

**EVALUACION FARMACO-PARASITOLOGICA DE LA VIA DE  
ADMINISTRACION SOBRE LA EFICACIA DE LA IVERMECTINA CONTRA  
NEMATODES GASTROINTESTINALES RESISTENTES DE LOS OVINOS**

**María Mercedes LLoberas**

**Trabajo de tesis para ser presentado como requisito para optar al título de  
MAGISTER SCIENTIAE EN SANIDAD ANIMAL**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS**

**Área de Producción y Sanidad Animal**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

**Balcarce, Argentina**

**Julio de 2011**

**EVALUACION FARMACO-PARASITOLOGICA DE LA VIA DE  
ADMINISTRACION SOBRE LA EFICACIA DE LA IVERMECTINA CONTRA  
NEMATODES GASTROINTESTINALES RESISTENTES DE LOS OVINOS**

**María Mercedes LLoberas**

.....

Dr. Adrián Luis Lifschitz

Director de Tesis

.....

Dr. Carlos Miguel Entrocasso

Co-Director de Tesis

.....

Dr. Luis Ignacio Álvarez

Co-Director de Tesis

EVALUACION FARMACO-PARASITOLOGICA DE LA VIA DE ADMINISTRACION  
SOBRE LA EFICACIA DE LA IVERMECTINA CONTRA NEMATODES  
GASTROINTESTINALES RESISTENTES DE LOS OVINOS

**María Mercedes LLoberas**

Aprobada por:

.....

Dr. Oscar Anziani

Evaluador

.....

Dr. Carlos Lanusse

Evaluador

.....

Dr. Pedro Steffan

Evaluador

## DEDICATORIA

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente:

- *a Adrián, Carlos e Ignacio, por darme la oportunidad, por su respeto y confianza y porque sin ellos esta tesis no hubiese sido posible.*
- *a mi familia, por acompañarme y saber esperar.*
- *al Negro, por estar siempre que lo necesité.*
- *al personal de la Reserva 8, Eduardo, Llamas y Sergio, por su buena predisposición permanente.*
- *a los integrantes del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Cs. Veterinarias UNICEN, principalmente a la Dra. Mariana Ballent por su colaboración, paciencia y afecto.*
- *a Claudia, Virginia y Juliana, por acompañarme de cerca.*
- *a todos los que de alguna u otra manera son parte de esta tesis. Gracias.*

## Índice de Contenidos

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Gastroenteritis parasitaria.....	2
1.2. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales ovinos.....	2
1.2.1. Ciclo biológico.....	2
1.2.2. Géneros implicados.....	4
1.2.3. Contaminación de las pasturas.....	7
1.2.3.1. Clima.....	8
1.2.3.2. Pasturas.....	9
1.3. Desarrollo en el interior del hospedador.....	10
1.3.1. Factores dependientes del parásito: hipobiosis larvaria.....	10
1.3.2. Factores dependientes del huésped: respuesta inmune.....	11
1.4. Control de las parasitosis gastrointestinales.....	12
1.4. 1. Control Farmacológico.....	12
1.4.1.1. Lactonas Macrocíclicas (LM).....	13
1.4.2. Control biológico.....	14
1.4.3. Resistencia Genética.....	15
1.4.4. Vacunas.....	15
1.4.5. Estrategias de Pastoreo.....	16
1.4.6. FAMACHA©.....	16
1.4.7. Dieta.....	16
1.4.8. Fitoterapia.....	17
1. 5. Resistencia antihelmíntica.....	18
1.5.1. Reversión.....	20

1.5.2. Diagnóstico de Resistencia.....	21
1.6. Marco teórico de la tesis, hipótesis y objetivos.....	22
1.6.1. Hipótesis general.....	23
1.6.1.1. Hipótesis particulares.....	23
1.6.2. Objetivos.....	23
1.6.2.1. Objetivo General.....	23
1.6.2.2. Objetivos específicos.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1. Antecedentes de Resistencia en el Campo Experimental – Reserva 8 de EEA INTA Balcarce.....	26
2.2. Lugar.....	27
2.3. Animales.....	27
2.4. Infestación.....	27
2.4.1. Infestación natural.....	27
2.4.2. Infestación artificial.....	27
2.4.2.1. Preparación del inóculo.....	28
2.5. Tratamientos.....	28
2.6. Determinaciones parasitológicas.....	29
2.6.1. Carga parasitaria de los animales.....	29
2.6.1.1. Análisis coprológicos.....	29
2.6.1.1.1. Recuento de huevos por gramo en materia fecal (hpg).....	29
2.6.1.1.2. Identificación de géneros en coprocultivos.....	29
2.6.2. Necropsias parasitarias.....	30
2.6.2.1. Recuperación de nematodos.....	30
2.6.2.2. Conteo e identificación de parásitos adultos.....	30
2.6.2.3. Interpretación de los datos.....	31

2.7. Determinaciones Farmacológicas.....	31
2.7.1. Estudio Farmacocinético.....	31
2.7.1.1. Preparación de estándares.....	31
2.7.1.2. Obtención de las muestras.....	31
2.7.1.3. Extracción físico-química y análisis cromatográfico.....	32
2.7.1.4. Cuantificación de concentraciones y validación de la metodología analítica.....	32
2.8. Análisis de datos.....	33
2.8.1. Análisis farmacocinético.....	33
2.8.2. Análisis estadístico.....	33
3. RESULTADOS.....	35
3.1. Carga parasitaria de los animales previa a la inoculación.....	36
3.2. Pesos y carga parasitaria inicial por grupos.....	36
3.3. Resultados de hpg y TRCH.....	37
3.4. Coprocultivos.....	39
3.5. Recuento de parásitos adultos en el abomaso y Test de Eficacia Controlada.....	40
3.5.1. Cuenta de parásitos adultos en el abomaso y Test Eficacia Controlada en abomaso .....	41
3.5.2. Recuento de parásitos adultos en el intestino y Test Eficacia Controlada en Intestino .....	42
3.5.3. Cuenta de parásitos adultos en el abomaso de los animales sacrificados al día 3 post tratamiento.....	45
3.6 Validación de métodos cromatográficos de IVM en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos .....	47
3.7. Cinética plasmática.....	51
3.8. Concentraciones de IVM en el tracto gastrointestinal y en H. contortus.....	55
4. DISCUSION.....	59
5. CONCLUSIONES.....	68



6. BIBLIOGRAFIA.....	71
7. APÉNDICE.....	81

## Índice de Tablas

TABLA 1: Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg) y peso vivo inicial (promedio y desvío estándar), en los animales del Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR.....	37
TABLA 2: Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg) y peso vivo inicial (promedio y desvío estándar), en los animales del Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR sacrificados a los 3 días post-tratamiento.....	37
TABLA 3: Comparación del hpg entre los diferentes grupos experimentales (Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR) y en los 3 tiempos de muestreo.....	38
TABLA 4: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 3 post-tratamiento.....	39
TABLA 5: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 9 post-tratamiento.....	39
TABLA 6: Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 15 post-tratamiento.....	40
TABLA 7: Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacias para cada grupo (Control, SC e IR) en la suma total de parásitos del tracto gastrointestinal.....	40
TABLA 8: Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del abomaso y en cada uno de los géneros presentes hallados al día 15 post-tratamiento.....	40
TABLA 9: Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino al día 15 post-tratamiento.....	42
TABLA 10: Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino delgado y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	44
TABLA 11: Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino grueso y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento.....	45
TABLA 12: Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar, para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos al día 3 post-tratamiento.....	46

TABLA 13: Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del abomaso y en cada uno de los géneros presentes al día 3 post-tratamiento. ....	46
TABLA 14: Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes hallados al día 3 post-tratamiento.....	47
TABLA 15: Resumen de los diferentes parámetros de validación obtenidos para las metodologías de extracción y análisis por HPLC de ivermectina en diferentes matrices biológicas.....	48
TABLA 16: Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración subcutánea (SC) e intraruminal (IR) de ivermectina (IVM) a ovinos a razón de 0.2 mg/kg.....	55

## Índice de Figuras

FIGURA 1: Corridas cromatográficas típicas de IVM obtenidas luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas..	49
FIGURA 2: Curva de calibración obtenida para IVM en plasma.....	50
FIGURA 3: Curva de calibración obtenida para IVM en mucosas mucosas gastrointestinales.....	51
FIGURA 4: Perfil de concentraciones plasmáticas promedios ( $\pm$ DE) de IVM tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos.....	53
FIGURA 5: Concentraciones plasmáticas promedios ( $\pm$ DE) de IVM tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos obtenidos entre los 5 y los 15 días post-administración. A letras iguales n no hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).....	54
FIGURA 6: Relación entre las concentraciones promedio de IVM obtenidas al día 3 post-administración en los contenidos abomasal e intestinal y en sus respectivas mucosas tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0.2 mg/kg). A letras iguales no hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).....	57
FIGURA 7: Concentraciones de IVM en <i>Haemonchus contortus</i> tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0.2 mg/kg) en ovinos. El inserto muestra la correlación obtenida entre las concentraciones de droga en el parásito y las obtenidas en el contenido abomasal. A letras iguales no hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). r: Coeficiente de correlación.....	58

## Resumen

El presente trabajo de tesis abordó la Resistencia Antihelmíntica desde un enfoque integrador fármaco-parasitológico, comparando la eficacia clínica y la farmacocinética de IVM administrada por diferentes vías (subcutánea e intraruminal) bajo condiciones estandarizadas en un mismo estudio, a corderos infestados con parásitos resistentes. Para ello se utilizaron veintiséis (26) corderos, infestados con cepas parasitarias resistentes a IVM, divididos en 3 grupos: Control (n=6), SC (n=10), (IVM administrada por vía subcutánea a razón de 0,2 mg/kg) e IR (n=10), (IVM administrada por vía intraruminal a razón de 0,2 mg/kg). Para el estudio parasitológico, se tomaron muestras de materia fecal, en forma individual, pre y post tratamiento (pt). Dichas muestras se utilizaron para la determinación de huevos por gramo de materia fecal (hpg), coprocultivo e identificación de larvas infestivas. Al día 15 pt se realizó la necropsia de 6 animales por grupo, para el recuento e identificación de parásitos adultos en el tracto digestivo. Para el estudio farmacocinético, se obtuvieron muestras de sangre yugular entre la hora 0 y el día 14 días pt. Adicionalmente 4 animales de los grupos SC e IR se sacrificaron al día 3 post-tratamiento y se recuperaron muestras de contenido y mucosas de abomaso e intestino, y de *Haemonchus contortus*. Las muestras se procesaron para cuantificar IVM por análisis cromatográfico (HPLC). El análisis farmacocinético se realizó utilizando el programa PKsolutions (Summit Research Services, USA) y los parámetros farmacocinéticos se analizaron mediante t-test. Los resultados de hpg se analizaron por métodos no paramétricos. La reducción del hpg tuvo un incremento de 45,5 % (SC) a 51,7 % (IR). El porcentaje de eficacia de IVM por género parasitario fue siempre mayor en el grupo tratado por vía IR. Las eficacias en parásitos abomasales fue de 52.4 % (SC) and 81.9 % (IR). Los tratamientos mostraron una eficacia de 95.2 % (SC) y 99.9 (IR) para nematodos intestinales. *H. contortus* demostró ser altamente resistente al tratamiento por ambas vías de administración, aumentado la eficacia de 0 % (SC) a 40 % tras el tratamiento IR.

La disponibilidad de IVM en plasma fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) luego de la administración por vía SC. Sin embargo, la concentración de IVM en el contenido gastrointestinal fue mayor en los corderos tratados por vía IR. La relación entre la concentración de IVM

medida en el contenido abomasal y la mucosa fue de 0.07 (SC) y 2.97 (IR); la relación concentración contenido/mucosa en el intestino delgado fue de 1.39 (SC) y 1.99 (IR). Las concentraciones de droga observadas en *H. contortus* fueron 14.4 veces mayor tras la administración IR reflejando la importancia del ambiente en el cual está inmerso el parásito.

Las mayores concentraciones de IVM recuperadas en el contenido gastrointestinal se correlacionan con el incremento en la eficacia obtenido después del tratamiento IR. Los resultados del presente trabajo contribuyen a optimizar el uso de IVM en el control antiparasitario en ovinos.

**Palabras clave:** Resistencia antihelmíntica, Ivermectina, *Haemonchus contortus*

## Abstract

The present thesis work studied the anthelmintic resistance from a pharmacoparasitological perspective, comparing the clinical efficacy and pharmacokinetics of IVM administered by different routes (subcutaneous e intraruminal) to lambs infected with resistant parasites. Twenty six (26) lambs were divided into 3 groups: control (n = 6) without treatment, IVM SC (n = 10) (IVM subcutaneously at 0.2 mg/kg) and IVM IR (n = 10), IVM IR (IVM intraruminally at 0.2 mg/kg). For the parasitological study, individually feces samples were taken, pre and post treatment (pt). These samples were used for the determination of fecal eggs counts per gram (epg), fecal culture and larvae identification. At day 15 pt, six animals per group were sacrificed, for counting and identification of adult parasites in the digestive tract. Jugular blood samples were obtained for pharmacokinetic studies, between 0 hour and day 14 pt. Additionally, four animals of SC and IR group were sacrificed at day 3 pt and samples of gastrointestinal content and mucosa and *Haemonchus contortus* were taken. IVM concentrations were quantified by HPLC. Pharmacokinetic analysis was performed using the PKsolutions (Summit Research Services USA) and pharmacokinetic parameters were compared using t test. Adult parasites and hpg results were analyzed by non-parametric methods. The reduction of the hpg increased from 45% (SC) to 51.7% (IR). The percentage of IVM effectiveness by parasitic gender was always greater in the IR group. Efficacies in abomasal parasites were 52.4% (SC) and 81.9% (IR). Treatments showed an efficacy of 95.2% (SC) and 99.9 (IR) for intestinal nematodes. *H. contortus* proved to be highly resistant to treatment by both routes of administration, efficacy increased from 0% (SC) to 40% (IR) treatment. IVM availability in plasma was higher ( $p \leq 0.05$ ) after the SC administration. However, the IVM concentration in gastrointestinal contents was higher in IR treated lambs. The ratio between concentration of IVM measured in abomasum content and mucosa was 0.07 (SC) and 2.97 (IR). Drug concentrations observed in *H. contortus* were 14.4 times higher after IR administration compared those observed after SC treatment, reflecting the importance of the environment in which the parasite is located. The largest concentrations of IVM recovered in gastrointestinal contents correlated with the increased efficacy obtained after IR treatment. The current Thesis contributes to optimize the use of IVM and therefore the parasite control in sheep.

**Keywords:** Anthelmintic resistance, Ivermectin, *Haemonchus contortus*



## 1. INTRODUCCION

## **1.1. Gastroenteritis parasitaria**

La gastroenteritis parasitaria es una enfermedad de carácter enzootico, de curso generalmente crónico y mortalidad baja, caracterizada clínicamente por alteraciones gastrointestinales, retraso del crecimiento, disminución en la producción y ocasional anemia.

La mortalidad por parásitos constituye la forma más extrema de reducir la productividad; sin embargo, las pérdidas clínicas y subclínicas generadas por una disminución en la producción de lana, carne y leche de los animales afectados, como así también la afección directa o indirecta de las crías, son de fundamental importancia en los sistemas pastoriles (Entrocasso, 1994) y constituye una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción pecuaria.

Esta enfermedad está producida por nematodos gastrointestinales, que comprenden diversos nematodos que se localizan en el abomaso y en el intestino de los rumiantes. Las especies de mayor importancia epidemiológica en el ganado ovino y caprino son los pertenecientes al orden *Strongylida* y se clasifican en cuatro superfamilias: *Trichostrongyloidea*, *Strongyloidea*, *Ancylostomatoidea* y *Trichuroidea*, siendo la primera la de mayor interés veterinario.

La interdependencia existente entre las diferentes especies de nematodos gastrointestinales y el medio ambiente, hace que varíe tanto la diversidad genérica como de especies o la densidad de las poblaciones de acuerdo a las características del clima y del manejo de las explotaciones.

## **1.2. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales ovinos**

### **1.2.1. Ciclo biológico**

El ciclo biológico de los *Trichostrongilideos* es directo, con una fase de desarrollo sobre el huésped (relación parásito – animal) y otra libre (relación parásito – medio ambiente). La fase de vida libre o externa comienza cuando los huevos de los parásitos caen junto con las heces de los animales infectados al suelo. Bajo condiciones apropiadas de

humedad, temperatura y aireación comienzan a evolucionar a través varios estadios dando origen al primer estadio larvario (L1) que eclosiona y abandona el huevo. La L1 muda a Larva segunda (L2) que tras una nueva muda se convierte en Larva tercera (L3) o infestante. La larva infestante mantiene la cutícula de la L2 y desarrolla por fuera otra cutícula, que si bien le impide alimentarse, le confiere resistencia a las condiciones ambientales. La supervivencia de estas larvas dependerá de la energía acumulada en sus células intestinales y su resistencia a las adversidades climáticas. Finalmente, cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, la L3 abandona las heces y migra por la pastura, permaneciendo allí hasta que son ingeridas por el hospedador, iniciándose así el ciclo interno (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994; Entrocasso, 1988a).

El período de desarrollo desde la fase de huevo hasta la formación de las larvas infestantes, constituye la fase pre-parásita del ciclo. En condiciones óptimas de temperatura (22-25 °C) y humedad (60-70 %), el tiempo necesario para la formación de larvas infestantes oscila entre los 3 y 14 días (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994).

La fase de vida libre, en líneas generales, es común para todos los géneros excepto para *Nematodirus*, que alcanza el estado de L3 en el interior del huevo, y luego eclosiona espontáneamente o ante ciertos estímulos como el frío (Fiel y Steffan, 1994).

El ciclo interno comienza cuando los animales ingieren pastos contaminados con larvas infestantes. Estas se desprenden de su envoltura externa en el rumen (parásitos abomasales) o en abomaso (parásitos intestinales). Tras la liberación de la cutícula, las larvas comienzan una fase histotropa, en la que migran a través de la mucosa penetrándola más o menos profundamente. Allí realizan la segunda muda a L4, entre el 2º y el 8º día post-infestación. Después de unos días de crecimiento en la mucosa mudan a L5, maduran rápidamente emergiendo a la luz del abomaso o intestino, convirtiéndose en adultos. Copulan y las primeras hembras grávidas comienzan a poner huevos que son eliminados con las heces. El tiempo transcurrido desde la infestación hasta la eliminación de huevos en las heces se denomina período de prepatencia y en general, para el conjunto de los *Trichostrongilideos* tiene una duración aproximada de 16 a 21 días (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994).

