
ARTÍCULO CIENTÍFICO

Diagnóstico de resistencia al Albendazol sulfóxido en ovejas y cabras, en la provincia de Matanzas

Diagnosis of resistance to Albendazole sulfoxide in sheep and goats, in the Matanzas province

Javier Arece-García*¹, Yoel López-Leyva¹, Uriel Flores-Aguilar², David Ramon Ventura², Emmanuel Macedo-Porcayo² y Rolando Rojo-Rubio²

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Universidad de Matanzas. Ministerio de Educación Superior. Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

²Centro Universitario UAEM Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, México

*Autor para correspondencia: arece@ihatuey.cu

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la eficacia del Albendazol sulfóxido en el control de la parasitosis ovino-caprina, se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* en tres rebaños ovinos y uno caprino, en la provincia de Matanzas (Cuba). En cada rebaño se hizo un ensayo de reducción de conteo fecal de huevos (RCFH) y un ensayo de inhibición de la eclosión de huevecillos. Para el ensayo *in vivo* se seleccionaron 30 animales por rebaño con altos conteos de huevos de nematodos, y se asignaron de forma aleatoria dos tratamientos con 15 animales cada uno: Albendazol sulfóxido (Labiozol®, Labiofam, Cuba) en la dosis recomendada para ovejas y cabras, y un grupo control que no se desparasitó. A los 11 días postratamiento se muestrearon los animales para evaluar la RCFH. Para el ensayo *in vitro* se colectaron heces, se almacenaron de forma anaerobia y se evaluó la inhibición de la eclosión de huevos frente a concentraciones seriadas de Albendazol sulfóxido, de 75 a 0,07 mg/mL. Se calculó la RCFH y se estimó la concentración efectiva media (CE₅₀). En los cuatro rebaños el Labiozol® no logró reducir el conteo de huevos, con valores que indicaron resistencia de los parásitos a este fármaco (RCFH inferior a 95 % y/o sus intervalos de confianza inferiores a 90 %) y predominio absoluto de *Haemonchus contortus*. El estudio de inhibición de la eclosión de huevecillos evidenció una gran variabilidad en la CE₅₀, con valores de hasta más de 1 000 veces superior respecto a la CE₅₀ más baja. Se concluye que en los rebaños estudiados hubo evidencias de la resistencia de *H. contortus* al Albendazol sulfóxido

Palabras clave: eclosión, *Haemonchus contortus*, huevos, nematoda.

ABSTRACT: In order to evaluate the efficacy of Albendazole sulfoxide in the control of parasite infestation in sheep and goats, *in vivo* and *in vitro* studies were conducted in three sheep herds and a goat herd, in the Matanzas province (Cuba). In each herd, a fecal egg count reduction (FECR) trial and an egg hatching inhibition essay were carried out. For the *in vivo* essay 30 animals per herd with high nematode egg counts were selected, and two treatments with 15 animals each were randomly assigned: Albendazole sulfoxide (Labizol®, Labiofam, Cuba) in the recommended dose for sheep and goats, and a control group which was not dewormed. Eleven days post-treatment the animals were sampled to evaluate the FECR. For the *in vitro* trial feces were collected, anaerobically stored and the egg hatching inhibition was evaluated against serial concentrations of Albendazole sulfoxide, from 75 to 0,07 mg/mL. The FECR was calculated and the mean effective concentration (EC₅₀) was estimated. In the four herds Labiozol® could not reduce the egg count, with values that indicated resistance of the parasites to this drug (FECR lower than 95 % and/or its confidence intervals lower than 90 %) and absolute predominance of *Haemonchus contortus*. The egg hatching inhibition study showed high variability in the EC₅₀, with values up to 1 000 times higher with regards to the lowest EC₅₀. It is concluded that in the studied herds there was evidence of the resistance of *H. contortus* to Albendazole sulfoxide.

Keywords: hatching, *Haemonchus contortus*, eggs, nematodes

INTRODUCCIÓN

La resistencia de los parásitos de los rumiantes a los fármacos antiparasitarios constituye una problemática global de consecuencias impredecibles y escasamente cuantificadas. En Cuba, los primeros reportes de resistencia de nematodos a los antiparasitarios comenzaron a aparecer en los primeros años del siglo XXI (Rodríguez, 2002; Arece *et al.*, 2004), y en la actualidad hay un interés creciente por conocer el estado de eficacia de estos fármacos, pues existe consenso general entre productores y veterinarios acerca de que ya no funcionan.

