



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal

Implementación, prueba y comparación de dos técnicas para determinar resistencia Antihelmíntica frente al Bencimidazol en Nematodos del equino

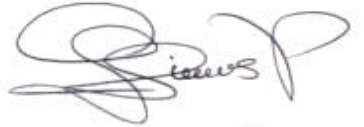
Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA

Alejandro Nicolás Canales Helmer

Valdivia Chile 2001

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Gerold Sievers P.



COLABORADOR:

Sra. Ivette Quintana G.



PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. Oscar Araya V.



Dr. Arturo Escobar V.



FECHA APROBACION: 20 Noviembre de 2001.

A mis Padres

INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	7
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSION	26
7. BIBLIOGRAFIA	30

1. RESUMEN

Entre mayo y agosto del 2000, se investigó la presencia de resistencia antihelmíntica a los derivados del bencimidazol en los nemátodos estrogilidos en equinos de los planteles: Criadero Militar "Riñihue", Criadero Las Encinas de "Frutillar" y Grupo de Formación Policial de "Valdivia", todos ubicados en la Xª Región de Chile. Se analizó un total de 32 equinos antes y después de un tratamiento con Fenbendazol. Para determinar la resistencia al bencimidazol se utilizaron dos pruebas:

- a) Prueba de reducción de la oviposición después del tratamiento (FECRT): de todos los animales se obtuvieron muestras fecales siete días antes y siete días después de un tratamiento con 7,5 mg/kg de Fenbendazol (Panacur®). A cada muestra fecal se le determinó la cantidad de huevos por gramo (hpg) y se calculó el porcentaje de reducción de la oviposición después del tratamiento. Para declarar resistencia al bencimidazol, se consideró <90% de reducción de la oviposición después del tratamiento.
- b) Prueba de eclosión de huevos (EHA): para obtener una gran cantidad de huevos de nemátodos estrogilidos se realizó una flotación-sedimentación; en cantidades exactas, se incubaron por 48 hrs. a 24° C. en placas de cultivo sometidos a diferentes concentraciones de Tiabendazol. La concentración de TBZ que inhibió el 50% de la eclosión de las larvas (LD50) se determinó mediante el método "Probit". Para declarar resistencia al bencimidazol se consideró cuando la LD50 se presentaba a una concentración mayor a 0.1 µgTBZ/ml.

Por medio de la prueba FECRT se encontró 28.1%, 87.3%, y 94.7% de reducción de la oviposición en Riñihue, Frutillar y Valdivia respectivamente. En los dos primeros hubo resistencia al bencimidazol y en el último hubo susceptibilidad al producto.

Por medio de la prueba EHA, se detectó resistencia al bencimidazol en Riñihue antes y después del tratamiento (LD50 = 0.136 y 0.176 µgTBZ/ml, respectivamente). En Frutillar se detectó resistencia sólo después del tratamiento (LD50 = 0.127 µgTBZ/ml). En Valdivia se diagnosticó susceptibilidad a los bencimidazoles (LD50 = 0.058 µgTBZ/ml).

Presencia de resistencia antihelmíntica al bencimidazol se determinó mediante ambas pruebas. Sin embargo, la prueba FECRT es mucho más económica y fácil de realizar.

Palabras clave: equinos, FECRT, EHA, resistencia antihelmíntica, bencimidazol, Chile.

2. SUMMARY

Comparison of two techniques to determine benzimidazole resistance in horses nematodes.

Two techniques were used: faecal egg count reduction test (FECRT) and egg hatch assay test (EHA). A total 32 horses from 3 different farms were studied: 11 horses of Riñihue, 14 horses of Frutillar and 7 horses of Valdivia.

The faecal samples were obtained seven days before and seven days after the treatment with 7.5 mg/kg of fenbendazole (Panacur®). For each faecal sample, the egg per gram (epg) and faecal egg count reduction percentages was calculated. To declare benzimidazole resistance for FECRT, faecal egg count reduction less than 90% was considered. The eggs from faecal samples were obtained by flotation-sedimentation techniques and incubated in cultivation plates for 48 hours to 24° C adding different concentrations of thiabendazole (TBZ). The concentration of TBZ that inhibited 50% of larvae appearance (LD₅₀) was calculated by Probit method. A concentration higher than 0,1 µgTBZ/ml as LD₅₀ was considered to declare benzimidazole resistance for EHA.

By FECRT, the faecal egg count reduction percentages was of 28.1% in Riñihue, 87.3% in Frutillar and 84.7% in Valdivia. In the first two ones, there was resistance to the benzimidazole and in the last one there was susceptibility to the same product. By EHA, benzimidazole resistance was detected in Riñihue before and after the treatment (LD₅₀ = 0,136 and 0,176 µgTBZ/ml, respectively). In Frutillar, resistance was only detected after the treatment (LD₅₀ = 0,127 µgTBZ/ml). In Valdivia, horses were susceptible to benzimidazole (LD₅₀ = 0,058 µgTBZ/ml).

It can be concluded anthelmintic resistance to benzimidazole is present in Riñihue and Frutillar by FECRT and by EHA. Horses from Valdivia were considered susceptible to BZs. But the FECRT is the most useful, economic and technique to perform.

Key Words: Horse, anthelmintic resistance, benzimidazole, Chile. FECRT, EHA.

3. INTRODUCCION

En los últimos años, los nemátodos parásitos de importancia económica de los animales domésticos han desarrollado una preocupante resistencia frente a los diferentes fármacos antiparasitarios existentes en el mercado. Su uso frecuente e indiscriminado para el control de las parasitosis en los animales, ha provocado la selección y reproducción de aquellos parásitos que presentan una resistencia natural frente a los diferentes principios antihelmínticos; lo cual ha sido descrito en muchos países (Maingi y col., 1998). En Chile, los cada vez más frecuentes tratamientos antihelmínticos insatisfactorios realizados a caballos, hacen sospechar que se ha producido una selección de cepas de nemátodos estrogilidos resistentes a muchos productos antiparasitarios existentes en el mercado. Esto, principalmente porque las medidas de control se basan casi exclusivamente en la aplicación regular de antiparasitarios.

La resistencia antihelmíntica se define como la capacidad que han desarrollado algunas cepas de parásitos a sobrevivir frente a la acción de los fármacos antiparasitarios. La selección de nemátodos resistentes involucra factores propios de los antihelmínticos, de los parásitos, de los hospedadores y del medio ambiente donde se desarrolla el fenómeno (President, 1985). Los parásitos adultos dentro del hospedador seleccionan sus genes de resistencia cuantas veces tengan contacto con los antiparasitarios (Thomas, 1982).

La resistencia antihelmíntica es hereditaria, y por lo tanto, el desarrollo de ésta requiere que primero estén presentes los genes de resistencia. Con la continua selección y reproducción de estos parásitos nemátodos, la frecuencia de genes resistentes va en aumento en la población tratada, por lo que más nemátodos resistentes sobreviven hasta producir el fracaso del tratamiento antihelmíntico (Sangster, 1999). Una vez que la resistencia está presente no se revierte dicha situación, es por ello que se debe prevenir precozmente su desarrollo y establecimiento para tardar la acumulación de genes resistentes (Martín, 1987).

Los hospedadores que tienen acceso a estos genes resistentes son pocos, debido a que sólo una parte del total de las larvas son ingeridas, permaneciendo el resto en la pradera en espera de un nuevo hospedador. Allí guardan sus caracteres de susceptibilidad, por lo que en futuras infecciones hay seguridad de que se mezclarán los genes de susceptibilidad proveniente de las larvas que quedaron en la pradera, con los genes de resistencia de las larvas cuyos progenitores fueron seleccionados por los antihelmínticos. Los híbridos resultantes, con características de susceptibilidad, permiten retrasar la aparición de poblaciones de nemátodos resistentes (Sáenz y col, 1991). Si por el contrario, todas las larvas son ingeridas por los hospedadores en un período corto de tiempo, seleccionan sus genes al tener contacto con los antiparasitarios manifestándose rápidamente el problema de resistencia (Martín, 1987).

Desafortunadamente, los antihelmínticos del grupo de los benzimidazoles están asociados a una rápida selección de cepas de nemátodos resistentes (Prichard y col., 1980).

Los antihelmínticos del grupo de los bencimidazoles producen resistencia lateral; es decir, cuando una población de nemátodos es resistente a un antihelmíntico, lo es también para el resto de los otros antiparasitarios del mismo grupo, aún cuando nunca hayan tenido contacto con ellos (Campos, 1990). Esto se debe a que todos los antiparasitarios del grupo de los bencimidazoles; tienen una estructura química y mecanismo de acción similar entre ellos (Martín, 1987). Es probable que la resistencia antihelmíntica esté presente donde frecuentemente se usan antiparasitarios y recién se descubre cuando se investiga (Prichard, 1997). La selección de poblaciones de nemátodos resistentes ocurre con casi todas las familias de antihelmínticos modernos; la única condición para que se presente, es que los parásitos tengan contacto frecuente con el mismo antiparasitario (Campos, 1990).

Según Coles (1990), el uso de antihelmínticos ha resultado en el desarrollo de resistencia de algunas especies de nemátodos frente a los antihelmínticos, como los bencimidazoles, probencimidazoles, levamisol, morantel, avermectinas, rafoxanide, closantel y los insecticidas órganos fosforados. Dicho desarrollo de resistencia se ha descrito en la mayoría de las especies animales (Condor y Camphel, 1995). La resistencia antihelmíntica está extendida especialmente a los parásitos nemátodos de oveja, cabras y equinos. La situación es crítica en los nemátodos de la familia Trichostrongylidae de los ovinos y caprinos, donde se han informado resistencia a bencimidazol, levamisol, morantel e ivermectina; en menor grado también se está desarrollando en parásitos nemátodos del ganado bovino y porcino (Graven y col., 1999).

Los problemas de resistencia más frecuentes ocurren en antihelmínticos derivados del grupo de los bencimidazoles en nemátodos gastrointestinales de los ovinos y caprinos. Se han informado en Australia, África, Europa y Sudamérica (McKenna, 1990; Maingi y col., 1996, 1998; Hazelby y Probert, 1994; Balicka y col., 1997). En América latina el mayor número de descripciones de resistencia antihelmíntica en ovinos proviene de Argentina, Uruguay, Paraguay, Brasil (Waller y col., 1996) y México (Sáenz y col., 1991; Campos y col., 1995). Información de resistencia a bencimidazol en nemátodos gastrointestinales de bovinos existe en Australia y Nueva Zelanda (Eagleson y Bowie, 1986; Jackson y col., 1987).

