

En ocasiones, después de la desparasitación de un rebaño no se obtienen los resultados esperables; es decir, se producen fallos terapéuticos. Una de las causas es la presencia en el rebaño de "cepas" de parásitos con genes resistentes, que no son eliminados por el fármaco administrado.

RESERVA

Resistencia a antihelmínticos en rumiantes

Métodos de diagnóstico y situación en España

M.A. Álvarez-Sánchez, J. Pérez-García, F.A. Rojo-Vázquez.
Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León.

Sin embargo, no siempre los fallos terapéuticos son debidos a resistencias a un antiparasitario determinado. Muchas otras causas pueden ser responsables de que el tratamiento no ha ya sido eficaz, siendo las más frecuentes el diagnóstico incorrecto y la utilización inadecuada de los fármacos, la subdosificación y la propia farmacocinética de los antihelmínticos.

A pesar de ello, realmente el desarrollo de resistencias a los antiparasitarios es un problema serio que puede llegar a limitar la producción ovina. Diversos factores pueden favorecer el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos. Los más desatacados son: la frecuencia y épocas de tratamiento; la subdosificación; los métodos de manejo; la especie parásita; el abuso en la utilización de un fármaco de la misma familia química; y el mantenimiento de ovejas y cabras en el mismo rebaño.

La resistencia antihelmíntica es un problema que tiene plena vigencia tanto en Europa como en el resto del mun-

do, afectando a las tres familias de antihelmínticos de amplio espectro.

Sin embargo, en España hay poca información sobre la prevalencia de resistencia. En un estudio llevado a cabo por Requejo-Fernández et al. (1997) en un rebaño de cabras Cachemira importadas de Escocia, se observó que la eficacia del tratamiento con netobimín era del 89,4% y la DE50 del ensayo de eclosión de huevos (EHA) era de 0,22 mg/ml de tiabendazol, siendo *Teladorsagia circumcincta* la especie predominante tras el tratamiento. Este trabajo fue la primera descripción de resistencia antihelmíntica en Es-

paña en los pequeños rumiantes, aunque se trataba de una cepa importada.

Métodos para detección de la resistencia antihelmíntica

El diagnóstico de la tricostrongilidosis y de la resistencia antihelmíntica no se debe de realizar por separado, si no que el primero debería complementarse con los métodos para detectar resistencias. Aunque la resistencia se puede sospechar en base a los datos clínicos y epidemiológicos, para su confirmación se necesita recurrir al laboratorio. Así, las técnicas de detección pueden ser de dos tipos in vivo e in vitro (**cuadro I**).

Pruebas in vivo

Reducción del número de huevos en las heces (FECRT)

Es el método recomendado para la detección de resistencia frente a los antihelmínticos. Es una prueba sencilla y fácil de

El desarrollo de resistencias a los antiparasitarios es un problema serio que puede limitar la producción ovina

realizar que en rumiantes, équidos y cerdos y puede servir para la detección de resistencias frente a todos los grupos de antihelmínticos y especies de tricostrongílidos (Coles et al., 1992).

La técnica se basa en la valoración de la eficacia de un antihelmíntico comparando el recuento de huevos fecales de un grupo de animales antes y después del tratamiento.

Se han desarrollado diferentes métodos para calcular el porcentaje de reducción de huevos en las heces; el empleado por la WAAVP recomienda utilizar un grupo testigo que se mantiene sin tratar para conocer los posibles cambios en la eliminación de huevos durante el periodo de estudio (Coles et al., 1992).

La otra opción consiste en utilizar como grupo testigo a los mismos animales antes del tratamiento. En este caso, puede estimarse el porcentaje de reducción individual, ya que cada animal es su propio control.

Existe resistencia cuando la reducción de huevos fecales es menor del 95% y el límite inferior para su intervalo de confianza del 95% menor o igual al 90%; si sólo se cumple uno de estos dos criterios, no se habla de resistencia, si no de sospecha (Coles et al., 1992). Esta interpretación es adecuada cuando se emplea la media aritmética para el cálculo del porcentaje de reducción.

Hay cierta controversia a la hora de fijar el momento de realizar el recuento de huevos post-tratamiento, ya que en ocasiones el antihelmíntico puede provocar una supresión temporal de la ovoposición sin que los parásitos sean eliminados.

Para ello, el momento más adecuado para establecer una buena relación entre el número de huevos y la de adultos presentes en el hospedador en un recuento de huevos es a los 10-14 días post-tratamiento.

