

EFFECTO DEL NIVEL DE NUTRICION SOBRE LA RESISTENCIA DE *Haemonchus contortus* FRENTE A BENCIMIDAZOLES EN OVEJAS

Calvete, C.¹, Calavia, R.¹, Ferrer, L.M.², Ramos, J.J.², Lacasta, D.², Ruíz-de-Arkaute, M.², Valderrábano, J.¹ y Uriarte, J.¹

¹CITA de Aragón. Avda de Montañana 930. 50059-Zaragoza. ²Dpto Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Zaragoza. ccalvete@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La lucha contra las parasitosis en la ganadería de rumiantes se ha basado principalmente en la administración de sustancias antihelmínticas pertenecientes, sobre todo, a las familias de los bencimidazoles o de las lactonas macrocíclicas. El uso reiterado de estos antihelmínticos ha derivado en un incremento de la resistencia genética de las poblaciones parasitarias (Jabbar et al., 2006).

Una de las principales herramientas para prevenir el aumento de la resistencia es el desarrollo de programas dirigidos a monitorizar su evolución a lo largo del tiempo, mediante la estimación de la tasa de reducción en la eliminación de huevos (FECRT) o del efecto del antihelmíntico sobre la eclosión de los huevos o el desarrollo larvario de los parásitos.

No obstante, no toda la resistencia observada o medida con estas técnicas parece ser debida únicamente al desarrollo de resistencia genética frente a estas sustancias por parte del parásito, ya que en ocasiones se observan variaciones en los niveles de resistencia sin una explicación aparente. La identificación de estos factores que pueden influir en la magnitud de la resistencia medida con las técnicas anteriores resulta primordial para poder interpretar los resultados de cualquier estudio y poner en su justo valor la prevalencia o la intensidad de resistencia medida por estas técnicas.

En consecuencia, y teniendo en cuenta que trabajos anteriores han puesto de manifiesto la estrecha relación entre el estado nutricional del hospedador y la viabilidad y la fenología del nematodo *Haemonchus contortus* (Valderrábano et al., 2002), en el presente trabajo se ha tratado de comprobar si la resistencia observada de éste parásito frente a antihelmínticos de la familia de los bencimidazoles puede variar significativamente en función del estado nutricional del hospedador.

MATERIAL Y METODOS

El ensayo se realizó con 30 ovejas Rasa Aragonesa libres de parásitos, alojadas en jaulas individuales con suelo de rejilla, que habían sido previamente tratadas con esponjas vaginales para sincronizar el celo. Cinco semanas después de la cubrición los animales fueron distribuidos en dos lotes de 15 animales, y a partir de ese momento, uno de los lotes fue alimentado *ad libitum* con pellets de alfalfa mientras que el otro (lote racionado) recibió una ración equivalente a 0,7 sus necesidades de mantenimiento. El día 90 de gestación todas las ovejas fueron infectadas con 5000 larvas infectantes de *H. contortus*, y a partir de ese día todos los animales recibieron 30 g de alfalfa por kg de peso vivo al día en base a su PV a las seis semanas post cubrición. Finalmente, todas las ovejas fueron desparasitadas con albendazol a razón de 5mg/kg (Valbazén® Pfizer) el día 56 posterior a la infección.

El estado nutricional se valoró mediante la estimación del espesor (E) en mm de la grasa en el cuadrado lumbar mediante ultrasonidos los días 0 y 56 post infección. La cantidad de huevos de *H. contortus* excretados por gramo de heces (Hpg) fue estimada para cada oveja los días 28, 56 y 70 post infección mediante conteo en cámara de McMaster.

La resistencia frente a los bencimidazoles se estimó mediante FECRT y mediante el test de eclosión de huevos (EHA). El porcentaje de reducción del hpg (FECRT) se calculó a partir de los hpg estimados los días 56 (día de la última desparasitación) y 70 (14 días después). Las tasas se calcularon tanto individualmente como para el

conjunto de individuos de cada uno de los dos lotes siguiendo la fórmula de Kochapakdee et al. (1995). La prueba EHA se realizó siguiendo el protocolo estándar, si bien únicamente se preparó, además de los dos pocillos control, dos pocillos a dosis discriminante de tiabendazol (0,1 µg/ml) capaz de inhibir como mínimo el 99% de eclosión en cepas sensibles (Coles et al., 2006). Para la infección se utilizó una cepa de *H. contortus* con un nivel moderado de resistencia a los bencimidazoles (DE50 = 1,28 µg/ml de tiabendazol para la prueba EHA), con el fin de obtener tasas medias de reducción en la FECRT inferiores al 100% y facilitar su análisis estadístico.

El análisis de la variación de E y del hpg en función del plan de alimentación (A) y del tiempo (T) transcurrido entre ambos muestreos (día 28 y 56 post infección) se realizó mediante ANOVAs con medidas repetidas. En este caso los hpg tuvieron que ser previamente transformados a su log(+1), si bien la estimación de las medias y los intervalos de confianza al 95% de los valores reales fueron calculados posteriormente mediante bootstrapping.

Para el análisis de la variación de las FECRT individuales, de las tasas de eclosión de huevos en los pocillos control como un indicador de la viabilidad de los huevos (EHA_Control) y de la EHA a dosis discriminante de tiabendazol (EHA_D), se procedió al ajuste de un modelo MANOVA en el que estas tres variables fueron las variables dependientes y la alimentación el factor predictor. Posteriormente se procedió a un ajuste de un modelo ANOVA para cada una de las tres variables. A partir de estos últimos ANOVAs se realizó un análisis de componentes de la varianza con el fin de determinar el porcentaje de variación explicado por el factor alimentación para cada una de las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor medio de E fue significativamente mayor en el lote *ad libitum* que en el lote con alimentación racionada, si bien mostró una disminución significativa a lo largo del estudio similar en ambos lotes. No ocurrió así para el hpg, donde no se detectó ninguna diferencia significativa en función de la alimentación, del tiempo o de la interacción de ambos (Tabla 1).