En el caso de los equinos el primer informe de resistencia antihelmíntica en los nemátodos strongilidos del equino fue a la fenotiacina, descrita por Gibson en el año 1960 (Young y col., 1999). Desde entonces, informes de resistencia antihelmíntica se han citado en Australia (Kelly y col., 1981), Alemania (Bauer y col., 1986; Ullrich y Bauer, 1988), Noruega (Ihler, 1995), U.S.A. (Herd, 1993), Inglaterra (Fisher y col., 1992), Dinamarca (Bjorn y col., 1991), Brasil (Pereira y col., 1991), Ucrania (Borgsteede y col., 1997) y Suecia (Nilsson y col., 1989).

Para evaluar el grado de resistencia antihelmíntica se han desarrollado diversas pruebas *in vivo* e *in vitro* (Duncan y col., 1988; Ihler y Bjorn, 1996). La World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) ha estandarizado las pruebas basadas en datos epidemiológicos (Coles y col., 1992). Una prueba *in vivo* es la reducción de huevos en la materia fecal después de un tratamiento, denominada FECRT (Faecal Egg Count Reduction Test), la cual puede ser usada en rumiantes, equinos y cerdos frente a todos los tipos de

antihelmínticos y todos los nemátodos que eliminan huevos por las heces. Esta prueba provee una estimación de la eficacia del antihelmíntico al comparar la eliminación de huevos antes y después de aplicar el tratamiento (Martín y col., 1989). La prueba de reducción huevos, es la más usada para el análisis de resistencia en estudios de terreno, ya que puede realizarse fácilmente sin la necesidad de personal muy especializado (Graven y col., 1999). Se usa para evaluar la resistencia- sensibilidad del antihelmíntico en los parásitos del equino (Johansen, 1989), pero lamentablemente es poco sensible y proporciona escasa información del número e identidad de los parásitos (McKenna, 1987, 1996). Su insuficiente precisión se atribuye a las variaciones individuales y a la farmacodinámica de los diferentes productos antihelmínticos (Lacey y col., 1990).

Producto de lo anterior se han desarrollado pruebas *in vitro* más sensibles. Las dos pruebas más conocidas son la prueba de eclosión de huevos o EHA "Egg Hatch Assay" y la prueba de desarrollo larvario o LDA "Larval Development Assay" (Graven y col., 1999).

La prueba EHA, sin embargo, sólo es eficaz para analizar la resistencia a los bencimidazoles y no para otras clases de compuestos antihelmínticos (Whitlock y col., 1980; Hazelby y col., 1994; Graven y col., 1999). El uso de anaerobia descrita por Hunt y Taylor (1989), o frío a 4°C descrita por Smith-Buijs y Borgsteede (1986) para el almacenamiento de muestras fecales, permitió su uso masivo en estudios de terreno. La prueba EHA, descrita originalmente por Le Jambre (1976) y modificada por Coles y col. (1992), se basa en la inhibición de la embriogénesis y eclosión de huevos cultivados junto a concentraciones de un antihelmíntico. Permite la obtención de la dosis en la cual se obtiene el 50% de la inhibición de la eclosión de larvas en una placa de cultivo (Johansen, 1989; von Witzendorff, 2001).

En equinos, la prueba LDA ha sido ampliamente usada para evaluar *in vitro* la resistencia antihelmíntica (Kelly y col., 1981; Ullrich y Bauer, 1988; Ihler, 1995). Tiene la ventaja que se puede utilizar para determinar resistencia antihelmíntica a un número mayor de drogas antiparasitarias (Hubert y Kerboeuf, 1992). Sin embargo, a pesar del potencial de la técnica en terreno, muy pocos investigadores la han utilizado con este fin (Johansen, 1989).

Las pruebas más modernas para el diagnóstico de la resistencia o susceptibilidad a bencimidazol (BZ) se basan en el uso de la reacción de la polimerasa en cadena "PCR" , con el objeto de determinar en forma individual resistencia o susceptibilidad a los productos del grupo de los bencimidazoles (Prichard, 1997). Los antiparasitarios de las familias de los bencimidazoles (Tiabendazol (TBZ), Fenbendazol, Oxibendazol, Cambendazol, Oxfendazol (OFZ), Mebendazol y Albendazol (ABZ)) y los probencimidazoles (Tiofonato, Netobimin y Febantel), se caracterizan por poseer estructura química y mecanismo de acción similares. Actúan de varias formas, pero la principal es impidiendo la unión de la alfa y beta tubulina para formar los microtúbulos de las células intestinales de los nemátodos. Por medio de estas pruebas, la resistencia ha sido asociada con alteraciones en los genes de la beta-tubulina, demostrándose poseer una alta afinidad con los bencimidazoles (Martín, 1987).

El uso del PCR permite determinar el genotipo resistente (rr) o susceptible (rS y SS), tanto del parásito adulto como de la larva. Los nemátodos parásitos pueden ser genotipados

con respecto a la mutación en el residuo 200 (Phe-Tyr) de los genes de la cadena de la beta-tubulina, la que se relaciona en la resistencia a los bencimidazoles (von Witzendorff, 2001). Una proporción muy alta de individuos homocigotos SS (Phe/Phe) caracterizan a las poblaciones susceptibles a los bencimidazoles, y una proporción muy baja de individuos homocigotos RR (Tyr/Tyr) caracterizan a las poblaciones resistentes a bencimidazol. Una correlación positiva se observó entre las LD50 estimados por la prueba EHA, y la proporción de individuos homocigotos mutantes RR (Tyr/Tyr). Este método basado en el uso del PCR permite el descubrimiento de los primeros individuos resistentes al genotipificar rápidamente numerosos nemátodos en una población (Elard y col., 1999).

En muchas crianzas de equinos en Chile se sospecha que se ha producido una selección de cepas de nemátodos strongilidos resistentes a los productos antiparasitarios existentes en el mercado. Una evidencia de ausencia de reducción de la oviposición después de un tratamiento con un probencimidazol (Febentel) en caballares de uso militar fue descrito por Raizman (1997). Sin embargo, todavía no existe evidencia científica de dicha resistencia ni antecedentes sobre la magnitud de su ocurrencia. Se supone que el uso frecuente y repetitivo de antihelmínticos genera una selección genética a cepas de nemátodos resistentes. En los equinos chilenos se han usado, durante muchos años, varios antihelmínticos derivados del bencimidazol. Ello puede haber provocado una selección de cepas de nemátodos strongilidos resistentes a dichos fármacos.

Los objetivos del presente trabajo son: a) implementar la prueba *in vitro*, de eclosión de huevos (egg hatch assay "EHA") para determinar la resistencia antihelmíntica de los nemátodos strongilidos en equinos frente a derivados del bencimidazol, y b) comparar dicha técnica con la prueba de reducción de la oviposición fecal (fecal egg count reduction test "FECRT") después de un tratamiento de los equinos con Fenbendazol.

La hipótesis del presente trabajo es: que en algunos criaderos de equinos del Sur de Chile existen caballos con cepas de nemátodos strongilidos resistentes al bencimidazol.

4. MATERIAL Y METODOS

Este trabajo, fue realizado entre mayo y agosto del año 2000 en la Xª Región, en las localidades de Riñihue, Frutillar y Valdivia. Los equinos maestreados fueron respectivamente del Criadero Militar "Riñihue", del Criadero "Las Encinas" y del Grupo de Formación Policial. De estos lugares se seleccionó un total de 32 animales: 11 equinos del Criadero Militar Riñihue, 14 equinos del Criadero Las Encinas y 7 equinos del Grupo de Formación Policial, los que presentaron recuentos de huevos iguales o superiores a 150 hpg, y que no fueron tratados con antihelmínticos en los últimos cuatro meses.

Esquema general del ensayo:

- a) 1ª toma de muestra fecal a los equinos de cada criadero, para realizar la prueba de reducción de la oviposición FECRT y la prueba de eclosión de huevos EHA con el fin de determinar la presencia de cepas resistentes a bencimidazoles antes del tratamiento.
- b) Tratamiento de los equinos una semana mas tarde con Fenbendazol (PANACUR 10%) a una dosis de 7.5 mg/kg.
- c) 2ª toma de muestra fecal para realizar la prueba de reducción de la oviposición FECRT y la prueba de eclosión de huevos EHA con el fin de determinar la presencia de cepas resistentes a bencimidazoles después del tratamiento.

Materia fecal se obtuvo rectalmente de cada equino y se enfrió inmediatamente utilizando hielo para detener momentáneamente el desarrollo de los huevos. A cada muestra se le realizó:

1. Recuento de huevos según la técnica de Mc Master modificada por Schmidt (1971) para la prueba FECRT.
2. Flotación-sedimentación derivada de la Técnica de Bass (1910), para obtener el mayor número de huevos de cada muestra.
3. Los huevos de cada muestra se sometieron a la prueba EHA descrita por Le Jambre (1976) y modificada por Coles y col. (1992).

Descripción de la Técnica de Mc Master modificada por Schmidt (1971):

- a) A un frasco de plástico se vierte solución saturada de cloruro de sodio hasta una marca que indica 42 ml; luego se agrega material fecal hasta alcanzar una marca que indica 45 ml, lo que corresponde a 3 g de material fecal a analizar.
- b) La muestra fecal debe deshacerse con una baqueta.
- c) Se tapa el frasco y agita suavemente para asegurar suspensión homogénea.
- d) Se destapa el frasco y con un gotario se llenan las dos secciones de una cámara de recuento de huevos especialmente diseñada para ello (cámara de Mc Master).

- e) A los dos minutos se inicia el recuento de huevos en ambas secciones de la cámara.
- f) Los huevos encontrados se multiplican por 50 para obtener el número de huevos por gramo de materia fecal (hpg).

El cálculo de la presencia de cepas resistentes mediante la prueba de reducción de la oviposición FECRT, se realizó mediante el recuentos de huevos antes y después del tratamiento de los animales con Fenbendazol, determinando el porcentaje de reducción de la oviposición, por la fórmula descrita por Young y col. (1999):

$$\frac{(\text{Media de hpg antes del tratamiento} - \text{Media de hpg después del tratamiento}) \times 100}{\text{Media de hpg antes del tratamiento}}$$

Descripción de la técnica de flotación-sedimentación de Bass (1910) modificada para obtener el mayor número posible de huevos de nemátodos estromgilidos de cada muestra fecal:

- a) Se prepara una solución saturada de cloruro de sodio (360 g de NaCl en 1000 ml de agua).
- b) El material fecal de un animal se macera en un mortero con algo de la solución salina.
- c) Desde el mortero se vierte la suspensión a un embudo con tamiz, adicionando solución salina hasta llenar un vaso de 250 ml Según la cantidad de huevos (hpg) que tenga la muestra fecal, es recomendable usar 1 a 3 vasos por muestra.
- d) Se espera 15 minutos para que noten los huevos.
- e) Los huevos flotada se obtienen succionando la superficie de la suspensión mediante una pipeta. Dicha operación debe realizarse muchas veces.
- f) La suspensión pipeteada se vierte a un recipiente con abundante agua para diluir la solución salina que destruye los huevos.
- g) Los huevos se sedimentan en el recipiente de agua durante 30 minutos. El sobrenadante se extrae mediante una bomba de vacío para concentrar el material sedimentado con los huevos en el fondo.

