

Series:
Comunicaciones Técnicas
ISSN 1667-4006

COMUNICACIÓN TÉCNICA
ÁREA PRODUCCIÓN ANIMAL N° 773

Resistencia de *Fasciola hepatica* al
Triclabendazol: primer reporte en ovinos de
la provincia de Santa Cruz, Patagonia
Argentina

Marcela Larroza, Marcelo Aguilar, Paula Soler, Julio Mora, Martín Roa, Raúl
Cabrera, Juan P. Martinez Stanziola, Laura Ceballos, Luis I. Alvarez

2023

Estación Experimental Agropecuaria Bariloche.
"Dr. Grenville Morris"
eeabariloche.cd@inta.gob.ar

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria
Argentina



Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol: primer reporte en ovinos de la provincia de Santa Cruz, Patagonia Argentina

Marcela Larroza^a, Marcelo Aguilar^b, Paula Soler^a, Julio Mora^c, Martín Roa^c, Raúl Cabrera^a, Juan P. Martinez Stanziola^d, Laura Ceballos^e, Luis I. Alvarez^e

^aGrupo de Salud Animal, Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Bariloche, Bariloche, Río Negro, Argentina.

^bAgencia de Extensión Rural INTA, San Julián, Santa Cruz, Argentina.

^cAgencia de Extensión Rural del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Los Antiguos, Santa Cruz, Argentina.

^dEstación Experimental Agropecuaria INTA Esquel, Chubut, Argentina.

^eLaboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

En el presente informe técnico se describen los principales resultados de los estudios de eficacia fasciolicida de antiparasitarios realizados en un establecimiento cercano a Los Antiguos, Santa Cruz, a partir de los cuales se confirmó la existencia de una cepa de *F. hepatica* resistente a triclabendazol. Los trabajos descriptos fueron realizados por el Grupo de Salud Animal de la EEA INTA Bariloche, las Agencia de Extensión Rural INTA San Julián y Los Antiguos, la EEA INTA Esquel, y el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN).

El trabajo completo se encuentra publicado en la revista **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 45. 100927.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2405939023000977>

Introducción

La fasciolosis, causada por el parásito del hígado *Fasciola hepatica*, genera considerables pérdidas en los sistemas de producción ganadero a nivel mundial. Sus efectos incluyen desde la enfermedad clínica, con altos niveles de mortalidad y morbilidad, hasta infecciones subclínicas de larga duración que reducen la productividad animal a través de efectos en el crecimiento, fertilidad y lactancia. En Argentina, la fasciolosis es particularmente importante en la región Patagónica, donde se ha reportado en la última década una prevalencia de aproximadamente 60% en ovinos y 70% en bovinos. Para el tratamiento de la fasciolosis, existe un número limitado de antiparasitarios disponibles, entre los cuales el triclabendazol (TCBZ) ha sido el de elección debido a su alta eficacia contra los parásitos adultos e inmaduros. La alta frecuencia de aplicación, sumada a la falta de rotación con otros principios activos, han sido factores importantes que contribuyeron al desarrollo de resistencia al TCBZ, reportada por primera vez en Argentina, en bovinos en la provincia de Neuquén en el año 2011, con subsiguientes reportes en Rio Negro y Chubut.

En el otoño de 2022, se sospechó de una falla terapéutica del TCBZ contra *F. hepatica* en un establecimiento productor de ovinos en la provincia de Santa Cruz. La sospecha se basó en la observación de ejemplares adultos de *F. hepatica* en hígados obtenidos de ovinos sacrificadas que habían sido tratados previamente con TCBZ. Considerando que nunca se había informado resistencia al TCBZ en *F. hepatica* en esta provincia, se llevó a cabo un ensayo clínico en ovinos para explorar esta posibilidad. En este estudio, nuestro objetivo fue evaluar la eficacia del TCBZ

y de otros compuestos antiparasitarios como el closantel (CLO) y el nitroxinil (NTX), mediante la prueba de reducción del conteo de huevos en materia fecal (TRCH) como un indicador indirecto de la aparición de resistencia a los antiparasitarios. Además, se evaluó la eficacia del albendazol (ABZ) mediante la prueba de eclosión de huevos *in vitro* (TEH).

Metodología

Ensayo a campo

El estudio se llevó a cabo entre mayo y junio de 2022, en un establecimiento cercano a la localidad de Los Antiguos, Santa Cruz (-47°21'45,17" S -71° 17'18,82" O). El establecimiento tiene una extensión de 20.800 hectáreas y un stock de 30.000 ovinos Merino.

Se realizaron análisis de materia fecal (técnica de sedimentación – filtración) en un lote de ochenta (80) ovinos Merino de entre 9 y 11 meses de edad, naturalmente parasitados con *F. hepática*. A partir de estos análisis, se determinó individualmente la cantidad de huevos de *F. hepática* por gramo de materia fecal (HPGFh), y para ser incluidos en el estudio se seleccionaron los sesenta y ocho (68) animales con conteos de más de 20 HPGFh.

