



Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología animal
Área de Sanidad animal
Parasitología y Enfermedades
parasitarias

Pequeños estróngilos en el valle Medio del río Ebro.

Manejo y detección de resistencias al tiabendazol.



Eva Goñi Álvarez de Eulate
Zaragoza, Septiembre de 2012

Trabajo de fin de Máster de Iniciación
a la Investigación en Ciencias Veterinarias.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutora del trabajo fin de Máster, María Jesús Gracia Salinas, por la ayuda y disponibilidad prestada en todo momento.

A Francisco Vázquez Bringas y Antonio Romero Lasheras, veterinarios especialistas en équidos y especialmente a Arantza Vitoria Moraiz por asesorar y prestar ayuda en la visita a las explotaciones equinas y cumplimentación de encuestas.

A los propietarios de las explotaciones visitadas por permitirme el acceso a las mismas y proporcionarme información sobre las encuestas.

A los residentes del área de grandes animales del Hospital Clínico Veterinario de Zaragoza, especialmente a Almudena Arenas Álvarez por la ayuda en el manejo de los animales y recogida de muestras.

A Carlos Calvete, veterinario e investigador en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Montañana, por su disposición y enseñanza de las técnicas in Vitro. Gracias del mismo modo a Ana Guillén y Rebeca Calavia, trabajadoras también del CITA.

Y por último, al profesorado y becarios de Parasitología por el apoyo ofrecido en todo este tiempo.

Resumen

Los pequeños estróngilos constituyen, en la actualidad, los parásitos más emergentes y patogénos de los équidos, pudiendo ocasionar tanto efectos clínicos como subclínicos. El control de estos parásitos recae sobre todo en la utilización de antihelmínticos y aunque existen productos eficaces, los équidos no adquieren una inmunidad completa, por lo que es necesario seguir tratándolos con antiparasitarios a lo largo de su vida.

Uno de los problemas que puede ocasionar la utilización de antihelmínticos es el desarrollo de cepas de nematodos resistentes. La resistencias a los antihelmínticos por parte de los nematodos gastrointestinales, cada día cobra más importancia. Muchos son los casos descritos en otras especies, sobretodo en rumiantes, pero en la especie equina, todavía hay mucho por investigar. Así pues, en países como Reino Unido, Italia, Alemania o Francia, hay artículos publicados donde se pone de manifiesto la existencia de resistencias a los antiparasitarios y sus consecuencias en la ganadería equina. Sin embargo, en España, los estudios realizados son escasos y algunos centran el problema en provincias como Cantabria, Álava o Palencia.

La resistencia a los antihelmínticos conlleva la pérdida o disminución de su eficacia frente a los parásitos a los que van dirigidos. Por ello es importante detectar las resistencias en su fase inicial para poder cambiar de estrategia de control y preservar el bienestar de nuestros animales.

Nuestro estudio tiene como objetivo identificar aspectos de manejo que pueden favorecer el desarrollo de resistencias. También pretende conocer la prevalencia, niveles de parasitación y los géneros más comunes de pequeños estróngilos que parasitan a los équidos en la zona media del Valle del río Ebro. Asimismo, también se realizaron pruebas in Vitro con el fin de detectar la posible presencia de cepas de pequeños estróngilos resistentes al tiabendazol.

Los resultados del estudio nos indican que el manejo, en general, es correcto. Sin embargo, hábitos como desparasitar de forma no selectiva o utilizar dosis estandarizadas sin realizar el pesaje de los animales, son aspectos que pueden favorecer el desarrollo de resistencias.

La prevalencia de parasitación por pequeños estróngilos en la zona de estudio fue del 34,04%. Los niveles de parasitación eran bajos, inferiores a 100 huevos por gramo de heces y las parasitaciones más elevadas, en

términos generales, se presentaban en los animales más jóvenes. En el 100% de los casos, el género implicado era *Cyathostomun*.

La utilización del test in Vitro de inhibición de la eclosión nos permitió detectar que sólo el 5.55% de los animales muestreados portaban parásitos resistentes al tiabendazol.

En general, y a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos considerar que, en la actualidad, los pequeños estróngilos no representan una amenaza seria para los caballos en la zona media del Valle del Ebro.

ÍNDICE:

1. Introducción _____	6
1.1 Nematodos gastrointestinales: pequeños estróngilos	6
1.1.2 Ciclo biológico	7
1.1.3 Síntomas y lesiones en caballos.....	10
1.1.4 Diagnóstico.....	11
1.1.5 Tratamiento	13
1.2 Resistencia a antihelmínticos y métodos de detección.....	15
1.3 Control de los pequeños estróngilos con el fin de reducir el riesgo de desarrollo de resistencias a los antihelmínticos	22
2. Objetivos del trabajo _____	25
3. Material y métodos _____	26
3.1 Aspectos de manejo que pueden determinar la aparición de cepas de pequeños estróngilos resistentes a antihelmínticos	26
3.2. Parasitación por pequeños estróngilos en équidos en el Valle Medio del río Ebro	27
3.2.1. Coprología Cualitativa.....	28
3.2.2. Coprología Cuantitativa.....	28
3.2.3. Identificación de géneros. Coprocultivo.....	29
3.3. Situación de Resistencias a antihelmínticos en la especie equina.....	31
4. Resultados _____	34
5. Discusión _____	41
6. Conclusiones _____	49
7. Bibliografía _____	50

1. Introducción:

1.1 Nematodos gastrointestinales: pequeños estróngilos.

Los caballos de cualquier parte del mundo, están expuestos a una gran variedad de parásitos. Entre éstos, los nematodos digestivos, son los más frecuentes y la razón por la que se requiere el establecimiento de medidas preventivas en caballos durante todo el año (Fayet, 2005). Además, suponen la mayor amenaza en la industria equina, ya que cuando las cargas parasitarias son elevadas, pueden comprometer su salud y bienestar (Matthews, 2011).

Los nematodos, se clasifican dentro del Reino *Animalia*, Subreino *Metazoa*, Phylum *Nemathelminthes*, Clase *Nematoda* (Johnstone, 1998).

Se trata de vermes no segmentados con simetría bilateral y cavidad corporal (Figura 1). El aparato digestivo consta de boca y ano sin pared muscular definida. No tienen aparato circulatorio ni respiratorio. Presentan sexos separados y un sistema reproductor relativamente sencillo (Johnstone, 1998).

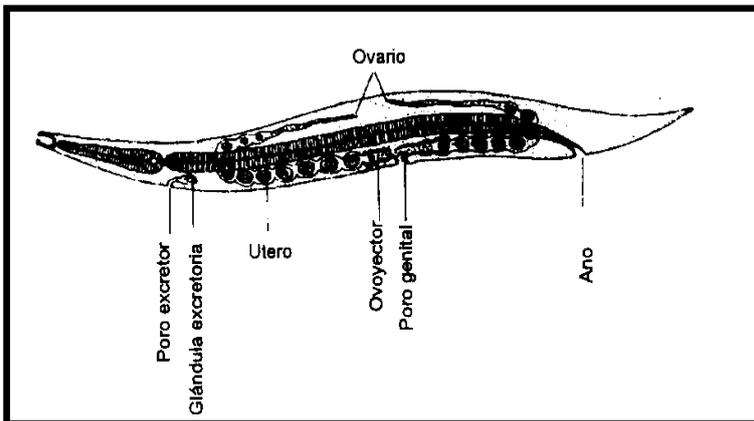


Figura 1: Corte longitudinal de nematodo hembra.

En los nematodos, dentro del Orden *Strongylida*, se ubican los *grandes* y los *pequeños estróngilos*. Éstos forman parte a su vez, de la Superfamilia *Strongyloidea* (Dwight et al., 2004; Johnstone, 1998), Familia *Strongylidae*, Subfamilia *Cyathostominae* (Dwight et al., 2004), de ahí que también sean

conocidos los pequeños estróngilos con el sobrenombre de *ciatostomas* (Corning, 2009).

Dentro de esta subfamilia, se distinguen varios géneros, tales como: *Cyathostomum*, *Cylicostephanus*, *Cylicocyclus*, *Cylicodontophorus*, *Poteriostomum* y *Gyalocephalus* (Johstone, 1998).

Incluyen aproximadamente 50 especies de distribución cosmopolita, las cuales se localizan en el intestino grueso, principalmente en el ciego y colon de caballos y asnos.

Mientras hace unas pocas décadas, los grandes estróngilos, eran considerados como la máxima preocupación epidemiológica y clínica, debido a los efectos fatales que ocasionan con sus migraciones a través de los vasos sanguíneos, hoy en día, esta situación ha cambiado desde que en la década de 1960 llegaron antiparasitarios altamente eficaces (Herd, 1990).

Actualmente, los pequeños estróngilos, en lo que se refiere a la ganadería equina, son considerados como los parásitos más emergentes y patógenos, pudiendo ocasionar tanto efectos clínicos como subclínicos (Corning, 2009).

Asimismo, la falta de eficacia que se lleva observando a lo largo de los últimos años en Europa, Oceanía y América (Kaplan 2002; Kaplan 2004; Wolstenholme et al., 2004), debido a la resistencia que han desarrollado a los tratamientos antihelmínticos, complica el control de estos parásitos.

En el caballo no provocan la activación de la respuesta inmune, de modo que estos animales no adquieren una inmunidad completa, por lo que es necesario seguir tratándolos con antiparasitarios a lo largo de su vida.

1.1.2 Ciclo biológico:

Estos nematodos tienen un ciclo directo (Stratford et al., 2011; Matthews, 2011). El periodo de prepatencia oscila de 2 meses y medio a 4 meses (Matthews, 2011; Dwight et al., 2004).

Los estadios adultos de los pequeños estróngilos miden de 5 a 10 mm y se localizan en la superficie de la mucosa intestinal. Depositán grandes cantidades de huevos, que el caballo eliminará a través de las heces. Estos huevos miden entorno a 90-70 μm (Kassai, 2002).

Los animales parasitados defecan en los prados donde pastan. A través de estas heces se vehiculan millones de huevos de nematodos, en cuyo interior se desarrollarán las larvas L1, siempre que se reúnan unas condiciones ambientales favorables. Así, la humedad óptima para que se produzca la eclosión es del 80% y una temperatura entorno a 22-26°C (Johnstone, 2002).

Las larvas L1 eclosionan de los huevos accediendo al pasto, donde mudan a L2 (provista de una cutícula que la protege de la desecación, al mismo tiempo que impide la alimentación) y a L3 tempranas, que es la forma infectante para los équidos (Figura 2).



Figura 2: Ciclo biológico de pequeños estróngilos.

La tasa de desarrollo de L1 a L3 es directamente proporcional a la temperatura: con clima templado, los huevos pueden eclosionar y evolucionar a L3 infectante en un corto periodo de tiempo, como 3 días (Corning, 2009).

Las larvas que han mudado hasta el estadio de L3 (Figura 3) mantienen la cutícula del estadio anterior. Ésta les impide alimentarse pero a su vez, les permite sobrevivir incluso a condiciones de congelación, pudiendo perdurar en el pasto durante largos periodos de tiempo. De esta manera, en los pastos podemos encontrar tanto larvas L3 de la estación previa, como las que corresponden a las que han eclosionado recientemente de los huevos (Matthews et al., 2004).

Estas L3 tempranas son ingeridas junto con la vegetación cuando los

animales presan el alimento. En el interior del caballo, pierden la vaina y llegan hasta las *criptas de Lieberkuhn* del intestino delgado.

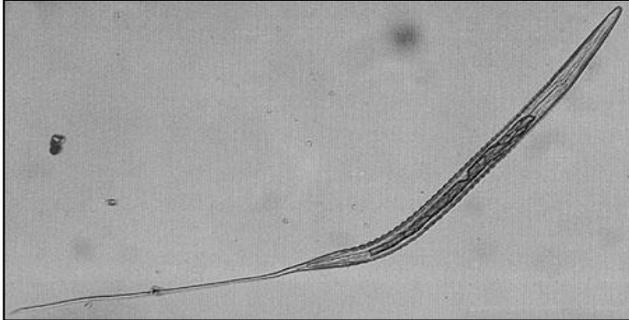


Figura 3: Larva en estadio L3. Provista de vaina, cola larga y con forma de látigo y ocho células intestinales. Forma infectante para los équidos.