Descripción de la técnica EHA modificada por Coles y col. (1992)

- a) Se prepara una solución matriz de Tiabendazol (TBZ) a una concentración 1 mg/ml. (El TBZ es el único bencimidazol que en presencia de ácido clorhídrico (HCl) tiene una buena solubilidad en agua). A 100 mg de TBZ se le adicionan 200 µl de HCl más 99,8 ml de agua.
- b) De la solución matriz se distribuye en los pocillos de placas de cultivo (Limbro plate, Flow Laboratories, McLean, VA) 11 diferentes concentraciones de TBZ. Las concentraciones finales de TBZ en los pocillos fueron de 0,01; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,09; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2 y 0,25 µg/ml en el Criadero Militar Riñihue y de 0.01; 0.03; 0.05; 0.07;0.09; 0.1; 0.125; 0.15; 0.2; 0.25; y 0.3 µgTBZ/ml en el Criadero Las Encinas y Grupo de Formación Policial. El pocillo control solamente posee agua y HCl. Como cada placa tiene 24 pocillos

se realiza una réplica a cada muestra. La distribución de los pocillos control (c) y las distintas diluciones de TBZ se presentan en la Figura 1:

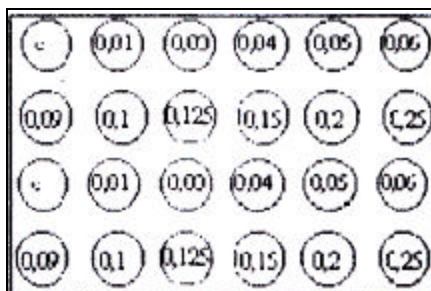


Figura 1: Distribución de las diferentes concentraciones de Tiabendazol en los pocillos de una placa de cultivo.

- c) Se adiciona 1990 μ l de la suspensión de huevos obtenidos mediante la técnica de Bass (1910) modificada a cada pocillo.
- d) Las placas se incuban a 27° C. por 48 horas.
- e) Después de la incubación (que permite el desarrollo y la eclosión de las larvas 1), se detiene y fija el proceso adicionando una gota de lugol a cada pocillo.
- f) Posteriormente se cuentan 100 huevos y/o larvas eclosionadas en cada pocillo.
- h) Concentraciones de Tiabendazol (TBZ) en la cual observamos el 50% de la inhibición de la eclosión de las larvas antes y después del tratamiento superiores a 0,1 μ g/ml indican resistencia frente a los bencimidazoles (Várady y Corba, 1999). La concentración de TBZ donde se obtiene el 50% de inhibición de la eclosión de las larvas indica la LD50.

Análisis estadístico de los datos de la prueba de eclosión de huevos (EHA):

El cálculo de la presencia de cepas de nemátodos resistentes a bencimidazol se determinó mediante el cálculo de la dosis en la cual obtenemos el 50% de inhibición de la eclosión de las larvas (LD50), por análisis Probit (Análisis de Respuesta a Dosis) utilizando los programas computacionales Sigma Stat y Sigma Plot.

Para calcular el valor de la LD50 debe corregirse cada serie en relación a la eclosión normal determinada en los pocillos controles en el cual los huevos se cultivaron solamente con agua y HCL (von Witzendorff, 2001). Posteriormente se calculó la inhibición de la eclosión de larvas utilizándose respectivamente las fórmulas 1 y 2.

Fórmula 1: $LS(\%) = LSTBZ \times 100 / LSc$

Fórmula 2: $LS-H(\%) = 100 - LS$

LS-H: Inhibición de la eclosión de las larvas.

LS: Eclosión de las larvas.

LSTBZ: Eclosión de larvas a distintas concentraciones de Tiabendazol.

LSc: Eclosión de larvas en el pocillo negativo a Tiabendazol.

La media aritmética de la inhibición de la eclosión de las larvas, leídas en concentraciones de Tiabendazol se transformó en Probit (Sigma Plot) y se representó gráficamente. Después, se calculó por regresión lineal los valores de la ecuación de la recta (b0 y b1) por medio de la Fórmula 3, calculándose el punto medio de la recta para obtener la LD50 (von Witzendorff, 2001).

Fórmula 3: $LD50 (\mu gTBZ/ml) = ((5-(b0))/(b1))$

Se comparó los resultados obtenidos de la prueba FECRT y de la prueba EHA antes y después del tratamiento con Fenbendazol.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los tres lugares (Criadero Militar "Riñihue", Criadero "Las Encinas" y Grupo de Formación Policial de Valdivia) se ordenaron de la forma siguiente: 1) Determinación de resistencia antihelmíntica mediante el cálculo del porcentaje de reducción de la oviposición después del tratamiento (FECRT), 2) Determinación de resistencia antihelmíntica mediante la prueba de eclosión de huevos (EHA) con cálculo de la dosis de Tiabendazol (expresada en $\mu\text{gTBZ/ml}$) necesaria para inhibir el 50% de eclosión de las larvas (LD50) en los cultivos antes y después del tratamiento con Fenbendazol.

1. Determinación de resistencia antihelmíntica mediante el cálculo del porcentaje de reducción de la oviposición después del tratamiento.

1.1. Criadero Militar "Riñihue":

1.1.1. Los recuentos de huevos antes y después del tratamiento con Fenbendazol (Tabla 1) de los 11 equinos fueron en promedio, 386,4 hpg (rango: 150-850) y 268.2 hpg (rango: 50-450), respectivamente. En promedio hubo un 28.1% de reducción de la oviposición después del tratamiento.

Tabla 1

Recuentos de huevos por gramo de materia fecal (hpg) antes y después del tratamiento con Fenbendazol en 11 caballos del Criadero Militar "Riñihue".

Equinos	hpg antes tratamiento	hpg después tratamiento	Reducción oviposición (%)
R1	550	300	45.45
R2	550	250	54.54
R3	450	300	33.33
R4	250	100	27.27
R5	150	300	0.0
R6	150	200	0.0
R7	400	350	12.5
R9	300	250	16.66
R8	150	50	66.67
R10	450	450	0.0
R11	850	400	52.94
Media	386.4	268.2	28.1
Desv. estándar	± 216.9	± 119.0	± 24.2

- 1.1.2. Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de 11 equinos estudiados en el Criadero Militar Riñihue (Gráfico 1). 7 equinos (63.6%) presentaron una reducción de la oviposición <40%, 4 equinos (36.4%) entre 40-<80%. No se obtuvieron equinos con porcentajes de reducción de la oviposición superiores al 80 %.

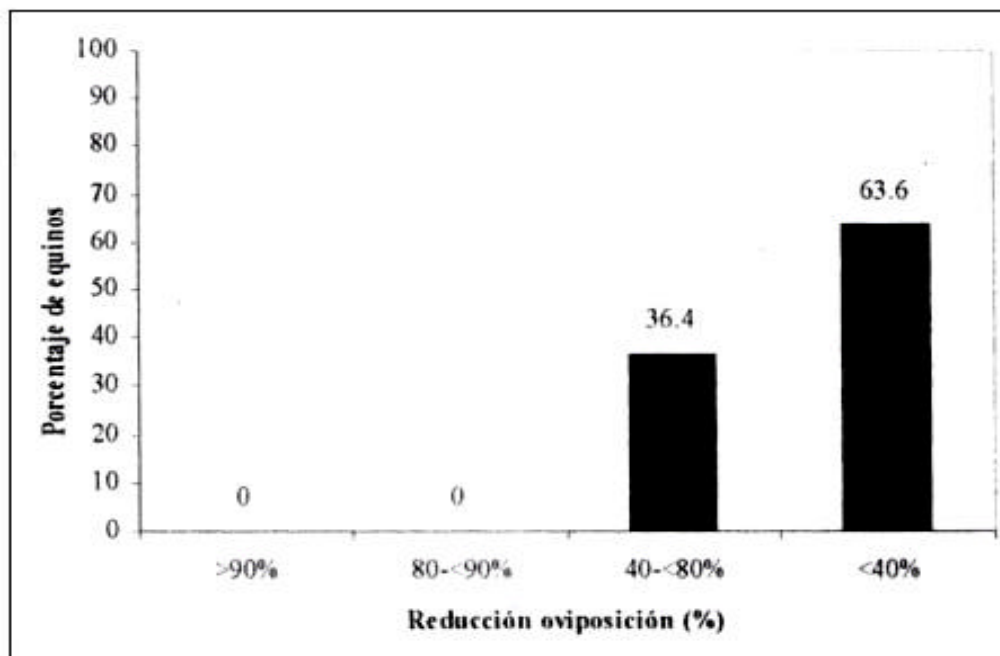


Gráfico 1: Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de los 11 equinos muestreados en el Criadero Militar Riñihue.

1.2. Criadero "Las Encinas":

1.2.1. Los recuentos de huevos antes y después del tratamiento con Fenbendazol (Tabla 2) de los 14 equinos fueron, en promedio, 728.6 hpg (rango: 200-1800) y 117.9 hpg (rango: 0-750), respectivamente. En promedio hubo un 87.3% de reducción de la oviposición después del tratamiento.

Tabla 2

Recuentos de huevos por gramo de materia fecal (hpg) antes y después del tratamiento con Fenbendazol en 14 caballos del Criadero "Las Encinas".

Equinos	hpg antes tratamiento	hpg después tratamiento	Reducción oviposición (%)
E1	450	50	88.8
E2	350	0	100.0
E3	550	50	90.9
E4	400	0	100.0
E5	450	0	100.0
E6	1800	0	100.0
E7	1000	0	100.0
E8	350	0	100.0
E9	500	250	50.0
E10	1550	350	77.4
E11	200	0	100.0
E12	1400	750	46.4
E13	950	100	89.4
E14	250	50	80.0
Media	728.6	117.9	87.3
Desv.estándar	± 521.7	± 211.6	± 18,3

- 1.2.2. Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de 14 equinos estudiados en el Criadero Las Encinas (Gráfico 2). 8 equinos (57.1%) presentaron una reducción de la oviposición $>90\%$, 3 (21.4%) animales entre $80-<90\%$ y 3 equinos (21.5%) entre $40-<80\%$, no se obtuvieron equinos con porcentajes inferiores al 40%.