En el país existen antiparasitarios –producidos por la empresa LABIOFAM– de tres familias o grupos farmacológicos: Ivermectina (Labiomec®), Albendazol (Albendazol®/Labiozol®) e Imidazotiazoles (Levamisol 10 %). Estos comparten diferentes mecanismos de acción y pudieran ser insertados en planes de rotación que impidan el desarrollo de resistencia; sin embargo, en ocasiones su baja disponibilidad obliga al empleo del mismo producto en ocasiones consecutivas. A ello se une el desconocimiento, por la mayoría de los productores, de los principales factores que intervienen en la aparición de la resistencia, así como la tradición de realizar tratamientos «preventivos» a toda la masa. Aun cuando se estime que la prevalencia de la resistencia es baja, resulta de especial interés conocer el estado de su dispersión con el objetivo de poder seleccionar el grupo de medicamentos a emplear (Čudeková *et al.*, 2010).

Dentro de los fármacos empleados en Cuba, el Labiozol® (presentación inyectable, Albendazol sulfóxido) y el Albendazol® (presentación oral) tienen gran aceptación, debido a su margen de seguridad terapéutica y su resultado a corto plazo, además de su efecto (en otras dosis) contra *Fasciola hepatica*. Ello ha propiciado el uso desmedido de estos medicamentos en regímenes de tratamientos arbitrarios y sin bases epizootiológicas, lo que ha conllevado la sospecha, por parte de los propios productores, del fallo del medicamento en el control parasitario.

El interés creciente acerca de la resistencia necesita de métodos estandarizados para su diagnóstico, y hoy día se emplean varios métodos con este fin. El de mayor difusión es un estudio *in vivo* que determina la reducción del conteo fecal de huevos (Coles *et al.*, 2006); sin embargo, otros ensayos *in vitro* también han sido validados (Várady *et al.*, 2007) y constituyen una herramienta práctica y útil

para conocer el estado actual de los fármacos en determinadas regiones. De este modo, se ha demostrado que el ensayo de inhibición de la eclosión de huevecillos posee una sólida base para el diagnóstico clínico de resistencia al albendazol (Várady *et al.*, 2015) y su uso en condiciones de campo.

En la actualidad hay discrepancia entre los ensayos *in vivo* e *in vitro* e incluso de las sustancias empleadas en cada caso. En los ensayos *in vivo* se evalúan los efectos de los fármacos en las fases adultas de los parásitos, mientras que en los ensayos *in vitro*, las fases exógenas del ciclo de vida de los parásitos (huevos y larvas). También existen otros ensayos, como el test de desarrollo larvario (útil frente a las lactonas macrocíclicas y el levamisol) y el ensayo de inhibición de la migración larvaria.

Para el diagnóstico de resistencia, el ensayo de reducción del conteo fecal de huevos ha sido el más estudiado y recomendado por la World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology –WAAVP– (Coles *et al.*, 1992). Este tiene la desventaja de que es costoso y requiere tiempo para su ejecución, pues es necesario contar con un mínimo de 15 animales por fármaco a evaluar y la realización de dos muestreos (día cero y día 14 postratamiento). En contraste, el ensayo de inhibición de la eclosión de huevecillos es sencillo y barato cuando se cuenta con las condiciones mínimas de laboratorio. Ambos presentan una sensibilidad baja, pero logran detectar resistencia cuando el 25 % de la población es ya resistente (Fortes y Molento, 2013).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la eficacia del Albendazol sulfóxido mediante ensayos pareados de reducción del conteo fecal de huevos y el de inhibición *in vitro* de la eclosión de huevecillos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se desarrolló en condiciones de producción, en tres rebaños de ovejas y uno de cabras de la provincia de Matanzas. En estos rebaños, habitualmente, los tratamientos antiparasitarios son realizados de manera arbitraria y se emplea el medicamento que exista en ese momento.