Una vez en el intestino delgado, puede suceder dos cosas: que las L3 vayan mudando hasta la forma adulta y pongan huevos fértiles, en el lumen del intestino grueso en un rápido ciclo vital de unas 5-6 semanas, o que las larvas L3 lleguen a la mucosa del ciego y colon y formen quistes (*larvas en hipobiosis* o inactivas) que suele coincidir con la llegada del otoño (Jasko y Roth, 1984; Church et al., 1986).

La estación durante la cual ocurre la hipobiosis depende del clima. Así en climas templados, el cúmulo de larvas tiene lugar durante la temporada de pastoreo, la larva se enquistará durante los meses más frescos del año y podría emerger en masa cuando el tiempo más caliente en primavera. Esta sincronización se da a la inversa en climas tropicales, donde la sincronización de la inhibición se da en periodos de estrés propiciados por los meses de verano, con emergencia de larvas en otoño.

Los estadios larvales se protegen enquistándose. Además más del 90% de los ciatostomas enquistados, pueden quedar inhibidos en su estadio L3 temprana y permanecer dentro de la pared intestinal, como pequeños nódulos, durante largos periodos que pueden ir desde los 4 meses a los 2 años (Corning, 2009).

Durante este periodo de enquistamiento, los ciatostomas se hacen resistentes a muchos de los fármacos antihelmínticos actualmente disponibles, incluida la ivermectina oral a 0,2 o 1,0 mg/kg y moxidectina a 0,3 o 0,4 mg/kg (Xiao et al., 1994).

En la primavera del año siguiente, estas larvas “despertarán” en masa muy rápidamente saliendo de los quistes, traducándose en una fuerte inflamación de la mucosa intestinal e intensa diarrea acuosa. Este fenómeno es conocido como *Ciatostomosis larval* y suele acabar con final fatal. La mayoría de los vermes son inmaduros y por lo tanto, la cantidad de huevos que se vehiculan por las heces es engañosamente baja (Dwight, 2004).

Tras este desenquistamiento, las larvas mudan a los estadíos L4 y L5 hasta convertirse en adultos fértiles y situarse en el lumen del intestino grueso, donde realizan la puesta de huevos y su posterior salida hasta los pasto a través de las heces (Corming, 2009).

Por tanto, podemos observar que en otoño e invierno, aumenta la proporción de las fases hipobióticas y enquistadas y disminuye la proporción de las fases lumbales. Esto supone un retraso en la transformación de las larvas en individuos adultos para así también retrasar la puesta de huevos para cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas (temperaturas frescas y humedad elevada).

A finales del invierno y principios de la primavera aumentan la proporción de fases lumbales pero nunca llegan a ser la mayoría de la población de ciatostomas. Siempre hay un mayor porcentaje de ciatostomas en la mucosa, esperando a desarrollarse.

En cada primavera, es cuando se produce una mayor eliminación de huevos a través de las heces. En los animales jóvenes (menores de 6 años) se observan altos recuentos de huevos fecales (hpg). Por otra parte, en animales más viejos, estos recuentos son bajos, pero son fuentes importantes de contaminación de prados.

En ocasiones, los mecanismos de salida sincronizada de estas larvas, se cree que puede ser debido a la eliminación del feed-back negativo asociado con los ciatostomas lumbales y los que están en desarrollo en la mucosa, después del tratamiento con antihelmínticos (Matthews et al, 2004).

1.1.3 Síntomas y lesiones:

Los pequeños estróngilos, desde su llegada al intestino del caballo, producen daños en la mucosa intestinal y reducción del metabolismo nutricional.

Sin embargo, el daño más grave recae en el síndrome de *Ciatostomosis larval*, que puede dar lugar a cuadros de diarrea persistente, emaciación progresiva e hipoalbuminemia marcada, a veces agravada por una anasarca. Ello es debido a la salida sincronizada y en masa de miles de larvas enquistadas, al lumen intestinal. Origina la muerte del 50-60% de los caballos afectados (Dwight, 2004). Los animales más vulnerables son los potros jóvenes y los animales geriátricos (Fritzen et al., 2010; Lyons et al., 2006). En los équidos, los parásitos adultos son responsables de síntomas como letargia, repentina pérdida de peso, retraso en el crecimiento, distensión abdominal, debilidad, diarrea y rendimiento físico más bajo de lo normal (Brady et al, 2009). En el caso de las yeguas, se ha descrito pérdida en la eficacia de producción de leche para los potrillos, baja condición corporal y altas incidencias de pérdidas embrionarias durante la gestación.

Pese a todo, son los estadios larvales quienes causan los problemas más graves. En cuanto a las lesiones, en los casos más leves, los cambios patológicos están restringidos a larvas encapsuladas. En el caso de afecciones más graves, se ve un deterioro de la mucosa, con infiltración celular intensa, edema y producción de moco. También ulceraciones superficiales, que corresponden con la huella de la salida de las larvas de los nódulos de encapsulación. En potros menores de dos años, las lesiones suelen ser más severas y se describen como enteritis hemorrágicas, catarrales y fibrinosas (Corning, 2009).

1.1.4 Diagnóstico:

Muchos diagnósticos solo se pueden dar post-mortem.

Diagnóstico clínico: Los efectos subclínicos se traducen como una disminución de la función y eficacia del tracto digestivo.

Diagnóstico laboratorial: Un cuadro típico incluye neutrofilia, hipoalbuminemia, hiperglobulimemia, especialmente betaglobulinas, hallazgos que corresponden con una enteropatía con pérdida de proteínas. Las proteínas séricas están bajas con un ligero aumento de proteínas totales, como consecuencia de la deshidratación; una concentración de albúmina sérica < 20g/l y una tasa de albúmina:globulina < 0.7. Puede haber anemia con o sin eosinofilia y con o sin linfocitosis.

Diagnóstico parasitológico: Un hallazgo útil de diagnóstico es la presencia de un gran número de larvas de ciatostomas en heces, pero su ausencia no descarta la parasitación (Corning, 2009).

Para poder detectar la presencia de huevos de pequeños estróngilos, realizamos exámenes coprológicos (coprología cualitativa) de flotación directa con Sulfato de Zn (Urquhart et al., 2001) y con la ayuda de la cámara de Mc Master (Raynaud, 1970), hacemos el recuento (coprología cuantitativa). Hay autores que señalan que sólo debería administrarse antiparasitarios en el caso de que los équidos superasen cierto nivel de hpg (Brady et al, 2009) o sean animales muy delgados (Nielsen et al., 2010) y que en caso contrario, los tratamientos deberían suspenderse. Los niveles críticos de hpg que se han establecido son por encima de 100 huevos/g (Herd, 1993; Uhlinger, 1990), 200 huevos/g (Little, et al., 2003) o cuando el 25% de los animales exceden los 200 huevos/g (Uhlinger, 1991). Sin embargo, otros autores señalan que animales con niveles de 200-500 huevos/g, requieren tratamiento antiparasitario (Matthews, 2008).

Para determinar el género y la especie de estos nematodos gastrointestinales, realizamos coprocultivos. Para ello nos valemos del estadio larval L3 desarrollado gracias al coprocultivo de los huevos presentes en las heces (Euzby, 1982). Para ello, se deja cultivando la muestra de heces unos 7-10 días a 22- 27 °C y 80% de humedad. Con frecuencia, es necesario humedecer la muestra con agua, dependiendo de su consistencia, así como removerla para una mejor oxigenación e incubación (Johnstone, 2002).

Posteriormente, las larvas L3 se depositan en el aparato de Baermann durante 24 horas y son recogidas para su visualización en el microscopio óptico a X10. Para facilitar su identificación se puede utilizar lugol, que inmoviliza a las larvas (Silva et al., 2009). La técnica de Baermann es considerada el método de elección para la detección de estadios inmaduros de ciatostóminos en casos de ciatostomosis larval (Olsen et al, 2003). Actualmente es el único medio para la detección de infecciones de ciatostóminos en su fase inicial, pero todavía no se usa de forma habitual (Nielsen et al, 2010).

El género *Cyathostomun* es uno de los más importantes y teniendo en cuenta unas claves de identificación preestablecidas, se caracteriza, entre otras cosas, por la presencia de ocho células intestinales (Euzby, 1982; Nielsen et al., 2010)

1.1.5 Tratamiento:

Disponemos de tres grupos de antihelmínticos de amplio espectro para el tratamiento y control de los pequeños estróngilos de los animales en pasto (Brady et al., 2009; Stratford et al., 2011; Matthews, 2011).

- Benzimidazoles: Fenbendazol, Oxibendazol, Mebendazol y Oxfendaol.
- Tetrahidropirimidinas: pirantel y tartrato de morantel.
- Lactonas macrocíclicas: avermectinas (ivermectina) y milbemicinas (moxidectina) (Von Samson-Himmelstjerna, 2011).

Varios regímenes de tratamiento con estos tipos de drogas han sido recomendados y con frecuencia se establecen los intervalos de administración sin tener en cuenta sus propiedades farmacológicas, edad de los caballos o la epidemiología de los ciatostomas. Además el uso de un antihelmíntico de espectro restringido, contribuye al establecimiento gradual de una carga parasitaria patógena de unas determinadas especies (Love, 2003).

Todas estas drogas tienen distintos niveles de eficacia, duración de actividad y espectro frente a los estadios que controlan (Corning, 2009). Los benzimidazoles, ocasionalmente se usan con dosis más elevadas, para tratar larvas enquistadas de ciatostomas.

Las lactonas macrocíclicas, tienen un amplio espectro contra especies de nematodos y parásitos estomacales (Ej: *Gasterophilus* spp). Son los únicos fármacos cuyo efecto persiste evitando la excreción de huevos de estróngilos al exterior, al menos durante 6 semanas (Mercierre et al., 2001; Sangster, 1999).

Estos tres grupos de fármacos tienen distintos niveles de eficacia contra los ciatostomas. Así, el Pirantel tiene una eficacia del 95-100% (Eysker et al., 1991; Valdez et al., 1995), las lactonas macrocíclicas casi siempre reducen en un 99% o más, el recuento de huevos fecales y para los benzimidazoles la reducción del recuento de huevos fecales es de un 95% o más (DiPietro y Todd, 1987).

Colectivamente, las características antiparasitarias de los actuales antihelmínticos, hacen de las Lactonas macrocíclicas los fármacos de elección para la mayoría de los propietarios y veterinarios, debido a su potencia, espectro de actividad, relativa seguridad y por su todavía baja resistencia demostrada (Von Samson- Himmelstjerna et al., 2007; Fritzen et al.,

2010).

Además de esto, los tres grupos tienen distintos mecanismos de acción (Stratford et al, 2011).

Los Benzimidazoles inhiben la formación de huevos. Sus efectos al inicio del tratamiento son bajos, lo cual tiene importancia en la terapia de enfermedades parasitarias concretas. Uno de los fármacos a destacar, dentro de esta familia, por su uso frecuente en las desparasitaciones rutinarias es el fenbendazol.

La eficacia de los Benzimidazoles es lograda, exponiendo a los parásitos a niveles de plasma letales, mediante su administración durante largos periodos. Esto conlleva el desarrollo de protocolos de dosificación repetidos de fármacos como el fenbendazol: la dosis recomendada de 5mg/Kg de PV controlará las cepas sensibles de adultos y los estadios larvales de pequeños estróngilos. Para controlar las larvas inhibidas se recomienda una dosis diaria durante 5 días consecutivos de 10mg/Kg de PV. La resistencia al fenbendazol se ha observado ampliamente en la mayoría de los caballos estudiados y el uso de este compuesto en cualquier régimen de dosificación debería evitarse cuando la resistencia aparece (Corning, 2009; Brady et al., 2009).

Dentro del grupo de las Lactonas macrocíclicas destacamos dos compuestos de diferente potencia y espectro: ivermectina y moxidectina.

La ivermectina es altamente potente contra los estadios adultos, estadios larvales luminales y los de la mucosa, pero tiene una variable y baja eficacia frente a los estadios larvales inhibidos incluso cuando se administran elevadas dosis (X5) (Love, 2003).

Por otra parte, la moxidectina posee una mayor vida media en la grasa del organismo (mayor solubilidad en lípidos) que se traduce en un mayor periodo de supresión de los huevos fecales tras su uso como tratamiento. Los potros jóvenes y los animales muy delgados con poco tejido adiposo, están predispuestos a intoxicarse con moxidectina debido a su alta lipofilia e incluso ocasionar la muerte. Es por eso que está contraindicada en potros menores de cuatro meses de edad. Tiene eficacia frente a todos los estadios de ciatostomas (excepto sobre formas enquistadas) administrada en una única dosis de 0,4mg/Kg de PV y actividad persistente contra re-infecciones causadas por pequeños estróngilos, resultantes de un largo intervalo de reaparición de huevos.