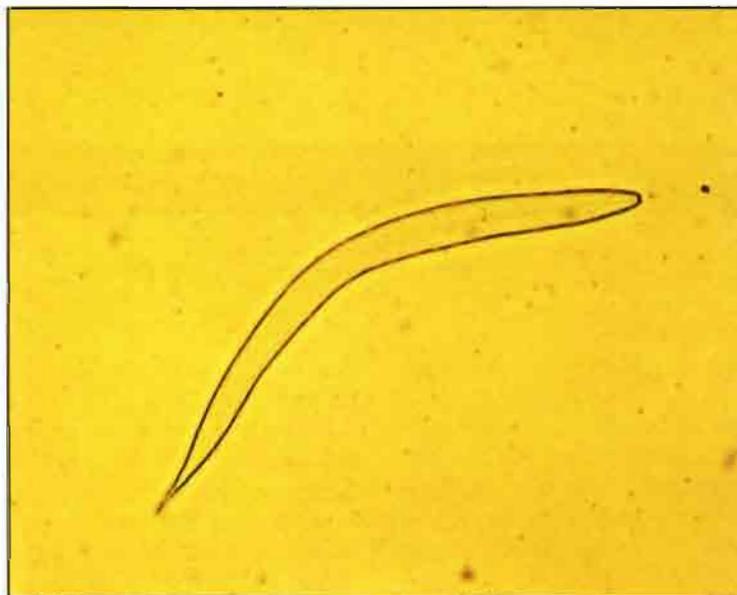
Aunque la FECRT no detecta niveles de resistencia, sin embargo otros métodos desarrollados in vitro (EHA y *tubulin binding assay*) tampoco son más sensibles. Todas estas técnicas detectan resistencia cuando la proporción de indi-

viduos resistentes en la población está por debajo del 25%. Además, la FECRT no detecta bajos niveles de resistencia cuando las infecciones son mixtas, recomendando realizar un coprocultivo pre y post-tratamiento, especialmente cuando están presentes especies sensibles con alta fecundidad.

ausencia de resistencia frente a cualquier tipo de antihelmíntico, tanto en condiciones naturales como experimentales (Álvarez-Sánchez et al., 2002). Además, es obligatoria cuando se pretende registrar un nuevo fármaco. Básicamente se basa en observar la carga de nematodos gastrointestinales que tiene el animal sacrificado tras



LFA. Larva fluorescente.



LFA. Larva no fluorescente.

A pesar de estas limitaciones (no demasiado sensible y requerir un mínimo de 10 días para obtener el resultado), su utilización conjunta con un coprocultivo pre y post-tratamiento permite valorar la resistencia adecuadamente (Álvarez-Sánchez et al., 2002).

Pruebas controladas de eficacia (CEI)

Es la prueba más fiable para determinar la presencia o

haber sido sometido a un tratamiento antihelmíntico.

Se confirma la presencia de resistencia cuando la reducción en la media geométrica es inferior al 90%, o el recuento de los vermes que sobreviven al tratamiento es superior a 1.000. También se ha utilizado en combinación con otras técnicas para confirmar resultados de la FECRT o de diferentes pruebas in vitro (EHA, LDA, LMA, etc.) con las que muestra una buena correlación.

Es una prueba muy costosa en términos de tiempo y económicos, lo que limita su uso como método rutinario de diagnóstico de resistencia antihelmíntica.

Pruebas in vitro

Ensayo de eclosión de huevos (EHA)

El EHA es un término que se ha venido empleando para englobar una serie de métodos que se utilizan para detectar resistencia frente a los antihelmínticos de la familia de los benzimidazoles. Todos se ba-

(DE₅₀) que es la concentración de antihelmíntico necesaria para inhibir la eclosión del 50% de los huevos.

Como en la FECRT, el EHA también se ha estandarizado y se ha observado que los huevos de las cepas susceptibles raramente eclosionan a concentraciones por encima de 0,1 µg/ml de antihelmíntico (Coles et al., 1992).

La necesidad de utilizar material fresco ha sido el principal obstáculo de esta técnica. Para solventarlo, las muestras pueden almacenarse a 4 °C durante 72 horas o mantenerse en anaerobiosis hasta siete días sin que se produz-

tencias a BZs en ovejas, cabras y caballos. Aunque en algunos trabajos no se han encontrado una buena correlación entre el EHA y el LDA o la PCR alelo-específica, en otros se ha demostrado lo contrario. Es una técnica más rápida y económica que la FECRT, siendo una buena herramienta para emplear en estudios de campo.