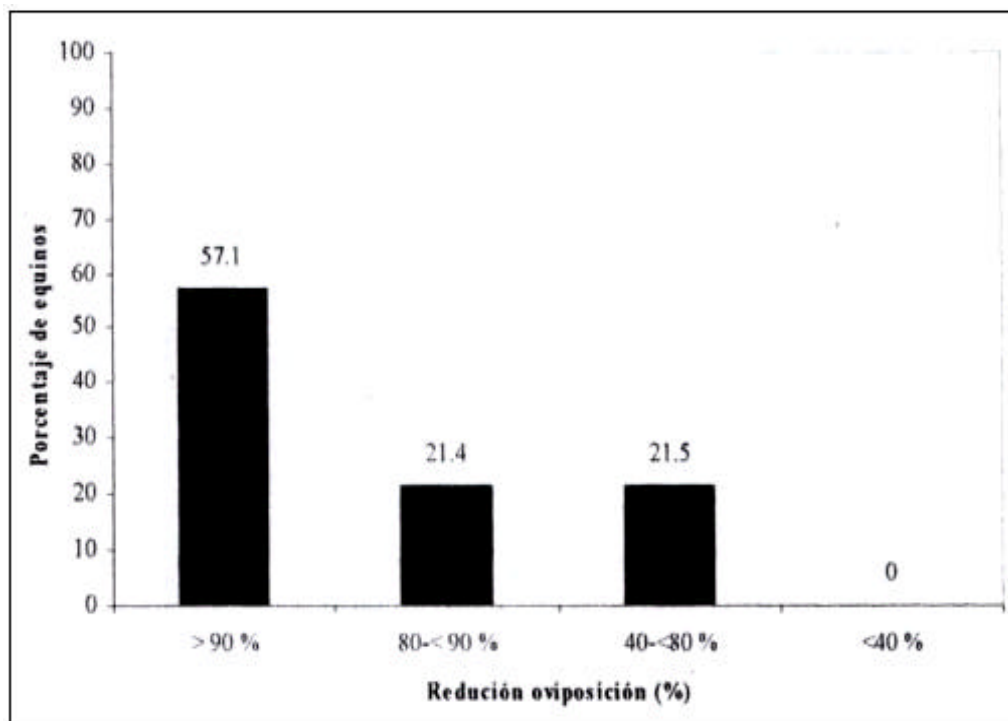


Gráfico 2: Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de los 14 equinos muestreados en el Criadero Las Encinas.

1.3. Grupo de Formación Policial:

- 1.3.1. Los recuentos de huevos antes y después del tratamiento con Fenbendazol (Tabla 3) de los 7 equinos fueron, en promedio, 1085.7 hpg (rango: 750-1850) y 50.0 hpg (rango: 0-100), respectivamente. En promedio hubo un 94.7 % de reducción de la oviposición después del tratamiento.

Tabla 3

Recuentos de huevos por gramo de materia fecal (hpg) antes y después del tratamiento con Fenbendazol en 7 caballos del "Grupo Formación Policial".

Equinos	hpg antes tratamiento	hpg después tratamiento	Reducción oviposición (%)
FP1	1550	0	100.0
FP2	1850	50	97.3
FP3	850	100	88.2
FP4	850	50	94.1
FP5	750	0	100.0
FP6	800	50	93.8
FP7	950	100	89.5
Media	1085.7	50.0	94.7
Desv.estándar	± 432.73	± 49.82	± 4.71

- 1.3.2. Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de los 7 equinos estudiados en el Grupo de Formación Policial (Gráfico 3). 5 equinos (71.4%) presentaron una reducción de la oviposición >90%, y 2 animales (28.6%) entre 80-<90%, no se obtuvieron porcentajes >80%.

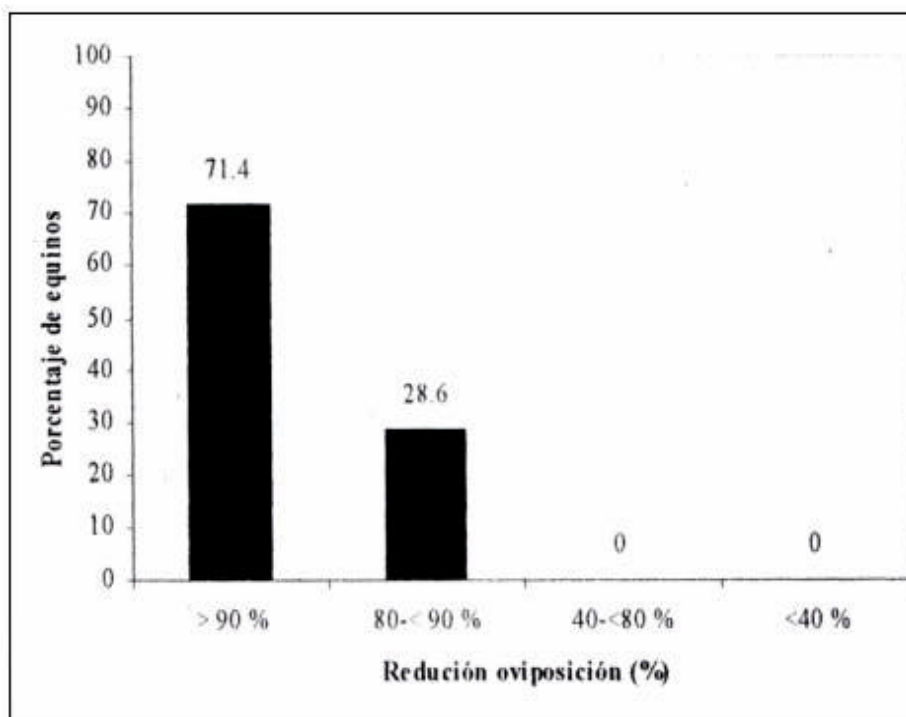


Gráfico 3: Distribución de los porcentajes de reducción de la oviposición de 7 equinos muestreados en el Grupo Formación Policial.

2. Determinación de resistencia antihelmíntica mediante la prueba de eclosión del huevo (EHA) con calculo de la dosis de Tiabendazol (expresada en $\mu\text{gTBZ/ml}$) necesaria para inhibir el 50% de eclosión de las larvas (LD50) en los cultivos antes y después del tratamiento con Fenbendazol.

2.1. Criadero Militar "Riñihue":

2.1.1. LD50 individuales de los 11 equinos maestreados en el Criadero Militar "Riñihue" (Tabla 4). En promedio se determinó que antes del tratamiento con Fenbendazol la LD50 fue $0.136 \mu\text{gTBZ/ml}$ y después del tratamiento $0.176 \mu\text{gTBZ/ml}$.

Tabla 4

Dosis (expresada en $\mu\text{gTBZ/ml}$) que inhibe la eclosión de la larvas en un 50% (LD50) antes y después de un tratamiento con Fenbendazol en 11 equinos del Criadero Militar "Riñihue".

Equinos	LD 50 ($\mu\text{g TBZ/ml}$) antes tratamiento	LD 50 ($\mu\text{g TBZ/ml}$) después tratamiento
R1	0.144	0.215
R2	0.128	0.154
R3	0.134	0.189
R4	0.137	*
R5	0.152	0.124
R6	0.156	0.164
R7	0.138	0.218
R8	0.124	*
R9	0.155	0.184
R10	0.110	0.172
R11	0.117	0.163
Media	0.136	0.176
Desv. estándar	± 0.0153	± 0.0296

* No se realizó prueba de eclosión de huevos por recuentos inferiores a 150 hpg.

- 2.1.2. Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) obtenida en 11 equinos antes del tratamiento y 9 equinos después del tratamiento en el Criadero Militar "Riñihue" (Gráfico 4). Antes del tratamiento, 8 equinos (72.7%) obtuvieron valores de LD50 $>0.1 \sim 0.15$ $\mu\text{gTBZ/ml}$, y 3 equinos (23.3%) una LD50 >0.15 $\mu\text{gTBZ/ml}$, Después del tratamiento, 8 equinos (88.9%) obtuvieron una LD50 >0.15 $\mu\text{gTBZ/ml}$ y 1 equino (11.1%) una LD50 $>0.1 \sim 0.15$ $\mu\text{gTBZ/ml}$. Ni antes y después del tratamiento se obtuvieron LD50 inferiores a 0.1 $\mu\text{gTBZ/ml}$.

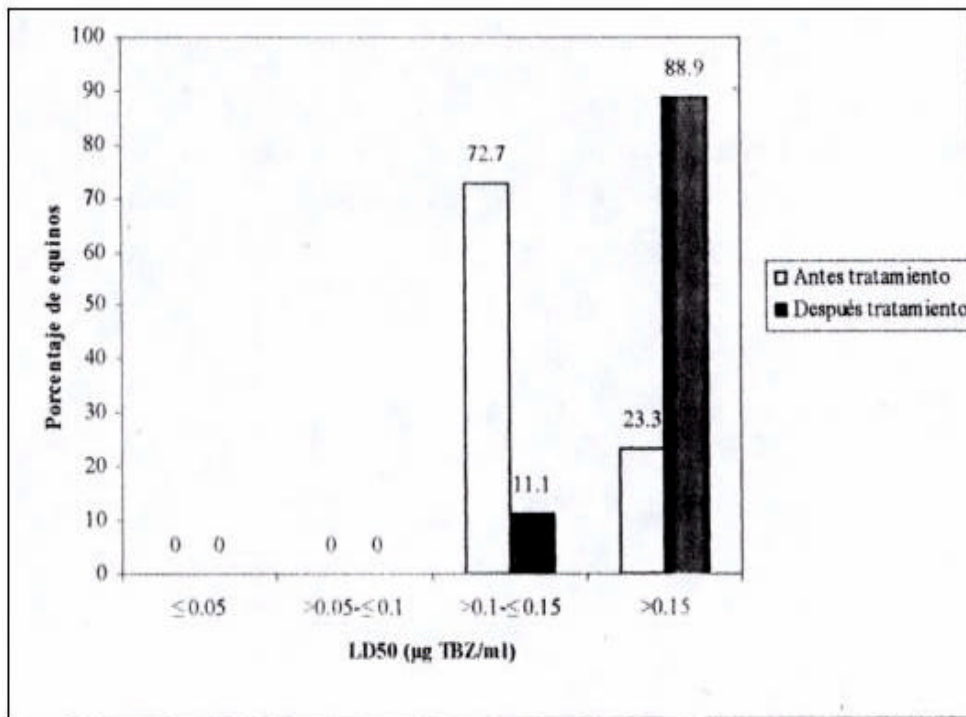


Gráfico 4: Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) en 11 equinos antes del tratamiento y 9 equinos después del tratamiento en el Criadero Militar "Riñihue".