El intervalo de re-tratamiento requerido con moxidectina es mas largo que para otros antihelmínticos, requiriendo menos frecuencia de tratamientos y menos selección para la resistencia (Love, 2003).

El tercer y último grupo de fármacos que destacamos son las Tetrahidropirimidinas que comprenden las sales de pirantel (pamoato, embonato y tartato).

No son efectivas frente a los estadíos de larvas inhibidas de pequeños estróngilos pero eliminarán las cepas sensibles de adultos.

En cuanto al periodo de reaparición de huevos (PRH) en heces tras los tratamientos, los más cortos corresponden con los animales jóvenes y a menudo se observan recuentos de huevos fecales (hpg) más elevados con respecto a los animales de edad más avanzada. Por lo que se justifica, en este grupo de animales, la administración de antihelmínticos más potentes. Este PRH no solo varía en función de la edad del animal, sino también del antihelmíntico que se use, siendo más corto para los piranteles; intermedio para los benzimidazoles y más largo para las avermectinas.

Bien es sabido que cuando los intervalos entre tratamientos son más largos que PRH, se produce la eliminación de huevos y contaminación del pasto. Mientras que cuando los intervalos entre tratamientos son más cortos que el PRH, estamos realizando más tratamientos de los necesarios y por lo tanto, hay un aumento del riesgo de aparición de resistencias.

No son esperados en el mercado, nuevos antihelmínticos con diferentes mecanismos de acción en un futuro cercano. Por lo tanto, el mantenimiento de la eficacia de éstos es esencial para que continúe la productividad y bienestar de los animales (Coles et al., 2006).

1.2 Resistencia a antihelmínticos:

Durante los últimos años, la resistencia a antihelmínticos ha ido aumentando de importancia en el campo veterinario y especialmente en la medicina equina (Kaplan, 2002,2004; Wolstenholme et al., 2004).

Estas resistencias afectan a algunas especies de nematodos para uno o más de los principales tipos de antihelmínticos disponibles.

En España, existen varios estudios realizados en otras especies, como son los rumiantes (Michel, 1968; Michel 1969; Brunsdon, 1971; Reinicke y Groeneveld, 1991;

Stear et al., 1995; Calvete et al, 2012). Así como en otras especies se dispone de más información sobre el tema de las resistencias a los antiparasitarios, no ocurre lo mismo con la especie equina (Meana et al, 2000). Prácticamente no hay ningún estudio en nuestro país en équidos. Hasta el momento se han publicado la presencia de ciatostóminos resistentes en dos yeguas en Cantabria y Álava y sospecha de una tercera en Palencia. La razón de estas resistencias parece ser el tratamiento rutinario y frecuente con mebendazol (Rojo Vázquez y Meana Mañes, 2008).

En caballos, a partir de finales de los años ochenta, se ha descrito resistencias principalmente de ciatostomas a Benzimidazoles como consecuencia del uso irracional de antiparasitarios (Kaplan, 2004; Lind et al., 2007; Traversa et al., 2007; Traversa et al., 2009; Witherle et al., 2004; Fayet, 2005).

Así, en relación con lo anterior, son varios los estudios realizados en otros países como Italia (Traversa et al, 2007), Suecia (Lind et al., 2007), Reino Unido, EEUU, Dinamarca, Alemania, República Checa, Polonia o Australia (Heidy A. Brady et al, 2009), que señalan la presencia de estas resistencias.

Varias investigaciones han demostrado que cuando se ha desarrollado la resistencia a antihelmínticos en nematodos, ésta permanecerá durante muchos años frente al fármaco concreto, incluso con el cese del tratamiento. Sin embargo, no se conoce cuando ocurre el punto de "no retorno" (Jackson y Coop, 2000; Lind et al., 2007; Lyons et al., 2007).

Podemos afirmar que hay resistencia cuando una población de parásitos ha adquirido genéticamente la capacidad de resistir a concentraciones de antiparasitarios habitualmente letales para los individuos de esa especie (OMS, 1957).

Así pues, la resistencia supone la ineffectividad de un fármaco o disminución de su actividad. El desarrollo de nuevas moléculas, supone un coste elevado y por tanto, las posibilidades de extensión de la farmacoterapia antiparasitaria, en cualquier caso son muy limitadas.

Es un fenómeno evolutivo que resulta de una selección genética. De este modo, los individuos que se vuelven resistentes, es debido a una mutación en su genoma. Al principio, los individuos son poco numerosos y tras cada tratamiento sobrevive al fármaco utilizado, una pequeña proporción. Éstos son los únicos capaces de reproducirse y contaminan los pastos con sus huevos. De esta manera, aumentan los genes de resistencia en la población, hasta reemplazar a la población sensible.

Las resistencias, al tratarse de un fenómeno de base genética, convierten a los nematodos, resistentes en todos los estadios de su vida: larvario y adultos.

Para poder hacernos una idea de la trascendencia que esto tiene, señalaremos que gracias a esta capacidad de supervivencia que tienen las larvas de ciatostomas hipobióticas de la mucosa, a múltiples dosis de antihelmíntico, ante una nueva ingesta de pasto de los caballos a su regreso a los prados, se podría reanudar la excreción durante meses o incluso años, de huevos de ciatostomas fecales con las consecuencias que ello supone.

Se han puesto en evidencia varios mecanismos de resistencia, entre ellos destacamos los descritos en los estróngilos:

- Producción de *esterasas* que modifican la estructura del antiparasitario y favorecen su eliminación.
- Modificación cuantitativa y cualitativa de los receptores de los antiparasitarios (mutación de la Beta-tubulina en los individuos resistentes a los bencimidazoles) (Fayet, 2005).

Para que la resistencia a los antihelmínticos se produzca ha de cumplirse una serie de condiciones tales como:

- Frecuencia de utilización: La aparición de resistencias está asociado a menudo con el empleo repetido de antiparasitarios o a errores de utilización. Cuanto mayor es la frecuencia de utilización de un antiparasitario, mayor es la presión de selección. Se ha señalado que 5/6 desparasitaciones/año generan resistencia en 2 años (Calvete et al, 2012). Además el uso continuo de un antihelmíntico de espectro restringido puede ocasionar, de forma gradual, el cúmulo de ciertas especies de parásitos (Fayet, 2005).
- Fallos en la sincronización del tratamiento de los animales que pastan en los prados, puede producir contaminación de los mismos y así transmitir la infección. En todos los programas de prevención, los animales deben estar tratados sincronizadamente. La razón que justifica esto es que los animales jóvenes son más susceptibles de contraer una infección y la mezcla de animales de distintas edades en un mismo pasto, aumenta la posibilidad de la transmisión de parásitos, porque los animales jóvenes tienden a tener PRH postratamiento más cortos. En los caballos adultos se produce además, un alargamiento de los PRH en heces tras los tratamientos

con antihelmínticos (Herd y Gabel, 1990).

- Subdosis o sobredosis: Dosis insuficientes de antiparasitarios es una razón obvia que explique un fallo en el control parasitario. Permiten la supervivencia de individuos heterocigotos que portan los alelos de resistencia. La sobredosis conlleva la selección de individuos muy resistentes (Fayet, 2005; Calvete et al, 2012).
- Alternancia o asociación de moléculas: La alternancia demasiado rápida de moléculas antiparasitarias supone la coselección de los parásitos resistentes a los antihelmínticos. Sin embargo, las asociaciones de dos antiparasitarios de familias diferentes, retardan la aparición de resistencias (Fayet, 2005).

Si un antihelmíntico ejerce presión de selección en las larvas de la mucosa, entonces sobrevivirán y salen hacia el lumen para completar el ciclo y deberían ser menos sensibles a la droga que sus antecesoras.

Por otra parte, si un tratamiento antihelmíntico tiene una actividad excelente solo frente a las fases alojadas en el lumen y poca o nada de actividad frente a las fases de la mucosa, hay poca presión de selección para la resistencia a las drogas hacia ese producto. Las larvas de la mucosa que continúan desarrollándose y ocupan el lumen, deberán ser tan sensibles a la droga como sus antecesoras.

La ivermectina es un ejemplo de fármaco que ejerce poca o nula presión de selección, en este caso sobre los ciatostomas enquistados. Su actividad se limita a las larvas en la mucosa (a dosis terapéuticas y a elevadas).

Además del manejo de los pastos y el papel del veterinario, los factores que determinan la rápida aparición de resistencias en el campo son:

- La frecuencia del gen para la resistencia en poblaciones sin tratar. Parece ser que están implicadas mutaciones en sitios del receptor donde los antihelmínticos actúan o diferentes enzimas o mecanismos que pueden afectar al metabolismo o transporte de los antihelmínticos. En caballos el 3% de los ciatostomas son resistentes y el 17% son heterocigotos (Pape et al., 2003).
- Si la resistencia es dominante o recesiva. Todo indica que las resistencias se desarrollan más rápido si los genes implicados, son dominantes (Coles et al., 2004).
- La aptitud biológica de vermes resistentes comparados con los

susceptibles (Coles et al., 2005).

El poder detectar las resistencias a los productos antiparasitarios es importante para poder llevar a cabo una apropiada administración de estrategias.

El poder conocer hasta donde se extienden las resistencias, depende de la existencia de pruebas capaces de detectarlas y del diseño de tests estandarizados para resistencias que fueron elaborados por la asociación de parasitología veterinaria, WAAVP en 1992 (Coles et al., 1992).

Los test son necesarios para así conocer el estatus de resistencia de las granjas y para la planificación del uso óptimo de los restantes antihelmínticos efectivos, especialmente para las lactonas macrocíclicas (Coles et al, 2006).

La detección de la resistencia cuando está aún en un bajo nivel debería ser un objetivo clave en nuestras estrategias para el control de nematodos en un futuro (Coles et al, 2006).

Hay test muy simples y eficaces que pueden ser usados en laboratorios de parasitología. Entre estos test destacan:

Tests *in Vivo* como el de la reducción del recuento de huevos fecales (FECRT) y dos test *in Vitro*, como el de inhibición de la eclosión de huevos con Tiabendazol (EHT) y el test de inhibición de la migración larvaria (LMIT). Parece ser que hay una correlación entre los resultados que se obtienen de las pruebas EHT y FECRT (Witherle et al., 2004).

Hay una gran necesidad de mejorar los métodos de detección de resistencia a antihelmínticos, particularmente para la detección de la resistencia a las lactonas macrocíclicas.

En la actualidad, el mejor método de detección de resistencia recae en la prueba de la reducción del recuento de huevos fecales (FECRT) que puede ser usado en todos los grupos de antihelmínticos.

Se trata de un método *in Vivo* recomendado para la detección de resistencias a antihelmínticos en animales infectados natural o experimentalmente y la dosis a suministrar debe ser la registrada en la etiqueta del producto. Además, puede ser usado en diferentes especies como rumiantes, caballos o cerdos, con todo tipo de antihelmínticos y con todas las especies de nematodos, cuyos huevos se eliminan a través de las heces. Sin embargo, este test es solo fiable si más del 25% de las larvas

son resistentes (Martin et al, 1989).

El test proporciona una estimación de la eficacia del antihelmíntico por comparación del recuento de huevos de nematodos de los animales, antes y después del tratamiento (Figura 4). La diferencia del recuento de huevos entre las dos muestras recogidas (antes y después de cada tratamiento) depende del antiparasitario utilizado. Un grupo sin tratar infectado de forma natural proporciona una medida de los cambios del recuento de huevos durante la prueba.



Figura 4: huevos de pequeños estróngilos al microscopio óptico a X10.

Para llevarlo a cabo, se deben coger unos 5 g de heces del recto antes de proceder al tratamiento de desparasitación. El recuento de huevos se realiza con la técnica de Mc Master (Raynaud, 1970). En el caso concreto de los caballos, esta técnica es la más simple, sensible y fiable, especialmente en el caso de recuentos bajos (Presland et al., 2005).

Posteriormente, se coge una segunda muestra de cada animal y se vuelve a contar los huevos. La diferencia en cuanto al tiempo que transcurre entre una muestra y otra, depende del tratamiento de desparasitación utilizado, de modo que si son Lactonas macrocíclicas, el tiempo transcurrido entre el recuento de una muestra y de la otra ha de ser 14-17 días, si se trata de benzimidazoles 8-10 días y si es levamisol tan solo 3-7 días.