Ensayo de eclosión de huevos para el levamisol y el tartrato de morantel (EHPA)

Se ha desarrollado un EHA para detectar la resistencia frente a levamisol y tartrato de morantel, en los huevos se incuban como en el EHA pero el antihelmíntico se añade inmediatamente antes de que eclosionen.

Después de seis horas de incubación con el antihelmíntico se determina el porcentaje de eclosión en cada dilución y la DE₅₀, tal y como se ha descrito en el EHA.

El EHPA es una técnica rápida y fácil de realizar, y necesita el mismo equipamiento que el EHA, con el que comparte las mismas desventajas. Sin embargo, en este caso, hay que tener en cuenta cuando se añade el antihelmíntico y la duración del periodo de incubación. Todas estas razones han hecho que no sea un método rutinario de diagnóstico de resistencia en trabajos de campo (Varady y Corba, 1999).

Desarrollo larvario (LDA)

Se han publicado diferentes descripciones sobre el LDA para la detección de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales. Mientras que las diferencias entre las metodologías se deben al tipo de medio de cultivo empleado en cada caso (líquido o con agar), la base de la técnica es la misma en todos los casos; los huevos se incuban hasta L3 en presencia de distintas diluciones de antihelmíntico.

Es una prueba que se emplea para detectar resistencia frente a miembros de las tres

CUADRO I. Métodos de detección de resistencias.

Familia de antihelmíntico	In vivo	In vitro
BZs	FECRT, CET	EHA, LDA, LMA, TBA, Biología molecular
LM	FECRT, CET	LFIA, LDA, LMA
IM	FECRT, CET	LFIA, EHPA, LDA, LMA

CUADRO II. Número y porcentaje de rebaños en los que la resistencia fue detectada por medio de la FECRT en la provincia de León.

Familia de antihelmíntico	Rebaños			Rebaños Totales
	Susceptibles	Sospechosos	Resistentes	
BZs	48 (92.31%)	1 (1.92%)	3 (5.76%)	52
LM	40 (80%)	5 (10%)	5 (10%)	50
IM	6 (50%)	2 (16.66%)	4 (33.34%)	12

CUADRO III. Número y porcentaje de rebaños en los que la resistencia fue detectada por medio de la FECRT en la provincia de León.

EHA			
Susceptibles	Sospechosos	Resistentes	Rebaños Totales
37 (74%)	6 (12%)	7 (14%)	50

san en las propiedades ovicidas de estos antihelmínticos y en la capacidad de los huevos de cepas resistentes para embrionar y eclosionar a concentraciones más altas que los de las cepas susceptibles (Álvarez-Sánchez et al., 2002).

Así, tras incubar durante 48 horas a 23 °C los huevos sin embrionar en diluciones seriadas de antihelmíntico, se determina el porcentaje de huevos que eclosionan en cada dilución y se corrige para la mortalidad natural observada en los controles.

Después, se hace la transformación "probit" de los porcentajes de eclosión y la logarítmica de las diluciones de cada antihelmíntico para, a partir de la línea de regresión, calcular la dosis eficaz 50

can variaciones significativas en la DE₅₀.

Otro factor a tener en cuenta es la relación entre el tiempo transcurrido tras la infección y la DE₅₀, observándose una variación importante de la DL₅₀ en función del tiempo, siguiendo un modelo parabólico.

Tampoco esta técnica detecta bajos niveles de resistencia (menos del 25%). Por ello, se recomienda utilizar la FECRT y el desarrollo larvario (LDA) como pruebas complementarias cuando la DE₅₀ está ligeramente por encima del valor que delimita la resistencia -0,1 µg/ml.

A pesar de todo es una prueba que se ha empleado rutinariamente como método de elección para detectar resis-

familias de antihelmínticos de amplio espectro. Sin embargo, en algunos trabajos se señala la dificultad de diferenciar entre cepas susceptibles y resistentes cuando se desconoce el día de la infección y de interpretar los resultados cuando se emplea el LDA para detectar resistencia frente a las LM. Frente a esta familia de antihelmínticos, se ha observado que la sensibilidad de la técnica mejora si se sustituye la ivermectina por la avermectina B.