- 2.1.3. Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes y después del tratamiento en el Criadero Militar "Riñihue" (Gráfico 5), determinado por Probit (Modelo de Respuesta a Dosis), con el fin de calcular la LD50 grupal. La media aritmética de LD50 obtenida por regresión lineal en Probit en el Criadero Militar Riñihue fue de 0.136 y 0.176 $\mu\text{gTBZ/ml}$, respectivamente, siendo la diferencia entre ambas estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

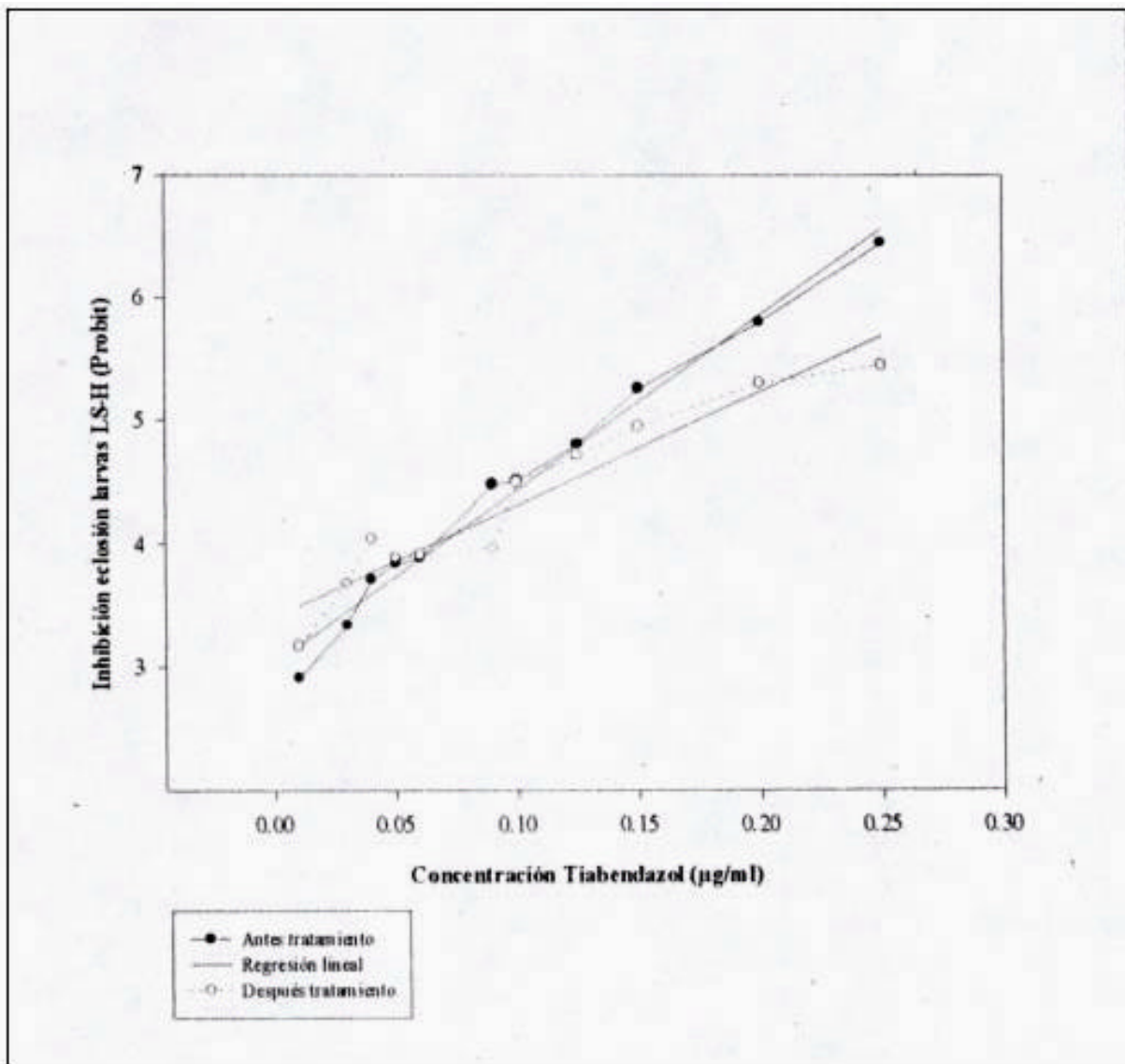


Gráfico 5: Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes y después del tratamiento en el Criadero Militar "Riñihue", determinado por Probit.

2.2. Criadero "Las Encinas":

2.2.1. LD50 individuales de los 14 equinos muestreados del Criadero "Las Encinas" (Tabla 5). En promedio se determinó que antes del tratamiento con Fenbendazol la LD50 fue 0.073 $\mu\text{gTBZ/ml}$ y después del tratamiento 0.127 $\mu\text{gTBZ/ml}$.

Tabla 5

Dosis (expresada en $\mu\text{gTBZ/ml}$) que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) antes y después de un tratamiento con Fenbendazol en 14 equinos del Criadero "Las Encinas".

Equinos	LD 50 ($\mu\text{g TBZ/ml}$) antes tratamiento	LD 50 ($\mu\text{g TBZ/ml}$) después tratamiento
E1	0.048	*
E2	0.065	*
E3	0.030	*
E4	0.053	*
E5	0.066	*
E6	0.054	*
E7	0.123	*
E8	0.073	*
E9	0.088	0.068
E10	0.102	0.152
E11	0.060	*
E12	0.094	0.142
E13	0.094	*
E14	0.067	0.146
Media	0.073	0.127
Desv. estándar	± 0.025	± 0.040

* No se realizó prueba de eclosión de huevos por recuentos inferiores a 150 hpg.

2.2.2. Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) en 14 equinos antes del tratamiento y 4 equinos después del tratamiento del Criadero "Las Encinas" (Gráfico 6). Antes del tratamiento, 10 equinos (71.4%) obtuvieron valores de LD50 $>0.05-0.1 \mu\text{gTBZ/ml}$, 2 equinos (14.3%) una LD50 $=0.05 \mu\text{gTBZ/ml}$ y 2 equinos (14.3%) una LD50 $>0.1-0.15 \mu\text{gTBZ/ml}$. Después del tratamiento, 2 equinos (50%) obtuvieron valores de LD50 $>0.1-0.15 \mu\text{gTBZ/ml}$, 1 equino (25%) obtuvo una LD50 $>0.15 \mu\text{gTBZ/ml}$ y 1 equino (25%) una LD50 $>0.05-0.1 \mu\text{gTBZ/ml}$.

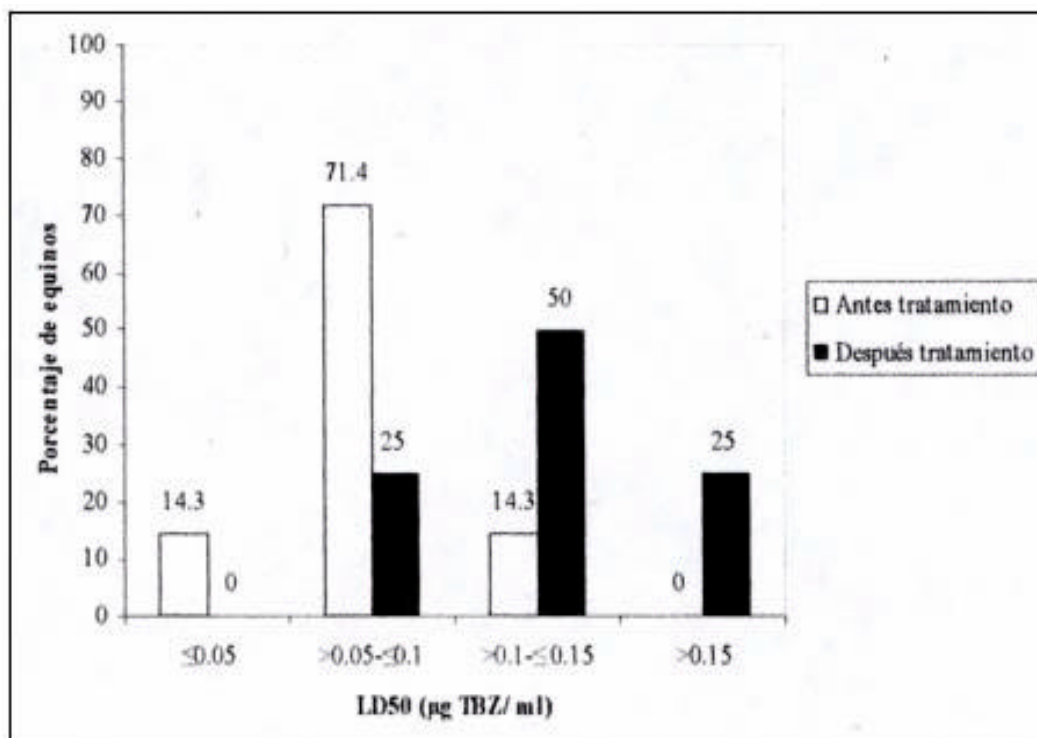


Gráfico 6: Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) de 14 equinos antes y 4 después del tratamiento del Criadero "Las Encinas".

2.2.3. Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes y después del tratamiento en el Criadero "Las Encinas" (Gráfico 7), determinado en Probit (modelo de respuesta a dosis), con el fin de calcular la LD50 grupal. La media aritmética de LD50 obtenida por regresión lineal en Probit en el Criadero Las Encinas fue respectivamente de 0.073 y 0.127 $\mu\text{gTBZ/ml}$, siendo la diferencia entre ambas estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