En el caso de que hubiera resistencia a estos tratamientos, transcurrido esos días, seguirán apareciendo huevos en las heces.

Evaluando el recuento de huevos totales obtenido con test críticos, investigaciones recientes han mostrado, que la reducción de los periodos de reaparición de huevos observada después del tratamiento con moxidectina e ivermectina parece ser debido al desarrollo de resistencias a lactonas

macrocíclicas de L4 en el lumen (Lyons et al., 2009, 2010).

Para que una detección de resistencia a antihelmínticos sea fiable en un 99%, ha de haber menos de un 95% de eficacia del tratamiento antihelmíntico utilizado sobre los vermes. Por lo tanto, una reducción de más del 95% en la puesta de huevos indica que el antihelmíntico utilizado es bueno para ser utilizado en programas de control para mantener la productividad.

Un test de eficacia controlada es el método más fiable, pero el gasto que supone, generalmente limita su uso. Sin embargo es el estándar de oro para la detección de resistencias a antihelmínticos. En el caso de los caballos, una reducción del recuento de huevos menor del 90% (no del 95%) es indicativo de resistencia a benzimidazoles.

Además del test FECRT, tenemos otras pruebas in Vitro como el Test de inhibición de la eclosión de huevos (EHT) con tiabendazol (TBZ). Se trata de una técnica indicada para la detección de resistencia de nematodos a los Benzimidazoles y sales de Pirantel (Craven et al., 1999; Ihler and Bjorn, 1996; Konigova et al., 2003; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009; Young et al., 1999). Se utiliza en nematodos que eclosionan poco después de la embrionación (eclosión rápida).

Al igual que el test FECRT, el test in Vitro (EHT) es fiable si la proporción de larvas resistentes es mayor del 25% (Martin et al., 1989).

Para la detección de la resistencia a Benzimidazoles se utiliza el TBZ, antihelmíntico que pertenece a dicha familia, que fue descubierto en 1961 y que marcó el inicio de los antihelmínticos de amplio espectro. Poco tiempo después, se probaría la existencia de cepas resistentes en algunas poblaciones de ciatostomas de la especie equina (Drudge et al., 1977; Drudge et al., 1979; Drudge et al., 1984).

Lo que se pretende con su uso es comprobar si existe eclosión de los huevos de nematodos a distintas concentraciones de este fármaco. Las cepas resistentes al TBZ eclosionarán a concentraciones de TBZ superiores que las cepas no resistentes. Se utiliza TBZ por su solubilidad en agua, por ser activo contra los adultos y algunas formas inmaduras de nematodos, donde también inhibe la formación del embrión en los huevos y por ser un producto seguro. Debido a esto último, puede ser utilizado en animales de todas las edades, gestantes y debilitados (Dwight et al., 2004).

Su sensibilidad disminuye conforme avanza la edad de los huevos. Así pues, lo óptimo es utilizar huevos de menos de 3h tras la recolección de las heces o que hayan estado almacenados en condiciones de anaerobiosis y por lo tanto, que estén en el mismo estado de embrionación.

La capacidad del TBZ para inhibir la embrionación y eclosión de los huevos de nematodos recolectados es usada para calcular la dosis letal 50 (LD50) del antihelmíntico. Esta dosis permitirá compararla con otras poblaciones las cuales se conocen como resistentes o no resistentes.

En los protocolos de los test in Vitro para la detección de resistencias se utiliza la dosis discriminante de TBZ, que es aquella que mata al 99% de los huevos susceptibles de eclosionar. En el caso de los équidos, esta dosis es de 0,12 $\mu\text{g/ml}$. Una dosis superior a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ es indicativa de resistencia. Algunos autores contemplan la posibilidad de que esta dosis podría ser superior (0,185 $\mu\text{g/ml}$.) (Coles, unpublished).

El test de inhibición de la migración larvaria (LMIT), es otra prueba in Vitro, en la que las larvas L3, procedentes de coprocultivo, se les permite migrar en pocillos con la presencia de concentraciones crecientes de lactonas macrocíclicas, las cuales causan parálisis. Por lo tanto, es una prueba que prueba la sensibilidad de los ciatostomas a las lactonas macrocíclicas en el laboratorio (Stratford et al., 2011).

Todos estos tests deberían ayudar a los veterinarios sobre qué antihelmínticos deberían usar. Es imprescindible conocer si los problemas clínicos en los animales son debidos a la ineficacia de un determinado antihelmíntico como consecuencia de un fenómeno de resistencia. Es interesante por tanto, detectar lo antes posible la aparición de estas resistencias, para poder así modificar las estrategias de control parasitario y para que la salud y bienestar de nuestros animales no se vean comprometidos.

1.3 Control de los pequeños estróngilos con el fin de reducir el desarrollo de resistencias a los antihelmínticos:

Los objetivos de los programas de control deberían encaminar medidas para:

- Reducir el número de larvas infectantes en los pastos.
- Reducir la transmisión de las larvas entre los animales,

- Reducir el número de tratamientos antihelmínticos requeridos para lograr la reducción de los huevos como medio de retrasar o evitar resistencia a drogas por parte de la población de ciatostomas.
- Programa de vigilancia: aplicación rutinaria de protocolos para valorar la eficacia de los tratamientos (Calvete et al, 2012; Corning, 2009).

Una de las opciones de las que disponemos para controlar los niveles de parasitación de los pequeños estróngilos, como hemos visto, es llevar a cabo tratamientos farmacológicos que favorezcan su eliminación. Del mismo modo, aparte del tratamiento de animales enfermos, estos antihelmínticos son también utilizados para reducir la contaminación medioambiental de larvas a nivel de explotación. Uno de los riesgos que conlleva la utilización inadecuada de los fármacos antiparasitarios es la aparición prematura de resistencias a los mismos.

En relación a la frecuencia de los tratamientos, un programa basado en dos desparasitaciones anuales no debería representar un riesgo de selección. Ésta se produce con más de seis desparasitaciones anuales y si todas son hechas con el mismo grupo antihelmíntico. En general, la frecuencia de estos tratamientos disminuye conforme avanza la edad de los caballos.

Otra alternativa para el control de estos nematodos y ante una presión de selección excesiva, sería tratar solamente aquellos animales que estén por encima del umbral de hpg (Nielsen et al., 2006) con el objetivo de reducir la presión de selección de la resistencia a antihelmínticos en la población de vermes en la respectiva granja. Hay autores que también recomiendan realizar recuentos de huevos fecales y coprocultivo de larvas, al menos tres veces al año y al menos al 20% de los caballos de una ganadería (Dipietro et al, 1987) para determinar su estatus parasitario.

Un aspecto interesante sería, combinar fármacos que pertenezcan a distintas familias como es el caso de fenbendazol y piperazina (PPZ) (FBZ/PPZ) (Lyons, Tolliver et al, 1992) o hacer una rotación de antihelmínticos de diferente clase con los que se desparasitan a lo largo del año. Se ha descrito dos modalidades: rotación lenta y rotación rápida. Con la rotación *lenta* anual se pretende retrasar la selección de la resistencia al antihelmíntico. Consiste en el uso de un único antihelmíntico durante un año, seguido de la administración de otro de diferente clase en el segundo y tercer año (Woods et al, 1998). Esta práctica no es fácil de llevar a cabo, porque en situaciones de campo, donde hay múltiples especies que deben ser controladas, es necesario usar más de una clase de droga (dos o tres, según estudios recientes) durante un año. Por su parte, la rotación *rápida*

plantea el uso o rotación de clases de antihelmínticos en periodos de tres a seis veces por año. Con ello se trata de minimizar la exposición a los parásitos a una determinada clase de antihelmíntico (Brady et al, 2009). Debido al planteamiento que defiende la rotación rápida de fármacos, como es utilizar varias veces el mismo antihelmíntico como el fenbendazol a lo largo del año, aunque sea de forma alterna con otros productos, se contradicen muchas teorías que afirman de que un antihelmíntico jamás debe ser utilizado una vez que la resistencia se ha establecido (Corning, 2009, Brady et al., 2009).

Por otro lado, se puede disminuir los nematodos de los pastos con el uso de antihelmínticos. Para estos casos sería aconsejable usar un producto con una alta eficacia que reduzca eficazmente las cargas de larvas de los pastos y otro, administrado en caballos, que sea eficaz contra las larvas enquistadas.

Además de esto, se pueden llevar a cabo otras pautas de manejo como el traslado de los animales desde pastos contaminados a zonas "limpias" libres de nematodos, la eliminación de las heces de los prados al menos una vez/semana seguido de la arada y resiembra de los mismos para eliminar las larvas de pequeños estróngilos, disminuyendo así las probabilidades de que huevos allí presentes, evolucionen y los caballos contacten con ellos (Mejer, 2006) y rotación anual de pastos con especies domésticas como el ganado vacuno y ovino, ya que no son parasitados por pequeños estróngilos y con el consumo de hierba, disminuyen las cargas parasitarias (Fritzen et al., 2010; Herd, 1986). También se recomienda evitar el hacinamiento de los animales, buena higiene de establos (Fritzen, 2005; Fritzen et al., 2010) y una serie de buenas prácticas sobre los caballos nuevos antes de su introducción a los prados (Brady et al, 2009). Con esta serie de medidas, se podría disminuir la frecuencia de los tratamientos antiparasitarios (Hinney et al., 2011).

Este trabajo se puso en marcha ante la escasez de información a cerca de qué parásitos están presentes en caballos en la zona de Aragón y alrededores, cual es su prevalencia y el deseo de conocer cómo está la situación de la resistencia a los antihelmínticos en la ganadería equina.

2. Objetivos:

El presente estudio pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- 2.1 Conocer aspectos de manejo que pueden determinar la aparición de cepas resistentes.
- 2.2 Conocer la parasitación por pequeños estróngilos en équidos en el Valle Medio del río Ebro.
- 2.3. Detección de resistencia a los Benzimidazoles mediante pruebas in Vitro.

3. Material y métodos:

El estudio se realizó entre noviembre de 2011 y julio de 2012 en yegudas, picaderos y establos situados en diversas localidades del Valle Medio del río Ebro. En esta región hay un predominio de clima mediterráneo, las precipitaciones anuales, raramente superan los 250mm y la temperatura media es de 15°C. En todo momento las visitas a las explotaciones se realizaron con la ayuda de un veterinario y el consentimiento del propietario.

3.1 Conocer aspectos de manejo que pueden determinar la aparición de cepas resistentes.

Con el fin de obtener información relacionada con aspectos de manejo llevados a cabo en cada establecimiento, que podrían predisponer a la aparición de resistencias a los antihelmínticos de uso cotidiano, se elaboró un modelo de encuesta (Figura 5). Bien los propietarios de los animales, como el veterinario responsable de las yegudas fueron respondiendo a un cuestionario. En éste se recogen datos relacionados con la explotación (localización, censo de animales, sexo, raza, edad, alojamiento, alimentación, importación de animales), desparasitaciones que se llevan a cabo al año (productos utilizados, frecuencia, dosis, época y tratamientos selectivos o indiscriminados).

Datos del establecimiento:

-Localización explotación:

- Censo:
- Sexo:
- Razas:
- Edad:
- Alojamiento: Régimen Extensivo/Intensivo
- Alimentación:
- Desparasitación:

- Frecuencia:

- Época de desparasitación:

- Productos utilizados:

- ¿Siempre los mismos productos?

- ¿Desde cuando?

- Dosis (estandarizada, individualizada...).

- Riesgo importación

Figura 5: Modelo de encuesta.

3.2 Conocer la parasitación por pequeños Estróngilos en équidos en el Valle Medio del río Ebro.

En concreto se estudió: la prevalencia, niveles de parasitación y géneros de pequeños estróngilos que parasitan a los équidos en yegadas, picaderos y establos de diversas localidades en el Valle Medio del río Ebro.

La toma de muestras se realizó individualmente y fueron extraídas directamente del recto con la ayuda de gel y un guante de palpación. Se transportaron de forma individualizada en guantes de palpación que se identificaban con los datos del animal y se conservaban en nevera hasta el momento de su análisis.

Para detectar la presencia de huevos de nematodos, se utilizó la técnica de coprología de flotación con Sulfato de Zn (coprología cualitativa). Para realizar el recuento de huevos de pequeños estróngilos por gramo de heces (coprología cuantitativa) se utilizó la técnica de Mc Master.