### 1.2.2. Géneros implicados

El género que más pérdidas ocasiona a los lanares es el *Haemonchus*, que se halla presente en todo el territorio del país, excluyendo la Patagonia, debido a la predominancia de lluvias promedio de 50 mm primavero-estivales y temperaturas mínimas de 12,5 °C. Le sigue en importancia el género *Trichostrongylus*, especialmente *T. colubriformis* que prácticamente está presente en todo el territorio a excepción de las regiones más áridas. En la pampa húmeda la estacionalidad de *Haemonchus spp* es más marcada que en la Mesopotamia, por las bajas temperaturas invernales que limitan el desarrollo parasitario a partir de mayo (Romero, *et al.* 2007).

Además de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*, las especies predominantes en la Pampa Húmeda son: *Ostertagia ostertagi*, *Ostertagia trifurcata*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus longyspicularis*, *Cooperia punctata*, *Cooperia oncophora*, *Cooperia pectinata*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicolis*, *Strongyloides papillosus*, *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis*, *Bunostomum trigonocephalum* y *Dictyocaulus filaria* (Romero, *et al.* 2007).

#### **Género *Haemonchus*** (Cobb, 1898)

***H. contortus*** (Rudolphi, 1803) es una de las especies más patógenas. Se localiza en el abomaso de los rumiantes y de allí deriva su denominación “gusano del cuajo”. Los machos son de color rojo, mientras que las hembras presentan el ovario blanquecino enrollado en espiral sobre el intestino rojo dándole aspecto de “palo de barbero”. (Lapage, 1962; Soulsby, 1988).

Es un parásito hematófago, tanto en estadio larval como adulto. Puede matar a los corderos rápidamente y producir anemia severa. La haemonchosis en las zonas subtropical y templada predomina durante los meses de febrero, marzo y abril, coincidiendo con el post destete, siendo los corderos la categoría más susceptible. Las primeras heladas determinan una caída brusca de la tasa de contaminación de las pasturas ya que es un parásito que resulta poco viable si los huevos o larvas se someten

a bajas temperaturas (Soulsby, 1988; Sánchez y Romero, 2005) entrando en un período de hipobiosis, como alternativa de mantenimiento durante los meses invernales. En la pampa húmeda las larvas en cuarto estadio tienden a inhibirse hasta el 40 % y la duración no se extiende más allá de las 8 a 12 semanas. La menor tasa de infestación por esta especie se presenta en los meses de julio y agosto, tanto en la Pampa húmeda como en la Mesopotamia. (Romero, *et al.*, 2007).

La capacidad reproductiva de estos helmintos es sumamente elevada, las hembras ponen de 5000 a 10000 huevos por día y por su gran patogenicidad, no son necesarias cargas parasitarias muy altas para producir síntomas. Cuando se presentan épocas cálidas, con elevadas precipitaciones, las tasas de infestación pueden ser muy altas y producir importantes pérdidas por muerte. Es común la presentación de animales con muy buen estado corporal pero con hematocritos bajos, de 15 % o menores. (Romero, *et al.* 2007).

***H. placei***: (Place, 1893) *Haemonchus placei* infecta primariamente al bovino mientras que *Haemonchus contortus* es principalmente un parásito del ovino. Sin embargo, ambos pueden ser encontrados en el otro huésped principal, como así también en rumiantes domésticos y salvajes. (Lichstenfels, *et al.*, 1994).

***Trichostrongylus***: (Loos, 1905) Las especies de este género son pequeñas, color pardo – rojizo sin un extremo cefálico especialmente desarrollado. ***T. colubriformis*** (Giles, 1892): Se presenta en la porción anterior del intestino delgado y a veces en el cuajo del ovino, caprino, bovino, camellos y diversos antílopes. El potencial biótico es de 100 a 150 huevos por día. Altas cargas producen congestión y enteritis catarral erosionando la superficie epitelial. (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994). Los mayores recuentos hallados en las necropsias ocurren en los meses de primavera y verano (Romero, *et al.*, 2007). ***T. axei*** (Cobbold, 1879): se encuentra en el abomaso de bovinos, ovinos, caprinos y también equino y cérvido. Produce áreas de necrosis superficiales localizadas llamadas “crateriformes” (Fiel y Steffan, 1994). Se presenta abundantemente en otoño, invierno y primavera y es posible encontrar tasas de inhibición del 25 % en primavera en la Provincia de Buenos Aires (Romero, *et al.* 2007). El fenómeno está condicionado al historial de tratamientos y cohabitación de los potreros con bovinos.

***Teladorsagia circumcincta*** (Stadelmann, 1894): se localiza en el abomaso del ganado ovino y caprino. Los estadios adultos e inmaduros producen daño en la mucosa abomasal afectando la función digestiva, causando grandes perjuicios como diarrea, pérdida de peso y merma en la producción de lana. El desarrollo de huevos a larvas ocurre a mediados del otoño a invierno, dependiendo que la temperatura media sea de 10 °C o más. Las larvas son muy resistentes al frío y decrecen durante la primavera cuando entran en un período de hipobiosis durante los meses de verano (Soulsby, 1988)

***Ostertagia ostertagi*** (Stiles, 1892): suele ser abundante cuando existen bovinos pastoreando en el área (Romero, *et al.* 2007). Comparten características epidemiológicas con *Teladorsagia spp.*

***Nematodirus*** (Ransom, 1907): Se localizan en el intestino delgado. Las especies de este género son parásitos relativamente grandes con la porción anterior filiforme. El potencial biótico es de 50 a 100 huevos por día, los cuales se caracterizan por ser de gran tamaño y desarrollar hasta L3 dentro del huevo (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994). ***Nematodirus filicollis*** (Rudolphi, 1802) y ***Nematodirus spathiger*** (Railliet, 1896) son las especies mas comunes en las zonas templadas (Romero, *et al.* 2007).

***Cooperia punctata*** (Linstow, 1907); ***Cooperia pectinata*** (Ransom, 1907); ***Cooperia oncophora*** (Railliet, 1898) y ***Cooperia curticei*** (Railliet, 1893): Se localizan en el intestino delgado de los rumiantes. Oviponen 500 a 1000 huevos por día, teniendo una importante participación en otoño – invierno. Generalmente complican el cuadro iniciado por otros parásitos como *Teladorsagia* y *Ostertagia*, en el cuajo (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994).

***Oesophagostomun*** (Molin, 1861): La especie mas frecuente de este género en las zonas templadas es el *O. venulosum* (Rudolphi, 1809). Se ubica en el ciego y colon produciendo lesiones nodulares. Es muy prolífico y no requiere una alta carga parasitaria para que aparezcan signos clínicos. Desde el comienzo de la primavera, basta un número bajo de ejemplares para producir una elevación importante en el porcentaje de larvas del coprocultivo (Soulsby, 1988; Lapage, 1962).

***Bunostomun triganoccephalum*** (Rudolphi, 1908); ***Chabertia Ovina*** (Gmelin, 1790) y ***Trichuris ovis*** (Abildgaard, 1975) y ***Strongyloides papillosus***: (Wedl, 1856) Estos

parásitos son de presencia frecuente pero no determinan por sí mismos cuadros de parasitosis. (Soulsby, 1988; Romero, *et al.* 2007).

### 1.2.3. Contaminación de las pasturas

Los gráficos de tendencias de la contaminación de las pasturas en la provincia de Buenos Aires demuestran que en los meses de verano y otoño, la oferta de L3 es especialmente de *Haemonchus*, mientras que a fines del invierno la carga se diversifica con L3 de *Trichostrongylus spp*; *Ostertagia spp*; *Teladorsagia circumcincta* y *Cooperia spp* según la influencia de los bovinos. Podemos separar por lo tanto, dos picos de elevación de larvas infestantes de *Trichostrongylus spp* en la pastura: un primer pico caracterizado por la presencia de *Haemonchus spp*, anemia y elevados conteos de huevos por gramo de materia fecal (hpg), y el otro, principalmente integrado por *T. colubriformis* y variablemente por *T. axei* caracterizado clínicamente por diarrea o al menos reblandecimiento de materia fecal, con relativa importancia de *Oesophagostomum spp* y *Nematodirus spp* (Romero, *et al.* 2007).

Las categorías susceptibles son los animales de menos de un año y las ovejas en el periparto y en la lactancia; ya sea en pariciones de otoño o de primavera con prevalencias de *Haemonchus spp* y *Trichostrongylus spp* respectivamente (Romero, *et al.* 2007).

La supervivencia de las larvas en la fase de vida libre, donde se encuentra mas del 90 % de la población total de nematodos del sistema, depende de numerosos factores ambientales, sin embargo los factores climáticos y las pasturas son considerados los más importantes (Fiel, 2008)\*.

---

\* FIEL, C; 2008. Comunicación Personal.

### 1.2.3.1. Clima

Las condiciones climáticas establecen el predominio de determinadas especies en las distintas zonas del país. La humedad y la temperatura son los aspectos climáticos más relevantes. (Fiel, *et al.* 1990, Fiel y Steffan, 1994). La humedad es el factor limitante ya que afecta el desarrollo y supervivencia de huevos y larvas y condiciona la migración larvaria. Los valores óptimos de humedad, tanto para el desarrollo como para la supervivencia de las larvas deben estar comprendidos entre el 65 y 70 %, aunque este porcentaje es relativo a la especie y al estadio de desarrollo. La humedad está determinada por las precipitaciones mensuales, de forma tal que debajo de un régimen de 50 mm y altas temperaturas de verano, es difícil que ocurra la infestación de las pasturas (Gordon, 1973; Fiel y Steffan, 1994). Sin embargo esto puede variar según la frecuencia y la cantidad de lluvia caída en un tiempo determinado, el tipo de precipitación, la evapotranspiración de la vegetación y el tipo y/o pendiente del terreno. A pesar de lo antes expuesto, la humedad propia de las deposiciones fecales es suficiente para que se produzca la eclosión de las larvas y la posterior evolución hasta alcanzar el estadio infestante (Williams, 1983). La temperatura, en cambio, aparece como un factor determinante para esta etapa del ciclo. A medida que la temperatura aumenta, el tiempo requerido para alcanzar el estadio infestante disminuye, en tanto que con bajas temperaturas este periodo se extiende (Fiel, 2008<sup>†</sup>).

Para el conjunto de tricostrongylideos, el rango térmico de desarrollo se encuentra comprendido entre 4° y 37,5 °C (Gibson, 1981). Dentro de este rango térmico cada especie presenta su temperatura óptima de desarrollo, que oscila entre 22 y 25 °C (Rojó Vazquez, 1976; Rose y Small, 1985).

Trabajos realizados en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Sttefan y Fiel, 1986), establecieron que el desarrollo de huevo a larva infestante oscilaba entre 1-2 semanas en verano; 2-3 semanas en otoño; 3-6 semanas en invierno y 2-4 semanas en primavera. Se observó también que cuando las temperaturas medias son cercanas a los

---

<sup>†</sup> FIEL, C, 2008. Comunicación Personal.



20° C el tiempo de maduración de huevo-L3 se acorta 1 semana, mientras que se alarga a 6 semanas cuando la temperatura media desciende a los 5° C (Fiel, 2008<sup>‡</sup>).

### **1.2.3.2. Pasturas**

El fenómeno de migración larvaria de las heces a las pasturas también está condicionado en gran forma por la humedad y la temperatura (Anderson, 1988). Es necesaria una fina película de agua de al menos 2,5 µm de espesor y la temperatura debe estar comprendida entre los 10° y 45° C para que exista una migración activa gracias al continuo movimiento larvario que permite un desplazamiento horizontal o vertical. (Young y Anderson, 1981) Fuera de estos rangos la tasa de migración activa se reduce considerablemente como resultado de la ralentización del movimiento larvario, o bien agotamiento de las reservas energéticas de las L3 (Soulsby, 1988), a los que se le debe agregar el efecto deletéreo ejercido por la desecación y la luz ultravioleta (Fiel, 2008<sup>§</sup>).

La supervivencia de las L3 (bovinos) en el pasto oscila entre 5 y 14 meses y depende de las reservas energéticas acumuladas en sus células intestinales y de las condiciones climáticas a las que están expuestas (Fiel y Steffan, 1994).

Cabe destacar la influencia de otros microorganismos del suelo sobre la población parasitaria como hongos nematófagos, artrópodos, bacterias o virus, entre los que se establecen complejas relaciones de competencia, parasitismo o depredación (Gomez Rincón, 2006).

---

<sup>‡</sup> Fiel, C; 2008. Comunicación Personal.

### **1.3. Desarrollo en el interior del hospedador**

La fase interna del ciclo, en general, se desarrolla como fue descrito anteriormente; sin embargo esta fase puede verse afectada por numerosos factores dependientes del parásito y del hospedador.

#### **1.3.1. Factores dependientes del parásito: hipobiosis larvaria**

La hipobiosis larvaria se define como el cese temporal del desarrollo de un nematode en una fase temprana de su vida parásita (Armour y Ogbourne, 1982). Dicha inhibición se produce según la especie en fases de L4 temprana, como *Ostertagia spp* y *Haemonchus spp*, o tardía como *Nematodirus spp*. La L4 permanece metabólicamente inactiva en la mucosa por un período de tiempo variable, prolongando así el período de prepatencia. Luego reanuda su desarrollo, madurando las larvas inhibidas hasta el estadio de adultos, cuya progenie reinicia el ciclo.

El origen del fenómeno de hipobiosis, a pesar de los numerosos trabajos que lo describen, sigue siendo motivo de controversia. En un principio fue considerada como respuesta a la inmunidad adquirida tras la ingestión de un gran número de larvas infestantes en un corto período de tiempo (Michel, 1963; Armour, *et al.*, 1969). Posteriormente, al hallarse este fenómeno en animales primo infectados, quedó sin efecto esta hipótesis. Surgiendo, una segunda hipótesis que sostiene, que la hipobiosis larvaria es el resultado de un proceso adaptativo transmitido de generación en generación. Las condiciones ambientales adversas soportadas por las L3 son las responsables de desencadenar el proceso de inhibición, considerándola una regulación activa del desarrollo por parte del parásito (Armour, *et al.*, 1969; Armour y Duncan, 1987). Numerosos trabajos sugieren que la inhibición larvaria, responde a un modelo estacional característico de cada región climática coincidente con las condiciones más desfavorables para la supervivencia de los estadios de fase libre (Armour, 1980; Armour y Duncan, 1987).

Independientemente de los mecanismos que desencadenan la hipobiosis, ésta representa un fenómeno de gran importancia epidemiológica, pues permite al parásito

escapar de las condiciones adversas garantizando, tras su maduración, la contaminación del medio y por lo tanto el inicio de un nuevo ciclo (Fiel y Steffan, 1994).

### **1.3.2. Factores dependientes del huésped: respuesta inmune**

En la respuesta del huésped a la infestación parasitaria, intervienen mecanismos específicos e inespecíficos, cuyo objetivo consiste en eliminar o bien controlar a la población parasitaria establecida, reduciendo los efectos patógenos a ella asociados, y prevenir el establecimiento de nuevos parásitos (McClure, 2000).

Dentro de los mecanismos parásito-específicos, el principal mecanismo, es la reacción de hipersensibilidad inmediata que constituye la base inmunológica del fenómeno de autocuración o “self cure” que ocurre en el ganado ovino parasitado con *H. contortus*, definido como la eliminación masiva de parásitos adultos y la expulsión de las L3 ingerida en un corto periodo de tiempo (Soulsby, 1988; Fiel y Steffan, 1994).

La IgA, es la inmunoglobulina más abundante en la mucosa gastrointestinal y su función está determinada por su unión a los antígenos del parásito, evitando su adhesión al epitelio del tracto gastrointestinal. En términos generales, la respuesta inmune humoral y celular condiciona una alteración en el metabolismo de los parásitos que lleva a que los mismos estén reducidos de tamaño, presenten alteraciones morfológicas y reproductivas y disminuye la ovoposición en las hembras (Mitchel, *et al.*, 1971, 1972; Kloosterman, *et al.*, 1984; Soulsby, 1988).

A estas alteraciones en los parásitos se le suma la respuesta parásito-inespecífica cuya inducción es parásito específica, y que consiste en la expulsión rápida de los parásitos mediante el aumento de los movimientos peristálticos antes mencionados y por el atrapamiento en el mucus, generado por una marcada actividad de las células mucosas que producirán gran cantidad de moco y por un efecto mecánico se dificulta el establecimiento de larvas ingeridas (Miller, 1984).

La respuesta inmune en general está determinada por varios factores que influyen directa o indirectamente sobre esta: la raza, edad, sexo, estado nutricional, estado fisiológico, enfermedades intercurrentes, etc. (Eddi y Caracostantogolo, 1994).

#### **1.4. Control de las parasitosis gastrointestinales**

##### **1.4.1. Control Farmacológico**

El control de las parasitosis en los animales domésticos ha estado y sigue estando basado en el uso de fármacos antiparasitarios, complementado con medidas de manejo animal en el caso de las especies productivas (Lifschitz, *et al.*, 2002).

Las metodologías utilizadas en el control de vermes en las últimas dos décadas se han basado casi exclusivamente en el uso de drogas de amplio espectro cada vez más eficaces y persistentes. Este abuso en el uso de fármacos es probablemente el principal generador de resistencia, con la grave consecuencia de acortar la vida útil de los antihelmínticos (Suárez, 2007).

Para optimizar la eficiencia del control antiparasitario es fundamental conocer las propiedades físico-químicas, el comportamiento farmacológico y la eficacia clínica de las drogas antihelmínticas, así como también su relación con la información epidemiológica disponible (Lanusse, 1994).

Factores inherentes al animal como el estado nutricional, calidad y tipo de dieta, tipo de manejo nutricional, estados patológicos inclusive las propias parasitosis, como así también el ayuno y otros estados fisiológicos, son capaces de influenciar el comportamiento farmacológico y la eficacia de drogas antihelmínticas (Lanusse, 1994).

Actualmente no son muchos los grupos químicos disponibles en el mercado farmacéutico y la disponibilidad futura de nuevos antiparasitarios no solo se encuentra comprometida por el progresivo aumento de los casos de resistencia sino también por los crecientes costos de investigación y desarrollo (Geary, *et al.*, 1999). Los fármacos antihelmínticos que se utilizan actualmente se pueden clasificar en 4 grupos según sus propiedades farmacológicas, a saber: Benzimidazoles y Pro-benzimidazoles (Febendazol,

Albendazol, Oxfendazol, Netobimin, etc.), Imidazotiazoles (Levamisol), Lactonas macrocíclicas (Avermectinas, Milbemicinas) (Lanusse, 1994) y Monepantel (Kaminsky, *et al.*, 2008). Se desarrolla en el siguiente punto la familia de drogas que son de interés de estudio de esta tesis.