Tabla 1. Media (intervalo de confianza del 95%) del espesor de grasa y músculo lumbar (E) y del número de huevos de *H. contortus* excretados (hpg).

		Lote <i>Ad libitum</i>	Lote racionado	A	T	A x T
E	Día 0	15,74 (13,19–18,29)	11,45 (10,0–12,91)	P<0,001	P=0,002	P=0,560
	Día 56	12,29 (9,90–14,69)	9,01 (7,69–10,32)			
Hpg	Día 28	3051 (1896–5125)	2239 (1700–2987)	P=0,652	P=0,503	P=0,438
	Día 56	4630 (3374–5745)	3519 (2764–4114)			

A: tipo de alimentación; T: tiempo entre muestreos.

Después de la desparasitación con albendazol, la FECRT (IC95%) en el lote alimentado *ad libitum* fue del 90,27% (79,24 – 94,60), claramente superior a la del lote con alimentación racionada que fue del 75,72% (66,77 – 84,79).

El análisis MANOVA detectó una variación significativa (P=0,006) de las tres variables dependientes en función del lote de alimentación. Los análisis univariantes (Tabla 2) mostraron una fuerte relación estadística de cada una de las variables con la alimentación. El valor medio de los FECRT individuales fue superior para el lote alimentado *ad libitum*, mientras que las tasas de eclosión de huevos en los pocillos control y con dosis discriminante de tiabendazol fueron superiores para el lote con alimentación racionada. Para las tres variables, el análisis de componentes de la varianza estimó que, respectivamente, el 17,6%, 16,0% y 19,8% de la variación observada estuvo asociada al factor alimentación.

Tabla 2. Medias (intervalo de confianza del 95%) de la tasas individuales de reducción fecal de huevos (FECRT) y de las tasas de eclosión en ausencia de antihelmíntico (EHA Control) y en presencia de tiabendazol a concentración de 0,1 µg/ml (EHA D).

	Lote <i>ad libitum</i>	Lote racionado	P univariante
FECRT	89,71% (78,94 – 94,61)	76,64% (68,17 – 84,13)	0,075
EHA_Control	76,61% (69,06 – 84,17)	86,37% (79,98 – 92,75)	0,053
EHA_D	78,72% (74,79 – 82,65)	87,20% (83,88 – 90,52)	0,002

Algunos autores han sugerido un posible cambio en la fisiología del parásito como causa de las variaciones en los niveles de resistencia. Nuestros resultados demuestran una marcada variación de la resistencia observada en función del estado nutricional del hospedador. Una posible explicación es que la respuesta inmune frente a los parásitos de las ovejas con mejor estado nutricional haya redundado en una menor vitalidad de los parásitos adultos y una menor viabilidad de los huevos, disminuyendo su resistencia al efecto del antihelmíntico.

Estos resultados indican que los niveles de resistencia medidos con algunas de las técnicas rutinarias vienen determinados no sólo por las características genéticas del parásito, sino también por otros procesos que pueden contribuir a incrementar sustancialmente la variabilidad de tales estimaciones. Por este motivo es necesario identificar tales factores cuantificando su efecto sobre la resistencia observada, así como incrementar la cautela a la hora de interpretar los valores de prevalencia de la resistencia, pues, en vista del fuerte componente de variación que pueden incluir estos factores no controlados, la posibilidad de detectar falsos positivos podría ser más elevada de lo asumido hasta ahora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coles, G.C., et al. 2006. *Vet. Parasitol.* 136: 167-185.
- Jabbar, A., et al. 2006. *Life Sci.* 79: 2413-1431.
- Kochapakdee, S., et al. 1995. *Vet. Rec.* 137: 124-125.
- Valderrábano, J., et al. 2002. *Vet. Parasitol.* 104: 327-338.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido cofinanciado por los proyectos INIA_MEC. RTA2006-00183-C03-01 y RTA2006-180-00-00.

EFFECT OF NUTRITIONAL STATUS ON THE SUBSEQUENT RESISTENCE OF *Haemonchus contortus* TO BENCIMIDAZOLES IN SHEEP

ABSTRACT: A study was conducted to examine the effect of host nutrition on resistance levels of *H. contortus* to bencimidazoles estimated by faecal egg count reduction test (FECRT) after administration of Albendazol (5mg/hg) and egg hatch test (EHA) carried out with a single discriminant dosis of thyabendazol (0,1 µg/ml). Pregnant ewes were given access to lucerne pelleted diet either *ad libitum* or at approximately 0.70 of their maintenance requirements from the 35nd day of pregnancy in order to achieve a clearly differentiated level of body reserves by the 90th day of pregnancy, when all ewes in both groups received 5000 infective larvae of *H. contortus*. Then, all animals were put on the same plane of nutrition till the end of the study. Estimation of anthelmintic resistance was performed in day 56th after infection.

The animal fat back showed a significant effect on the subsequent measured resistance levels. Mean percentage reduction (95% confidence interval) of faecal egg counts was higher in *ad libitum* group 90,27% (79,24 – 94,60) than in restricted feed group 75,72% (66,77 – 84,79) whereas, accordingly, mean percentage of hatched eggs both in control and in thyabendazol added wells was higher in this last group. Results herein suggest that host immune response modulated by nutritional status can highly influence anthelmintic resistance measured by FECRT and EHA.

Keywords: anthelmintic resistance, energy restriction, sheep-nematoda,