La identificación de los géneros se realizó mediante coprocultivo y posterior recogida de larvas L3 por medio del aparato de Baermann.

3.2.1. Coprología Cualitativa.

La coprología cualitativa (Figura 6) consiste en pesar 2 g de heces extraídas del recto del caballo con la ayuda de un guante de palpación y conservadas en refrigeración hasta el momento de su análisis (Ruiz González, 2007). Los mezclamos con 10 ml de solución de flotación (Sulfato de Zn) con la ayuda de un mortero (Urquhart et al., 2001). A continuación la filtramos con un colador que deje pasar las partículas más finas y huevos y nos retenga el material más grosero. Después, depositamos la mezcla filtrada en un tubo de 15ml y lo rellenamos hasta arriba, formando un menisco convexo, con más solución de flotación. El sulfato de Zn al tener mayor densidad que los huevos, hace que éstos asciendan hacia la superficie del tubo. Depositamos un cubreobjetos sobre el tubo de 15 ml y lo dejamos reposando durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, cogemos el cubreobjetos, donde estarán adheridos, en caso de muestra positiva, huevos de nematodos y lo ponemos en un portaobjetos para su visualización al microscopio (X10).

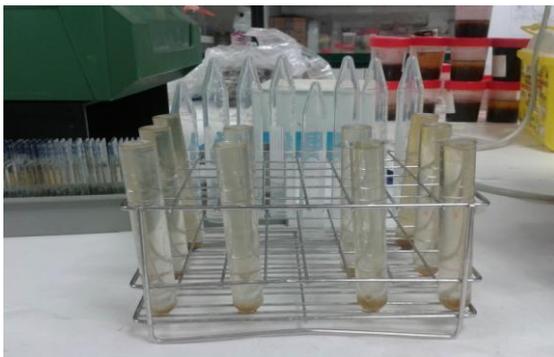


Figura 6: Coprología cualitativa. Método de flotación con sulfato de Zn.

3.2.2. Coprología Cuantitativa.

El recuento de huevos por gramo de heces se realizó con la ayuda de la cámara de Mc Master (Figura 7) (Raynaud, 1970). Para ello, tomamos 3g de heces y los mezclamos con 42ml de solución de flotación en un mortero (Urquhart et al., 2001). La mezcla, se filtra con un colador que no retenga las partículas más groseras y permita el paso de los huevos. Trasvasamos la mezcla filtrada a un vaso de precipitados sometido a agitación continua con la ayuda de un agitador y un imán.

Tomamos con una pipeta *Pasteur* una pequeña cantidad de la mezcla y la depositamos en la cámara de Mc Master. Los detritus irán al fondo de la cámara, pero los huevos gracias a la solución de flotación, ascenderán hacia

la superpie permitiendo su visualización. A continuación, realizamos el recuento de huevos de cada una de las cinco filas que componen la cuadrícula.

Este recuento se realiza tres veces y calculamos la media aritmética.

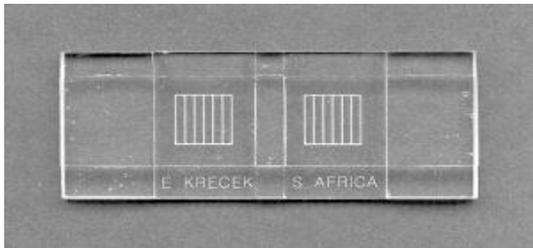


Figura 7: Cámara de Mc Master para determinar el número de huevos de nematodos en heces.

3.2.3. Identificación de géneros.

Coprocultivo

El coprocultivo (Figura 8) consiste en coger una muestra de heces que contenga huevos de pequeños estróngilos (50-100g). Con un mortero la disgregaremos y la humidificaremos con un pulverizador. La mantendremos al menos durante 10 días, a temperatura 22-26°C y una humedad relativa del 80% en una placa de Petri (Johnstone, 2002). Cada 48h removeremos la muestra para que se oxigene correctamente y la humidificaremos siempre que sea necesario (Silva et al., 2009.). Con ello tratamos de simular las condiciones climatológicas que hay en los pastos en primavera y aseguramos que los huevos evolucionan y salgan larvas que se desarrollan hasta el estadio L3, del que nos valemos para la identificación del género al que pertenecen (Euzby, 1982). Para facilitar esta identificación podemos utilizar unas gotas de lugol, que las inmoviliza (Silva et al., 2009).



Figura 8: Coprocultivo de muestra de heces de caballo.

Recogida de larvas: Aparato de Baermann

Para la recogida de larvas L3 desarrolladas en los coprocultivos se utilizó el Aparato de Baermann (Figuras 9 y 10) que consiste en un embudo soportado en posición vertical, al que se le añade en su extremo una goma tubular que se cierra con una pinza. Sobre el embudo se coloca un colador, donde se depositan las muestras de heces del coprocultivo (10-20g).

A continuación, se añade agua templada hasta que contacte con la parte media-inferior del colador que contiene las heces que han estado cultivándose durante 10 días. Debe permanecer aproximadamente unas 24 horas, tiempo en el que las larvas, por gravedad y su hidrofilia, se dispondrán en la parte inferior del tubo de goma. Hay autores que afirman que con 6-8h es suficiente (Silva et al., 2009). Transcurrido este periodo, se procede a recoger la muestra y depositarla sobre un portaobjetos y visualizar las larvas al microscopio a X10 y proceder a su identificación a X40 (Euzéby, 1982).

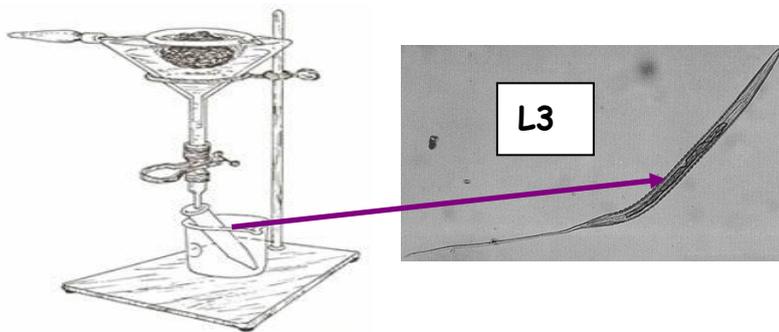


Figura 9: Aparato de Baermann.



Figura 10: Recogida de muestra lista para centrifugar y su visualización al microscopio óptico.

3.3. Detección de resistencia a los Benzimidazoles mediante pruebas in Vitro.

Se analizaron muestras de manera individual. Sin embargo, en ocasiones los niveles de parasitación eran tan bajos que no nos permitieron hacer un ensayo individualizado, por lo que en estas situaciones se utilizaron heces de varios animales procedentes de un mismo lugar y que, por lo tanto, compartían el mismo ambiente e historial de manejo.

Las muestras se transportaron de forma individualizada en guantes de palpación que se identificaban con los datos del animal y se conservaban en nevera hasta el momento de su análisis. En todos los casos, las muestras fueron extraídas directamente del recto con la ayuda de gel y un guante de palpación.

Para la detección de resistencia a los benzimidazoles, se llevó a cabo el test in Vitro, de inhibición de la eclosión de huevos con tiabendazol (Le Jambre, 1976; Coles et al, 1992, Coles et al, 2006, Calvete et al, comunicación personal).

El procedimiento es el siguiente:

Partimos de una muestra que contenga huevos de pequeños estróngilos que nos permita realizar el ensayo. Inicialmente filtramos la muestra con la ayuda de mallas de nylon. Se utilizaron cinco mallas de nylon de distintos diámetros de poro: 3mm, 1mm, 0.100mm, 0.080mm y 0.036mm. Con los tamices de mayor diámetro eliminamos la parte más grosera de la muestra, mientras que la malla de menor diámetro ($36\mu\text{m}$) permite retener los huevos de ciatostomas.

A continuación, cogemos tubos de 15 ml y repartimos la muestra de heces filtradas. Rellenamos los tubos con agua y centrifugamos a 1500rpm durante 3 minutos (Figura 11). Con una bomba de vacío eliminamos el sobrenadante de los tubos, apurando hasta llegar casi al sedimento. Después añadimos solución salina saturada, mezclamos suavemente y centrifugamos nuevamente a 1500rpm durante 3 minutos. A continuación, recogemos el sobrenadante con una pipeta y lo llevamos a tubos de 50 ml y los rellenamos, como en el caso anterior, con agua. Estos tubos los centrifugaremos a 2000rpm durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, retiramos el sobrenadante de los tubos de 50ml y lo que nos queda, lo concentramos en un solo. Después, añadimos agua hasta llenarlo por completo y centrifugamos 10 minutos a 2000rpm. Tras este último paso,

eliminaremos con la bomba de vacío el sobrenadante (dejando 5ml o 5000 μ l) y nos quedamos con el sedimento.



Figura 11: Centrifugación de la muestra.

Posteriormente, calcularemos la concentración de huevos, de manera que haya al menos 150 huevos/ml. En algunos casos tendremos que añadir o eliminar agua con el fin de ajustar la concentración de huevos.

Para realizar el ensayo se utilizaron placas 24 pocillos (Figura 12). En cada pocillo de la placa se añaden 100 μ l de la muestra de huevos, 10 μ l de tiabendazol a una concentración de 20 μ g/ml y 1890 μ l de agua destilada. En los controles se sustituye el tiabendazol por 10 μ l de agua destilada.

Para cada muestra se utilizaron tres réplicas control (sin antihelmíntico) y tres replicas con la dosis discriminante de 10 μ l de tiabendazol (Coles et al, 2006).



Figura 12: Placa de 24 pocillos con tres réplicas control y tres réplicas con tiabendazol.

Una vez preparada la placa, la dejaremos en incubación en una estufa durante 48 horas a 23°C. Transcurrido este periodo, podremos mirarla con la ayuda de un microscopio invertido (Figura 13) y comprobar la existencia o no de larvas que han eclosionado de los huevos en aquellos pocillos donde se añadió el tiabendazol. Para ello, se contabilizan las primeras 100 formas parásitas (huevos o larvas) y se calcula el porcentaje de cada una.



Figura 13: Microscopio invertido.

Para determinar si hay resistencia o no, se realiza el cálculo del ratio de eclosión (Hdd):

$$Hdd = \frac{M \text{ huevos eclosionados en los pocillos con antihelmíntico}}{M \text{ huevos eclosionados en los pocillos control}}$$

Si Hdd es \geq a 0,5 hay resistencia; Si Hdd es $<$ 0,5 no hay resistencia (Coles et al, 1992).

4. Resultados:

4.1 Conocer aspectos de manejo que pueden determinar la aparición de cepas resistentes.

Desde noviembre de 2011 hasta julio de 2012 se cumplimentaron un total de 21 encuestas. Las encuestas se realizaron en 21 yeguas, picaderos o establos situados en 18 localidades del Valle Medio del río Ebro.

Las explotaciones, comprendían desde un único animal hasta 100 animales; incluyendo tanto machos como hembras y con edades que oscilaban desde un mes de vida hasta 21 años.

Los animales de las explotaciones estudiadas estaban constituidos mayoritariamente por Pura Raza Español y cruzados. También había animales Lusitanos, Pura Raza Árabe, Ponis, Silla Francés o Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland (KWPN).

El alojamiento se realizaba mayoritariamente en boxes, aunque también se alojaban en padoccks y en menor medida, en corraletas con acceso a prados.

La alimentación consistía en la administración de 12-15kg/día de paja, pienso compuesto (1,5 kg) y suplemento de avena (1 kg) o alfalfa según el caso y agua a plena disposición. Excepcionalmente, algunos animales podían acceder a la alimentación en pradera.

En el caso de las grandes yeguas encuestadas, el pienso que se administraba dependía del estado fisiológico de las hembras, aportando uno de mayor valor energético para aquellas yeguas gestantes y para las que estaban en época de competición.

En relación a los datos con respecto a pautas de desparasitación, prácticamente el 100% de los animales encuestados se desparasitan dos veces al año, principalmente en primavera y otoño, excepcionalmente la desparasitación se realiza tres veces al año.

Los productos utilizados, están incluidos en tres familias: Benzimidazoles, (fenbendazol), Isoquinolonas (praziquantel) y Lactonas Macroclínicas o macrólidos (ivermectina) (Dwight et al., 2004). El fenbendazol y praziquantel

se administran conjuntamente mientras que la ivermectina se utiliza sola y alternada con los anteriores cada 6 meses.