#### **1.4.1.1. Lactonas Macrocíclicas (LM)**

Las drogas de este grupo presentan una compleja estructura química, y pueden dividirse en dos familias según su origen, a saber: avermectinas (Abamectina, Ivermectina, Doramectina, Eprinomectina y Selamectina) y milbemicinas (Nemadectina, Moxidectina, Milbemicina D y Milbemicina 5 oxima). Además, por su actividad tanto en parásitos externos como internos, se denominan fármacos endectocidas (Shoop, *et al.*, 1995).

Los endectocidas son fármacos de elevada liposolubilidad, solubles en solventes orgánicos, poco hidrosolubles y sensibles a la luz ultravioleta (Fisher y Mrozik, 1989). Si bien estos compuestos comparten algunas propiedades fisicoquímicas, pequeñas diferencias en la estructura, determinan cambios en el comportamiento farmacocinético, lo cual repercute en la eficacia antiparasitaria (Lanusse, *et al.*, 1997). Los fármacos endectocidas producen su efecto antiparasitario al incrementar la permeabilidad de la membrana celular para los iones cloro (Cl<sup>-</sup>), con la resultante hiperpolarización y parálisis de la musculatura faríngea y somática de los parásitos (Mc Kellar y Benchaoui, 1996). Los parásitos susceptibles poseen receptores de alta afinidad donde la ivermectina (IVM) se une, provocando un aumento de permeabilidad para los iones Cl<sup>-</sup>, con el consiguiente desprendimiento del parásito por parálisis flácida. Este receptor de alta afinidad en el parásito diana es un canal de cloro ligado al glutamato, donde interacciona la droga, dando lugar a la hiperpolarización descrita (Arena, *et al.*, 1995).

La IVM es la lactona macrocíclica de mayor difusión, por lo tanto es la más estudiada con respecto a sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas. Y a su vez la mayor información disponible se refiere a bovinos, aunque existe gran variabilidad entre especies y aún entre individuos de la misma especie (Lifschitz, *et al.* 2002).

El comportamiento farmacocinético de estas moléculas difiere del resto de las drogas antiparasitarias, teniendo en cuenta la prolongada permanencia de concentraciones detectables luego del tratamiento. La pobre solubilidad de IVM en agua favorece la deposición de la droga en el sitio de administración subcutánea, lo cual actúa como un depósito de droga que retarda la absorción y favorece una mayor permanencia del fármaco en el organismo (Lanusse y Prichard, 1993).

En ovinos el tratamiento con IVM por vía oral resulta en una menor disponibilidad sistémica de droga. La menor disponibilidad de IVM impacta en su eficacia sobre parásitos externos, por lo cual no se recomienda esta vía de administración para el tratamiento de la sarna (McKellar y Benchaoui, 1996). A su vez, luego de la administración subcutánea de IVM en ovinos, la persistencia de acción antiparasitaria sobre nematodos gastrointestinales resulta más prolongada comparada a la obtenida tras el tratamiento por vía oral (Borgsteede, 1993). Estas diferencias farmacocinéticas observadas tras la administración de IVM por diferentes vías de administración y la influencia que tienen las mismas sobre la eficacia de nematodos gastrointestinales de reducida susceptibilidad a la droga son la base de estudio del presente trabajo de tesis.

#### **1.4.2. Control biológico**

La utilización de seres vivos, antagonistas naturales de una especie no deseada, se ha mostrado como un método eficaz en el control de ciertas plagas en agricultura. (Larsen, 2000).

Entre los enemigos naturales de los nematodos gastrointestinales con mayor potencial, los hongos nematófagos (principalmente *Duddingtonia flagrans*) fueron seleccionados por su eficacia y facilidad de manipulación tanto en laboratorio como a nivel de campo. Estos hongos, que son propios del suelo, tienen la propiedad de controlar los nematodos gastrointestinales capturando y predando las larvas en las heces antes de la migración a las pasturas, evitando así su ingestión por los animales en pastoreo. Su acción fue demostrada tanto en bovinos, ovinos y cabras, como en equinos y cerdos (Larsen, 2002; Saumell , *et al.*, 2005; Waller , *et al.*, 1994; Wolstrup , *et al.*, 1996).

### 1.4.3. Resistencia Genética

La resistencia es la habilidad del animal de resistir la enfermedad parasitaria, lo que se logra a través de un fuerte componente inmunológico, disminuyendo el establecimiento de L3 infestantes, el desarrollo de dichas larvas a L4 y adultos, la eliminación de adultos y la disminución de la oviposición.

Resiliencia, es la habilidad del animal de mantener niveles productivos aceptables, a pesar de la infestación parasitaria (Albers, *et al*, 1987). Tolerancia es la habilidad de mantener niveles productivos aceptables, pero sin la intervención de mecanismos inmunológicos (Castells, 2002a).

La tolerancia, es algo poco utilizado y sería la habilidad de mantener la producción aceptable sin intervención del sistema inmunitario (Castells, 2002b).

Reconociendo la existencia de diferencias genéticas entre razas de una misma especie animal, hay animales naturalmente resistentes al establecimiento y desarrollo de parásitos, su respuesta inmune permite controlar la población parasitaria (Saumell, *et al.*, 2005; Castells, 2002b; Miller, 1996).

### 1.4.4. Vacunas

La producción de vacunas para estimular el sistema inmune frente infestaciones por nematodos gastrointestinales, es un método de control potencial considerando que los animales adultos son claramente más resistentes que los jóvenes (Castells, 2002b).

Para nematodos gastrointestinales y otros parásitos son vacunas recombinantes las que están en desarrollo. Sin embargo aun se presentan varias dificultades a superar como la obtención y producción de las fracciones de antígenos de los nematodos para su comercialización, o la complejidad de la respuesta inmune del huésped a los parásitos. En *Haemonchus contortus* y *Ostertagia ostertagi* han sido observados avances significativos aunque aun con gran variabilidad de resultados (Saumell, *et al.*, 2005; Claerebout, *et al.*, 2005; Geldhof, *et al.*, 2007).

#### 1.4.5. Estrategias de Pastoreo

El tipo de pastoreo puede facilitar o impedir la supervivencia de los estadios de vida libre, condicionando los niveles de infección y por ende los efectos patógenos sobre los animales.

Estas medidas de manejo tienden a disminuir la contaminación de huevos o la infestación de L3 de los potreros, minimizando así el contacto entre el hospedador y los estadios infestantes. En nuestros sistemas de producción, esto se puede lograr alternando especies animales (ovino/bovino), alternando categorías (adultos/jóvenes) o bien utilizando pasturas diferidas o pastoreo rotativo (Nari y Eddi, 2002; Gómez Rincón, 2006).

#### 1.4.6. FAMACHA©

A los efectos de minimizar el uso de drogas y con el objetivo de desarrollar métodos sencillos y económicos tendientes a controlar las parasitosis gastrointestinales y que puedan ser aplicados tanto por profesionales como por productores, se desarrolló un método diagnóstico clínico de *Haemonchus contortus* en ovinos y caprinos, el cual denominaron FAMACHA© (Van Wyk y Bath 2002). Este método se basa en la comparación del color de la conjuntiva ocular con una escala de cinco grados (1 a 5). Los animales de acuerdo a esta categorización se agrupan desde normal a muy anémico. El objetivo principal de este método es controlar la Haemonchosis, dosificando solamente los animales con anemia marcada (Salles Echeverri, 2002; Kaplan, *et al.*, 2004).

#### 1.4.7. Dieta

Las parasitosis gastrointestinales en rumiantes están siempre acompañadas por una disminución en la ingesta voluntaria y de la eficacia en la utilización de los nutrientes que conducen a la desnutrición y disproteinemia (Sykes, 1982; Entrocasso, 1984; Entrocasso, *et al.*, 1986).



La interacción entre la nutrición y el huésped puede ser considerado desde dos perspectivas interrelacionadas. Por un lado, los efectos de la nutrición sobre los disturbios metabólicos y la patofisiología inducida por la parasitosis y por otro lado, la influencia de la disponibilidad nutricional en la habilidad del huésped de montar una respuesta efectiva contra el establecimiento y/o el desarrollo de los parásitos e inducción de la eliminación de los mismos. (Coop y Kyriazakis, 1999; Coop y Holmes, 1996).

#### **1.4.8. Fitoterapia**

La posibilidad de reducir el uso de fármacos en el control de las parasitosis gastrointestinales mediante el empleo de plantas con propiedades antihelmínticas, constituye una de las estrategias de control que ha suscitado gran interés en los últimos años. Los taninos condensados (TC) tienen efectos biológicos que pueden ayudar en el control de los parásitos gastrointestinales. Los TC se unen a proteínas y otras moléculas a pH neutro o casi neutro, tal como ocurre en el rumen y luego en abomaso, se disocian con pH ácido, liberándolas para su digestión (Min, *et al.*, 2003).

Aunque los métodos no quimioterápicos podrían desempeñar un papel relevante en el control antiparasitario, en la actualidad los sistemas de producción animal dependen del uso de fármacos antiparasitarios como herramientas para el control de endoparásitos y ectoparásitos (Vercruyse, *et al.*, 1999). Sin embargo nuevas tendencias en la producción de alimentos, en el cuidado de los recursos naturales y el advenimiento de la resistencia marcan ciertas limitaciones en el uso de antihelmínticos, a saber:

- Residuos tóxicos de drogas antihelmínticas y sus metabolitos en la carne y la leche destinadas al consumo humano, por lo que se aplican los tiempos de espera y retirada.
- El impacto ambiental del uso de estas drogas, como por ejemplo los efectos de los antihelmínticos eliminados por heces y orina en el medio ambiente, principalmente sobre los organismos colonizadores de la materia fecal (Mc Kellar, 1997).
- Resistencia antihelmíntica.

## 1. 5. Resistencia antihelmíntica

La resistencia es un fenómeno hereditario que ocurre cuando hay una alta frecuencia de individuos dentro de una población que son capaces de tolerar la dosis de un compuesto, mientras que una población normal de la misma especie no es capaz de tolerarlo. (Waller, 1985). La tolerancia en cambio, se refiere a la falta de respuesta innata de la población parasitaria, para cada droga, independientemente de la exposición previa (Conder y Campbell, 1985). La evolución de la resistencia antihelmíntica está determinada por la cantidad de parásitos sobrevivientes al tratamiento que contribuyen con sus genes en las generaciones futuras. Esta contribución está influenciada por la frecuencia entre tratamientos, eficacia de la droga utilizada, fecundidad de los parásitos adultos, tasa de ingestión de larvas infestantes, deposición de huevos, manejo de pastoreo y clima (Barnes, *et al.*, 1995).

La resistencia a los antihelmínticos es un fenómeno generalizado y motivo de preocupación creciente en la producción de ovinos en muchas partes del mundo, incluso en nuestro país (Waller, *et al.*, 1996; Romero, 2005; Olaechea, *et al.*, 2007). En la década del 60 aparecieron los primeros reportes de resistencia a bencimidazoles (BZM) (Drudge, *et al.*, 1964); luego a levamisol (LVM) (Lejambre, *et al.*, 1976) drogas muy usadas en esos años. En cuanto a las avermectinas, sólo llevó algunos años desde su lanzamiento comercial para que se detectara la resistencia (Carmichael, *et al.*, 1987). En países como Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica o Uruguay, donde la explotación del ovino participa en forma importante dentro de sus producciones pecuarias, la elevada persistencia de la resistencia a antihelmínticos existente en las majadas es un tema de relevancia y de constante preocupación. En líneas generales el problema hasta el presente es más importante en los países ubicados en regiones templadas cálidas o tropicales que en las de clima templado frío. Por el contrario, en bovinos existen menos informes sobre la resistencia a antihelmínticos (Vermunt, *et al.*, 1995; Coles, *et al.*, 1998), probablemente debido a que el desarrollo de esta es más lento en los parásitos bovinos, o a una menor presión de selección debido a menor frecuencia de tratamientos o al efecto “refugio” de las heces bovinas (Prichard, 1999), sin embargo esta situación está comenzando a cambiar.

La resistencia antihelmíntica de ovinos y bovinos en distintos países del mundo, expresado como porcentaje (%), se resume en el siguiente cuadro:

PAIS	BZM	LVM	LM
España	12,7	34,6	15,7
Escocia	64	*	35
Australia	90	80	70
Nueva Zelanda	41	24	25
Méjico	50	*	44
Paraguay	86	71	1,2
Uruguay	97	82	89
Brasil	90	84	13
Argentina	53	25	50

\*Resistencia identificada pero no se conoce el porcentaje. BZM: Bencimidazoles; LVM: Levamisol; LM: Lactonas Macrocíclicas.

Fuente: Hosking y Kaminsky, 2007

La resistencia incrementa los costos de producción, reduce la eficacia del sistema y la calidad de los productos y entraña un riesgo para la salud pública y el medio ambiente debido a la necesidad de incrementar la dosis y la frecuencia de tratamientos a fin de mantener las producciones.

En Argentina, Entrocasso (1988b) y Romero (1992) publicaron los primeros reportes de resistencia en los que informaron la presencia de resistencia de *H. contortus* y *Nematodirus spathiger* a los antiparasitarios del grupo de los BZM. En el año 1996 Eddi, *et al.* utilizando técnicas de diagnóstico *in vivo* detectaron cepas resistentes en un estudio realizado en 73 establecimientos de las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. En este estudio se determinó que la prevalencia de resistencia de nematodos ovinos fue del 40% para BZM, 22% para LVM, 11% para la combinación BZM y LVM, y del 6% para Ivermectina (IVM). También se determinó que la resistencia a los antihelmínticos de los ovinos en la Argentina, se presenta en los tres nematodos más importantes que afectan la producción ovina del país pertenecientes a la familia *Trichostrongylidae*: *H. contortus*, *Ostertagia* spp y *Trichostrongylus* spp. (Castaño Zubieta, 2005). En un relevamiento de situación de la resistencia a antihelmínticos llevado a cabo en 85 establecimientos para bovinos y 35 establecimientos para ovinos, bajo un proyecto FAO (TCP AR 2904), se evaluaron los antihelmínticos de uso mas frecuente en la producción ganadera (IVM, BZM, LVM y CLS), utilizando la prueba de detección de

resistencia in vivo. Los resultados del proyecto mostraron que un 55 % de establecimientos presentaron parásitos resistentes a IVM, un 10 % a BZM y un 7 % a LVM, en bovinos. Mientras que en ovinos un 54 % de los establecimientos presentaron parásitos resistentes a BZM, 50 % a IVM; 29 % a LVM y 11 % a Closantel (CLS) (Caracostantogolo, 2005).

En América Latina los animales son mantenidos principalmente sobre pasturas naturales bajo condiciones de cría extensiva, siendo expuestos continuamente a reinfecciones. A causa de ello los productores necesitan desparasitar los animales regularmente para evitar helmintiasis (Eddi, *et al.*, 2002).

La creciente utilización de lactonas macrocíclicas en los últimos años en la producción bovina y ovina en Argentina nos lleva a sospechar que el incremento en la resistencia a dichas drogas se debe al aumento en la presión de selección en favor de cepas de nematodos gastrointestinales resistentes.

### **1.5.1. Reversión**

La reversión es la disminución del porcentaje de individuos resistentes dentro de una población luego de suspender la droga seleccionadora para la resistencia. Sin embargo, esta reversión puede que no logre que el nivel de genes sensibles a la droga retorne a sus niveles originales. Por otro lado, al retomar el uso de la droga se seguirán segregando genes para la resistencia y aunque esta droga vuelva a ser efectiva durante algunas generaciones, su uso continuo nos llevaría a tener una población resistente más rápidamente de lo que ocurrió en un principio (Prichard, *et al.*, 1980; Maingi, *et al.*, 1990) encontraron que la resistencia a benzimidazoles en *H. contortus* aumentaba a través de la selección, al igual que aumentaba la rusticidad y adaptación de estos individuos y concluyeron que con bajos niveles de resistencia la reversión a la susceptibilidad podría ocurrir, pero con niveles de resistencia altos la reversión sería muy poca o nula.

### 1.5.2. Diagnóstico de Resistencia

Para el diagnóstico se utilizan técnicas *in vivo*, *in vitro* y moleculares. Los métodos *in vivo* e *in vitro* son eficaces, pero sólo pueden detectar resistencia en poblaciones de nematodos cuando más del 25 % de a frecuencia génica es resistente. En cambio, el desarrollo de técnicas moleculares permite la detección temprana de cambios genéticos relacionados con la presencia de resistencia en las poblaciones (Nari y Eddi, 2002).

La técnica *in vivo* más ampliamente difundida y de uso común en todo el mundo es el test de reducción del recuento de huevos por gramo de materia fecal denominada TRCH (Coles, *et al.* 1992). Esta técnica provee una estimación de la eficacia antihelmíntica a través de la comparación de los hpg previo y post tratamiento. El Test de Eficacia Controlada (TEC) es el método más confiable para evaluar la sensibilidad de los nematodos a las drogas antihelmínticas, ya que consiste en el recuento de parásitos adultos alojados en el tracto digestivo a los 14 días post tratamiento (Wood, 1995).

Las técnicas *in vitro* son:

a) La prueba de eclosión de huevos para BZM: consisten en la incubación de huevos de nematodos en concentraciones seriadas de BZM por un tiempo predeterminado y luego evaluar la cantidad que falla a la eclosión.

b) Parálisis larval para LVM: determina el porcentaje de parálisis de L3 incubadas por 24 hs. en diluciones crecientes de LVM.

c) Unión a la tubulina para BZM: mide el grado de unión de la droga marcada con un isótopo radioactivo, a la tubulina de cepas de parásitos susceptibles y resistentes.

d) Test de desarrollo larval para todos los grupos químicos (LDA): Compara el bloqueo que se produce en el desarrollo de larvas L1-L3, incubadas en distintas concentraciones de drogas antihelmínticas, con un control (Craven, *et al.* 1999).

La mayoría de estos tests *in vitro* aún no están debidamente estandarizados y carecen de repetibilidad en los resultados entre distintos laboratorios.

Las técnicas moleculares detectan en forma precoz diferencias en el ADN entre cepas de parásitos resistentes y susceptibles a una droga. Las técnicas empleadas son:

- a) PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
- b) RAPD-PCR (amplificación al azar de sectores polimórficos de ADN)
- c) PCR Real Time (cuantificación de frecuencias alélicas)

Considerando que la resistencia de nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos se está desarrollando y expandiendo rápidamente en la producción ganadera y que estas drogas son la principal herramienta de control disponible, es imprescindible la búsqueda de nuevas estrategias de manejo con el fin de recobrar aceptables niveles de eficacia clínica y evitar o revertir la resistencia.