Selección de los animales, tratamientos y dosis del fármaco. En cada entidad se muestreó la totalidad de los animales. Se extrajeron heces directamente del recto de cada animal, las cuales se transportaron al laboratorio de parasitología de la EEPF Indio Hatuey para la determinación del nivel de infestación

individual, mediante la técnica de McMaster (Arece *et al.*, 2002). A partir de los resultados de los conteos fecales de huevos (cfh) se seleccionaron 30 animales, con cfh superiores a 500 huevos por gramo de heces (hpg); de ellos 15 para el grupo control (no recibieron tratamiento antiparasitario) y 15 que recibieron Albendazol sulfóxido (Labiozol®, LABIOFAM, Cuba, presentación inyectable) en la dosis recomendada por el fabricante (3,5 mg/kg de peso vivo) para ovejas; mientras que en cabras se empleó una dosis de 11,5 mg/kg de peso vivo (Jackson *et al.*, 2012).

Ensayo *in vivo* (reducción del conteo fecal de huevos, RCFH)

Procedimiento experimental. Se empleó la metodología para la evaluación de fármacos, propuesta por la WAVVP (Coles *et al.*, 1992). Así, se realizaron muestreos de heces directamente del recto de cada animal para diagnosticar la carga parasitaria mediante la técnica de McMaster modificada.

A los once días postratamiento se realizó un segundo muestreo coprológico para determinar el cfh, así como la RCFH. Se realizaron coprocultivos para definir las especies de parásitos presentes en cada grupo (Roberts y O'Sullivan, 1952).

Ensayo *in vitro* (prueba de eclosión de huevos)

Procedimiento experimental. En el muestreo pretratamiento se tomaron heces, que se mezclaron y se conservaron anaeróbicamente para realizar el ensayo de inhibición de la eclosión (Coles *et al.*, 1992). Se utilizaron once concentraciones de Albendazol sulfóxido a partir de diluciones seriadas desde 75 a 0,07 mg/mL, y se usó agua destilada como control negativo.

Se colectaron los huevos de strongílidos mediante la técnica de Hubert y Kerboeuf (1992) y se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos, para ser enfrentados con cada una de las concentraciones, sobre la base de un diseño completamente aleatorizado, con seis réplicas por tratamiento. Se incubaron durante 48 h, y transcurrido ese tiempo se detuvo la eclosión con 10 µL de solución de Lugol. Se contaron las larvas y los huevos en 20 alícuotas de 10 µL, y se determinó el porcentaje de eclosión.

Análisis estadístico. En el estudio *in vivo* se determinó la RCFH, y los intervalos de confianza superior e inferior mediante el software RESO®

(Wursthorn y Martin, 1990). Estas variables fueron los criterios para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de los fármacos; así, se consideró resistente un medicamento si: i) la RCFH (%) era inferior a 95 %, y/o ii) sus intervalos de confianza eran inferiores a 90 % (Coles *et al.* 1992).

En el estudio *in vitro* se realizó un análisis de regresión Probit a través del paquete estadístico SAS versión 9.0, con el fin de determinar la concentración efectiva media (CE₅₀) para la eclosión de los huevecillos, en la que se emplearon los valores del grupo control positivo para la corrección de los resultados siguiendo el siguiente modelo (González-Garduño *et al.*, 2014):

$$\text{Pr (Respuesta)} = C + (1-C)F(X'\beta) = C + (1-C)\Phi(b_0 + b_1x \log_{10}(\text{Dosis}))$$

Donde:

Pr: probabilidad de una respuesta

C: tasa de respuesta natural (proporción de individuos que responden a la dosis cero)

F: función de distribución acumulativa (normal)

X: vector de variables explicativas

β: vector de parámetros estimados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad, el ensayo fenotípico *in vivo* es el método por elección y, además, el recomendado por la WAAVP para el diagnóstico de resistencia (Kaplan y Vidyashankar, 2012); sin embargo, resulta poco sensible para tal fin. Para realizar este ensayo se debe hacer un muestreo de heces anterior y otro posterior al tratamiento antiparasitario, así como contar con un número mínimo de animales y que estos posean una tasa de infestación mínima; además, los conteos fecales se hacen de manera individual.

En la tabla 1 aparece el resultado de la prueba de eficacia *in vivo* del Albendazol sulfóxido en las cuatro unidades. Se apreció, en todos los casos, resistencia de los parásitos a este fármaco, tanto por la RCFH como por los intervalos de confianza. En Cuba es la primera vez que se reporta resistencia a este medicamento en pequeños rumiantes.

