbendazol	85.8
Closantel	77.5

En el rebaño estudiado hubo presencia de NGE con resistencia a los tres principios activos evaluados (cuadro 3), tal situación se conoce como resistencia múltiple, aunque dado que el albendazol y el fenbendazol pertenecen a la misma familia (bencimidazoles) pudiera también clasificarse como resistencia colateral (Nari, 2001), que representa un problema grave en los sistemas de producción ovina. Los bencimidazoles fue el primer grupo químico donde se observó el problema de RA en el mundo (Sangster, 1999) (<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1054/cuf0018s.pdf>), en la actualidad existen problemas de RA a los bencimidazoles que ha orillado a prescindir de este grupo



de medicamentos. Para México, es de los antiparasitarios donde más se ha detectado la presencia de *Haemonchus* con RA (Campos y col., 1990; Cuéllar, 2002; Torres y col., 2003a; Torres y col., 2003b). Lo anterior se explica por la amplia utilización del albendazol en los diversos ecosistemas donde se crían ovinos.

El porcentaje de reducción en la eliminación de huevos de esos parásitos osciló entre un 84 y 90%, siendo la más alta en los animales tratados con albendazol y la menor en los que recibieron fenbendazol y no muy lejos el closantel con 87%. Esta reducción tuvo un paralelismo con la eficacia antiparasitaria mencionada anteriormente (<http://www.borrego.com.mx/archivo/n46/f46nematodos.php>).

Cuadro 3. Detección de resistencia a antihelmínticos por medio del procedimiento RESO¹ en un rebaño ovino del Estado de México.

	Pretratamiento	Control	Albendazol	Fenbendazol	Closantel
Número de animales	15	15	13	15	15
Promedio hgh	1,140	4,343	419	677	550
% reducción			90	84	87
Intervalo de confianza <95%			73	55	62



Intervalo de confianza >95%			77	95	96
Resultado			Resistente	Resistente	Resistente

¹RESO= Programa de análisis de reducción del conteo de huevos fecales

CONCLUSIONES.

- Por medio de la prueba de reducción del conteo de huevos en heces, se diagnosticó la presencia de nematodos gastroentéricos con resistencia a albendazol, fenbendazol y closantel en los ovinos estudiados.
- La eficacia antiparasitaria contra nematodos gastroentéricos en un rebaño ovino del Estado de México fue moderada o baja, siendo del 88.5% para albendazol, 85.8% en el fenbendazol y 77.5% para el closantel.
- En vista de que la resistencia detectada abarcó a los tres antiparasitarios usados, el tipo de resistencia a los antihelmínticos fue múltiple.
- Los géneros de nematodos gastroentéricos identificados fueron en primer lugar *Haemonchus*, seguidos de *Teladorsagia* y *Cooperia*.
- Se crea la necesidad de generar nuevas opciones para el control antiparasitario para evitar o disminuir el problema de resistencia a los antihelmínticos.

BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar CAJ, Torres AJFJ, Cámara SR. Importancia del parasitismo gastrointestinal en ovinos y situación actual de la resistencia antihelmíntica. En: Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico. Editado por: R. González, G. y A.C. Berumen, A. Universidad Autónoma Chapingo, Ovinocultores Asociados del Sureste, S.C. de R.L., 2009.



Alba HF. Parasitología veterinaria. Manual de laboratorio. UNAM, 2007

Balic A, Veron MB, Els NTM. The immunobiology of gastrointestinal nematode infection in ruminates. Adv. Parasitol 2000; 45: 182-227.

Campos RR, Herrera RD, Quiroz RH. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. Téc. Pec. Méx. 28 (1): 30-34. 1990.

CSIRO. Anthelmintic resistance. Report of the working party for the Animal Health Committee of the Standing Committee on Agriculture. SCA Technical Report Series. No. 28. 1989.

Cuéllar OJA. La resistencia a los antihelmínticos un problema emergente. Memorias X Reunión del CONASA. México, D.F. 2002.

Cuéllar OJA. Fármacos con actividad antihelmíntica en ovinos. En: Memorias del Curso Precongreso Manejo integral de parasitosis en rumiantes organizado por la Asociación Mexicana de Técnicos en Ovinocultura, AMTEO. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2008.

Cuéllar OJA. Evaluación de la resistencia a los desparasitantes. En: Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico. Editado por: R. González, G. y A.C. Berumen, A. Universidad Autónoma Chapingo, Ovinocultores Asociados del Sureste, S.C. de R.L., 2009.

Figuroa CJA, Méndez MRD, Berruecos VJM, Álvarez LJA. Detección de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. Vet. Méx. 31 (4): 309-313. 2000.



González GR, Torres HG, Nuncio OMGJ, Cuéllar OJA, Zermeño GME. Detection of anthelmintic efficiency in nematodes of hair sheep using the fecal egg reduction test. Liv Res for Rural Develop. 15: 12. 2003.

Montalvo AX, López AME, Vázquez PV, Liébano HE, Mendoza GP. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a fenbendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. Tec. Pec. Mex. 44, 81-90. 2006.

Nari A. Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes. Mem. II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos; Mérida, Yucatán. México. 2001.

Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Limusa, 2003.

Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. Int. J. Parasitol. 29: 115-124. 1999.

Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7ª edición. Editorial Interamericana, México, 1988.

Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología veterinaria. 2ª edición. Interamericana. México. 1997.

Torres AFJ. Diagnóstico y control de resistencia a antihelmínticos en pequeños rumiantes. Mem. Curso Ovinotecnia Hidalgo 2001. AMTEO. Pachuca, Hidalgo. 2001.

Torres AJF, Dzul CU, Aguilar CAJ, Rodríguez VRI. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México. Vet. Parasitol. 144: 33-42. 2003a.





Torres AJF, Roberts B, Canto DJ, Martínez OC, Rodríguez J, Canul KL, Cob GL, Tirado MF, Aguilar CA. Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in Yucatán. Mem. V International Seminar in Animal Parasitology. Mérida, Yucatán México. 2003b.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn MM, Jennings FW. Parasitología veterinaria. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 2002.

<http://www.borrego.com.mx/archivo/n46/f46nematodos.php>

<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1054/cuf0018s.pdf>

http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=144&Itemid=2