Como ocurre en el EHA, en esta prueba también se han observado variaciones en la DE_{50} en función del momento de la infección, alcanzándose el valor más alto para la DE_{50} entre el día 50-60 post-infección.

Respecto al EHA, tiene la ventaja de que no son necesarios huevos recién recuperados de las heces para realizar la prueba. Además, no es tan subjetiva como el LMA cuando se realiza la lectura de la muestra.

Se considera una buena técnica para emplear en los estudios de resistencia antihelmíntica y para complementar a otras pruebas in vitro e in vivo con las que muestra una buena correlación (Johansen & Waller, 1989; Varady y Corba, 1999).

Ensayo de motilidad larvaria (LMA)

A lo largo de los años han ido apareciendo trabajos que emplean esta técnica como método de diagnóstico de resistencia en tricostrongílidos, compartiendo en todos los casos un objetivo común: determinar el porcentaje de L3 que quedan paralizadas cuando se incuban en diluciones seriadas de antihelmíntico.

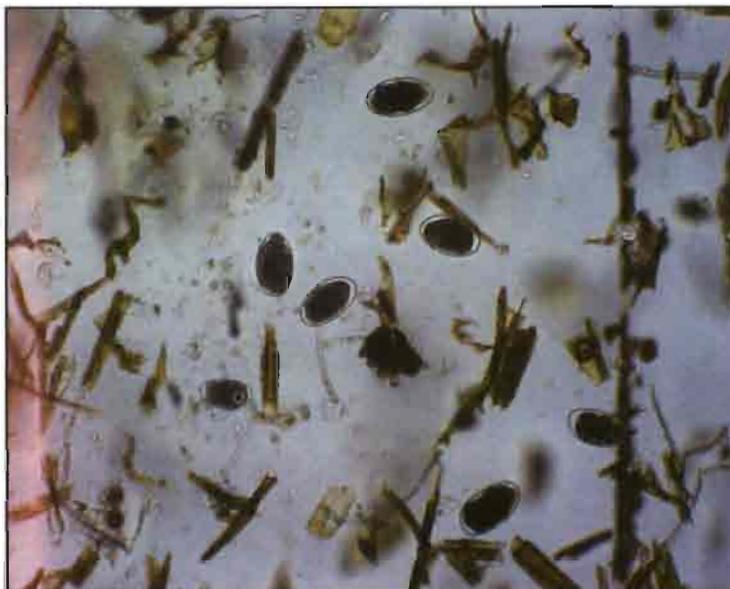
Aunque inicialmente esta técnica se desarrolló para valorar la resistencia a levamisol y tartrato de morantel, también se ha empleado para detectar la resistencia frente a las LM, los BZs y el closantel.

Respecto a su utilización para detectar resistencia a levamisol y tartrato de morantel, los resultados son contradictorios. Se han obtenido buenos

resultados cuando se empleó el LMA en algunas cepas de *T. circumcincta*, mientras que en otras no se observó una buena relación dosis-respuesta.

Además, se han observado problemas para lograr una buena repetibilidad de la técnica debido a la reversión de la parálisis larvaria cuando se

santel, detectando cepas 2-10 veces más resistentes a este fármaco. Por otro lado, Sutherland & Lee (1990) desarrollaron una prueba de motilidad larvaria para detectar resistencia a BZs empleando la eserina, un inhibidor de la acetilcolina que provoca parálisis reversible en *Caenorhabditis elegans*. La presencia de mayor



EHA, LDA.



L3 y huevos.

emplea levamisol. Sin embargo, esta reversibilidad en la parálisis no se observaba cuando se realizaban tres lecturas (tras 24, 48 y 72 horas) a las concentraciones utilizadas (levamisol 1-20 $\mu\text{g/ml}$ y tartrato de morantel 37,5-600 $\mu\text{g/ml}$), aunque cuando se empleaban altas concentraciones de levamisol (>200 $\mu\text{g/ml}$) la parálisis era reversible.

Rothwell & Sangster (1993) desarrollaron una prueba de motilidad larvaria para el clo-

cantidad de acetilcolina en las cepas resistentes a BZs reduce la posibilidad de unión de la eserina a los receptores y de este modo retrasa o previene la parálisis.

En el caso de las LM también se han desarrollado diferentes pruebas de motilidad larvaria (Gill et al., 1991; Dasonville et al., 1996). Ambos autores se encontraron diferencias significativas entre cepas de *H. contortus* resistentes y susceptibles a ivermectina.