Los 68 ovinos fueron caravaneados y pesados, luego se asignaron a cuatro grupos diferentes distribuidos homogéneamente según los conteos promedio de HPGFh, conformando así los siguientes grupos: **Grupo control (n:17)**, animales que no recibieron tratamiento antihelmíntico; **Grupo TCBZ (n:17)**, animales tratados con TCBZ (Biofasiolex T10®, TCBZ 10%, Biogenesis-Bagó, Argentina) por vía oral a una dosis de 12 mg/kg; **Grupo CLO (n:17)**, animales tratados con CLO (Galgosantel®, CLO 15%, Biogenesis-Bagó, Argentina) por vía oral a una dosis de 10 mg/kg; **Grupo NTX (n:17)**, animales tratados con NTX (Overxinil®, NTX 34%, Over, Argentina) por vía subcutánea a una dosis de 10 mg/kg.

Ensayos para determinar la eficacia de antiparasitarios

1. Prueba de reducción del conteo de huevos (TRCH)

Se recolectaron muestras de materia fecal, directamente del recto de cada animal previamente al tratamiento (día 0) y nuevamente el día 21 después del tratamiento.

Se utilizó la técnica de sedimentación-filtración para analizar las muestras y obtener el conteo de HPGFh. La eficacia del tratamiento se evaluó según la fórmula recomendada por la WAAVP (Coles et al., 1992):

$$TRCH (\%) = [(C - T) / C] \times 100$$

donde T es el conteo medio aritmético de HPGFh en el grupo tratado 21 días después del tratamiento, y C es el conteo medio aritmético de HPGFh en el grupo de control 21 días después del tratamiento. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% según lo descrito por Coles et al. (1992). Los HPGFh, expresados como medias aritméticas (\pm SD), se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el software InStat 3.0 (Graph Pad Software, CA, EE. UU.).

1.2 Prueba de eclosión de huevos in vitro (TEH)

Adicionalmente, se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de *F. hepatica* a ABZ mediante el TEH. Para ello, se aislaron huevos de *F. hepatica* a partir de muestras de materia fecal de ovinos del Grupo control, y se realizaron incubaciones en soluciones de trabajo de ABZ según la metodología descrita por Alvarez *et al.* (2021). Brevemente, las soluciones de trabajo de ABZ se prepararon disolviendo ABZ en metanol puro para alcanzar una concentración final de 50 μ M. Se incubaron

tubos con aproximadamente 200 huevos de *F. hepatica* en 1 mL de agua, a 25 °C en oscuridad durante un período de 12 horas con 10 µL de solución de ABZ (0.5 nmol/mL), la concentración recomendada para discriminar entre aislamientos resistentes y susceptibles a ABZ mediante el TEH (cinco réplicas). Los huevos de control se incubaron con 10 µL de metanol en 1 mL de agua (1%, v/v). Después de la incubación, todos los huevos se lavaron con agua para facilitar la eliminación de la droga y se mantuvieron en la oscuridad a 25 °C durante 15 días. Después de este período, los huevos se expusieron a la luz durante 2 horas para estimular la eclosión. Inmediatamente después, se agregó 0.1 mL de formalina tamponada al 10% a cada tubo para detener la eclosión, y se contabilizaron los huevos eclosionados y los no eclosionados en cada tubo.

La actividad ovicida de ABZ se estimó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad ovicida (\%)} = (\% \text{ de huevos eclosionados en el control} - \% \text{ de huevos eclosionados después de la incubación con el fármaco}) \div (\% \text{ de huevos eclosionados en el control}) \times 100$$

De acuerdo al protocolo utilizado, cuando la actividad ovicida es superior al 70% se considera que la población es susceptible a ABZ y cuando es inferior al 40%, se considera resistente a ABZ. El TEH fue realizado por duplicado en el Laboratorio de Parasitología, INTA Bariloche, Bariloche, Argentina, y en el Laboratorio de Farmacología, CIVETAN, Tandil, Argentina.