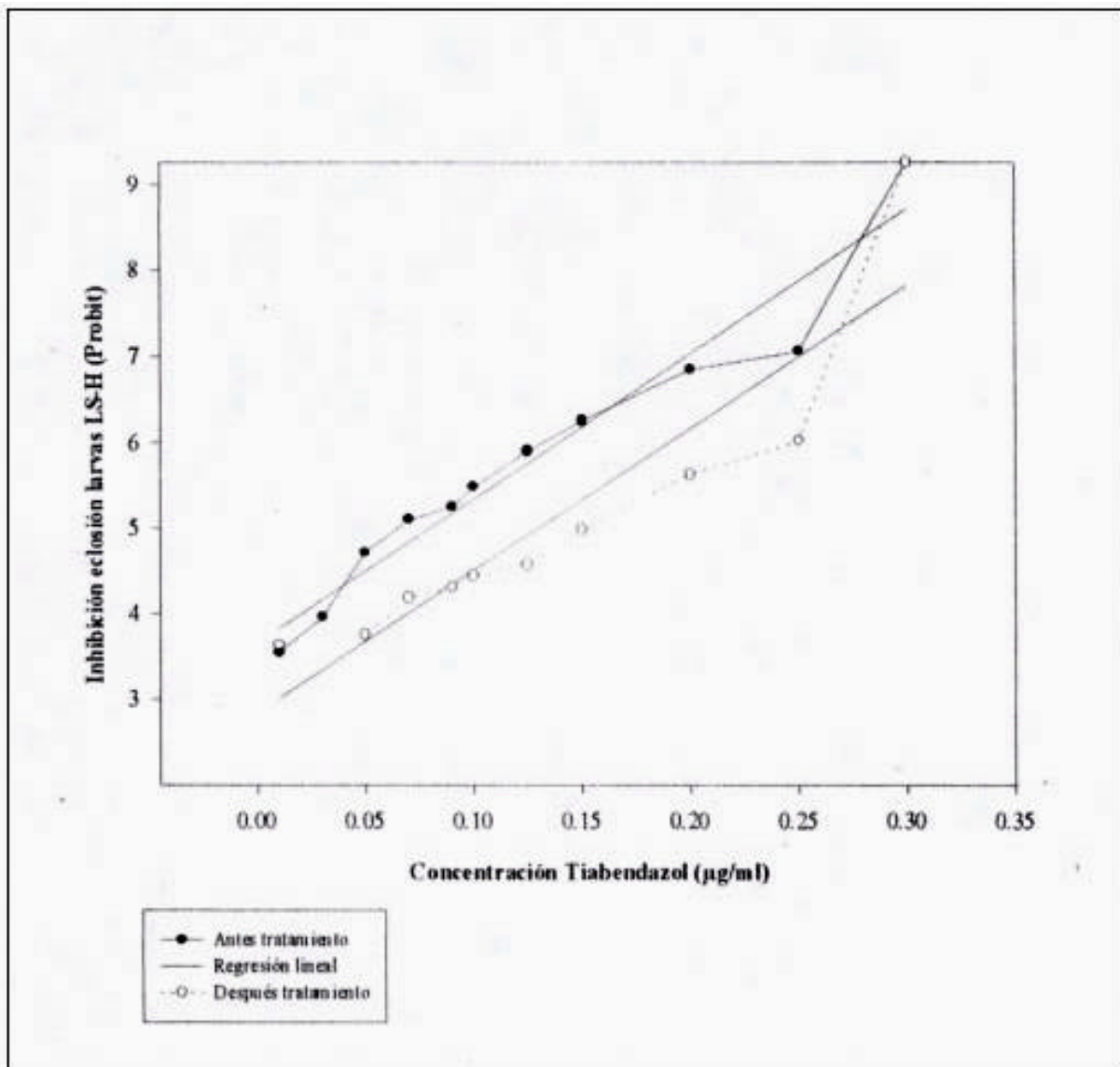


Gráfico 7: Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes y después del tratamiento en el Criadero Las Encinas, determinado en Probit.

2.3. Grupo de Formación Policial:

2.3.1, LD50 individuales de los 7 equinos maestreados del Grupo de Formación Policial (Tabla 6). En promedio se determinó que antes del tratamiento con Fenbendazol la LD50 fue 0.058 $\mu\text{gTBZ/ml}$ y después del tratamiento no se realizó calculo de la LD50, por bajo recuento de huevos (< 150 hpg).

Tabla 6

Dosis (expresada en $\mu\text{gTBZ/ml}$) que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) antes de un tratamiento con Fenbendazol en 7 equinos del "Grupo Formación Policial".

Prueba	LD 50 ($\mu\text{gTBZ/ml}$) antes tratamiento	LD 50 ($\mu\text{gTBZ/ml}$) después tratamiento
FP1	0.046	*
FP2	0.053	*
FP3	0.063	*
FP4	0.096	*
FP5	0.024	*
FP6	0.066	*
FP7	0.055	*
Media	0.058	
Desv.	± 0.022	

* No se realizó prueba de eclosión de huevos por recuentos inferiores a 150 hpg.

- 2.3.2. Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) antes del tratamiento en 7 equinos del "Grupo de Formación Policial" (Gráfico 8). Antes del tratamiento, 5 equinos (71.4%) obtuvieron valores de LD50 de >0.05 - $= 0.1$ $\mu\text{gTBZ/ml}$, y 2 equinos (28.6%) una LD50 <0.05 $\mu\text{gTBZ/ml}$. No se obtuvieron valores de LD50 superior a 0.1 $\mu\text{gTBZ/ml}$.

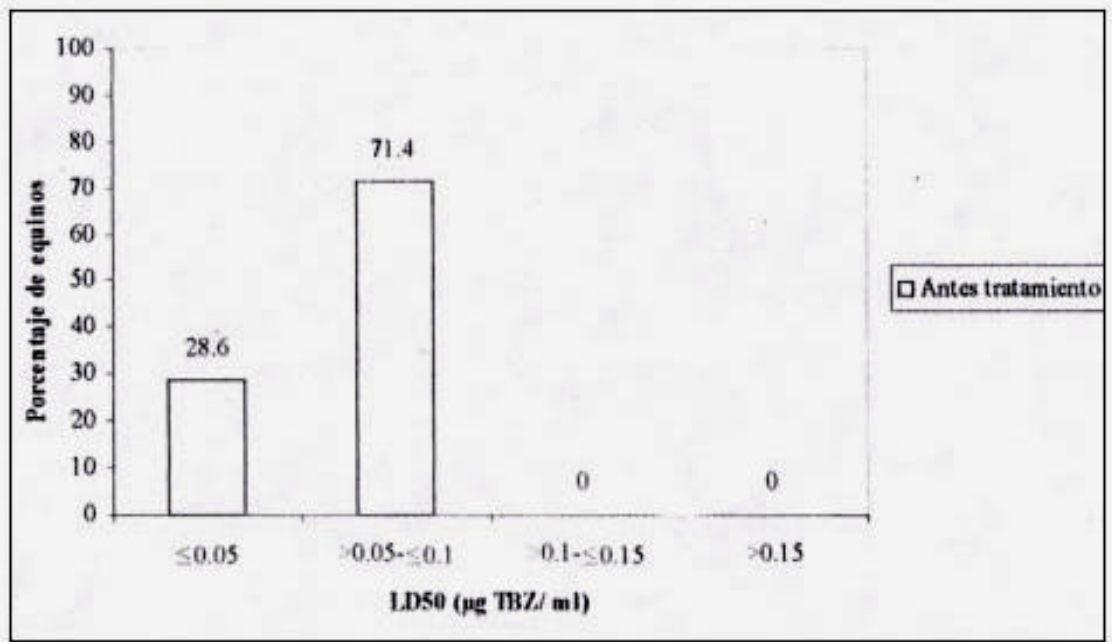


Gráfico 8: Distribución porcentual de la dosis que inhibe la eclosión de las larvas en un 50% (LD50) antes del tratamiento en 7 equinos del "Grupo de Formación Policial".

- 2.3.3. Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes del tratamiento en equinos del "Grupo de Formación Policial" (Gráfico 9), determinado en Probit (modelo de respuesta a dosis), con el fin de calcular la LD50 grupal. La media aritmética de LD50 obtenida por regresión lineal en Probit en el Grupo Formación policial fue de 0.058 ($\mu\text{gTBZ/ml}$).

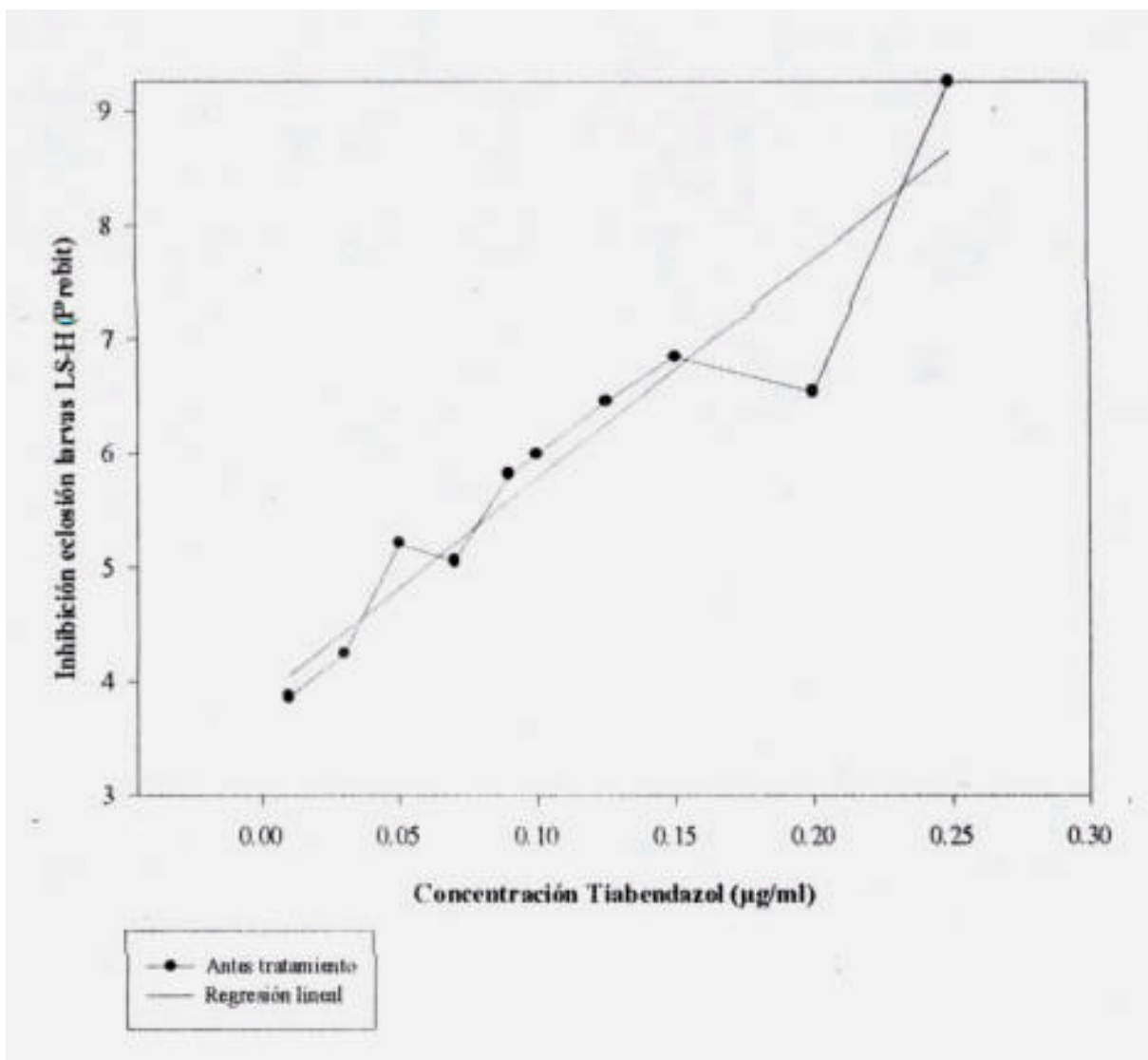


Gráfico 9: Promedio de inhibición de la eclosión de larvas (LS-H) a diferentes concentraciones de Tiabendazol antes del tratamiento en equinos del Grupo de Formación Policial, determinado en Probit.