Para calcular las dosis de los antihelmínticos no se lleva a cabo el pesaje del animal. La dosis de antiparasitario está estandarizada, de modo que en el caso del fenbendazol corresponden 40 ml para los caballos adultos, 20ml para los ponies y 10 ml para los potros. En el caso de la ivermectina, para un caballo adulto de 500kg, corresponde 1ml por cada 50 kg de PV. El praziquantel se administra a razón de 1,5 mg/kg.

Las desparasitaciones se realizan en la mayoría de los casos a petición de los propietarios, en sábana e independientemente del tipo de parásitos, de la carga parasitaria o del riesgo previo de exposición a parásitos.

En explotaciones con mayor censo de animales el riesgo de importación de parásitos (posible entrada de cepas resistentes) es elevado ya que es frecuente la entrada de nuevos animales, cuyo estatus parasitario es desconocido. Sin embargo, en las explotaciones pequeñas generalmente el trasiego de animales es menor por lo que la introducción de parásitos también se reduce.

Señalar que algunas de las preguntas de los cuestionarios, por desconocimiento, no fueron respondidas en todas las yegudas.

4.2 Conocer la parasitación por pequeños Estróngilos en équidos en el Valle Medio del río Ebro.

En total se tomaron muestras de 94 animales, procedentes de 21 explotaciones localizadas en 18 localidades situadas en el Valle Medio del río Ebro.

De los animales estudiados (Tabla 1), 44 (46,81%) son machos y 50 (53,19%) son hembras. Las edades de los animales estaban comprendidas entre un mes de vida y 21 años. En concreto, 78 animales son adultos (82,97%) y 16 son potros (17,02%).

La prevalencia de parasitación por pequeños estróngilos (Tabla 2) era del 34,04% (32 animales positivos). De estos animales positivos, 15 son machos (34,09% con respecto al total de los machos) y 17 son hembras (34% del total de las hembras).

Por edades, de los animales positivos, 23 animales (71,87%) eran adultos y 9 animales (28,12%) eran potros.

Localidad	Nº animales	♂	♀	Adultos	Potros	% ♂	% ♀	% adultos	% potros
Utebo	3	3	0	2	1	100,00%	0,00%	66,67%	33,33%
Peñaflor	7	2	5	7	0	28,57%	71,43%	100,00%	0,00%
Garrapinillos	3	0	3	2	1	0,00%	100,00%	66,67%	33,33%
Parque del agua	4	1	3	3	1	25,00%	75,00%	75,00%	25,00%
Logroño	11	6	5	9	2	54,55%	45,45%	81,82%	18,18%
Malpica	9	0	9	8	1	0,00%	100,00%	88,89%	11,11%
Quinto de Ebro	7	6	1	6	1	85,71%	14,29%	85,71%	14,29%
Movera	1	1	0	1	0	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
Belchite	1	1	0	1	0	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
Mercazaragoza	10	3	7	10	0	30,00%	70,00%	100,00%	0,00%
HCVZ	4	1	3	4	0	25,00%	75,00%	100,00%	0,00%
Siétamo	1	0	1	1	0	0,00%	100,00%	100,00%	0,00%
Alicante	1	1	0	1	0	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
Muel	2	1	1	1	1	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%
San Mateo de Gállego	4	0	4	3	1	0,00%	100,00%	75,00%	25,00%
Calamocha	2	0	2	1	1	0,00%	100,00%	50,00%	50,00%
Calahorra	1	1	0	1	0	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
María de Huerva	23	17	6	17	6	73,91%	26,09%	73,91%	26,09%
Total	94	44	50	78	16	46,81%	53,19%	82,98%	17,02%

Tabla 1: datos generales de las explotaciones

Localidad	Nº animales	(-)	(+)	(+) adultos	(+) potros	% (+) total	% (+) adultos	% (+) potros
Utebo	3	1	2	1	1	66,67%	50,00%	50,00%
Peñaflor	7	3	4	4	0	57,14%	100,00%	0,00%
Garrapinillos	3	3	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
Parque del agua	4	2	2	1	1	50,00%	50,00%	50,00%
Logroño	11	6	5	3	2	45,45%	60,00%	40,00%
Malpica	9	7	2	1	1	22,22%	50,00%	50,00%
Quinto de Ebro	7	2	5	5	0	71,43%	100,00%	0,00%
Movera	1	0	1	1	0	100,00%	100,00%	0,00%
Belchite	1	1	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
Mercazaragoza	10	10	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
HCVZ	4	1	3	3	0	75,00%	100,00%	0,00%
Siétamo	1	0	1	1	0	100,00%	100,00%	0,00%
Alicante	1	1	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
Muel	2	2	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
San Mateo de Gállego	4	1	3	2	1	75,00%	66,67%	33,33%
Calamocho	2	1	1	0	1	50,00%	0,00%	100,00%
Calahorra	1	1	0	0	0	0,00%	0,00%	0,00%
María de Huerva	23	20	3	1	2	13,04%	33,33%	66,67%
Total	94	62	32	23	9	34,04%	71,88%	28,13%

Tabla 2: Prevalencia de parasitación de las explotaciones

En cuanto a la coprología cuantitativa, en ningún caso, se superaron los 100 huevos/g de heces, lo que determina que las cargas parasitarias de los animales eran bajas.

En cuanto a los coprocultivos realizados, en el 100% de los casos, las larvas L3 corresponden al género *Cyathostomun*.



Figura 14: vista parcial de larva L3 de ciatostoma y sus células intestinales



Figura 15: vistas completas de larva L3 de ciatostoma

4.3. Detección de resistencia a los Benzimidazoles mediante pruebas in Vitro.

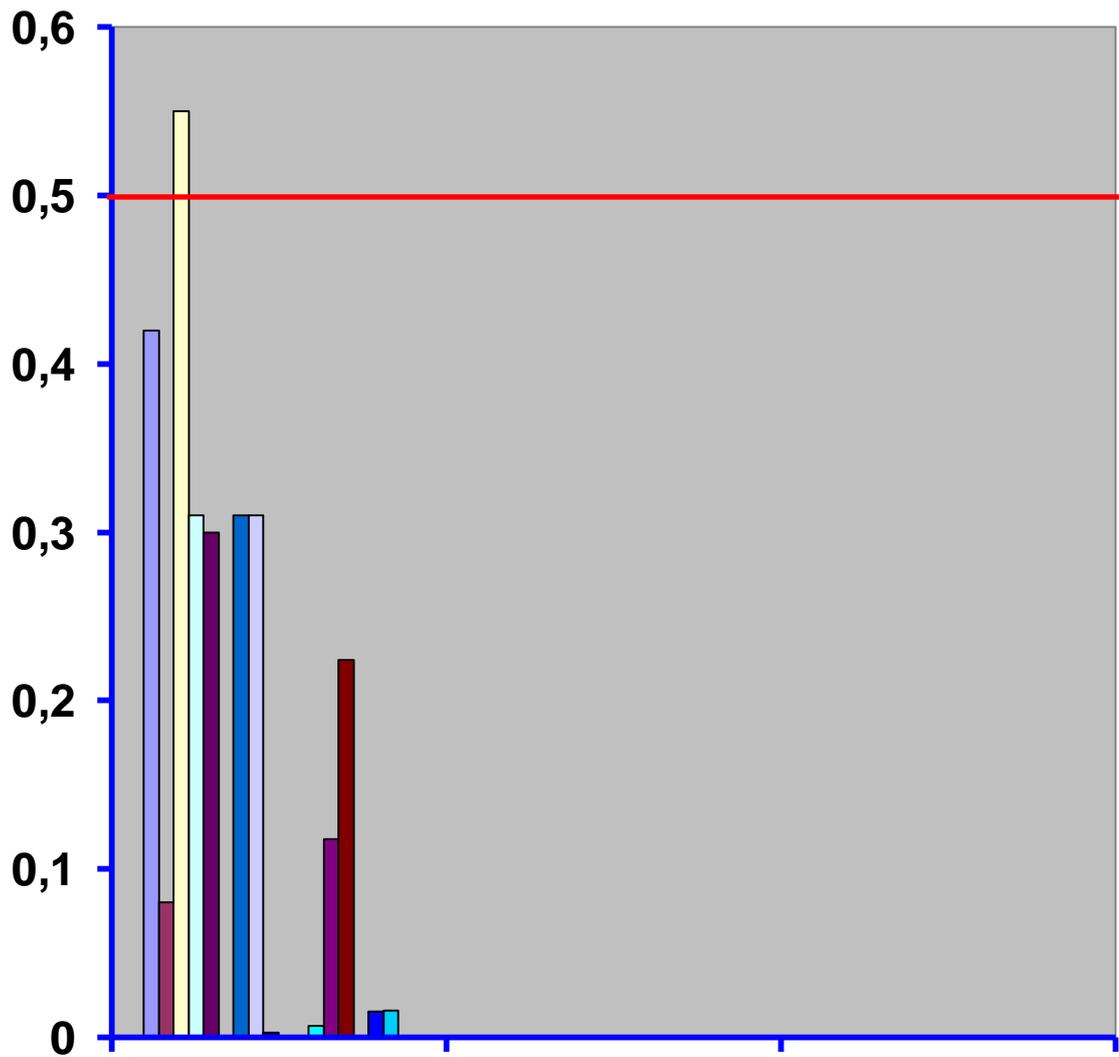
Los resultados de las pruebas in Vitro se realizaron en 18 animales procedentes de tres explotaciones. El criterio de selección de estos animales era la elevada carga parasitaria que tenían con respecto a los demás que fueron analizados.

El ratio de eclosión a la dosis discriminativa se situaba de 0 a 0.55 (Tabla 3). Sólo un animal presentó un valor superior a 0.5, lo que sugiere que el 5,55% de los animales presentaba un fenómeno de resistencia al tiabendazol.

Esto lo podemos determinar partiendo de la premisa, de que aquellos animales cuyo ratio de eclosión (Hdd) es $\geq 0,5$ son los resistentes (Coles et al, 1992).



Figura 16: larvas L1 que han eclosionado de los huevos tras la aplicación de tiabendazol en la prueba in Vitro para la detección de resistencias.



caballo1	0,42		
caballo 2	0,08		
caballo 3	0,55		
caballo 4	0,31		
caballo 5	0,3		
caballo 6	0		
caballo 7	0,31		
caballo 8	0,31		
caballo 9	0,0026		
caballo 10	0		
Caballo 11	0		
Caballo 12	0,007		
Caballo13	0,118		
Caballo 14	0,224		
Caballo 15	0		
Caballo 16	0,0156		
Caballo 17	0,016		
Caballo 18	0		

Tabla 3: Relación de Hdd de los 18 caballos con los que se se ha realizado la prueba in Vitro de TBZ.

5. Discusión:

De las encuestas cumplimentadas podemos destacar una serie de aspectos, que a continuación desarrollaremos:

En referencia a las explotaciones estudiadas en la zona media del Valle del río Ebro, destacar que se trata en la mayoría de los casos, de explotaciones de tamaño medio-pequeño, donde predomina la raza Pura Sangre Español y los animales cruzados. En cuanto a la edad de los animales, predominan los animales adultos.

En referencia al **alojamiento**, podemos observar que la mayoría de los animales que forman parte del estudio se alojan en box. Sin embargo, debemos hacer una diferenciación entre aquellos animales que están en régimen intensivo y por tanto, pasan la mayor parte del tiempo en un box y que salen de él para dar paseos, hacer ejercicio y visitas al veterinario y aquellos animales que están en régimen extensivo, utilizando el box únicamente como cobijo para pasar una parte del día, como podría ser la noche.

El primer grupo de animales no tiene mucho acceso a pastos y que por tanto, son caballos que comparten poco espacio con otros y el riesgo de que sean parasitados se ve disminuido. Podrían tratarse menos a menudo de lo que realmente se hace, pero sobre este hecho, en muchas ocasiones, es el propietario el que ejerce presión para que sus caballos sean desparasitados.