En el año 2004 se realizó en dos entidades productivas cubanas el primer estudio de evaluación de eficacia del Albendazol sulfóxido, a partir del cual se señaló que su eficacia era apropiada; ello se atribuyó a la limitada distribución de este fármaco, ya que recién iniciaba su comercialización en Cuba en presentación inyectable (Arece *et al.*, 2004). Hoy día la situación es completamente diferente, pues el

Tabla 1. Reducción del conteo fecal de huevos (RCFH) e intervalos de confianza (IC), en cuatro rebaños

Unidad	RCFH (%)	IC superior (%)	IC inferior (%)
Cabras	56	82	0
Ovinos 1	44	78	0
Ovinos 2	76	91	41
Ovinos 3	52	72	5
Especie resistente	<i>H. contortus</i>	<i>H. contortus</i>	<i>H. contortus</i>

albendazol en sus dos presentaciones actuales (oral e inyectable), junto con el Labiomec® (Ivermectina 1 %), constituye el de mayor uso en el país.

No obstante, cuando la presión de selección a la que es sometida un fármaco es baja, se logra mantener la eficacia en rangos aceptables, tal como informaron Hernández *et al.* (2015) en Cuba, quienes con estos mismos productos hallaron eficacia de 99,2 % de reducción del conteo fecal de huevos. En las condiciones del país es posible reducir la presión de selección a que están sometidos los antiparasitarios, siempre que se establezcan estrategias integrales para el control parasitario. En primer lugar, se debe eliminar el estereotipo asumido durante años de realizar tratamientos antiparasitarios preventivos o supresivos en masa (al 100 % del rebaño), pues se ha evidenciado que constituye un error tratar todos los animales cuando se conoce menos del 20 % de estos y albergan más del 80 % de los parásitos; en segundo lugar, es de vital importancia la rotación de los fármacos por familias e incentivar la cultura de realizar pesajes a los animales al ser desparasitados. Otro aspecto a considerar es la implementación de tratamientos selectivos mediante un estudio integral de la coloración de la mucosa ocular (método FAMACHA), la condición corporal y el estado general del animal, entre otros aspectos.

Hubo diferencias en la concentración letal media al Albendazol sulfóxido en cada unidad (tabla 2). Los valores más elevados se hallaron en el rebaño

de cabras, que fueron más de 100 veces superiores a los encontrados en un rebaño de ovejas y más de 1 000 en otro. Tales resultados constituyen una prueba fehaciente del nivel de resistencia de los nematodos a este medicamento.

A nivel internacional se emplea el Tiabendazol (pureza superior a 99 %), en lugar del albendazol, para determinar resistencia mediante el test de inhibición de la eclosión de huevos; en el que se establece como valor de corte para resistencia todo valor de CE_{50} superior a 0,1 mg/mL (Coles *et al.*, 1992). No obstante, Kumar *et al.* (2014) emplearon Albendazol sulfóxido y mantuvieron el mismo valor de corte para resistencia sugerido por la WAAVP. Teniendo en cuenta estos elementos, de los cuatro rebaños estudiados, dos mostraron CE_{50} superior al límite de resistencia y otro estuvo próximo a este valor, pero su intervalo de confianza superior lo superó. El estudio de eclosión es una prueba que puede ser considerada para el diagnóstico de resistencia, tal y como señalan Várady *et al.* (2015).

Recientemente se ha demostrado, mediante herramientas moleculares, que los ensayos *in vitro*, fundamentalmente el test de inhibición de la eclosión de huevecillos, son prácticas útiles para el diagnóstico de resistencia a los becimidazoles, con una elevada fiabilidad (Várady *et al.*, 2015). Poseen además, como ventaja, que se pueden hacer muestreos aleatorios a los animales y formar *pool*, lo cual conlleva una sola visita a la unidad; por otro

Tabla 2. Concentración letal media (CE_{50}) e intervalos de confianza (IC) en cuatro rebaños

Unidad	CE_{50} (mg/mL)	IC inferior (mg/mL)	IC superior (mg/mL)
Cabras	3,38	0,32	11,77
Ovinos 1	0,097	0,09	0,104
Ovinos 2	0,003	0,001	0,006
Ovinos 3	12,35	5,23	23,36

lado, permiten hacer muestreos en varias entidades productivas.

Hasta el momento se han reportado casos aislados de resistencia a algunos medicamentos, entre los que se destaca la Ivermectina (Labiomec®, LABIOFAM, Cuba), pero con bajo nivel de dispersión en los rebaños ovinos estudiados, pues se encontró en un solo rebaño de un total de 15 estudiados (Mencho-Ponce *et al.*, 2013). Similar situación ocurre en bovinos, ya que en un estudio realizado en la provincia de Camagüey se reportó que este mismo fármaco fue eficaz en los 20 rebaños seleccionados, con una eficacia superior al 97 % (Guerra-Llorens *et al.*, 2014).