6. DISCUSION

Coles y col. (1992) proponen para la prueba de reducción de la oviposición (FECRT), que un porcentaje de reducción inferior al 90% es indicativo de la presencia de resistencia antihelmíntica de los parásitos involucrados, mientras que para la prueba de eclosión de huevos (EHA), utilizada por Ullrich (1987) y Craven y col. (1999) determinan la presencia de cepas de nemátodos estrogilidos del equino resistentes a todos los derivados del bencimidazol cuando la concentración Tiabendazol que inhibe el 50% de la eclosión de las larvas (LD50) es superior a los 0,10 $\mu\text{g/ml}$. Esto concuerda con las proposiciones de la Asociación Mundial para el Desarrollo de la Parasitología Veterinaria (WAAVP).

De acuerdo con lo anterior, se determinó resistencia antihelmíntica, por medio de la prueba de reducción de la oviposición "FECRT" en el Criadero Militar Riñihue y el Criadero Las Encinas, porque los porcentajes de reducción de la oviposición después del tratamiento con 7.5 mg/kg de Fenbendazol fueron 28.1 y 87.3%, respectivamente (Tablas 1 y 2). En los equinos muestreados del Grupo de Formación Policial se observó un 94,7% de reducción de la oviposición (Tabla 3), con lo que es posible declarar que en dicho plantel existen cepas susceptibles de nemátodos estrogilidos a los antiparasitarios derivados del bencimidazol. Sin embargo, la baja oviposición detectada no significa la ausencia de nemátodos resistentes y, que de usarse frecuentemente productos con bencimidazol, se podría iniciar el rápido desarrollo de cepas resistentes, pero que al momento de realizar la prueba, no fueron detectados (Graven y col, 1999). Por ello, el Grupo de Formación Policial puede declararse como con una población importante de nemátodos susceptible a los bencimidazoles. A pesar de que Young y col. (1999) afirman que para declarar susceptible una población de nemátodos es necesario obtener un porcentaje de reducción de la oviposición superior al 95% y Campos y col. (1995) establece que debe ser del 100%, por que los bencimidazoles seleccionan rápidamente las cepas de nemátodos resistentes.

La prueba FECRT indicó la presencia de cepas de nemátodos muy resistentes a los bencimidazoles en el Criadero Militar Riñihue, lo cual es explicable porque el control de los nemátodos se ha realizado, según recomendación de Sievers y col. (1983), durante dos decenios casi exclusivamente mediante la administración de bencimidazoles a todos los animales del plantel. Según la misma prueba el Criadero Las Encinas, es un plantel en que existe una población de nemátodos estrogilidos con una resistencia moderada a los bencimidazoles, debido a que en dicho criadero sólo se han dosificado esporádicamente con bencimidazoles. El Grupo de Formación Policial es el plantel que presenta la menor presencia de cepas resistentes, ello por que los animales pasan el mayor tiempo estabulados.

Por medio de la prueba de eclosión de huevos, EHA, se determinó resistencia antihelmíntica antes y después del tratamiento solamente en el Criadero Militar Riñihue. La LD50 antes del tratamiento se determinó a una concentración de 0.136 $\mu\text{gTBZ/ml}$, mientras que después del tratamiento la LD50 fue de 0.176 $\mu\text{gTBZ/ml}$ (Tabla 4), lo que indica una nueva selección de los parásitos resistentes. En el Criadero Las Encinas, se determinó resistencia

solamente después del tratamiento con una LD50 de 0.127 $\mu\text{gTBZ/ml}$ (Tabla 5), indicando con ello que se produce un aumento y selección de cepas de nemátodos estrogilidos cada vez que se aplica un tratamiento con cualquier derivado de los bencimidazoles (Graven y col, 1999). Este aumento que es más visible gráficamente (Gráfico 7) al comparar las regresiones lineales obtenidas antes y después del tratamiento con Fenbendazol.

Después del tratamiento con Fenbendazol, los grupos tratados experimentaron un aumento en la LD50, excepto en dos equinos (R5 y E9) del Criadero Riñihue y Las Encinas, respectivamente (Tablas 4 y 5). Estos presentaron una disminución en la LD50 después del tratamiento. Esa disparidad también es observada por Borgsteede y Coweenbeerg (1987) y explican que la LD50 aumenta y decrece en el tiempo, manteniendo un curso irregular, produciendo disminuciones en algunos animales cuando en la mayoría aumenta. En cambio, Varady y col. (1995) observaron que siempre se presenta un aumento de la LD50 no pudiendo determinar su causa.

Al comparar las pruebas FECRT y EHA en relación a las proporciones de equinos detectados con presencia de cepas resistentes se determinó lo siguiente en los tres planteles estudiados:

En el Criadero Militar Riñihue, la proporción de equinos detectados resistentes por FECRT (< al 90%) fue el 100% (Gráfico 1) Sin embargo cabe destacar que el 63.6% de ellos presentó una reducción la oviposición inferior al 40% después del tratamiento. La proporción de equinos detectados resistentes (LD50 >0.1 $\mu\text{gTBZ/ml}$) por EHA (Gráfico 4) fue del 100% antes y después del tratamiento. En el Criadero Militar Riñihue, con ambas pruebas se detectó la misma proporción de equinos con cepas de nemátodos resistentes (100%); esta similitud entre los resultados de ambas pruebas puede deberse a que probablemente la frecuencia genes resistentes (RR) en la población de nemátodos es mayor al 25% (Martin y col, 1989). Maingi y col. (1998) también estiman que sobre esta frecuencia de genes resistentes ambas pruebas funcionan muy bien para detectar la presencia o ausencia de cepas resistentes.

En el Criadero Las Encinas, por medio de la prueba FECRT, se determinó un 42.9% de animales con porcentajes de reducción inferiores al 90% después del tratamiento (Gráfico 2) sin poderse determinar la magnitud de esta resistencia. Mediante la prueba EHA (Gráfico 6), la proporción de cepas resistentes (LD50 >0.1 $\mu\text{gTBZ/ml}$), fue de un 14.3% antes del tratamiento y 75% después del tratamiento. Uno de los factores que influyó para declarar presencia de cepas de nemátodos resistentes fue el hecho de que un 21.5% presentó reducciones de huevos inferiores al 80%. En cambio mediante la prueba EHA se determinó una baja proporción de equinos con cepas resistentes antes del tratamiento y una alta proporción después del tratamiento. Sin embargo, FECRT y EHA detectaron el mismo nivel de resistencia y calificaron a la población de nemátodos estrogilidos como de moderada resistencia. Solamente la prueba EHA puede discriminar entre resistencia o susceptibilidad al bencimidazol y ofrece datos más cuantitativos para estimar su nivel (Johansen, 1989).

En el Grupo de Formación Policial la proporción de equinos detectados resistentes por medio de la prueba FECRT fue un 28.6% (Gráfico 3). Mediante la prueba EHA en cambio, no

detectó equinos con cepas resistentes antes del tratamiento (Gráfico 8). De acuerdo a las indicaciones de Coles y col (1992), con el fin de estandarizar la prueba no se realizó la prueba después del tratamiento por encontrar sólo recuentos inferiores a 150 hpg. Si bien mediante la prueba FECRT se detectó un porcentaje bajo de animales con cepas resistentes, ambas pruebas indican presencia de cepas susceptibles, pero que frente al contacto frecuente con bencimidazoles es posible la selección de cepas resistentes (Graven y col., 1999).

Tanto la prueba FECRT y EHA pudieron determinar el grado de resistencia de los grupos estudiados, observándose entre ambas pruebas, correlaciones positivas. Sin embargo, solamente EHA pudo determinar la magnitud de esa resistencia otorgando un valor más cuantitativo del tipo de resistencia detectada. Esta relación de las pruebas esta descrita por Maingi y col (1998), Graven y col. (1999) y Varady y Gorba (1999) para diferentes especies de animales. Sin embargo, la prueba FECRT, si bien es menos específica, que la prueba EHA, es de menor costo y más fácil de realizar y, por ello, es una buena herramienta para detectar resistencia antihelmíntica cuando no se dispone de los medios para realizar la prueba EHA (Maingi y col, 1998; Love y col, 1999). Un porcentaje de eclosión inferior al 79% es usado por Young y col. (1999) para declarar una población de nemátodos como muy resistente a bencimidazoles. Este índice permite evaluar en grado diferente el plantel que realmente presenta cepas de nemátodos con alta resistencia, con el fin de utilizar eficientemente medidas de control para retardar el progreso de la formación de resistencia.

La prueba de eclosión de huevos (EHA) sería más fácil de interpretar si se especificara una dosis exacta de concentración de TBZ para indicar la presencia de cepas resistentes. Principio que utilizaron Ullrich (1987) y Ullrich y Bauer (1988), que fijaron una concentración de TBZ de 0.15 mg/ml (0.75 μ M), como el nivel para declarar resistencia.

Un estudio realizado por von Witzendorff (2001) en el Criadero Militar Riñihue y Criadero Las Encinas, obtuvo porcentajes de reducción de la oviposición de 26.5 y 83.9% respectivamente, demostrándose también resistencia antihelmíntica mediante FECRT. Mediante la prueba EHA, también detectó presencia de cepas resistentes antes del tratamiento en el Criadero Militar Riñihue (0.141 μ gTBZ/ml) y después del tratamiento en los planteles de Riñihue y Las Encinas (LD50- 0.149 y 0.158 (μ gTBZ/ml, respectivamente). Obteniendo los mismos resultados de este estudio.

El presente trabajo corrobora mediante dos pruebas la presencia de resistencia de los nemátodos del equino a los bencimidazoles. Los mayores niveles de resistencia se presentaron en los criaderos "Riñihue" y "Las Encinas". Debe destacarse que se pudo determinar que la resistencia se presenta tanto en los grandes como en los pequeños estróngilos, demostrado que la resistencia frente a los bencimidazoles es un problema serio para la crianza de equinos en Chile. La resistencia antihelmíntica debería ser tenida en cuenta tanto por los productores, la industria farmacéutica así como por Médicos Veterinarios que trabajan en la especialidad, con el fin de implementar medidas de control que impida o demore la selección de cepas de nemátodos resistentes y evitar que el problema se haga extensivo a otros grupos de fármacos antihelmínticos. Además, es recomendable determinar resistencia antihelmíntica en otras especies domésticas, considerando de que es un problema poco conocido en Chile.

Conclusiones:

- a) En el sur de Chile hay presencia de cepas de nemátodos estrogilidos del equino resistentes a los fármacos derivados de los bencimidazoles.
- b) Para determinar resistencia antihelmíntica en un plantel de equinos es más económica y expedita la prueba FECRT tomando la 1ª muestra el día del tratamiento y la 2ª una semana más tarde.
- c) Para la realización de la prueba EHA se recomienda determinar la LD50 a las muestras obtenidas una semana después del tratamiento.