El otro grupo restante, es un pequeño porcentaje de caballos que forma parte de nuestro estudio y que durante el invierno se aloja en boxes pero la mayor parte del día lo pasa en prados a los que accede al punto de la mañana y que cuando llega la noche se recoge en boxes. En verano incluso las noches, estos animales, las pueden pasar fuera a la intemperie. En estos casos de régimen extensivo, no es de extrañar, que el riesgo de que se parasiten sea mayor. La cercanía con los parásitos que se desarrollan en los pastos y el espacio a compartir con otros caballos se ven incrementados y por tanto, el contacto con otras heces, mediante las cuales se vehiculan larvas. De esta manera aumentan las posibilidades de contagio con pequeños estróngilos (Corning, 2009). En estas circunstancias el tratamiento antiparasitario está más justificado.

También hay animales que se alojan en paddock o pequeñas corraletas, donde el contacto con el exterior es mayor que en el caso de los boxes. El

riesgo de que los animales se parasiten depende de la existencia de zonas verdes en estos recintos, donde los huevos de parásitos puedan evolucionar hasta el estadio de larva L3. En el caso de que estas zonas de hierba no existan, el riesgo se asemeja al que pueda existir en los boxes.

Además de lo anterior, si en estos paddocks y corraletas, hay varios animales en el mismo recinto, el espacio a compartir se ve aumentado y por tanto, si un caballo está parasitado con pequeños estróngilos, el riesgo de que los otros animales que se encuentran junto a él, es grande y este riesgo aún sería mayor, si se incorporaran animales nuevos, cuyo estatus parasitario, en primera estancia, es desconocido.

Con respecto a los **productos antiparasitarios** que se utilizan, en el 100% de los casos, son los mismos: fenbendazol, praziquantel e ivermectina.

Una de las cosas positivas que se hace a la hora de utilizarlos, es que se administran de forma alternada, es decir, se asocian antiparasitarios de familias diferentes: primero se administra fenbendazol y praziquantel y a los 6 meses, la ivermectina. Con ello, hacemos que el riesgo de aparición de resistencias sea menor, porque utilizamos fármacos de distintas familias durante tiempos que no son muy prolongados (Fayet, 2005; Calvete et al, 2012) y en consecuencia hay una menor presión de selección.

Se sabe además, que uno de los factores que predisponen a la aparición de resistencias es el uso continuado de un fármaco. Una de las peores consecuencias, es que la resistencia no solo será hacia ese fármaco en concreto, sino que ésta se extiende hacia toda la familia y que permanecerá durante muchos años, pese al cese del tratamiento (Jackson y Coop, 2000; Lind et al., 2007; Lyons et al., 2007, Slocombe et al., 2008).

En referencia a la **dosificación**, se observa que los productos se administran de forma estandarizada, es decir, sin hacer el pesaje de los animales. Esto puede llevarnos a dos situaciones opuestas: subdosificación o sobredosificación de los animales (Fayet, 2005; Calvete et al, 2012). Al fin y al cabo se trata de errores en la administración del tratamiento, en el que una misma dosis para todo el conjunto de animales supone, que para unos se está permitiendo que sobrevivan los parásitos que portan los alelos que les proporcionan la resistencia a los antihelmínticos y en otros animales, un exceso de antiparasitario, hace que se seleccionen los nematodos más resistentes. Todo ello predispone a que aparezcan pequeños estróngilos con resistencia a los antihelmínticos.

En el caso de que estuviéramos ante un grupo de animales de características similares, se podría calcular la dosis con respecto al individuo de mayor peso (Coles et al, 1992) estimando éste último, midiendo la circunferencia corporal con la ayuda de una cinta métrica (Pook et al, 2002).

Por otra parte, el hecho de llevar a cabo **tratamientos no selectivos** supone que, todos los animales de la explotación son tratados por igual, independientemente de la carga parasitaria que presenten. De esta manera, podemos estar tratando a animales que no lo necesitan porque puede que su carga parasitaria sea muy pequeña o nula. Ello contribuye a un uso irracional y continuado de los productos farmacológicos, y por tanto, a la aparición de resistencias y a la necesidad en un futuro no muy lejano de tener que elaborar nuevas moléculas, además del elevado coste que esto supone (Fayet, 2005).

Para evitar esto, se debería hacer exámenes coprológicos de cada animal o por grupos, haciendo *pools* del 10-20% de los caballos de la explotación, que nos permitan conocer cómo de parasitados se encuentran y decidir si vale la pena tratarlos o no. En el caso de los animales que están box que llevan un régimen intensivo, hay que plantearse cuando vale la pena desparasitarlos y si con una sola vez al año tratarlos es suficiente.

En contraposición estarían los animales eliminadores, es decir, aquellos animales más viejos que contribuyen a contaminar los prados de forma eficaz y los caballos que muestren signos clínicos de infección por helmintos. Ambos son los candidatos a recibir un tratamiento selectivo (Duncan y Love, 1991; Hinney et al., 2011).

En nuestro estudio, en el caso de los paddocks, matizar que no había zonas verdes circundantes, por lo tanto, no se reúnen las condiciones adecuadas para que los huevos de pequeños estróngilos evolucionen. El contagio no se producirá pese a que los animales puedan estar en contacto con las heces de otros caballos que contengan dichos huevos. Además de esto, también hay que tener en cuenta, que los tratamientos antiparasitarios se realizan de forma no selectiva, sistemática sin tener en cuenta la carga parasitaria de los animales, ni tampoco del riesgo de explotación del que se parte.

En referencia a la **época** de desparasitación, en la mayoría de los casos se realiza en primavera y otoño.

En nuestra latitud, en primavera es cuando los vermes adultos ponen huevos fértiles que acaban llegando a los pastos y se desarrollan los estadíos

larvarios L1 a L3, siendo ésta última la fase infectante para los caballos. En otoño se produce el enquistamiento de las larvas en la mucosa intestinal protegiéndose de las condiciones climatológicas adversas (Corning, 2009).

Un tratamiento en primavera, eliminaría la mayoría de las fases luminales de nematodos, es decir, a los parásitos adultos. En otoño, se busca, pese a las dificultades que hay (Brady et al, 2009; Corning, 2009) eliminar esas fases enquistadas de la mucosa, que en un futuro serán los vermes adultos que colonicen el lumen del intestino grueso y pongan huevos.

En cuanto a la **frecuencia** de desparasitación, cerca del 100% de los animales que forman parte del estudio son desparasitados dos veces/año, y por tanto se encuentra dentro de lo aceptable si analizamos el ciclo biológico de los pequeños estróngilos, cuyas fases más importantes se dan en primavera y otoño. También hay que tener en cuenta lo que afirman ciertos autores, al señalar que cuatro desparasitaciones por año, no conlleva riesgo de aparición de resistencias (Calvete et al., 2012).

No obstante, todavía los investigadores no se han puesto de acuerdo para establecer una frecuencia óptima de administración de antihelmínticos (Reinemeyer, 1999; Uhlinger, 2007).

En base a todo lo anterior, recordemos que un uso en exceso de antihelmínticos, así como frecuencias de desparasitación elevadas o el uso de una sola clase de antihelmínticos, son causas que predisponen a la aparición de resistencias (Herd, 1990; Herd, 1993; Lyons et al., 1999; Brady et al, 2009).

En referencia al riesgo de importación de parásitos, en las grandes explotaciones, este riesgo puede verse incrementado, ya que la incorporación de nuevos animales, procedentes de otros lugares donde se han detectado resistencias, es frecuente tal y como lo corroboran recientes estudios (Zouiten et al, 2005).

En el caso de pequeñas explotaciones, como son los establos, la entrada de nuevos animales es inusual, por lo que el riesgo de importación de parásitos es irrelevante.

En relación al estudio realizado de pequeños estróngilos para conocer la parasitación de los caballos de la zona media del valle del río Ebro, hemos observado que la prevalencia de los animales encuestados, en términos generales, es menor con respecto a otros estudios realizados con anterioridad, donde se afirma que España está en la misma situación que el

resto de países (Meana, et al., 2008). Así de los 94 animales analizados, sin hacer distinción entre edad ni sexo, el 34,04% son positivos a pequeños estróngilos.

En referencia al **sexo**, a la vista de los resultados obtenidos, parece ser que el sexo de los animales no es un aspecto a tener en cuenta, pues la proporción de machos y hembras parasitados es muy semejante: 34,09% y 34% respectivamente.

Analizando la **edad** de los animales, vemos que de los 78 animales adultos que hay en total, tenemos 23 (29,48%) positivos y entre los 16 potros totales, 9 (56,25%). Parece ser que los animales más susceptibles de ser parasitados y por tanto, de padecer infecciones gastrointestinales por nematodos y de mayor intensidad, son los animales muy jóvenes, potros y geriátricos (Fritzen et al., 2010; Lyons et al., 2006, von Samson-Himmelstjerna et al., 2009) El animal conforme va creciendo, va adquiriendo inmunidad variable e incompleta, de ahí la necesidad de que a lo largo de su vida requiera intervención terapéutica (Stratford et al., 2011).

Así pues, analizando nuestros resultados, tanto en el caso de los animales adultos como en potros, se observa que las cargas parasitarias (hpg) son bajas puesto que ninguno de los animales superó los 100 huevos/g de heces. Además en nuestro caso en concreto, en términos generales, son los individuos jóvenes los que excretan mayor cantidad de huevos.

Estos resultados de baja carga parasitaria, se pueden explicar analizando el manejo que se llevan en las explotaciones, donde muchos caballos (48,93%) están en boxes en un régimen intensivo, y consecuentemente, el acceso al campo así como el contacto con otros animales, está muy restringido.

Sin embargo, es interesante señalar que recuentos de huevos fecales bajos o negativos no indican necesariamente bajas o negativas cargas parásitas. Por lo que aconsejar no tratar un animal en esta situación, conlleva cierto riesgo (Nielsen et al., 2010). Por lo tanto, cuando tengamos que tomar una decisión sobre si desparasitar o no a un caballo o grupo de ellos, no solo hay que tener en cuenta los huevos presentes en las heces, sino una hacer una valoración general de todo aquello que rodea a los animales (tipo de alojamiento, contacto con otros animales, salidas al pasto...etc).

En nuestro estudio, pocos han sido los potros analizados. En términos generales este sector de la población encuestada, presenta la mayor

prevalencia de parasitación y mayores cargas parasitarias (hpg) por lo que podrían presentar y padecer los síntomas mas graves. Son varios los autores que afirman que los caballos adultos tienen a mantener unos recuentos de huevos fecales más bajos (Gomez y Georgi, 1991; Dopfer et al., 2004; Matthee y McGeoch, 2004; Nielsen et al., 2006).

Algunos autores apuntan que sólo debería administrarse antihelmínticos en el caso de que los caballos superasen cierto nivel de hpg (Brady et al, 2009) o sean animales con baja condición corporal (Nielsen et al., 2010) y que en caso contrario, los tratamientos deberían suspenderse. Los niveles críticos de hpg que se han establecido son por encima de 100 huevos/g (Herd, 1993; Uhlinger, 1990), 200 huevos/g (Little, et al., 2003) o cuando el 25% de los animales exceden los 200 huevos/g (Uhlinger, 1991). Otros autores señalan que animales con niveles de 200-500 huevos/g requieren tratamiento antiparasitario (Matthews, 2008).

En la mayoría de los casos de parasitación por ciatostomas, las cargas parasitarias son bajas y raramente provocan enfermedad clínica.

En cuanto a los coprocultivos realizados, en el 100% de los casos, el género identificado ha sido *Cyathostomun*. Hay trabajos que se han ido realizando a lo largo de los últimos años, donde se indica que *Cyathostomun* es uno de los géneros mas frecuentes que se detectan en heces de équidos, con varias especies destacables (*Cyathostomun catinatum*, *Cyathostomun pateratum*...etc.) pero también hay otros géneros a destacar como *Coronocyclus*, *Cylicocyclus*, *Cylicostephanus*. Estos cuatro géneros engloban doce especies que suponen el 99% de la prevalencia de los ciatostomas (Kaplan, 2002).

Resaltar ante todo, que ni los huevos de estróngilos, debido a su similar morfología (Hummelinck, 1946) ni las larvas L1 y L2 sirven para identificar el género. Por ello debemos fijarnos en la morfología de las larvas en el estadio de L3 (MAFF, 1986; Nielsen et al., 2010).

En general, podemos pensar a la vista de los resultados de nuestro estudio, que los pequeños estróngilos, por el momento, no representan una amenaza para los caballos.