MADEIRA, S.A. - Calle de la Industria, 10 - 28014 Madrid - España - Tel. 91 848 85 00 - Fax 91 848 85 96
Schering-Plough Animal Health - Calle de la Industria, 10 - 28014 Madrid - España - Tel. 91 848 85 00 - Fax 91 848 85 96
Schering-Plough Animal Health - Calle de la Industria, 10 - 28014 Madrid - España - Tel. 91 848 85 00 - Fax 91 848 85 96

HAPASIL es el único terapéuticamente activo contra los parásitos internos incluyendo los hepáticos: Dicrocelio y Fasciola

Dosificación flexible:

una dosificación para cada necesidad

¡El antiparasitario interno con menor período de retirada!
sólo 2 días en leche y 5 días en carne



Schering-Plough Animal Health

¿parásitos internos?

HAPASIL. La molécula única
que los elimina:

NETOBIMIN



Esta técnica también se ha utilizado para valorar la actividad in vitro de la paraherquamida frente a diferentes nematodos gastrointestinales. Aunque se ha observado un descenso de la motilidad de las L3, la paraherquamida no produce una inhibición en el desarrollo de huevos a L3.

El ensayo de motilidad larvaria también se ha empleado para valorar la capacidad del mucus gastrointestinal ovino para inhibir la migración de L3 (Rabel et al., 1994). Se observó que el mucus de las ovejas más resistentes a las infecciones por nematodos gastrointestinales provocaba una

Ensayo de inhibición de la ingestión larvaria (LFIA)

Se trata de una nueva técnica de detección de resistencia frente a LM e IM en fase de desarrollo (Jackson & Coop, 2000; Álvarez-Sánchez et al., 2001b; 2002). La técnica se basa en la capacidad de las LM y del levamisol de inhibir la ingestión de alimentos de las L1 de nematodos gastrointestinales debido a que producen parálisis flácida de los músculos faríngeos y parálisis espástica generalizada, respectivamente.

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 hace una valoración de la fluorescencia en el intestino de la L1.

Además de la motilidad larvaria, las LM también inhiben el desarrollo y el peristaltismo faríngeo, pero a una concentración 10-100 veces inferior a la necesaria para inhibir la moti-

lidad de la musculatura somática. Así, la inhibición de la ingestión de alimento y del desarrollo podrían ser una consecuencia de la parálisis flácida de la faringe.

Sin embargo, en el caso de los IM, la inhibición en la ingestión de alimento es una consecuencia de la parálisis espástica generalizada.

Mediante el LFIA se pueden diferenciar cepas resistentes y susceptibles a LM e IM de diferentes especies de nematodos gastrointestinales. Además, es una técnica más rápida y fácil de desarrollar que el LDA y reduce el tiempo de espera con respecto al LMA, ya que no utiliza L3.

Sin embargo, se necesitan más estudios para llevar a cabo la evaluación de la téc-

nica y para ver si puede convertirse en una nueva herramienta de utilización en el diagnóstico rutinario de resistencia antihelmíntica.

Ensayo de unión a la tubulina (TBA)

Esta técnica se basa en la afinidad de los BZs por la tubulina. El TBA mide el grado de unión de los BZs a la tubulina preparada a partir de cepas susceptibles y resistentes.

Así, al extracto de tubulina de los parásitos resistentes a BZs se une una cantidad menor fármaco que al de las cepas susceptibles, aunque también depende del tipo de bencimidazol empleado.

Se ha observado una buena correlación entre esta técnica y el EHA, el LDA y las CET (Álvarez-Sánchez et al., 2002). Puede emplearse en condiciones de campo y, al estar estandarizada, las comparaciones entre laboratorios son más fiables.

Es una prueba sensible y muy rápida si el material parasitario está procesado. Sin embargo, aunque se pueden utilizar huevos, L3 o adultos, la cantidad de material parasitario que se necesita es grande (≥ 100.000 L3). Además, requiere un adecuado equipamiento para poder trabajar con isótopos radioactivos.

Pruebas de biología molecular

Durante los últimos años, diferentes técnicas moleculares han experimentado una importancia creciente en el estudio de la resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales.