#### **1.6. Marco teórico de la tesis, hipótesis y objetivos**

La IVM ha sido masivamente utilizada en ovinos por vía subcutánea, dado que a partir de dicha vía se alcanzan mayores concentraciones plasmáticas del fármaco en comparación a las alcanzadas tras la administración oral. Estas mayores concentraciones determinan un incremento en la eficacia contra ectoparásitos y una prolongada persistencia de la actividad sobre nematodos gastrointestinales, con respecto a la administración enteral. Sin embargo, con la aparición de cepas resistentes a este fármaco, algunos reportes plantean una mayor eficacia de esta familia de drogas tras su administración oral (Gopal, *et al.*, 2001; Alka, *et al.*, 2004). Las bases farmacológicas que fundamentan estas observaciones son desconocidas. La evaluación de las concentraciones de droga en los sitios de localización parasitaria así como también la cuantificación del fármaco en parásitos provenientes de animales tratados se hace necesario para aportar mayor conocimiento sobre la acción de IVM sobre cepas sensibles y resistentes. El presente trabajo abordó esta problemática desde un enfoque integrador fármaco-parasitológico, en un intento de profundizar el conocimiento de la relación farmacocinética-farmacodinamia en fármacos endectocidas.

### **1.6.1. Hipótesis general**

La eficacia antihelmíntica de ivermectina contra nematodos gastro-intestinales resistentes a endectocidas es mayor tras la administración oral de este fármaco comparada con la administración subcutánea.

#### **1.6.1.1. Hipótesis particulares**

La mayor eficacia antihelmíntica de la ivermectina administrada por vía enteral se debe a:

- Las elevadas concentraciones de IVM obtenidas en el contenido gastrointestinal tras su administración enteral, las cuales son relevantes para mejorar su eficacia contra nematodos gastrointestinales resistentes.
- Una mayor importancia del pasaje trans-cuticular del fármaco comparado con la ingestión oral por parte del parásito.

### **1.6.2. Objetivos**

#### **1.6.2.1. Objetivo General**

Comparar la eficacia clínica y la farmacocinética de IVM administrada por diferentes vías (subcutánea e intraruminal), sobre cepas de parásitos resistentes a la misma.

#### **1.6.2.2. Objetivos específicos**

- Determinar las concentraciones plasmáticas de IVM tras su administración por vía intraruminal (IR) o subcutánea (SC).
- Determinar la concentración de IVM en los sitios de localización parasitaria, tras su administración por vía IR o SC.

- Cuantificar los niveles de IVM en *H. contortus* recuperados de animales tratados con IVM por vía IR o SC.
- Evaluar la eficacia clínica de IVM contra nematodos gastrointestinales resistentes, tras su administración por vía IR o SC.
- Relacionar las concentraciones de IVM obtenidas a partir de las diferentes vías de administración estudiadas, con los resultados de eficacia clínica.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Antecedentes de Resistencia en el Campo experimental - Reserva 8 de EEA INTA Balcarce

La RESERVA N° 8 posee registros de resistencia a los BZM desde 1986 (Entrocasso, 1988b). En 1997 se detectó resistencia a BZM e IVM, si bien se mantuvo la sensibilidad a Moxidectin (MXD) (Ferrería, 1997). En el año 2001 se detectó resistencia a IVM y MXD, siendo activo el LVM y CLS. Durante el año 2003 se analizó la situación y solo el LVM resultó ser efectivo manteniéndose la resistencia a BZM e IVM. En el año 2006, se realizó una prueba de eficacia y TRCH, utilizando IVM e BZM, observándose la reversión en la resistencia a la IVM y al BZM en menor medida (Entrocasso\*\*). En el cuadro siguiente se resumen los valores de eficacia en porcentajes, obtenidos durante el período 1986- 2008).

Porcentaje de reducción del hpg (TRCH)

Año	LVM	CLS	BZM	IVM	MXD
1986			resistencia		
1997	91,5	-	1,1	0	99,5
2001	98,8	93,6	-	51	65,2
2003	96,4	-	15	6,1	-
2006	-	-	44,3	77,9	-
2007	-	-	-	78,6	-
2008	-	-	54	-	-

A partir del año 2006, además de realizarse el TRCH, se llevó a cabo el TEC, dando en todos los casos una eficacia del 0 % para el género *Haemonchus* tanto en IVM como en BZM y eficacias menores al 90 % para las mismas drogas en *Trichostrongylus colubriformis* y *Nematodirus sp*.

---

\*\* ENTROCASSO, C. 2006. Comunicación Personal

## **2.2. Lugar**

El experimento fue realizado en la Reserva Experimental 8, Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, (Lat 37° 45´ S – Long 58° 18´O de Greenwich – 130 msnm) y el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).

## **2.3. Animales**

Se utilizaron 26 corderos de raza Romney Marsh de 7-8 meses de edad, provenientes de un campo de la localidad de Las Armas, donde no existen registros de resistencia a antihelmínticos comprobada. Los animales fueron desparasitados con LVM a razón de 1 ml/22 kg de peso vivo previo a su ingreso al potrero experimental. Los animales fueron identificados con doble caravana plástica.

## **2.4. Infestación**

### **2.4.1. Infestación natural**

Los animales fueron alojados en el potrero experimental durante 21 días. Dicho potrero presentaba una baja carga de larvas infestantes, determinada por medios convencionales de lavado de pastos.

### **2.4.2. Infestación artificial**

Para asegurar una carga apropiada de parásitos gastrointestinales, con predominio de *Haemonchus* spp. y *Trichostrongylus* spp., se realizó una infección artificial mediante la administración oral de un total de 4 inóculos, en un periodo de dos semanas. Luego del

primer inóculo, los animales fueron ubicados en un corral y alimentados con rollo de Moha y agua *ad libitum*.

#### **2.4.2.1. Preparación del inóculo**

Las larvas infestantes fueron obtenidas mediante el cultivo de materia fecal proveniente de animales infestados con cepas de parásitos propias de la Reserva 8, las cuales tienen antecedentes de resistencia a endectocidas. Se usó la técnica de Baermann para su recuperación, logrando un inóculo “multi- especie”.

La suspensión de larvas fue diluida hasta obtener suficiente cantidad de alícuotas con una concentración de 500 L3 de *Haemonchus spp* y 1000 L3 de *Trichostrongylus spp* y refrigerada a 4 °C para su conservación por no más de 20 días.

Previo a la administración del inóculo, se suspendieron las larvas en forma homogénea utilizando un agitador, y luego se procedió a constatar la viabilidad de las larvas y la concentración de la suspensión larvaria mediante la identificación y recuento bajo observación al microscopio óptico.

### **2.5. Tratamientos**

Los animales fueron divididos en 3 grupos homogéneos, teniendo en cuenta el peso corporal y el grado de infestación parasitaria, evaluado de acuerdo al hpg, previo al inicio del experimento. Se realizaron los siguientes tratamientos:

Grupo Control, constituido por 6 animales, no recibieron tratamiento antihelmíntico.

Grupo SC, constituido por 10 animales, los cuales se trataron con IVM (Ivomec®, Merial Argentina) por vía subcutánea (SC) a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo.

Grupo IR, constituido por 10 animales, los cuales se trataron con IVM (Ivomec Oral® Merial Uruguay) por vía intraruminal (IR) a la dosis de 0,2 mg/kg de peso vivo. Se administró por vía IR para garantizar la correcta dosificación, evitando pérdidas por regurgitación.

## **2.6. Determinaciones parasitológicas**

### **2.6.1. Carga parasitaria de los animales**

#### **2.6.1.1 Análisis coprológicos**

Se tomaron muestras de materia fecal, obtenidas del recto de cada animal, en bolsas de polietileno claramente identificadas con el número de caravana. Las muestras fueron procesadas de inmediato.

Las muestras se tomaron semanalmente previo al experimento, para estimar el grado de carga parasitaria, y luego al día 0, día 3, día 9 y día 15 post-tratamiento.

##### **2.6.1.1.1 Recuento de huevos por gramo en materia fecal (hpg)**

Para la cuenta de hpg se utilizó la técnica de Mc Master modificada (Robert y O`Sullivan, 1950) y para minimizar los errores de dilución se utilizaron factores de corrección (Skerman y Hillard, 1966) (ver apéndice I)

##### **2.6.1.1.2. Identificación de géneros en coprocultivos**

Se tomaron 10 g de materia fecal obtenido de un "pool" por grupo, y se realizó un coprocultivo, mediante la técnica de Henriksen y Korsholm (1983), para la obtención e identificación de larvas infestantes. La identificación de larvas se realizó por observación directa al microscopio óptico de 100 larvas obtenidas de cada cultivo (Niec, 1968), utilizando unas gotas de solución yodada para matar las larvas y facilitar la lectura (Fiel, *et al.* 1998).

## **2.6.2. Necropsias parasitarias**

A los 15 días post tratamiento se realizaron las necropsias de los 18 animales del estudio, previo noqueo y desangrado. Se tomaron alícuotas del 10 % del contenido abomasal, de intestino delgado y del intestino grueso y se reservaron en recipientes plásticos, para la recuperación de nematodos adultos (ver apéndice II).

Adicionalmente, 4 animales del Grupo II y 3 animales del Grupo III fueron sacrificados a las 72 hs post tratamiento. Se tomaron muestras de contenidos y mucosas gastrointestinales y material parasitario para la cuantificación de IVM, la identificación y el recuento de parásitos nematodos adultos.

### **2.6.2.1. Recuperación de nematodos**

Las muestras de abomaso e intestino fueron lavadas para su clarificación en frascos con una malla de 38  $\mu\text{m}$  en la tapa y las muestras transferidas a frascos de boca ancha con el agregado de unas gotas de formol al 10 %,

### **2.6.2.2. Conteo e identificación de parásitos adultos**

Las muestras se colocaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, se agregaron unas gotas de solución yodada y se procedió al conteo de cada género parasitario, con luz inversa. Para la identificación de los géneros se colocaron los nematodos en portaobjetos, para ser observados en sus estructuras con microscopio óptico a mayor aumento.

### **2.6.2.3. Interpretación de los datos**

El porcentaje de reducción de la cuenta de huevos por gramo de materia fecal (TRCH) se calculó mediante la siguiente fórmula: % reducción =  $100 * (1 - X_t / X_c)$  donde  $X_t$  es la media aritmética del grupo tratado al día 15 y  $X_c$ , es la media aritmética del grupo control al día 15. (Coles, *et al.* 1992).

Para el porcentaje de eficacia, calculado mediante el TEC, se utilizó la siguiente fórmula: % Eficacia =  $((\text{media de E en C} - \text{media de E en T}) / \text{media de E en C}) * 100$ , donde E es una especie parásita determinada, T el grupo tratado, y C el grupo Control (Wood, *et al.* 1995).

## **2.7. Determinaciones Farmacológicas**

### **2.7.1. Estudio Farmacocinético**

#### **2.7.1.1. Preparación de estándares**

Se prepararon estándares de IVM en metanol (inyección directa) y plasma, utilizando droga pura en un rango de concentraciones entre 0.10 y 50 ng/ml, con estándar interno. El plasma se obtuvo de ovinos sin tratamiento previo. Como estándar interno se utilizó 10 ng de abamectina (ABM) por muestra. Los estándares fueron utilizados para la elaboración de las curvas de calibración y validación de la metodología analítica.

#### **2.7.1.2. Obtención de las muestras**

Se extrajeron muestras de sangre (7 ml) por punción venosa de cada animal. Las mismas fueron obtenidas en tubos heparinizados (Vacutainer®, Becton Dickinson, N.J., USA) de los animales de los grupos SC e IR a los siguientes tiempos de acuerdo al tratamiento: 0, 3, 6, 9 y 24 hs y 2, 3, 5, 7, 9, 12 y 15 días post tratamiento. Al grupo Control) se le extrajeron muestras de sangre a la hora 0 y el día 15 post tratamiento.

Dichas muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm y el plasma obtenido fue trasvasado a tubos colectores plásticos y posteriormente congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento.

Las muestras de tejidos fueron obtenidas durante la necropsia. Se recolectaron muestras de mucosa abomasal e intestinal, contenido abomasal e intestinal y parásitos adultos presentes en el abomaso. Cada muestra debidamente identificada fue almacenada en viales y congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis por HPLC (cromatografía líquida de alta performance).

#### **2.7.1.3. Extracción físico-química y análisis cromatográfico con detección de fluorescencia**

Las muestras de plasma fueron sometidas a un proceso de extracción y posterior derivatización para luego ser analizadas por HPLC con detector de fluorescencia, después de la separación por fase sólida de acuerdo al procedimiento descrito por Alvinieri, *et al.*, (1993); Lifschitz, *et al.*, (1999 a y 2000) y De Montigny, *et al.*, (1990) (ver apéndice III).

#### **2.7.1.4. Cuantificación de concentraciones y validación de la metodología analítica**

Acorde con los parámetros internacionalmente aceptados para métodos cromatográficos se realizó la validación de la metodología analítica. Se determinó la especificidad, linealidad, porcentaje de recuperación, precisión analítica y límites de cuantificación y detección (ver apéndice IV).



## **2.8. Análisis de datos**

### **2.8.1. Análisis farmacocinético**

El Análisis farmacocinético fue realizado mediante el programa PK solutions 2.0 (Ashland, Ohio, USA). Se determinó la constante de absorción ( $K_{ab}$ ) usando el método de residuales. La constante de eliminación ( $\beta$ ) se calculó tomando 4 o 5 puntos de las fases de eliminación. La vida media de absorción ( $t_{1/2 ab}$ ) y la vida media de eliminación ( $t_{1/2 el}$ ) fueron calculadas de la siguiente manera: logaritmo natural de  $2/K_{ab}$  y logaritmo natural de  $2/\beta$ . Las concentraciones máximas ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y el tiempo en que se alcanzan ( $T_{m\acute{a}x}$ ), fueron leídas en las curvas de concentración – tiempo de la droga en cada animal. El área bajo la curva (ABC) fue calculada por el método de los trapezoides y el tiempo medio de residencia (TMR) se calculó por análisis no – compartamental aplicando la teoría del momento estadístico:

$TMR = ABMC / ABC$  donde ABC fue definido previamente y ABMC es el área bajo el momento de la curva extrapolada al infinito. Las concentraciones plasmáticas de IVM y los parámetros farmacocinéticos fueron presentados como promedios y con sus correspondientes desvíos estándar (Lifschitz, 2000)

### **2.8.2. Análisis estadístico**

Las medias de las variables parasitológicas fueron comparadas por Kruskal Wallis. Para ello se utilizó Statistical Analysis System (SAS) (versión 9.1) procedimiento NPAR1WAY y el test WILCOXON.

Las medias aritméticas fueron calculadas por las fórmulas usuales y las medias geométricas mediante la transformación del hpg individual ( $\log_{10} hpg + 1$ ).

Los promedios de los parámetros farmacocinéticos fueron comparados para las dos vías de administración, utilizando el programa InStat 3.0 (Graph pad software Inc. San

Diego, USA) utilizando t de student para comparación de medias y Mann Whitney para las variables que no presentaron una distribución normal.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. Carga parasitaria de los animales previa a la inoculación

Los animales fueron desparasitados con LVM (SC, dosis 1ml/22,5 kg pv, Fosfamisol®, Biogénesis-Bagó, Argentina) previo a su ingreso al potrero experimental. A los 5 días post- tratamiento, la cuenta de hpg arrojó un promedio de 0.

A los 20 días post-tratamiento con LVM el hpg arrojó un promedio de 402 ( $\pm$  389.9) con la siguiente composición genérica: *Haemonchus spp* 25 %, *Teladorsagia spp* 35 %, *Trichostrongylus spp* 35 %, *Cooperia spp* 0 % y *Chabertia spp* 5 %. En esta misma fecha se realizó la primera inoculación con larvas infestantes por vía oral.

15 días después el promedio de la cuenta de hpg fue de 2010 ( $\pm$  3568.9). La composición genérica fue la siguiente: *Haemonchus sp* 92 %, *Teladorsagia sp* 4 %, *Trichostrongylus sp* 0 %, *Cooperia sp* 2 % y *Chabertia sp* 0 %.

A los 30 días de la primera inoculación la cuenta de hpg arrojó un promedio de 3744 ( $\pm$  2603.9) con la siguiente composición genérica: *Haemonchus spp* 76 %, *Teladorsagia spp* 12 %, *Trichostrongylus spp* 4 %, *Cooperia spp* 0 % y *Chabertia spp* 8 %.

### 3.2. Peso vivo y carga parasitaria inicial por grupos

El peso vivo inicial de los animales varió entre 20.4 a 35.6 kg, con un promedio de 25.6 ( $\pm$  4.2), 29.7 ( $\pm$  3.0), 26.2 ( $\pm$  5.5) para los grupos control, SC e IR, respectivamente. La carga parasitaria estimada promedio fue de 2867( $\pm$  1257.5), 2930( $\pm$  1209.2) y 2883( $\pm$  1192.0), para cada grupo antes mencionado (TABLA 1).

Los pesos promedios de los animales que fueron destinados a necropsia al día 3 del experimento fue de 28.6 y 25.3 kg ( $\pm$  4.1 y 7.6) para los grupos SC e IR respectivamente y los hpg fueron de 3060 y 1500 ( $\pm$  3637.8 y 1431.6) para los mismos grupos (TABLA 2)

En Los TABLAS 1 y 2 se muestran los valores promedios de la cuenta de hpg y el peso vivo de los animales al comienzo del período experimental (La información individual está en la TABLA I y TABLA II del Apéndice). En base a estos resultados fueron confeccionados los grupos de tratamiento.

**TABLA 1:** Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg) y peso vivo inicial (promedio) y desvío estándar, en los animales del Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR

	CONTROL		SC		IR	
	hpg	PV	hpg	PV	hpg	PV
<b>PROM.</b>	<b>2867</b>	<b>25.63</b>	<b>2930</b>	<b>29.7</b>	<b>2883</b>	<b>26.2</b>
<b>DE</b>	1257.5	4.2	1209.2	3.0	1192.0	5.5

PV: peso vivo; hpg: huevos por gramo de materia fecal, PROM. : promedio; DE: Desvío estándar

**TABLA 2:** Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg) y peso inicial (promedio) y desvío estándar en los animales del Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR sacrificados a los 3 días post tratamiento

	SC		IR	
	hpg	P.V.	hpg	P.V.
<b>PROM.</b>	<b>3060</b>	<b>28.6</b>	<b>1500</b>	<b>25.3</b>
<b>DE</b>	3637.8	4.1	1431.6	7.6

PV: peso vivo; hpg: huevos por gramo de materia fecal, PROM. : promedio; DE: Desvío standard

### 3.3. Resultados de hpg y TRCH

Al día 3 post tratamiento el recuento de hpg se redujo un 47.1 % en el grupo tratado en forma SC y un 77.6 % en el grupo tratado en forma IR. (TABLA 3). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo IR y los grupos Control y SC no así entre el grupo Control y SC. ( $p \leq 0.05$ ), Los valores individuales se encuentran en TABLA III del apéndice.