7. BIBLIOGRAFIA

- BALICKA-RAMISZ, A., J. MALECKI K. SUPERA. 1997. Benzimidazol resistance in nematode parasites in domesticated animals in North-West part Poland. *Magazyn Weterynaryjny* 6: 442-443.
- BASS, C.C. 1910. The diagnosis of hookworm infection with special reference to the examination of faeces for eggs of intestinal parasites. *Arch. Diag.* 3: 231-236.
- BAUER, C., J.C. MERKT, G. JAKE-GRIMM, H. J. BÜRGER. 1986. Prevalence and control of benzimidazole-resistance small strongyles on Germany thoroughbred studs. *Vet. Parasitol.* 21: 189-203.
- BJORN, H., C. SOMMER, H. SCHOUGARD, P. NANSEN 1991. Resistance to benzimidazole anthelmintics in small strongyles (C yathostominae) of horses in Denmark. *Acta Vet. Scan.* 32: 253-260.
- BORGSTEEDE, F.H.M., T. COWEENBERG. 1987. Changes in LC50 and in vitro egg development assay during the patent period of *Haemonchus contortus*. *Res.Vet. Sci.* 42: 413-414.
- BORGSTEEDE, F.H.M., G.M. DVOJNOS, V.A. KHARCHENKO. 1997. Benzimidazole resistance in cyathostomes in horse in the Ukraine. *Vet. Parasitol.* 68: 113-117.
- CAMPOS, R. 1990. Resistencia antihelmíntica en nemátodos gastroentéricos de los rumiantes domésticos. Tópicos de Parasitología animal: Helmintología I. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- CAMPOS, R., E. LIMON, M SAENZ, 1995. Efectividad en ovinos del Albendazol y Oxfendazol administrados solos o combinados contra nemátodos resistentes y susceptible al Tiabendazol. *Téc. Pec. Mex.* 29: 9.
- COLES, G.C. 1990. Recent advances in laboratory models for evaluation of helminth chemotherapy. *Br. Vet. J.* 146: 113-119.
- COLES, G.C., C. BAUNER, FILM. BORGSTEEDE, T.R. KLEI, M.A. TAYLOR, P.J. WALLER. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44: 35-44.
- GRAVEN, J., H. BJORN, E.H. BARNES, S.A. HENRIKSEN, P. NANSEN. 1999. A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. *Vet. Parasitol.* 85: 49-59.

- CONDOR, G.A., W.C. CAMPHEL. 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Adv. Parasitol.* 35: 1-84.
- DUNCAN, J.L., J.H. ARUNDEL, J.H. DRUDGE, A. MALCZEWSKI, J.O.D. SLOCOMBE. 1988. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 30: 57-72.
- EAGLESON, J.S., J.Y. BOWIE. 1986. Oxfendazole resistance in *Trichostrongylus axei* in cattle in Australia. *Vet. Rec.* 119: 604-610.
- ELARD, L., J. CABARET, J.F. HUMBERT. 1999. PCR diagnostic of benzimidazole-susceptibility or resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.* 80: 231-237.
- FISHER, M.A., D.E. JACOBS, W.T.R. GRIMSHA, W.L.M. GIBBONS. 1992. Prevalence of benzimidazole-resistance in equine cyathostome populations in southeast England. *Vet Rec.* 130:315-31.
- HAZELBY, C.A., A.J. PROBERT. 1994. Anthelmintic resistance in nematodes causing parasitic gastroenteritis of sheep in the UK. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17: 245-252.
- HUBERT, J., D. KERBOEUF. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130: 442-446.
- HUNT, K.R., M.A.. TAYLOR. 1989. Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Vet. Rec.* 125: 153-154.
- HERD, R.P. 1993. Control strategies for ruminant and equine parasites to counter resistance, encystment, and cototoxicity in the USA. *Vet. Parasitol.* 48: 327-336.
- IHLER, C.F. 1995. Use of two in vitro methods in the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma spp.*). *Vet. Parasitol.* 65: 117-125.
- IHLER, C.F., H. BJORN. 1996. Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma spp.*). *Vet. Parasitol.* 65: 117-125.
- JACKSON, R.A., K. TOWNSEND, C. PYKE, D. LANCE. 1987. Isolation of oxfendazole resistant *Cooperia oncophora* in cattle. *N. Z. vet J.* 35: 187-189.
- JOHANSEN, M.V. 1989. An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Vet. Res. Comm.* 13: 455-466.

- KELLY, J.D., J.H. WEBSTER, D.L. GRIFFIN, H.V. WHITLOCK, I.C.A. MARTIN, M. GUNAWAN. 1981. Resistance to benzimidazole anthelmintics in equine strongyles. Frequency, geographical distribution and relationship between occurrence, animal husbandry procedures and anthelmintic usage. *Aust. Vet. J.* 7: 163-171.
- LACEY, E., J.M. REDWIN, J.H. GILL, V.M. DEMARGHERITI, P.J. WALLER. 1990. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. *N.Z. vet. J.* 177-184.
- LE JAMBRE, L.F. 1976. Egg hatch as in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 2: 385-391.
- LOVE, S., D. MURPHY, D. MELLOR. 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Vet. Parasitol* 85: 113-122.
- MAINGI, N., H. BJORN, S. THAMSBORG, H BORGH, P. NANSEN. 1996. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Denmark. *Small. Rum. Res.* 23: 171-181.
- MAINGI, N., H. BJORN, V.M. GICHOCHI, W.K. MUNYUA, J.M. GATHUMA. 1998. Resistance to benzimidazoles and levamisole in nematode parasites of sheep in Nyandarua district of Kenya. *Acta Tropica* 69: 31-40.
- MARTIN, P.J. 1987. Development and control of resistance to anthelmintic, *Int. J. Parasitol.* 17: 493.
- MARTIN, P.J., N. ANDERSON, R.G. JARRETT. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction test and in vitro assays. *Aust. Vet. J.* 66: 236-240.
- MCKENNA, P.B. 1987. The estimation of gastrointestinal strongyle worm burdens in young sheep flocks: a new approach to the interpretation of faecal egg counts. *I. Development N. Z. vet. J.* 35: 94-97.
- MCKENNA, P.B, 1990. The detection of anthelmintic resistance by faecal egg count reduction test: an examination of some of factors affecting performance and interpretation. *N. Z. vet. J.* 38: 142-147.
- MCKENNA, P.B. 1996. Potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. *N. Z. Vet. J.* 44: 73-75.
- NILSSON, O., A. LINDHOLM, D. CHRISTENSSON. 1989. A field evaluation of anthelmintic in horses in Sweden. *Vet. Parasitol.* 32: 163-171.
- PEREIRA, C.M., I. KOHEK, R. CAMPOS, S.B. LIMA, R. FOZ. 1991. A field evaluation of anthelmintics for control of cyathostomes of horses in Brazil. *Vet. Parasitol.* 38: 121-129.

- PICHARD, R. 1997. Application of molecular biology in Veterinary Parasitology. *Vet. Parasitol.* 155-175.
- PRICHARD, R.K., C.A..HALL, J.D. KELLY, I.C.A. MARTIN, A.D. DONALD. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56: 239.
- PRESIDENT, J.A.P. 1985. Methods for detection of resistance to anthelmintics. Resistance in nematodes to anthelmintic drugs. Division of Animal Health Australian Wool Corporation, Australia.
- RAIZMAN, E. 1997. Estudio comparativo de la efectividad de Febantel, Ivermectina y Doramectina frente a los nemátodos del equino. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SAENZ, M., R. CAMPOS, G. IBARRA, M. ZAPATA, G. LIZARRAGA. 1991. Diagnóstico *in-vitro* de una población de *Haemonchus contortus* de caprinos resistentes a Tiabendazol. *Téc. Pec. Méx.* 29: 3-7.,
- SANGSTER, N.C. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins?. *Vet. Parasitol.* 85: 189-204.
- SCHMIDT, U. 1971. Parasitologische Kotuntersuchung durch ein neues Verdünnungsverfahren. *Tierärztl Umsch.* 26: 229-230.
- SMTTH-BUIJS, C.M.C., F.H.M. BORGSTEEDE. 1986. Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* eggs on the results of an in vitro egg development assay to test anthelmintic resistance. *Res. Vet. Sci.* 40: 4-7.
- SIEVERS, G., I. TERREZZA, J. NUÑEZ, I. QUINTANA. 1983. Anwendung des Antihelminthikums Fenbendazol (Panacur-Paste) in einem Gestüt, *Der prakt. Tierarzt* 64: 494-502.
- THOMAS, R.J. 1982. The ecological basis of parasite control: nematodes. *Vet. Parasitol.* 11:9.
- ULLRICH, D. 1987. Verbreitung benzimidazol-resistenter Strongyliden in Nordrhein-Westfalen. Tesis. Doctorado. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- ULLRICH, D., C. BAUER. 1988. Benzimidazolresistenz bei kleinen Strongyliden (Cyathostominae): Verbreitung in Pferdebeständen Nordrhein-Westfalens. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101: 406-408.
- VARADY, M., J. PRASLICKA, J. CORBA. 1995. Changes of ED50 in vitro egg hatch assay for detection of benzimidazole and levamisole resistance of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in lambs. *Helminthologia* 32: 219-223.

VARADY, M., J. CORBA. 1999. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazol and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet. Parasitol.* 80: 239-249.

VON WITZENDORFF, C. 2001. Untersuchungen zur Benzimidazolresistenz bei kleinen Strongyliden der Pferde in Chile. Tesis. Diplomado, Tierärztliche Hochschule, Hannover.

WALLER, P.J., F. ECHEVERRIA, C. EDDI, S. MACIEL, A. NARI, J. HANSEN. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America. *Vet. Parasitol.* 62: 181-187.

WHITLOCK, H.V., J.D. KELLY, C.J. PORTER, D.L. GRIFFIN, I.C.A. MARTIN. 1980. In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet. Parasitol.* 7:215-232.

YOUNG, K., V. GARZA, K. SNOWDEN, R.J. DOBSON, D. POWELL , T.M. CRAIG. 1999. Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Vet. Parasitol.* 85: 205-214.

Agradecimientos

Dr. Gerold Sievers, por todo su apoyo, disposición y amistad dada en la elaboración de esta tesis.

Srta. Carola von Witzendorff, por toda su colaboración en esta tesis.

Prof. Dr. Tomas Schnieder, del Institut für Parasitologie de la Tierärztliche Hochschule Hannover.

Dr. Arturo Escobar.

Dr. Gastón Valenzuela.

Sra. Ivette Quintana.

Sr. Belisario Monsalve.

Y en forma muy especial a todos aquellos que participaron en alguna forma en la elaboración de está tesis .