Resultados

Del lote de ochenta (80) ovinos, setenta y cuatro (74; 92.5%) resultaron positivos a la presencia de huevos de *F. hepatica*, y sesenta y ocho (68) tuvieron ≥ 20 HPGFh. La eficacia de TCBZ contra *F. hepatica* evaluada mediante el TRCH fue del 53.4%, lo que confirma la presencia de una cepa de *F. hepatica* resistente al TCBZ, comprobando además la alta efectividad fasciolicida de los compuestos de CLO y NTX en el establecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Eficacia de Triclabendazol (TCBZ), closantel (CLO) y nitroxinil (NTX) contra *Fasciola hepatica*, evaluada mediante la prueba de reducción del conteo de huevos (TRCH)

Tratamiento	HPGFh ¹ día 0	HPGFh ¹ día 21	Eficacia ²	Cepa
CONTROL	268.9 ^a	139.5 ^a	-	-
	(43-940)	(6-356)		
TCBZ	269.7 ^a	64.9 ^a	53.4 %	R
	(23-946)	(0-240)		
CLO	272.6 ^a	0 ^b	100%	S
	(21-830)	(0-0)		
NTX	274.2 ^a	0 ^b	100%	S
	(20-798)	(0-0)		

HPGFh¹: Recuento medio de huevos por gramo de materia fecal (rango) en el día 0 y el día 21 después del tratamiento y eficacia. Para cada grupo, diferentes superíndices indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el recuento de huevos de *F. hepatica* entre el día 0 y el día 21.

R: resistente; S: susceptible.

Resultados similares se obtuvieron mediante el TEH realizado en dos laboratorios diferentes (Bariloche y Tandil, Tabla 2). El porcentaje medio de eclosión de huevos obtenido varió entre 95.8 (Bariloche) y 96.5 % (Tandil) (Tabla 2), comprobando la susceptibilidad al ABZ de la cepa de *F. hepatica* evaluada.

Tabla 2. Porcentaje de huevos de *Fasciola hepatica* eclosionados (media \pm desviación estándar) y actividad ovcida (%) obtenidos después de la incubación con albendazol (ABZ) en los Laboratorios de Parasitología de Bariloche y Tandil

Laboratorio	Huevos eclosionados (%)		Actividad ovcida (%)	Cepa
	Control	ABZ (0.5 μ M)	ABZ (0.5 μ M)	
Bariloche	100 \pm 0	4.2 \pm 5.9	95.8	S
Tandil	92.2 \pm 3.6	3.2 \pm 1.3	96.5	S

R: resistente; S: susceptible.

Discusión

Aún en la actualidad existe una alta dependencia del uso de fármacos antihelmínticos para el control de parásitos, ya que son la opción más práctica y "fácil". Sin embargo, antes de utilizar un fármaco antiparasitario, incluidos los fasciolidas, es necesario saber si conservan su eficacia o si los animales están parasitados con parásitos resistentes. Por lo tanto, el diagnóstico preciso de la

resistencia a los fasciolicidas es esencial para su control efectivo, especialmente en el contexto actual de aumento de la prevalencia y difusión mundial de la resistencia al TCBZ en *F. hepatica*. Utilizando el TRCH, el método más utilizado a nivel mundial para la determinación de la eficacia y resistencia a los antiparasitarios, se confirmó la existencia de una cepa de *F. hepatica* resistente a TCZ en la provincia de Santa Cruz, Argentina. Ante presencia de poblaciones de parásitos susceptibles, se esperan reducciones del 90 al 95% o más en el conteo de huevos de *F. hepatica* a los 14-21 días después del tratamiento (normalmente 3 semanas después del tratamiento). En este caso, el historial extenso de tratamientos con TCBZ en el establecimiento estudiado explica, a priori, la selección de una población de *F. hepatica* resistente al TCBZ. Este historial incluye la implementación sistemática de 3-4 desparasitaciones anuales con TCBZ a todos los animales en los últimos 10 años. Por el contrario, el CLO y el NTX no se incluían rutinariamente en las prácticas sanitarias del establecimiento, lo que explica la alta eficacia observada para estos fármacos.

Ante el fracaso de un tratamiento antiparasitario, es importante identificar si se debe a la presencia de resistencia antihelmíntica o a otros factores, como una inadecuada administración del fármaco debido a jeringas y pistolas de dosificación defectuosas o mal reguladas, subdosificación debido a una estimación incorrecta del peso corporal, inadecuado almacenamiento y manejo de los productos, y/o la reducción de la calidad del fármaco. El uso más racional de los antihelmínticos (análisis coprológicos previos que justifiquen su uso, dosis exactas, tratamientos de baja frecuencia, rotación de drogas) y medidas de control integral, son necesarios para reducir la transmisión de parásitos, maximizar el bienestar animal y mitigar los impactos económicos del parasitismo.

El TEH realizado demostró una alta actividad ovicida del ABZ, confirmando que la cepa estudiada es susceptible al ABZ. Al igual que se describió para el CLO y el NTX, el ABZ no se utilizaba rutinariamente como antihelmíntico en el establecimiento, lo que explica la susceptibilidad observada. Además, se obtuvieron resultados similares después de la TEH cuando se realizó en dos laboratorios diferentes (Bariloche y Tandil), lo que indica la precisión interlaboratorio de la prueba y su confiabilidad.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por INTA a través de los Proyectos PD-I104 / PE-I002. Agradecemos la colaboración del encargado del establecimiento y la asistencia técnica del Vet. Mariano Marini.