A los 9 días post tratamiento, el grupo SC presentó una reducción de la cuenta total de hpg de 48 % y el grupo IR de 72 % con respecto al grupo Control (TABLA 3). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo Control y los tratados, pero no entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (Los valores individuales se hallan en TABLA IV del apéndice).

Al día 15 post tratamiento los valores de la cuenta total de hpg aumentó en todos los grupos con diferente intensidad. El hpg total del grupo SC, se redujo un 45,5 % mientras que el del grupo IR se redujo un 51.7 % con respecto al grupo Control (TABLA 3). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre tratamientos y el grupo Control. ( $p \leq 0.05$ ). Los valores individuales se muestran en el TABLA V del apéndice.

Los valores de hpg se mantuvieron estables durante el experimento para el grupo control con promedios aritméticos de 4420, 4300 y 4803.3 para los días 3, 9 y 15 postratamiento respectivamente. El grupo SC manifestó una reducción de la cuenta de huevos al día 3, que se mantuvo también estable durante el período experimental, con promedios de 2340, 2250 y 2620 para los días 3, 9 y 15 postratamiento. El grupo IR, sin embargo, marcó una importante reducción al día 3, que fue aumentando progresivamente hacia el día 15, con promedios de 990, 1190 y 2320 para los días 3, 9 y 15 respectivamente (TABLA 3). Los valores individuales se muestran en TABLA VI del apéndice.

**TABLA 3:** Comparación del hpg entre los diferentes grupos experimentales (Grupo Control, Grupo SC y Grupo IR) y en los 3 tiempos de muestreo

	hpg Día 3	hpg Día 9	hpg Día 15
<b>CONTROL</b>			
Xa	4420 <sup>a</sup>	4300 <sup>a</sup>	4803.3 <sup>a</sup>
DE	2500.1	2342.5	3627.6
IC	64.0	25.2	44.8
<b>SC</b>			
Xa	2340 <sup>a</sup>	2250 <sup>b</sup>	2620 <sup>a</sup>
DE	1748.9	1864.3	1697.8
IC	60.0	5.1	47.7
<b>% reducción</b>	<b>47.1</b>	<b>47.7</b>	<b>45.5</b>
<b>IR</b>			
Xa	990 <sup>b</sup>	1190 <sup>b</sup>	2320 <sup>a</sup>
DE	983.52	198.7	1433.71
IC	92.9	36.7	44.8
<b>% reducción</b>	<b>77.6</b>	<b>72.3</b>	<b>51.7</b>

Xa: media aritmética; DE: desvío estándar; IC: intervalo de confianza; % reducción: reducción del hpg en porcentaje. Letras iguales: no hay diferencia significativa entre grupos por día ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. Coprocultivos

Los cultivos de materia fecal mostraron una composición genérica al día 3 post-tratamiento similar para los grupos Control y SC y compuesto por un solo género para el grupo IR (TABLA 4). Al día 9, la composición genérica fue más homogénea entre grupos. (TABLA 5) y al día 15 post-tratamiento hay un predominio de *Haemonchus spp* sobre los otros géneros, en los grupos SC e IR (TABLA 6).

**TABLA 4:** Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 3 post-tratamiento

	<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Oesophagostomun</i>	<i>Nematodirus</i>
<b>Control</b>	52	6	20	4	18	0
<b>SC</b>	62	16	18	4	0	0
<b>IR</b>	100	0	0	0	0	0

**TABLA 5:** Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 9 post-tratamiento

	<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Oesophagostomun</i>	<i>Nematodirus</i>
<b>Control</b>	44	14	10	8	23	1
<b>SC</b>	80	16	4	0	0	0
<b>IR</b>	74	6	14	2	4	0

**TABLA 6:** Géneros parasitarios (%) presentes en el cultivo de materia fecal de cada grupo (Control, SC e IR), al día 15 post-tratamiento

	<i>Haemonchus</i>	<i>Teladorsagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Oesophagostomun</i>	<i>Nematodirus</i>
<b>Control</b>	68	8	14	4	6	0
<b>SC</b>	22	18	58	0	2	0
<b>IR</b>	78	6	8	2	6	0

### 3.5. Recuento de parásitos adultos en el abomaso y TEC

Los parásitos adultos contados en los diferentes sectores del tracto digestivo sumaron un total promedio, en media geométrica, por grupo de 4376.0 ( $\pm$  1.48) para el grupo control, 1299.7 ( $\pm$  3.1) para el grupo SC y 206.1 ( $\pm$  4.0) para el grupo IR mientras que la media aritmética para dichos grupos fue de 7368.33, 3255 y 341.67, respectivamente ( $\pm$  3032.4; 3939.3 y 233.5). La eficacia por media geométrica total fue de 70.3 % y 95.29 % para los grupos SC e IR respectivamente mientras que la eficacia aritmética fue de 55.82 % y 95.36 % para dichos grupos (TABLA 7). Los valores individuales se muestran en la TABLA VII del apéndice.

**TABLA 7:** Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentaje de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR), en la suma total de parásitos del tracto gastrointestinal

<b>Total de parásitos adultos</b>						
	<b>Control</b>		<b>SC</b>		<b>IR</b>	
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	7368.3	4376.0 <sup>a</sup>	3255	1299.7 <sup>c</sup>	341.7	206.1 <sup>b</sup>
<b>DE</b>	3032.4	1.5	3929.3	3.1	233.5	4.0
<b>EFICACIA</b>			<b>55.8</b>	<b>70.3</b>	<b>95.4</b>	<b>95.3</b>

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvío estándar; EFICACIA: expresada como porcentaje. A letras iguales no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



### 3.5.1. Cuenta de parásitos adultos en el abomaso y TEC en abomaso

Considerando solamente los parásitos adultos hallados en el abomaso, se contó un promedio geométrico de 1740,62 en el grupo control; 829,16 en el grupo SC y 313,85 en el grupo IR, existiendo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo IR ( $p \leq 0.05$ ). Las eficacias en abomaso fueron de 52.4 % y de 81.9 % para los grupos SC e IR respectivamente. (TABLA 8). Si se consideran los promedios geométricos por género parasitario resultaron para el género *Haemonchus* spp. de 502,37, 597,4 y 300,15 para los grupos control, SC e IR respectivamente, con eficacias de -18,9 % y 40,5 % para los dos tratamientos; sin encontrarse diferencia significativa entre los grupos ( $p \leq 0.05$ ). Para el género *Teladorsagia* spp. los promedios fueron de 789.77, 36.08 y 3.22 para los grupos Control, SC e IR, con eficacias de 95.4 % y 99.59 % para los grupos tratados respectivamente. Se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos y entre cada tratamiento y el grupo control ( $p \leq 0.05$ ). En la especie *Trichostrongylus axei*, los promedios fueron de 322.0, 20.6 y 0.6 para los grupos C, SC e IR, respectivamente, y las eficacias fueron de 93,6 (SC) y 99.8 (IR) observándose diferencias significativas entre los tratamientos y entre cada tratamiento y el grupo control ( $p \leq 0.05$ ) (TABLA 8). Los valores individuales se muestran en TABLA VIII del apéndice.

**TABLA 8:** Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del abomaso y en cada uno de los géneros presentes hallados al día 15 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos en abomaso</b>								
	<b>Haemonchus sp</b>		<b>Teladorsagia sp</b>		<b>T. axei</b>		<b>Total Abomaso</b>	
<b>CONTROL</b>								
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	575	502.4 <sup>a</sup>	885	789.8 <sup>a</sup>	405	322.0 <sup>a</sup>	1865	1740.6 <sup>a</sup>
<b>DE</b>	307.7	1.8	470.6	1.7	267.0	2.2	802.6	1.5
<b>SC</b>								
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	743.3	597.4 <sup>a</sup>	178.3	36.1 <sup>b</sup>	90.0	20.6 <sup>b</sup>	1011.7	829.2 <sup>ab</sup>
<b>DE</b>	534.8	2.1	331.4	1.1	156.2	7.9	687.6	2.0
<b>EFIC.</b>	<b>-29.3</b>	<b>-18.9</b>	<b>79.8</b>	<b>95.4</b>	<b>77.8</b>	<b>93.6</b>	<b>45.7</b>	<b>52.4</b>
<b>IR</b>								
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	386.0	300.1 <sup>a</sup>	6.0	3.2 <sup>c</sup>	2.0	0.6 <sup>c</sup>	370.8	313.8 <sup>b</sup>
<b>DE</b>	191.6	2.7	5.5	3.7	4.5	2.9	196.7	2.7
<b>EFIC.</b>	<b>32.9</b>	<b>40.2</b>	<b>99.3</b>	<b>99.6</b>	<b>99.5</b>	<b>99.8</b>	<b>80.2</b>	<b>81.9</b>

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar; EFIC.: Porcentaje de eficacia. A letras iguales no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.5.2. Recuento de parásitos adultos en el intestino y TEC en Intestino

En el intestino las medias geométricas para cada tratamiento fueron de 2334.5, 113 y 2.82 para los grupos Control, SC e IR con eficacias de 59.2 y 99.9 para cada tratamiento respectivamente, encontrándose diferencias significativas de los tratamientos con respecto al grupo Control y entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ )(TABLA 9). Los valores individuales se hallan en TABLA IX del apéndice.

**TABLA 9:** Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino, al día 15 post-tratamiento

<b>Total de parásitos adultos en Intestino</b>						
<b>CONTROL</b>		<b>SC</b>		<b>IR</b>		
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	2751.6	2334.5 <sup>a</sup>	1121.7	113 <sup>b</sup>	6.7	2.8 <sup>c</sup>
<b>DE</b>	1422.8	2.1	1723.3	21.0	8.2	8.2
<b>EFICACIA</b>			<b>59.2</b>	<b>95.2</b>	<b>99.8</b>	<b>99.9</b>

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar; EFICACIA: Porcentaje de eficacia. A letras iguales no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En los géneros parasitarios presentes en el intestino delgado, los resultados fueron los siguientes: Para *Trichostrongylus colubriformis* las medias geométricas fueron de 1490.7, 96.0 y 1.5 para los grupos Control, SC e IR respectivamente con eficacias de 93.6 y 99.9 para cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre cada tratamiento y el control y entre tratamientos entre si ( $p \leq 0.05$ ). En el género *Cooperia*, las medias geométricas fueron de 220.7, 5.2 y 0 para los grupos C, SC e IR respectivamente, con eficacias de 97.6 % y 100 % para cada grupo tratado, encontrándose diferencias significativas entre cada grupo tratado y el grupo control ( $p \leq 0.05$ ). Para el género *Nematodirus*, las medias geométricas arrojaron valores de 342.1, 7.8 y 0.5 para los grupos Control, SC e IR respectivamente con eficacias de 95.7 y 99.9 para los grupos tratados. Se hallaron diferencias significativas entre el grupo Control y los grupos tratados ( $p \leq 0.05$ ) (TABLA 10). Los valores individuales se muestran en TABLA X del apéndice.

**TABLA 10:** Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino delgado y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos en Intestino delgado</b>							
		<i>T. colubriformis</i>		<i>Cooperia</i>		<i>Nematodirus</i>	
<b>CONTROL</b>							
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	1888.3	1490.7 <sup>a</sup>	348.3	220.7 <sup>a</sup>	386.7	342.1 <sup>a</sup>	
<b>DE</b>	1121.8	2.3	294.4	3.1	189.7	1.8	
<b>SC</b>							
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	770.0	96.0 <sup>b</sup>	811.7	5.2 <sup>b</sup>	266.7	7.8 <sup>b</sup>	
<b>DE</b>	1134.8	18.0	129.7	17.0	484.4	29.8	
<b>EFICACIA</b>	<b>59.2</b>	<b>93.6</b>	<b>76.5</b>	<b>97.6</b>	<b>31.0</b>	<b>95.7</b>	
<b>IR</b>							
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	5.0	1.5 <sup>c</sup>	0	0 <sup>b</sup>	1.7	0.5 <sup>c</sup>	
<b>DE</b>	191.6	8.4	5.5	0	4.5	4.1	
<b>EFICACIA</b>	<b>99.7</b>	<b>99.9</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>99.6</b>	<b>99.9</b>	

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar; EFICACIA: Porcentaje de eficacia. A letras iguales no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

En el intestino grueso, el género *Oesophagostomum* arrojó valores de media geométrica de 54.3, 0.66 y 0 para los grupos Control, SC e IR respectivamente con eficacias de 98.8 % y 100 % para cada grupo tratado. En el género *Chabertia*, las medias geométricas fueron de 27.21, 0 y 0, para los grupos Control, SC e IR respectivamente. Ambos grupos tratados con eficacias del 100 % y para el género *Trichuris* las medias geométricas fueron de 19.7, 0 y 0 para los grupos Control, SC e IR, también con eficacias del 100 % para los grupos tratados. En todos los géneros las diferencias fueron significativas entre el grupo control y los grupos tratados, sin diferencias entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (TABLA 11). Los valores individuales se muestran en TABLA XI del apéndice.

**TABLA 11:** Media aritmética, media geométrica, desvíos estándar y porcentajes de eficacia para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino grueso y en cada uno de los géneros presentes al día 15 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos en Intestino grueso</b>							
		<b><i>Oesophagostomum</i></b>		<b><i>Chabertia</i></b>		<b><i>Trichuris</i></b>	
<b>CONTROL</b>							
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	70	54.3 <sup>a</sup>	35	27.21 <sup>a</sup>	23.3	19.27 <sup>a</sup>	
<b>DE</b>	44.7	2.44	25.1	2.23	15.0	1.97	
<b>SC</b>							
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	3.3	0.7 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	
<b>DE</b>	8.2	3.5	0	1	0	1	
<b>EFICACIA</b>	<b>95.2</b>	<b>98.8</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	
<b>IR</b>							
<b>Medias</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	
	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	
<b>DE</b>	1	0	1	0	1	0	
<b>EFICACIA</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar; EFICACIA: Porcentaje de eficacia. A letras iguales no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.5.3. Cuenta de parásitos adultos en el abomaso de los animales sacrificados al día 3 post-tratamiento

El promedio geométrico de la cuenta de parásitos adultos totales del tracto gastrointestinal fue de 431.05 ( $\pm 1.36$ ) y 65.4 ( $\pm 1.64$ ) para los grupos SC e IR respectivamente. (TABLA 12) Encontrándose en el abomaso un promedio geométrico de 424.85 ( $\pm 11.32$ ) para el grupo SC y 67.22 ( $\pm 1.62$ ) para el grupo IR. De los cuales del género *Haemonchus* se encontró un promedio de 416,7 ( $\pm 1.29$ ) y 67.22 ( $\pm 1.62$ ) para cada grupo tratado; *Trichostrongylus axei* 3.66 ( $\pm 2.66$ ) y 0 para cada grupo, no encontrándose el género *Teladorsagia* presente (TABLA 13).

En intestino se encontró un promedio geométrico de 3.66 ( $\pm 2.66$ ) parásito adultos en el grupo SC, mientras que no se encontraron parásitos en el grupo IR. Este promedio

correspondió sólo a la presencia del género *Nematodirus* (TABLA 14). Los valores individuales se hallan en las TABLAS XII, XIII y XIV de apéndice.

**TABLA 12:** Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar, para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos al día 3 post-tratamiento

<b>Total de Parásitos adultos: día 3</b>					
<b>SC</b>			<b>IR</b>		
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	<b>780.0</b>	<b>431.0</b>		<b>204.0</b>	<b>65.4</b>
<b>DE</b>	957.0	1.4	<b>DS</b>	343.9	1.6

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar.

**TABLA 13:** Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del abomaso y en cada uno de los géneros presentes al día 3 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos en abomaso: día 3</b>								
<i>Haemonchus sp</i>		<i>Teladordagia sp</i>		<i>T. axei</i>		<b>Total Abomaso</b>		
<b>SC</b>								
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	<b>713.3</b>	<b>416.7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>33.3</b>	<b>3.7</b>	<b>746.7</b>	<b>424.8</b>
<b>DE</b>	843.1	1.3	0	0	57.7	2.7	900.5	11.3
<b>IR</b>								
<b>Media</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>	<b>Xa</b>	<b>Xg</b>
	<b>204.5</b>	<b>67.2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>204.5</b>	<b>67.2</b>
<b>DE</b>	343.9	1.6	0	0	0	0	343.9	1.6

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar

**TABLA 14:** Media aritmética, media geométrica y desvíos estándar para cada grupo (Control, SC e IR) en el total de parásitos adultos del intestino y en cada uno de los géneros presentes al día 3 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos Intestino: día 3</b>														
	<i>T. Col.</i>	<i>Cooperia</i>	<i>Nematod.</i>	<i>Oesphag.</i>	<i>Chabertia</i>	<i>Trichuris</i>	Total intestino							
<b>SC</b>														
Media	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg
	0	0	0	0	33.3	3.7	0	0	0	0	0	0	33.3	3.7
DE	0	0	0	0	57.7	2.7	0	0	0	0	0	0	57.7	2.7
<b>IR</b>														
Media	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg	Xa	Xg
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Xa: media aritmética; Xg: media geométrica; DE: desvíos estándar

### 3.6. Validación de métodos cromatográficos de IVM en plasma, tejidos gastrointestinales y parásitos

La metodología analítica de extracción físico-química, derivatización y análisis por HPLC de IVM se validó adecuadamente en las diferentes matrices bajo estudio. La identificación de IVM y ABM se realizó en base a los tiempos de retención de estándares de referencia de óptima pureza. La FIGURA 2 muestra corridas cromatográficas de un patrón de IVM en plasma mucosa gastrointestinal y *Haemonchus contortus*. Las curvas de calibración construidas por el método de regresión lineal en los diferentes rangos para las matrices bajo estudio mostraron coeficientes de determinación superiores a 0.98. Las FIGURAS 3 Y 4 muestran a manera de ejemplo curvas de calibración en plasma y en mucosa gastrointestinal. El porcentaje de recuperación promedio de IVM desde diferentes matrices estuvo por encima de 70 %. El límite de detección y cuantificación establecido en plasma resultó de 0.03 y 0.06 ng/ml respectivamente. La precisión analítica obtenida luego de la extracción y análisis por HPLC de estándares de IVM estudiadas en los diferentes contenidos y tejidos, resultó en un coeficiente de variación menor a 10 %, lo que indica el importante grado de reproducibilidad del método. La TABLA 15 muestra un

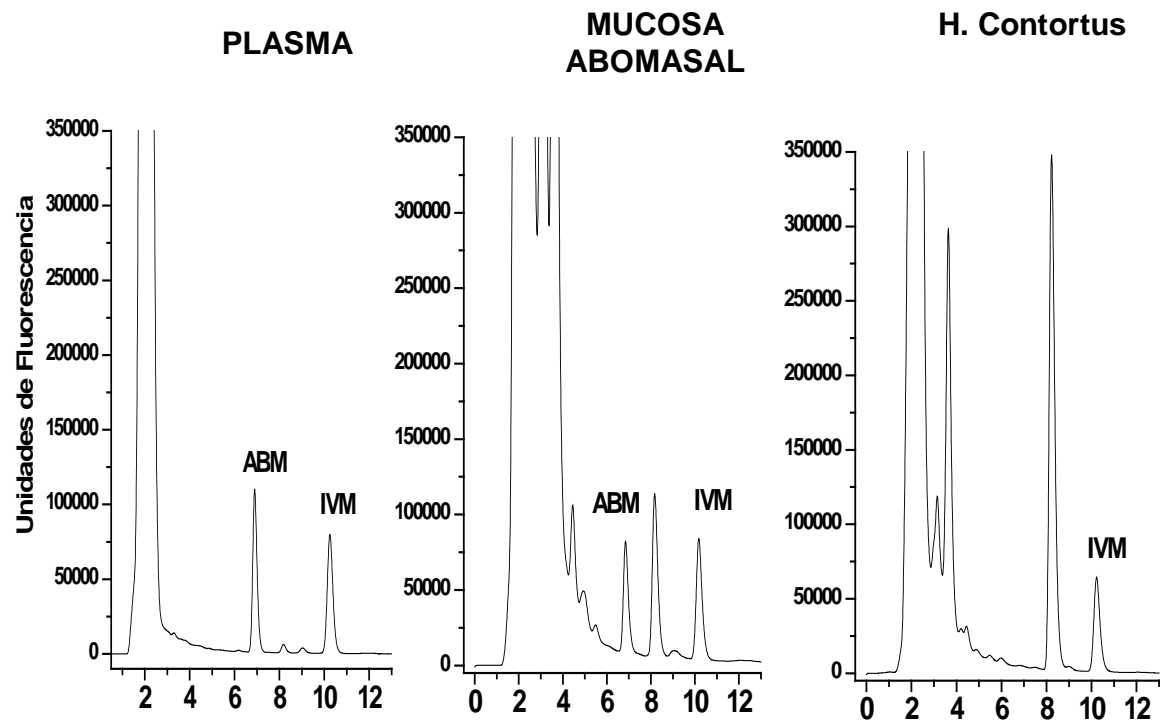
resumen de los parámetros de validación obtenidos en plasma, en contenidos/tejidos gastrointestinales y en *H. contortus*.