Con el fin de estudiar la situación de **resistencia a los antihelmínticos**, por parte de los pequeños estróngilos en la zona media del valle del Ebro, inicialmente, se planteó hacer un estudio de la eficacia de los tratamientos antiparasitarios en las diferentes explotaciones, cogiendo muestras antes de desparasitar y a los 14 días tras el tratamiento (Brady, et al, 2009), pero en

vista de que los exámenes coprológicos ponían de manifiesto bajos niveles de hpg, era difícil detectar fallos en la eficacia de los tratamientos y por tanto, no se pudo seleccionar aquellas explotaciones en las que había animales sospechosos de tener pequeños estróngilos con genes de resistencia a los antihelmínticos.

Así pues, nos limitamos a hacer pruebas de detección de resistencias con los animales que tuvieran parásitos en heces, independientemente de si la carga era elevada o menos elevada.

Analizando otros aspectos y a la vista de los resultados de las pruebas in Vitro, en las que solo apareció un caso de resistencia de pequeños estróngilos a antihelmínticos (5,55% de los animales), podemos decir, que en la zona de estudio no hay apenas resistencia en la especie equina de los pequeños estróngilos. Sin embargo, lo que también es cierto, y para poder hacernos una idea sobre este tema, es que hay que seguir investigando ya que son pocos los estudios llevados a cabo en nuestro país, en équidos (Rojo Vázquez, Meana Mañes, 2008; Kaplan et al, 2011) en contraposición con otros países como Italia (Traversa et al, 2007), Suecia (Lind et al., 2007), Reino Unido, EEUU, Dinamarca, Alemania, República Checa, Polonia o Australia (Brady et al, 2009)..

También hay que señalar, que el número de animales estudiados en este caso, no es muy elevado y no podemos asegurar que sea una situación que se generalice en la zona media del valle del Ebro.

El hecho de no encontrar un alto porcentaje de resistencias, puede estar justificado en que hasta la fecha se esta llevando a cabo estrategias buenas para el control de los pequeños entróngilos en lo que se refiere a la utilización de fármacos de distintas familias de forma alterna, evitando así el uso de un único grupo de antiparasitarios durante largos periodos de tiempo. Del mismo modo, también disminuimos la presión de selección.

No obstante, se debe evitar las desparasitaciones de los animales que no tengan un riesgo importante de ser parasitados y llevar a cabo buenas dosificaciones de los productos atendiendo al peso o estado corporal. Además deberemos valorar cuando un animal merece la pena tratarlo teniendo en cuenta su alojamiento, zonas verdes circundantes a las que tengan acceso, salidas a los prados, contacto con otros animales y que reúnan las condiciones que propicien la evolución de los huevos a larvas L3... etc.

Debemos señalar la importancia que tiene modificar las pautas de manejos en cuanto a los tratamientos antiparasitarios, en la especie equina si queremos detectar las resistencias en las primeras fases de su desarrollo.

Para ello deberemos hacer chequeos de forma periódica en las explotaciones de ganadería equina, para poder detectar fallos en la eficacia de los antihelmínticos y aplicar medidas de prevención, con el fin de retrasar la velocidad de aparición de este fenómeno de base genética. Muchos estudios están de acuerdo en que una detección temprana de las resistencias, es clave para llevar un control de la situación (Brady et al, 2009).

Hasta la fecha, parece ser que las resistencias en nuestro país podrían estar controladas, pero viendo que están presentes en los países vecinos y que si seguimos favoreciendo los factores que aceleran su aparición, no sería de extrañar su asentamiento en los próximos años.

6. Conclusiones:

1. Los resultados del estudio nos indican que el manejo, en general, es correcto. Sin embargo, hábitos como desparasitar de forma no selectiva o utilizar dosis estandarizadas sin realizar el pesaje de los animales, son aspectos que pueden favorecer el desarrollo de resistencias.
2. La prevalencia de parasitación por pequeños estróngilos en la zona de estudio es del 34,04%.
3. Las cargas parasitarias que presentan los animales son bajas.
4. El género implicado en las parasitaciones es *Cyathostomun*.
5. La prevalencia de resistencia de los pequeños estróngilos al tiabendazol es del 5,5% de los animales objetos de estudio.

7. Bibliografía:

- Brady H. A, Nichols, W.T; *Drug Resistance in equine Parasites: An Emerging Global Problem*. Journal of Equine Veterinary Science. 2009; 29 (5): 285-295.
- Calvete C, Calavia R, Ferrer L.M, Ramos J.J, Lacasta D, Uriarte J; *Management and environmental factors related to benzimidazole resistance in sheep nematodos in Northeast Spain*. Veterinary Parasitology; 2011; 184 (2-4): 193-203.
- Calvete C; Primeras jornadas de IVSA-Zaragoza. 2012 Febrero.
- Coles G.C, Bauer C, Borgsteede F.H.M, Geerts S, Klei T.R, Taylor M.A, Waller P.J; *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodos of veterinary importance*. Veterinary Parasitology; 1992; 44: 35-44.
- Coles G.C; *Anthelmintic resistance-looking to the future: a UK perspective*. Research in Veterinary Science; 2005; 78: 99-108.
- Coles G.C, Jackson F, Pomroy W.E, Prichard R.K, Von Samsin-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor M.A y Vercruysse J; *The detection of anthelmintic resistance in nematodos of veterinary importance*. Veterinary Parasitology. 2006; 136: 167-185.
- Corning S; Revisión. *Equine Cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy*. Parasites & vectors; 2009 Septiembre; 2 (2): 1-16.
- Dipietro J.A, Todd K.S, Paul A.J; *Environmental contamination by eggs of Toxocara species*; Veterinary Parasitology; 1988; 26(3-4): 339-342.
- Drudge J.H, Lyons E.T, Tolliver S.C; *Critical tests of morantel-trichlorfon paste formulation against internal parasites of the horse*; Veterinary Parasitology; 1984; 14(1):55-64.

- Dwight D; *Parasitología para veterinarios*, 8º edición, Ed. Elsevier. 2004; p.161-188.
- Euzby J; *Diagnostic experimental des helminthoses animals*. Lyon. 1982; Mayo 25.
- Fayet G; *La resistencia a los antiparasitarios*. Revista *Equinus*. 2005 Enero- Abril; (11):43-48.
- Herd R.P, Stinner B.R, Purrington F.F; *Dung dispersal and grazing area following treatment of horses with a single dose of ivermectin*; *Veterinary Parasitology*, 1993 Junio; 48(1-4):229-240.
- Hinney B, Wirtherle N. C, Kyule M, Miethel N, Zessin K.H, Clausen P.H; *A questionnaire survey on helminth control on horse farms in Brandenburg, Germany and the assessment of risk caused by different kind of Management*. *Parasitology Research*; 2011 Mayo 11; 109(6):1625-35.
- Johnstone C; *Parasites & parasitic diseases of domestic animals*, Ed. University of Pennsylvania. 1998.
- Johnstone C; *Parasites & parasitic diseases of domestic animals*, University of Pennsylvania. 2002.
- Kaplan R.M; Artículo de Revisión. *Anthelmintic resistance in nematodes of horses*. *Veterinary Research*; 2002; 33: 491-507.
- Kaplan R.M et al., *Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms*. *JAVMA*; 2004; 225(6): 903-910.
- Kaplan R.M, Vidyashankar A.N; *An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance*. *Veterinary Parasitology*; 2012 Mayo; 186(1-2):70-78.
- Kassai T; *Helminología veterinaria*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 2002.
- Le Jambre L.F; *Egg hatch as in Vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes*. *Veterinary Parasitology*; 1976; 2: 385-391.

- Love S; *Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease*. The Veterinary Clinics Equine Practice; 2003; 19:791-806.
- Lyons E.T, Tolliver S.C, Ionita M, Lewellen A, Collins S.S; *Field Studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky*. Parasitology Research; 2008; 103:209-215.
- Martin R, Beveridge I, Pullman A.L, Brown T.H; *A modified technique for the estimation of the number of infective nematode larvae present on pasture, and its application in the field under South Australian conditions*; Veterinary Parasitology;1990; 37(2):133-143.
- Matthews J.B, Hodgkinson J.E, Dowdall M.J, Proudman C.J; *Recent developments in research into the cyathostominae and Anoplocephala perfoliata*. Veterinary Research; 2004; 35:371-381.
- Matthews J.B: Artículo de Revisión. *HBLB's advances in equine veterinary science and practice*. Equine veterinary journal *Equine vet*. 2011; 43 (2): 126-132.
- Meana A, Sacristán E, Fernández Pato N, Bohórquez A, Tojo A, Florez E.C; *Sobre la presencia de parásitos resistentes a los antihelmínticos en España*. Congreso EAEVE, Segovia, 5-7 Mayo 2011.
- Nielsen M.K, Fritzen B, Duncan J.L, Guilllot J, Eysker M, Dorchies P, Laugier C, Beugnet F, Meana A, Lussot-Kervern I y Von Samson-Himmelstjerna G; Artículo de Revisión. *Practical aspects of equine parasite control: A review based upon a workshop discussion consensus*. Equine Veterinary Journal; 2010; 42 (5): 460-468.
- Nielsen M.K; *Sustainable equine parasite control: Perspectives and research needs*. Veterinary Parasitology; 2012 Abril 19; 185(1):32-44.
- Paz Silva A, Sánchez- Andrade R, Vázquez I; *Control antiparasitario en équidos*. *Equinus*; 2008; nº 22.
- Raynaud J.P; *Diagnostic expérimental des helminthoses animales: Vol. 1, by Jacques Euzeby. Informations Techniques des Services*

Vétérinaires, France, 349 pp; Veterinary Parasitology; 1982 November; 11(2-3): 281.

- Reinemeyer C, Nielsen M; *Parasitism and Colic; Veterinary clinics of North America: Equine Practice; 2009; 25 (2):233-245.*
- Rojo Vázquez F.A, Meana Mañes A, Olmeda A.S; *Endoparasitosis más importantes de los équidos: programas de control. Equinus; 2002; Tema 3; 49-70.*
- Rojo Vázquez F.A, Meana Mañes A; *Control integral de parásitos. Resistencia antihelmíntica. Equinus; 2008 Septiembre-Diciembre; 22:88-101.*
- Rojo Vázquez F.A, Meana Mañes A; *Control antiparasitario en équidos. Equinus. 2008 Octubre; nº22.*
- Ruíz González A.L; Tesis. *Diagnóstico inicial de parásitos gastrointestinales a través de los métodos de Flotación, Hakarua Ueno y Graham modificado, en asnos (Equus asinus) de la aldea Maraxco del municipio de Chiquimula. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia escuela de medicina veterinaria. Guatemala; 2007 Octubre.*
- Stratford C.H, McGorum B.C, Pickles K.J, Matthews J.B; Artículo de Revisión. *An update on cyathostomins: Anthelmintic resistance and diagnostic tools. Equine Veterinary Journal; 2011; 43(39): 133-139.*
- Traversa D, Čerňanská D, Paoletti B, Král'ová-Hromadová I, Iorio R, Pa Čudeková P, Milillo P; Application of a Reverse Line Blot hybridisation assay for the species-specific identification of cyathostomins (Nematoda, Strongylida) from benzimidazole-treated horses in the Slovak Republic; *Veterinary Parasitology; 2009 Marzo; 160 (1-2):171-174.*

- Urguhart G.M, Armaour J, Duncan J.L, Dunn A.M, Jennings F.W; *Parasitología veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. Facultad de medicina veterinaria. Universidad de Glasgow, Escocia. 2001.
- Von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schurmann S, Rohn K, Schnieder T, Epe C; *Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of Parascaris equorum egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms*. *Veterinary Parasitology* 2007; 144:74-80.
- Von Samson-Himmelstjerna G; *Anthelmintic resistance in equine parasites- detection, potencial clinical relevance and implications for control*. *Veterinary Parasitology*; 2012 Abril; 185 (1):2-8.
- Wolstenholme A, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna, Sangter N; *Drug resistance in veterinary helminths*; *Trends in Parasitology*; 2004; 20 (10):469-476.
- Xiao L, Herd R.P, Majewski G.A; *Comparative efficacy of moxidectin and ivermectin against hypobiotic and encysted cyathostomes and other equine parasites*; *Veterinary Parasitology*; 1994 Mayo; 53(1-2):83-90.
- Zouiten H, Berraq B, Oukessou M, Sadak A, Cabaret J; *Poor efficacy of the most commonly used anthelmintics in sport horse nematodes in Morocco in relation to resistance*; *Parasite*; 2005 Diciembre; 12(4):347-51.