A partir de los resultados se demostró que existe resistencia de *H. contortus* al Albendazol sulfóxido en ovejas y cabras, en ensayos *in vivo* e *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arece, J.; Mahieu, M.; Archimède, H.; Aumont, G.; Fernández, M.; González, E. *et al.* Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of gastrointestinal nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Res.* 54 (1-2):61-67, 2004.
- Arece, J.; Rojas, F.; González, E. & Cáceres, O. Eficacia de LABIOMECC® en el parasitismo en ovinos, terneros y equinos en condiciones de producción. *Pastos y Forrajes.* 25 (3):223-229, 2002.
- Coles, G. C.; Bauer, C.; Borgsteede, F. H. M.; Geerts, S.; Klei, T. R.; Taylor, M. A. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44 (1-2):35-44, 1992.
- Coles, G. C.; Jackson, F.; Pomroy, W. E.; Prichard, R. K.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Silvestre, A. *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136 (3-4):167-185, 2006.
- Čudeková, Patrícia; Várady, Marián; Dolinská, Michaela & Königová, Alžbeta. Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 172 (1-2):155-159, 2010.
- Fortes, F. S. & Molento, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Vet. Brasil.* 33 (12):1391-1402, 2013.
- González-Garduño, R.; López-Arellano, M. E.; Ojeda-Robertos, N.; Liébano-Hernández, E. & Mendoza-de Gives, P. Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 46 (3):399-405, 2014.
- Guerra-Llorens, Yunaisy; Mencho-Ponce, J. D.; Mencho, J. C.; de Miranda-Carrazana, B. & Galbán-Méndez, Dania Eficacia antihelmíntica del Labiomec® (Ivermectina 1%) en rebaños bovinos de Camagüey, Cuba. *Revista de Salud Animal.* 36 (1):58-61, 2014.
- Hernández, D.; Roque, E.; Meireles, Teresa; Peñate, Idolidia & Demedio, J. Evaluación de la eficacia de Albendazol e Ivermectina en el control de nemátodos gastrointestinales en ovinos Pelibuey. *Ciencia y tecnología ganadera.* 9 (1):53-57, 2015.
- Hubert, J. & Kerboeuf, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130:442-446, 1992.
- Jackson, F.; Várady, M. & Bartley, D. J. Managing anthelmintic resistance in goats. Can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Res.* 103 (1):3-9, 2012.
- Kaplan, R. M. & Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186 (1-2):70-78, 2012.
- Kumar, S. C.; Renukprasad, C.; D'Souza, P. E. D. & Pradeep, B. S. Evaluation of albendazole against sheep strongyles in farms of Karnataka state by different *in vitro* tests. *Ind. J. Vet. & Anim. Sci. Res.* 43 (5):330-339, 2014.
- Mencho-Ponce, J. D.; Guerra-Llorens, Yunaisy; Padilla-Villavicencio, L.; Rodríguez-Diego, J. G. & Beltrão-Molento, M. Eficacia antihelmíntica de la Ivermectina 1% (Labiomec®) en rebaños ovinos de Camagüey, Cuba. *Revista de Salud Animal.* 35 (2):134-136, 2013.
- Roberts, F. H. S. & O'Sullivan, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agr. Res.* 1:99-108, 1952.
- Rodríguez, Rafmary. Estudio de la resistencia de *Dictyocaulus viviparus* al levamisol en Cuba. *Memorias del XVII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.* La Habana. [CD-ROM], 2002.
- Várady, M.; Čudeková, P. & Čorba, J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Vet. Parasitol.* 149 (1-2):104-110, 2007.
- Várady, M.; Königová, A.; Dolinská, M.; Kupčinskas, T.; Babják, M. & Samson-Himmelstjerna, G. von. Does *in vitro* egg hatch test predict the clinical failure of benzimidazole treatment in *Haemonchus contortus*? *25th International conference of the World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology.* United Kingdom: University of Liverpool, 2015.
- Wursthorn, L. & Martin, P. *RESO©. FECRT analysis program.* Version 2.0. Parkville, Australia: CSIRO Animal Health Research Laboratory, 1990.