**TABLA 15:** Resumen de los diferentes parámetros de validación obtenidos para las metodologías de extracción y análisis por HPLC de IVM en diferentes matrices biológicas

<b>Contenido /tejido</b>	<b>Linealidad (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Porcentaje de recuperación</b>	<b>Precisión (CV %)</b>
<b>Plasma</b>	0.999	96	7.00
<b>Contenido</b>	0.995	84	3.11
<b>Mucosa gastrointestinal</b>	0.999	86	1.49
<b><i>Haemonchus contortus</i></b>	0.982	88	6.97

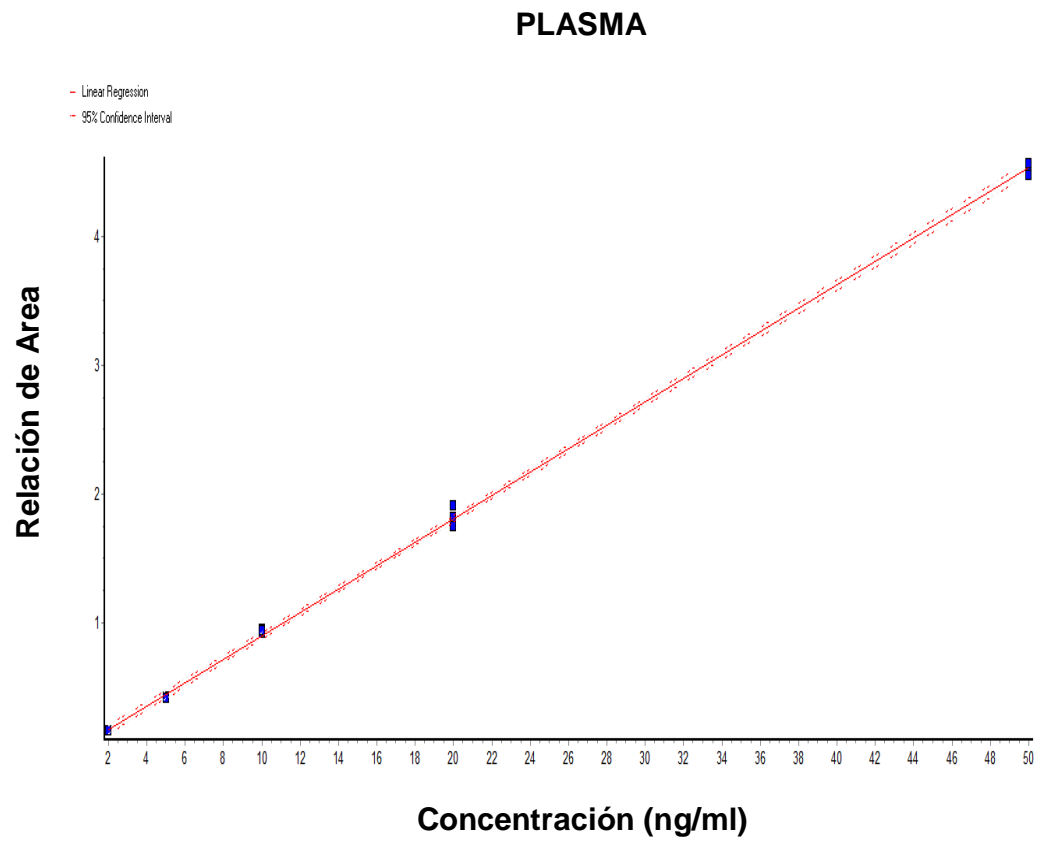
R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación CV. Coeficiente de variación





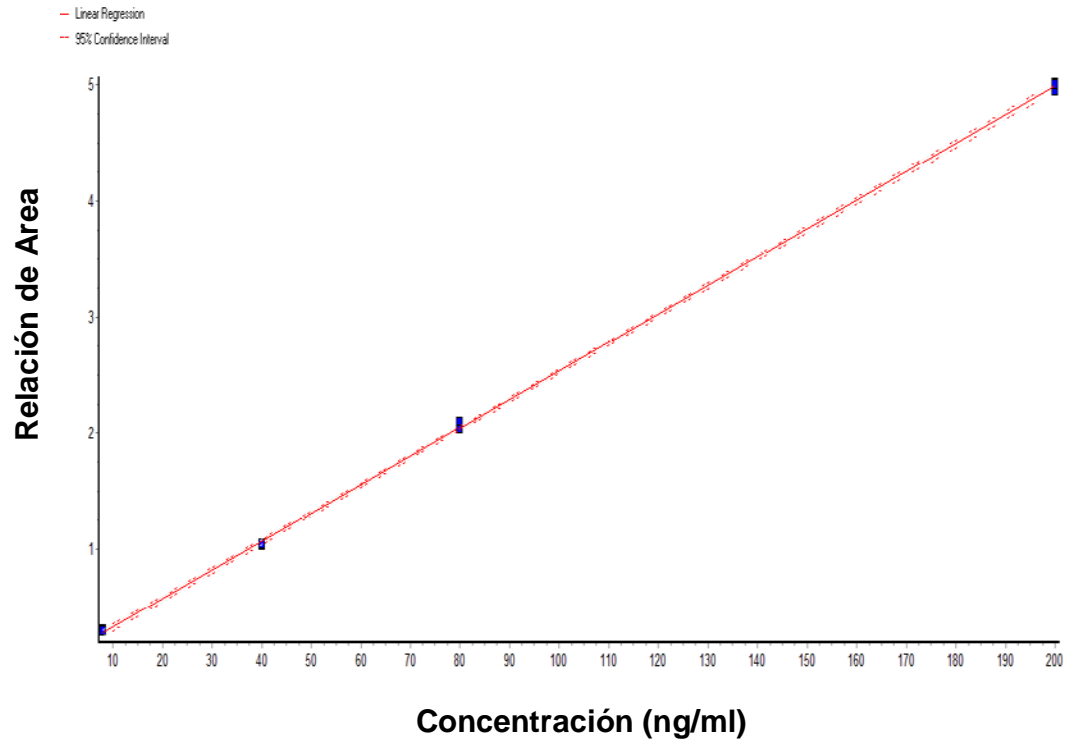
**FIGURA 1:** Corridas cromatográficas típicas de IVM obtenidas luego de la extracción físico-química desde diferentes matrices biológicas

ABM: abamectina



**FIGURA 2:** Curva de calibración obtenida para IVM en plasma

## MUCOSA GASTROINTESTINAL



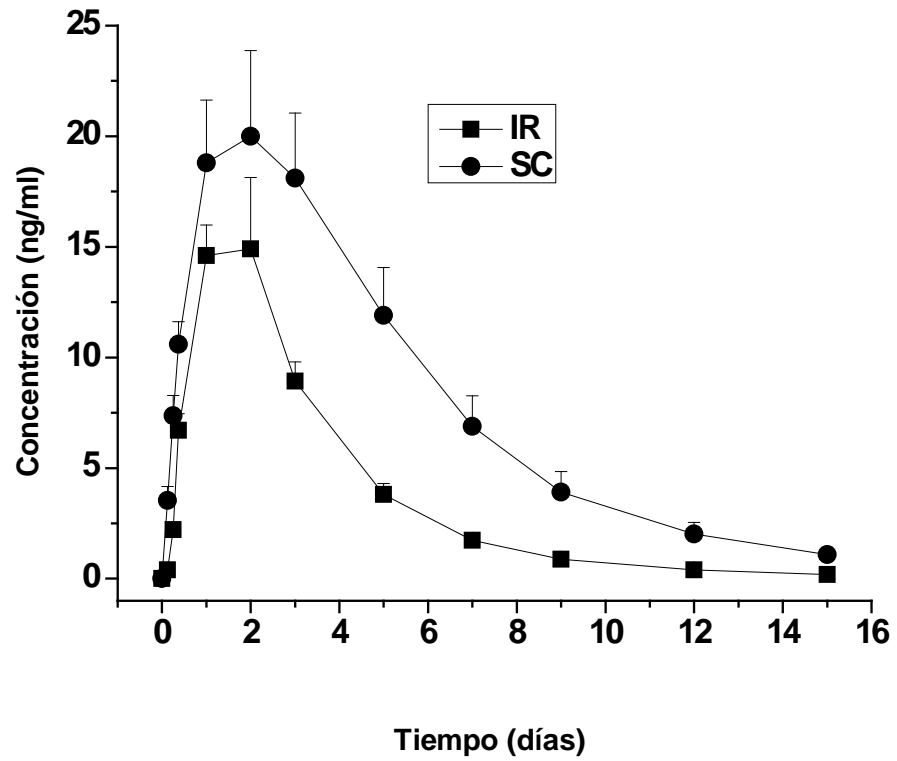
**FIGURA 3:** Curva de calibración obtenida para IVM en mucosas gastrointestinales

### 3.7. Cinética plasmática

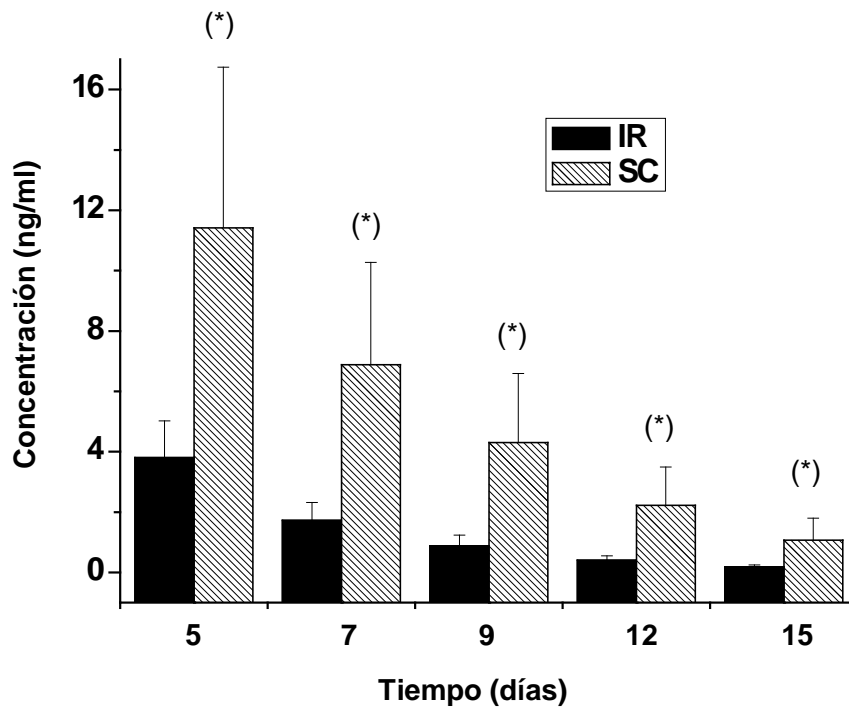
Ivermectina fue detectada en plasma desde su administración hasta los 15 días luego de su administración SC e IR. Las concentraciones de IVM en plasma tras la administración subcutánea fueron mayores en todos los puntos de muestreo a las observadas tras la administración IR. Por ejemplo al día 2 post-tratamiento las concentraciones promedio de IVM fueron 20 ng/ml (SC) y 13.8 ng/ml (IR). Sin embargo las mayores diferencias fueron observadas tras los 5 días post-tratamiento. Las concentraciones de IVM fueron entre 3 y 6 veces mayores tras la administración SC entre los días 5 y los 15 post-tratamiento. La FIGURA 5 muestra el perfil de concentraciones

plasmáticas promedio de IVM tras su administración por ambas vías. La FIGURA 6 muestra las concentraciones de IVM en plasma entre los 5 y 15 días post-administración por ambas vías. Las concentraciones plasmáticas individuales para cada grupo se muestran en el apéndice TABLAS XV y XVI.

Las diferencias observadas en los perfiles de concentraciones plasmáticas se reflejaron en los valores de parámetros farmacocinéticos. La exposición sistémica medida como ABC fue 2.20 mas alta luego de la administración SC respecto a la IR ( $P < 0.05$ ). Por otra parte la persistencia de concentraciones en plasma fue más prolongada luego de la administración SC lo que se reflejó en mayores valores de  $T_{1/2}$  el y de TMR ( $P < 0.05$ ). Los valores individuales se muestran en el apéndice TABLAS XVII y XVIII.



**FIGURA 4:** Perfil de concentraciones plasmáticas promedios ( $\pm$  DE) de ivermectina (IVM) tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos



**FIGURA 5:** Concentraciones plasmáticas promedios ( $\pm$  DE) de ivermectina (IVM) tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos obtenidos entre los 5 y los 15 días post-administración. (\*) Concentraciones significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

**TABLA 16:** Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración subcutánea (SC) e intraruminal (IR) de ivermectina (IVM) a ovinos a razón de 0.2 mg/kg

Parámetros Cinéticos	IVM SC	IVM IR
<b>T 1/2 ab (días)</b>	<b>0.54 ± 0.28</b>	<b>0.33 ± 0.11</b>
<b>Tmax (días)</b>	<b>1.67 ± 0.52</b>	<b>1.33 ± 0.52</b>
<b>Cmax (ng/ml)</b>	<b>22.2 ± 9.03</b>	<b>17.2 ± 7.30</b>
<b>ABC (ng.d/ml)</b>	<b>129 ± 41.5<sup>a</sup></b>	<b>58.4 ± 13.0<sup>b</sup></b>
<b>ABMC (ng.d<sup>2</sup>/ml)</b>	<b>693 ± 283</b>	<b>194 ± 46.1</b>
<b>TMR (días)</b>	<b>5.65 ± 2.90<sup>a</sup></b>	<b>3.32 ± 0.39<sup>b</sup></b>
<b>T 1/2 el (días)</b>	<b>3.43 ± 2.23<sup>a</sup></b>	<b>2.07 ± 0.23<sup>b</sup></b>

**T ½ ab:** tiempo medio de absorción. **Tmax:** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **Cmax:** pico de concentración plasmática. **ABC:** área bajo la curva concentración vs tiempo. **ABMC:** área bajo el momento de la curva concentración vs tiempo. **TMR:** tiempo medio de residencia. **T ½ el:** tiempo medio de eliminación. Letras diferentes hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.8. Concentraciones de IVM en el tracto gastrointestinal y en *H. contortus*

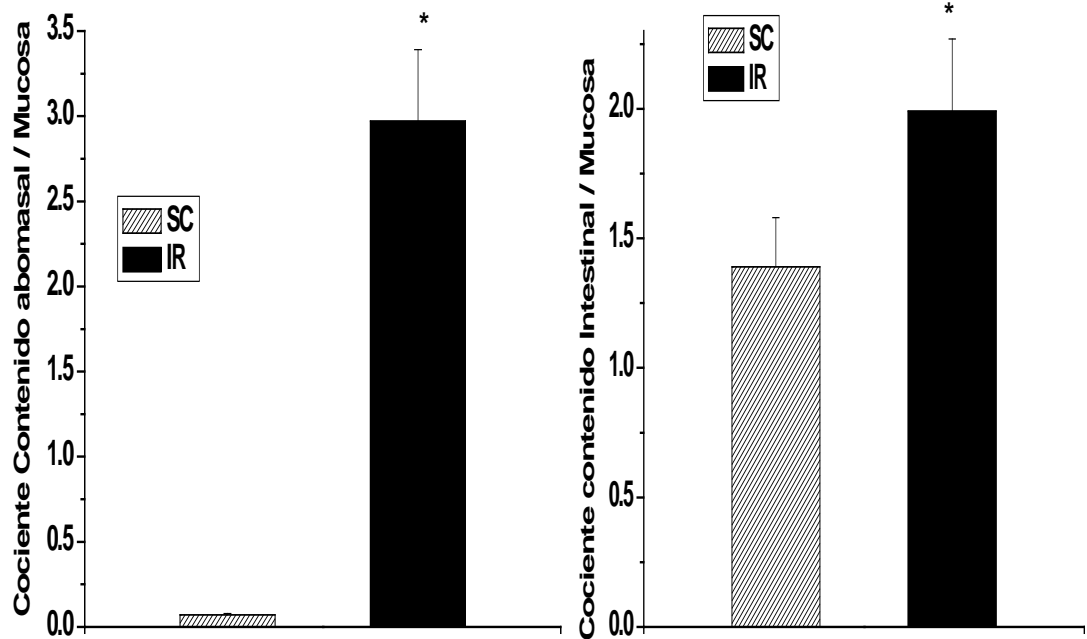
Las concentraciones de IVM fueron cuantificadas en contenidos y mucosas gastrointestinales y en el nematode *H. contortus* al día 3 post-tratamiento. Las concentraciones en contenido abomasal fueron significativamente mayores tras la administración IR (promedio de 143 ng/g; rango entre 31.5 y 409 ng/g) respecto a la administración SC (promedio de 2.53 ng/g; rango entre 2.26 y 2.66 ng/g). Similares resultados fueron obtenidos en el contenido intestinal pero las diferencias entre las concentraciones de IVM dependiendo la vía de administración fueron menores. Mientras que tras el tratamiento SC la concentración promedio de IVM fue 55 ng/g (rango entre 35.1 y 76.8 ng/g), las concentraciones tras la administración intraruminal fueron de 120 ng/g (rango 31.3 y 303 ng/g) (Los valores individuales se muestran en el apéndice TABLAS XIX y XX). En la mucosa abomasal las concentraciones promedio fueron 38.6

ng/g y (SC) 40.9 ng/g (IR) mientras que en la mucosa intestinal las concentraciones promedio de IVM fueron 39.4 ng/g y (SC) 65.6 ng/g (IR) (Los valores individuales se muestran en las TABLAS XXI y XXII). Resulta interesante remarcar que mientras las concentraciones plasmáticas promedio de los mismos animales utilizados en el estudio de distribución tisular fueron significativamente mayores tras el tratamiento SC (14.9 ng/ml) comparado con el IR (6.47 ng/ml), el patrón de concentraciones se invierte en el tracto gastrointestinal, especialmente en los contenidos donde las concentraciones de droga fueron mayores tras la administración IR. A manera de ejemplo mientras la relación entre la concentraciones de IVM el contenido abomasal y en plasma fueron de 0.19 tras la administración SC tras el tratamiento IR fue de 26 ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte la relación de concentraciones entre los contenidos gastrointestinales y las mucosas también estuvo influenciada por la vía de administración. El cociente contenido/mucosa abomasal fue de 0.07 (SC) y 2.97 (IR). Estas diferencias explican los resultados obtenidos al medir las concentraciones de IVM en *H. contortus*. Las concentraciones observadas en este nematode abomasal fueron 14.4 veces mayor tras la administración intraruminal reflejando la importancia del medio en el cual está inmerso el parásito. Los valores individuales se muestran en el apéndice TABLA XXIII).