Muchas de estas técnicas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*: PCR), que es muy útil porque la reacción puede diseñarse para que sea altamente específica, fácilmente reproducible y capaz de amplificar pequeñas cantidades de ADN. Se han desarrollado numerosos métodos basados en la PCR, pero los 3 más empleados en la detección de resistencias son la PCR alelo-específica, la PCR-



mayor inhibición sobre la motilidad de las L3 que el de las ovejas susceptibles.

Se ha encontrado una buena correlación entre el LMA y otras pruebas in vitro tales como el LDA y el EHA (Varady et al., 1999), aunque no siempre ha sido posible diferenciar entre cepas resistentes y susceptibles. La existencia de cierta subjetividad a la hora de valorar la parálisis larvaria y la importancia del tiempo de observación de las larvas son otros factores que pueden conducir a error a la hora de diferenciar las cepas entre sí. En consecuencia, es una técnica fácil de llevar a cabo y adecuada para complementar a otras pruebas in vitro e in vivo (Álvarez-Sánchez et al., 2002).

RFLP; PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism); y recientemente, la PCR a tiempo real.

Diversos estudios han demostrado que la resistencia a BZs en tricostrongílidos está asociada con una mutación en el gen que codifica para la β -tubulina (Grant & Mascord, 1996).

Esta mutación-sustitución de fenilalanina (TTC) por tirosina (TAC)-, presente en las principales especies de tricostrongílidos, está localizada en el aminoácido 200 del gen que codifica para el isotipo I de la β -tubulina (Elard et al., 1996; Elard & Humbert, 1999).

En base a estos resultados, se ha desarrollado una PCR para detectar esta mutación en *H. contortus* y *T. colubriformis* y otro método que combinaba PCR y la digestión con enzimas de restricción para detectar este tipo de resistencia en *T. circumcincta*.

Posteriormente, se ha desarrollado una PCR alelo-específica a partir de adultos y L3 de *T. circumcincta* (Elard et al., 1999). Silvestre & Humbert (2000) modificaron este método y lo utilizaron para identificar las principales especies de tricostrongílidos y detectar la resistencia frente a BZs en cada una de ellas. Recientemente, se ha desarrollado una PCR alelo-específica para detectar este tipo de resistencia en adultos y larvas

La prevalencia de resistencia en España ha sido estudiada por nosotros en la provincia de León frente a las tres familias de antihelmínticos de amplio espectro

de estrongílidos no migratorios de équidos (Samson-Himmelsjerna et al., 2002).

Estas técnicas permiten determinar la proporción de cada genotipo en la población: susceptibles y resistentes. Por tanto, el nivel de resistencia en la población viene determinado por la proporción de individuos homocigóticos recesivos (rr), porque son los únicos que sobreviven a la dosis recomendada de antihelmíntico (Elard & Humbert, 1999).

Como ya se señaló anteriormente, la principal ventaja de estas pruebas en comparación con otras, in vivo e in vitro, radica en que son capaces de detectar los primeros individuos resistentes que aparecen en la población.

Se ha observado una buena correlación entre estas técnicas moleculares y otras como el EHA y las CET para la detección de resistencia a BZs (Álvarez-Sánchez et al., 2002). En los estrongílidos no migratorios de équidos se ha observado una buena correlación con el EHA pero no con el FECRT.

Situación del problema en España

Durante los últimos años, la prevalencia de resistencia en España ha sido estudiada por nosotros en la provincia de León frente a las tres familias de antihelmínticos de amplio espectro (Álvarez-Sánchez et al., 1999, 2001a). Los resultados de estos estudios, tanto para la FECRT como para el EHA, aparecen en los cuadros II y III.

El total de resistencias observadas ha sido de 19, afectando a 15 (21,12%) rebaños de 71 empleados. El porcentaje de resistencia fue significativamente más alta en los imidazotiazoles -IM- (33%), comparado con las lactonas macrocíclicas -ML- (10%) y los bencimidazoles -BZs- (5,76%). Un número similar de rebaños: 14 (19,42%), se han considerado como sospechosos de resistencia. Los principales géneros implicados en los diferentes tipos de resistencia han sido *Teladorsagia* y *Trichostrongylus*.

Nutrición de futuro

Tecnología y Calidad al Servicio de la Producción



Premezclas vitamínicas, micro y macrominerales



Fabricación de productos según necesidades



Servicio de formulación



Piensos lactoiniciadores



Laboratorio de investigación y servicios



Lactonúcleos para piensos de primeras edades



Gestión de explotación