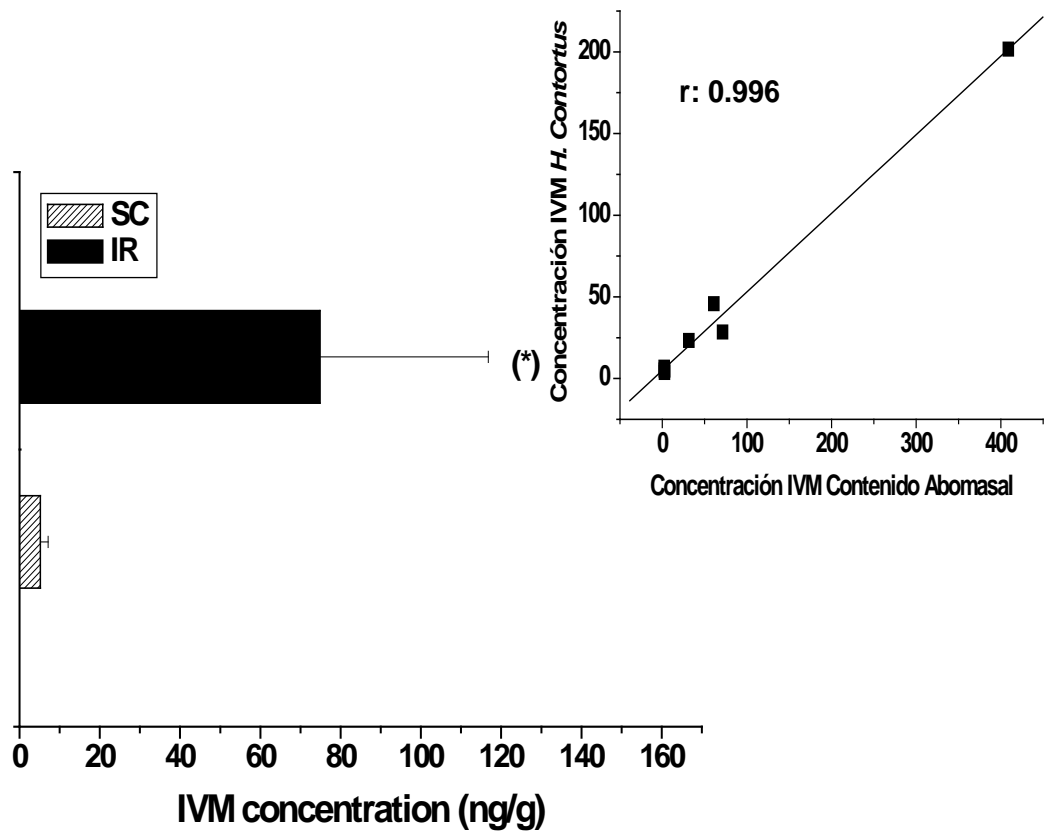
La FIGURA 7 muestra las relaciones entre las concentraciones de IVM obtenidas en los contenidos gastrointestinales (abomasal e intestinal) y sus respectivas mucosas

La FIGURA 8 muestra las concentraciones de IVM obtenidas en *H. contortus* tras el tratamiento por ambas vías y la correlación obtenida con las concentraciones de droga en el contenido abomasal





**FIGURA 6:** Relación entre las concentraciones promedio de ivermectina (IVM) obtenidas al día 3 post-administración en los contenidos abomasal e intestinal y en sus respectivas mucosas tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0.2 mg/kg). (\*) Concentraciones significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )



**FIGURA 7:** Concentraciones de ivermectina (IVM) en *H. contortus contortus* tras su administración por vía subcutánea (SC) e intraruminal (IR) (0.2 mg/kg) en ovinos. El inserto muestra la correlación obtenida entre las concentraciones de droga en el parásito y las obtenidas en el contenido abomasal. (\*) Concentraciones significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). r: Coeficiente de correlación

## 4. DISCUSSION

Desde la aparición de las primeras drogas antihelmínticas alrededor de 1940, nuevas moléculas se fueron incorporando al mercado farmacéutico veterinario aproximadamente cada 5 años (McKellar y Benchaoui, 1996). Sin embargo, en los últimos años la incorporación de nuevas drogas con mecanismos de acción diferentes a las ya existentes, que tengan un amplio espectro de acción antiparasitario ha disminuido considerablemente. Para obtener un nuevo fármaco con la apropiada eficacia y seguridad, varios cientos de candidatos son testeados en sistemas *in vitro*, animales de laboratorio y en el huésped destinatario del uso de esa potencial molécula (Witty, 1999). Este proceso de búsqueda y verificación de la eficacia clínica y margen de seguridad de nuevos compuestos requieren una inversión de varios cientos de millones de dólares y puede durar más de 10 años (Hennessy, 1997; Witty, 1999). En este contexto recientemente ha aparecido un nuevo compuesto como es el monepantel que tiene actividad contra cepas resistentes a los otros grupos de antiparasitarios (Kaminsky, *et al.*, 2008). Ante la alternativa de una baja renovación de los compuestos antiparasitarios y la aparición de resistencia a diferentes familias de drogas adquiere gran relevancia el conocimiento profundo de las propiedades farmacológicas de las drogas antiparasitarias tanto disponibles y las recientemente incorporadas y de todos los factores que pueden modificar su actividad en condiciones prácticas. Este trabajo de tesis está orientado a evaluar, desde de la interdisciplina fármaco-parasitológica, como la vía de administración afecta la eficacia de IVM contra parásitos gastrointestinales resistentes.

Diferentes vías de administración han sido ensayadas para la administración de drogas endectocidas. Las formulaciones disponibles para ovinos son una solución inyectable para ser aplicada por vía subcutánea y una solución para ser administrada vía oral. Las mismas presentan algunas diferencias desde el punto de vista de su uso en la práctica clínica así como también de espectro antiparasitario relacionado a las ectoparasitosis (McKellar y Benchaoui, 1996). En nuestras condiciones de explotación, la formulación subcutánea ha sido extensamente usada, además de ser la única formulación disponible en el mercado. Sin embargo, con la aparición de resistencia por parte de diferentes géneros parasitarios, las condiciones óptimas de vías de utilización deben ser reevaluadas.

En Argentina, desde 1988 se han reportado casos en ovinos de resistencia a drogas antihelmínticas. (Entrocasso, 1988b; Romero, et al., 1992; Eddi, et al., 1996; Caracostantogolo, et al. 2005), con eficacias variables según el establecimiento analizado. En el presente trabajo la eficacia según el TRCH fue de 45.5 % para el grupo administrado por la vía usual (SC). Este valor es muy bajo pero si lo comparamos con otros trabajos de diagnóstico de resistencia antihelmíntica realizados en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, donde se obtuvieron valores de eficacia entre 28.8 % y 99.9 %, está enmarcado dentro de valores medios para esta región. También es coincidente que el principal género involucrado en la resistencia antihelmíntica fue *Haemonchus* spp en la mayoría de los establecimientos evaluados (Entrocasso, 2006<sup>††</sup>).

Cuando el valor de eficacia lo comparamos con los valores históricos de la Reserva 8, la eficacia disminuyó con respecto al año 2006 y 2007, donde se mantuvo cerca del 75 %. Sin embargo fue marcadamente mayor que en los TRCH que fueron realizados en años anteriores (1997 y 2003) (Entrocasso, 2006<sup>\*</sup>).

La eficacia de IVM en los primeros años de su aparición en el mercado veterinario fue muy elevada contra diferentes géneros de nematodos gastrointestinales mas allá de la vía de administración usada. La eficacia original de IVM administrada por vía oral contra nematodos susceptibles fue similar contra los parásitos abomasales y levemente superior contra los nematodos intestinales comparado a la administración por vía subcutánea (Borgsteede, 1993). Sin embargo, algunos estudios con drogas pertenecientes a las LM plantean algún cambio cuando la susceptibilidad de las cepas parasitarias presentes disminuye. Dichos ensayos evaluaron el efecto de diferentes LM sobre ovinos infestados experimentalmente con cepas de conocida resistencia a IVM del parásito intestinal *Trichostrongylus colubriformis*. Una mayor reducción de huevos en materia fecal y del número de parásitos en intestino se obtuvo tras el tratamiento con ABM por vía oral (97-98 %) comparada a la administración por vía subcutánea (74-76 %) (Alka, et al., 2004). Resultados similares fueron conseguidos en otro ensayo con MXD. La reducción de huevos en materia fecal y eficacia contra el mismo parásito intestinal pasaron de un rango

---

\* ENTROCASSO, C, 2006. Comunicación personal.

de 0-4 % (vía SC) a 98-100 % (vía oral) (Gopal, *et al.*, 2001) lo que marca la importancia de la vía de administración en la eficacia cuando estamos en presencia de cepas resistentes. Estos antecedentes han llevado a la búsqueda del fundamento farmacológico que explique estas diferencias de eficacia para la misma droga administrada por diferente vía de administración contra cepas de parásitos resistentes. En este contexto, el presente trabajo de tesis estudió el efecto que tiene la vía de administración tomando como molécula representante a la IVM cuando se tratan ovinos infestados con parásitos abomasales e intestinales resistentes.

Los recuentos de hpg brindan una idea orientativa de la carga parasitaria animal, pero están muy influenciados por el potencial reproductivo de los géneros presentes en el tracto gastrointestinal. El TRCH descrito por Coles, *et al.* (1992), es el test considerado de referencia para evaluar la eficacia de una droga antihelmíntica. Dicho valor debe superar el 95 % en los rumiantes menores y tiene en cuenta los valores de la cuenta de hpg obtenidos en forma previa y 15 días posteriores al tratamiento. Cuando se realiza el TRCH la eficacia estimada por la media aritmética provee resultados no sesgados, donde la eficacia esperada es semejante a la eficacia real. En contraste, las eficacias determinadas por la media geométrica para los mismos datos frecuentemente dan resultados sesgados (Dobson, *et al.*, 2009).

La evolución del recuento de hpg fue diferente para los 3 grupos. Si bien finalizado el período de ensayo no se encontraron diferencias significativas entre los dos vías de administración utilizadas y el TRCH fue semejante para los dos grupos, el grupo SC manifestó una reducción en la cuenta del hpg y por lo tanto en la eficacia un 40 % menor que el grupo IR al día 3 post-tratamiento. Estas diferencias se mantuvieron al día 9 post-tratamiento, pero prácticamente no se observaron al día 15 post-tratamiento. El marcado aumento de la eficacia (77.6 %) al día 3 en el grupo tratado por vía IR podría deberse a los efectos de la IVM sobre la oviposición de los parásitos adultos presentes. Bottjer y Bone (1985), describen una inhibición en la oviposición de los nematodos tanto *in vivo* como *in vitro* como consecuencia del efecto de la IVM.

La cuenta de parásitos adultos a los 15 días post-tratamiento, llamado test controlado y descrito por Wood, *et al.* (1995), refleja objetivamente la composición genérica y la carga parasitaria total del animal en los diferentes sectores del tracto digestivo. Generalmente la eficacia de una droga se calcula a partir de la media geométrica de los recuentos

individuales de parásitos adultos, dado que la población parasitaria no tiene una distribución normal y por lo tanto la media aritmética no es un buen indicador de la tendencia central (Smothers, *et al.*, 1999).

Los valores de las medias geométricas variaron considerablemente a los 15 días post-tratamiento para la cuenta total de parásitos, sin discriminar por género parasitario, es notable el aumento de la eficacia (95.2 %) cuando la droga fue administrada por vía IR, alcanzando valores aceptables de eficacia recomendados por la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) (Wood, *et al.*, 1995), mientras que por vía SC la eficacia obtenida fue baja (70.3 %). Estos valores son coincidentes con los reportados por Borgsteede (1993), antes mencionado, que trabajando con cepas sensibles de nematodos obtuvo eficacias de 92 % y 100 % contra *T. vitrinus* y 85.7 y 98 % contra *Cooperia spp* en ovinos tratados SC y oralmente con IVM. De la misma manera, Gopal, *et al.* (2001) con MXD y Alka, *et al.* (2004) con ABM, mostraron un considerable aumento de la eficacia en el tratamiento oral comparado con el subcutáneo en cepas resistentes a IVM de *T. colubriformis*.

Cuando se consideró solamente el abomaso, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo IR, pero en este caso, si bien la eficacia aumentó de 52.2 % en el grupo SC a 81.9 % en el grupo IR, las diferencias entre los grupos tratados no llegaron a ser significativas, ni alcanzaron a los valores determinados por la WAAVP (Wood, *et al.*, 1995). Al analizar las eficacias por género parasitario presentes en el abomaso, se halló que para *T. axei* y *Teladorsagia spp* hubo diferencias significativas entre los 3 grupos y la eficacia aumentó para ambos géneros pasando de valores aceptables a valores de alta eficacia.

Para *H. contortus* en cambio, no hubo diferencias significativas entre los 3 grupos, pero a pesar de ello la eficacia se logró aumentar un 40 %. Si bien la eficacia obtenida es baja, este aumento de la eficacia podía utilizarse como estrategia en algunos casos de resistencia antihelmíntica.

En la cuenta de parásitos adultos totales de intestino, si bien se hallaron diferencias significativas entre los 3 grupos, las eficacias obtenidas siempre se mantuvieron sobre los valores aceptables recomendados. Al discriminar por género parasitario y por sector, en el intestino delgado tanto *Nematodirus spp*, como *T. colubriformis*, tuvieron diferencias

significativas entre los 3 grupos. Sin embargo, mientras que para *Nematodirus* spp. las eficacias fueron mayores a 95 % en los dos grupos tratados, para *T. colubriformis* el grupo SC mostró una eficacia inferior a la aceptada. Para *Cooperia* spp, no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados, pero sí entre cada uno de estos y el grupo Control. En ambos tratamientos las eficacias tuvieron porcentajes aceptables.

En el intestino grueso, tanto para *Oesophagostomum* spp, *Chabertia* spp y *Trichuris* spp, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados, pero sí entre cada uno de ellos y el grupo Control. Las eficacias superaron los valores recomendados por la WAAVP en todos los casos.

El recuento de parásitos adultos efectuado en los animales sacrificados el día 3 post-tratamiento, si bien no pudo ser analizado estadísticamente por tener un grupo con un número inadecuado de animales (n= 3), la tendencia marca una diferencia en las medias geométricas de ambos tratamientos, coincidente con lo que se observó en los recuentos del día 15 post-tratamiento. En el abomaso, las tendencias también son semejantes al recuento del día 15 post-tratamiento y en intestino grueso no se encontraron parásitos adultos salvo *Nematodirus* spp en el grupo SC.

Existe una directa relación entre comportamiento farmacocinético y eficacia de las drogas antiparasitarias (Lanusse y Prichard, 1993). De esta manera, el presente trabajo caracterizó en forma estandarizada la cinética plasmática y las concentraciones en los sitios de localización parasitaria de IVM tras su administración por ambas vías. Adicionalmente, se evaluó por primera vez bajo condiciones *in vivo* las concentraciones de IVM en un nematodo abomasal (*H. contortus*). La relación entre la cinética plasmática y las concentraciones en los sitios blanco fue extensivamente caracterizada para las diferentes drogas de esta familia tras su administración subcutánea en bovinos (Lifschitz, *et al.*, 1999 a; b y 2000). En estos trabajos se observó que el plasma reflejaba las concentraciones encontradas en los diferentes sitios de localización parasitaria. Sin embargo, este concepto debe revisarse cuando la vía de administración cambia. Tal lo observado en reportes anteriores (Alka, *et al.*, 2004, Gopal, *et al.*, 2001) en el presente trabajo la concentraciones plasmáticas de IVM tras el tratamiento IR fueron menores a las alcanzadas tras la administración SC (Figura 5). Esto determinó que la exposición sistémica medida como ABC fuese significativamente menor tras la administración IR. La



menor concentración plasmática de IVM en el plasma ovino luego de administración oral/IR estaría dada por la adsorción de la droga al material particulado de la ingesta y a la acción de la proteína de eflujo glicoproteína-P (Lifschitz, *et al.*, 2005; Ballent, *et al.*, 2007). La menor disponibilidad plasmática de IVM administrada por la vía enteral afecta en su eficacia sobre parásitos externos, por lo cual no se recomienda esta vía de administración para el tratamiento de la sarna (Benz, *et al.*, 1989, McKellar y Benchaoui, 1996). A su vez, luego de la administración subcutánea de IVM en ovinos, la persistencia de acción antiparasitaria sobre nematodos gastrointestinales resulta más prolongada comparada a la obtenida tras el tratamiento por vía oral (Borgsteede, 1993) lo que esta basado en la mayor vida media de eliminación y en el mayor tiempo medio de residencia comparado a la administración oral. Para poder explicar mejor la mayor eficacia de la vía oral contra cepas resistentes cuando las concentraciones plasmáticas obtenidas son menores, fue necesario estudiar las concentraciones obtenidas en el tracto gastrointestinal y en los parásitos.

Las concentraciones de droga en tracto gastrointestinal tendieron a ser mayores tras la administración oral que tras la subcutánea. Esto se vio particularmente magnificado en el contenido gastrointestinal (abomasal e intestinal). Las concentraciones de droga en el fluido abomasal fueron significativamente mayores tras la administración oral (56 veces). En el contenido intestinal las diferencias fueron menores dado el aporte de droga a través de la secreción biliar e intestinal luego de la administración subcutánea.

Otro parámetro interesante a analizar es la relación entre las concentraciones obtenidas en el contenido gastrointestinal y en las mucosas. Mientras que tras la administración subcutánea esta relación es menor a 1 en abomaso y levemente mayor a 1 en intestino, tras la administración oral los valores se invierten corroborando las elevadas concentraciones de droga en el contenido gastrointestinal.

Para tratar de comprender la acción de este tipo de drogas, se realizó por primera vez la cuantificación IVM en un nematodo abomasal obtenido de ovinos tratados por las diferentes vías de administración. La concentración de IVM en *H. contortus* provenientes de ovinos tratados por vía IR fue de 14.4 veces mayor que la observada en los parásitos de los animales tratados por vía SC. Existió una importante correlación entre las concentraciones encontradas en el contenido abomasal y en *H. contortus* (Figura 8). En

este contexto, las mayores concentraciones en el contenido abomasal obtenidas tras la administración IR determinarían mayores concentraciones en *H. contortus*. Mientras que estas diferencias no serían determinantes cuando los parásitos son susceptibles, sí lo serían cuando la droga se enfrenta a parásitos resistentes permitiendo obtener una mayor eficacia en el último caso cuando la droga se administra por una vía enteral. Esto podría ser similar en los parásitos ubicados en intestino y explicaría los resultados de la mayor eficacia obtenida contra *T. colubriformis* resistente tras la administración oral de ABM y MXD reportados anteriormente (Alka, *et al.*, 2004 Gopal, *et al.*, 2001). Los mecanismos descritos asocian la resistencia a las LM a mutaciones en subunidades del canal de cloro y/o a la expresión aumentada de glicoproteína P (Gp-P), lo que impediría alcanzar concentraciones suficientes para activar el receptor de glutamato en el parásito resistente (Pouliot, *et al.*, 1997, Blackhall, *et al.*, 1998). Aunque no se han podido determinar las concentraciones mínimas efectivas *in vivo* para las LM contra diferentes géneros parasitarios susceptibles y resistentes, estudios *in vitro* han corroborado que la acción antiparasitaria de estas drogas ocurre por lo menos en dos sitios diferentes del parásito “blanco”, produciéndose una parálisis de la musculatura faríngea y somática del mismo (Geary, *et al.*, 1993; Gill, *et al.*, 1995) con mayor sensibilidad de acción sobre el primer sitio blanco. Así, la exposición de los parásitos a las mayores concentraciones de droga en el contenido gastrointestinal tras la administración IR, permiten alcanzar mayores concentraciones en el parásito lo cual redundaría en una mayor eficacia antiparasitaria.

Los resultados aquí obtenidos aportan a la comprensión de los mecanismos de llegada de este tipo de drogas a los nematodos. Características físico-químicas como la lipofiliidad y el gradiente de concentración determinan la capacidad de una droga de alcanzar concentraciones terapéuticas en el parásito blanco (Alvarez, *et al.*, 2007). Por otra parte diferentes estudios *in vivo* proponen que la principal vía de entrada de IVM en diferentes parásitos sería por vía transcuticular (Smith y Campbell, 1996; Cross, *et al.*, 1998). En el caso de parásitos hematófagos como *H. contortus*, la ingestión de sangre con droga podría contribuir también a las concentraciones del antiparasitario alcanzadas en el parásito. Sin embargo la importancia de la entrada transcuticular se evidencia en este trabajo de tesis tras la cuantificación de las concentraciones alcanzadas en *H. contortus*. Los parásitos provenientes de animales tratados por vía IR alcanzaron concentraciones significativamente mayores de IVM lo que podría estar relacionado a un

mayor gradiente desde el contenido abomasal comparado a los nematodos provenientes del tratamiento subcutáneo. En estos en cambio, la contribución de la droga llegada por sangre a las concentraciones finales en el parásito podría ser relativamente mayor.

La información obtenida en el presente trabajo de tesis permite una mejor comprensión de las interacciones existentes entre las vías de administración de las LM y los nematodos gastrointestinales de los ovinos. Por un lado este trabajo aporta información básica acerca de mecanismos de entrada y concentraciones alcanzadas en los parásitos luego del tratamiento con IVM, la cual es considerada como la droga más usada en veterinaria. Dicha información de base farmacológica ayuda a explicar los resultados de la mayor eficacia antiparasitaria cuando se usa la IVM por vía oral contra parásitos resistentes. Por otro lado también surgen consideraciones prácticas, principalmente cuando la resistencia es a múltiples drogas. La mayor eficacia obtenida tras la administración oral debe ser evaluada para ser usada a conveniencia del momento del año y del nivel y composición genérica de los parásitos presentes y de la susceptibilidad a la IVM de los diferentes géneros parasitarios que se hallen presentes en las distintas estaciones climáticas.

## **5. CONCLUSIONES**

El presente trabajo consistió en comparar la farmacocinética y la eficacia clínica sobre cepas resistentes de parásitos gastrointestinales a IVM administrada por dos diferentes vías de administración, SC e IR (oral). Del análisis de los resultados y para las condiciones descritas en este trabajo de tesis se concluye:

a) Las concentraciones plasmáticas de IVM administrada por vía SC fueron mayores que cuando fue administrada por vía IR, lo que determina una mayor disponibilidad plasmática

b) La persistencia de las concentraciones plasmáticas fueron mayores cuando IVM fue administrada por vía SC.

c) Las concentraciones de IVM en el contenido y mucosas del tracto gastrointestinal (sitio de localización del parásito) fueron mayores cuando la droga fue administrada por vía IR.

d) La concentración de la IVM en los parásitos fue mayor al ser administrada por vía IR, por lo que permite aseverar que la incorporación de la droga al parásito por vía transcuticular es relevante para la eficacia clínica, aún para aquellos parásitos hematófagos como *Haemonchus* spp.

e) La eficacia medida por el TEC es mayor cuando la droga es administrada por vía IR, y esta diferencia es mas marcada en el abomaso y más específicamente en *Haemonchus* spp. Donde el porcentaje de reducción aumentó un 40 %.

f) El porcentaje de reducción del hpg, medido por el TRCH fue mayor también cuando la IVM fue administrada por vía IR, pero las diferencias son sustancialmente menores que cuando se las compara mediante el TEC.

g) El conocimiento básico e interdisciplinario de la relación entre las concentraciones plasmáticas, las alcanzadas en los sitios de localización parasitaria y en los parásitos y la eficacia de los fármacos debe ser utilizado estratégicamente para prolongar la vida útil de las drogas ya existentes contra parásitos de reducida susceptibilidad pero así también para las drogas nuevas que son incorporadas al mercado farmacéutico veterinario.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, A.; GRAY, G.; PIPER, L.; LEJAMBRE, L.; BARGER, J. 1987. The genetics resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. *Int J Parasitol.* 7 (7):1355-1363.
- ALKA, R.; GOPAL, R.M.; SANDHU, K.S.; SHIDU, P.K. 2004. Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Vet Parasitol.* 121 (3-4):277-83.
- ALVAREZ, L.I.; MOTTIER, M.L.; LANUSSE, C.E. 2007. Drug transfer into target helminth parasites. *Trends Parasitol.* 23(3):97-104.
- ALVINIERE, M. ; SUTRA, J. F. ; GALTIER, P. 1993. Ivermectin in goat milk after subcutaneous injection. *Vet Res.* 24 :417-421.
- ANDERSON, N. 1988. Aspects of the biology of *Ostertagia ostertagi* in relation to genesis of ostertagiasis. *Vet. Parasitol.* 27(1-2):13-21.
- ARENA, J.; LIU, K.; PARESS, P.; FRAZIER, E.; CULLY, D.; MROZIK, H.; SCHAEFFER, J. 1995. The mechanism of action of avermectin in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity. *J Parasitol.* 81:286-294.
- ARMOUR, J.; JENNINGS, F.W.; URQUHART, G.M. 1969. Inhibition of *Ostertagia ostertagi* at Early Fourth Larval Stage.2. Influence of Environment on Host or Parasite. *Res Vet Sci.* 10 (3): 238
- ARMOUR, J. 1980. Epidemiology of Helminth Disease in Farm Animals. *Vet Parasitol.* 6(1-3):7-46.
- ARMOUR, J. Y OGBOURNE, C. P. 1982. Bovine ostertagiosis: a review and annotated biography. Miscellaneous publications of the Commonwealth Institute of Parasitology. CAB. Ed. Farnham Royal, Bucks, England. 7 pp 93.
- ARMOUR, J.Y DUNCAN, M. 1987. Arrested larval development in cattle nematodes. *Parasitol Today.* 3(6):171-176.
- BALLENT, M.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C., 2007. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin availability in sheep: itraconazole-mediated enhancement of gastrointestinal disposition. *J Vet Pharmacol Ther.* 30:242-248
- BARNES, E.; DOBSON, R. ; BARGER, I. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: Adventures with a model. *Parasitol Today.* 11(2):56- 63
- BENZ, G.; RONCALLI, R.; GROSS, S. 1989. Use of ivermectin in cattle, sheep, goats and swine. In: Campbell, W. ed., *Ivermectin and Abamectin*, Springer-Verlag New York Inc., New York, USA, pp. 215-229
- BLACKHALL, W.J.; POULIOT, J.F.; PRICHARD, R.K.; BEECH, R.N. 1998. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Exp Parasitol.* 90(1):42-8.



- BORGSTEEDE, F. 1993. The efficacy and persistent anthelmintic effect of ivermectin in sheep. *Vet parasitol.* 50:117-124.
- BOTTJER, K. y BONE, L.W. 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Effect of anthelmintics on ingestion and oviposition. *Int J Parasitol.* 15(5):501-503.
- CARACOSTANTOGOLO, J.; CASTAÑO, R.; CUTULLE, CH.; CETRA, B.; LAMBERTI, R.; OLAECHEA, F.; RUIZ, M.; SCHAPIRO, J., MARTINEZ, M.; BALBIANI, G.; CASTRO, M. 2005. Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. En: Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina. FAO, Producción y Sanidad Animal pp 7-34.
- CARMICHAEL, J.; VISSER, R.; SCHNEIDER, D.; SOLL, M. 1987. *Haemonchus contortus* resistance to Ivermectin. *J S Afr Vet Assoc.* 58:93.
- CASTAÑO ZUBIETA, R. 2005 Estudio de la variación genética entre cepas de nematodos parásitos trichostrongylídeos de los rumiantes, resistentes y susceptibles a la ivermectina mediante el empleo de marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Buenos Aires. 90 p.
- CASTELLS, D. 2002 a. Nuevo enfoque en el control parasitario de ovinos. En: Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos. FAO. Animal Production and Health Paper. Pp 17-24
- CASTELLS, D 2002 b. Resistencia genética del ovino a los nematodos gastrointestinales (Revisión). En: Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos. FAO. Animal Production and Health Paper. pp 79-89.
- CLAEREBOUT, E.; SMITH, W.; PETTIT, D.; GELDHOF, P., RAES, S.; GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J. 2005 Protection studies with a globin enriched protein fraction of *Ostertagia Ostertagi*. *Vet parasitol.* 128:299-307
- COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.; GEERTS, S. ; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodos of veterinary importance. *Vet parasitol.* 44:35-44
- COLES, G.; STAFFORD, K.; MACKAY, P. 1998. Ivermectin resistance *Cooperia spp* from calves on a farm in Somerset. *Vet Rec.* 142:255-256
- CONDER, G. y CAMPBELL, W. 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drugs resistance. *Adv. Parasit.* 35:2-84.
- COOP, R. Y HOLMES, P. 1996. Nutrition and Parasite Interaction. *Int J Parasitol.* 26(8-9):951-952.
- COOP, R. Y KYRIAZAKIS, J. 1999. Nutrition – Parasite Interaction. *Vet parasitol.* 84:187-204

- CROSS, H.F.; RENZ, A.; TREES, A.J. 1998. In vitro uptake of ivermectin by adult male *Onchocerca ochengi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 92:711–720
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E.; HENRIKSEN, S.; NANSEN, P. 1999. A comparison of in vitro tests and fecal eggs count reduction test in detecting anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 85(1): 49-59.
- DE MONTIGNY, P.; SHIM, J.; PIVINICHNY, J. 1990. Liquid chromatographic determination of ivermectin with trifluoroacetyl anhydride and N- methylimidazole as the derivatization reagent. *J Pharmaceut Biom.* 8(6):507-511.
- DOBSON, R.J.; SANGSTER, N.C.; BESIÉ, R.B.; WOODGATE, R.G. 2009. Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT) *Vet Parasitol.* 161:162–167
- DRUDGE, J.H.; SZANTE, J.; WYANT, Z.N.; ELAM, G. 1964. Field studies on Parasitic control in sheep- Comparison of Thiabendazole, Ruelene and Phenothiazine. *An. J Vet Res.* 25:1512-1518.
- EDDI, C.; CARACOSTANTOGOLO, J.; PEÑA, M.; SHAPIRO, J.; MARANGUNICH, I.; WALLER, P.; HANSEN, J. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematodos parasites in sheep in southern Latin America: Argentina. *Vet. Parasitol.* 62: 189-197.
- ENTROCASSO, C. 1984. Production and metabolism studies of bovine trichostrongylosis. Tesis Doctoral. Glasgow University. Facultad Medicina Veterinaria. 185 p.
- ENTROCASSO, C.; PARKINS, J.; ARMOUR, J.; BAIRDEN, K. 1986. Production, parasitological and carcass evaluation studies in steers exposed to trichostrongyle infection and treated with a morantel bolus or fenbendazole in two consecutive grazing seasons. *Res Vet Sci.* 40:76-85.
- ENTROCASSO, C. 1988a. Epidemiology and control of bovine Ostertagiasis in South America. *Vet parasitol.* 27:59-65.
- ENTROCASSO, C. 1988b. Resistencia parasitaria al Oxfendazole en ovinos en un establecimiento en la provincia de Buenos Aires. Memoria del 6° Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Agosto 1988
- ENTROCASSO, C. 1994. Fisiopatología del Parasitismo Gastroentérico. Cap. 1. En: NARI, A; FIEL, C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Ed. Hemisferio Sur. pp 3-17.
- FERRERÍA, J. 1997. Resistencia de los parásitos gastrointestinales de los ovinos a los antihelmínticos. Monografía Residencia Interna en Sanidad Animal. INTA Balcarce. S.p.
- FIEL, C.; STEFFAN, P.; ALMADA, A.; AMBRUSTULO, R.; ENTROCASSO, C.; BULMAN, G. 1990. Epidemiology of trichostrongyle infection in grazing cattle of

- Humid Pampa. Argentina with special reference to *Ostertagia ostertagi*. En: GUERRERO, J; LEANNING, W. Proceedings Symposium Epidemiology of Bovine nematode Parasites in the Américas, in association with 16° World Buiatrics Congress, Salvador, Bahia, Brasil, pp 15-24.
- FIEL, C. y STEFFAN, P. 1994. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en la Pampa Húmeda. Cap. 4. En: NARI, A; FIEL, C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Hemisferio Sur. Pp 67-94.
- FIEL, C.; STEFFAN, P.; FERREYRA, D. 1998. Manual para el diagnóstico de nematodos en bovinos. Técnicas de frecuente utilización en la práctica veterinaria: su interpretación. Bayer. Argentina S.A. Div. Animal. Pp 1-61.
- FISHER, M.; MROZIK, H. 1989. Chemistry. In: Campbell ed., Ivermectin and Abamectin, W., Springer-Verlag New York Inc., New York, USA. pp. 1-23.
- GEARY, T.; SIMS, S.; THOMAS, E.; VANOVER, L.; DAVIS, J.; WINTERROWD, C.; KLEIN, R.; HO, N.; THOMPSON, D. 1993. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. Exp. Parasitol. 77:88-96.
- GEARY, T.; SANGSTER, N.; THOMPSON, D. 1999. Frontiers in Anthelmintic Pharmacology. Vet Parasitol. 84:275-295
- GELDHOF, P.; CLARK, D.; MOLLOY, C.; KNOX, D. 2007. Assesment of *Coenorhabditidis elegance* as a model of *Haemonchus contortus* vaccine research. Mol Biochem Parasit. 152(2):220-223
- GIBSON, T. E. 1981. The effect of constant and changing temperatures in the development rates of the eggs and larvae of *Ostertagia ostertagi*. J. Therm. Biol. 20:389-394
- GILL, J.; REDWIN, J.; VAN WYK, J.; LACEY, E. 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemoncus contortus*. Effects of ivermectin resistance. Int J Parasitol. 25:463-470
- GOMEZ RINCON, C. 2006. Valoración del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* como agente de control biológico de los nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria. 203 p.
- GOPAL, R.M.; WEST, D.M.; POMROY, W.E. 2001. The difference in efficacy of ivermectin oral, moxidectin oral and moxidectin injectable formulations against an ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. New Zeal Vet J. 49(4):133-7
- GORDON, H. L. 1973. Epidemiology and control of gastrointestinal nematodos of ruminants. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. pp 396 – 437

- GRAPHPAD InStat®, Version 3.0 for Windows 95 .GraphPad Software, Inc, San Diego, California,[ En línea] USA ; <[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).> [consultas : junio 2010]
- GRAPHPAD SOFTWARE. 1998 InStat guide to choosing and interpreting statistical test. GraphPad Software, Inc, San Diego, California, [En línea] USA ; <[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).> [consultas : junio 2010]
- HENNESSY, D. 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol.* 72:367-390
- HENRIKSEN, S.A.; KORSHOLM ,H. 1983. A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Nord Vet Med.* 35:429–430
- HOSKING, B. Y KAMINSKY, R. 2007. Anthelmintic and Resistance: a review. *Novartis Animal. Health.* S.p.
- KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; WEBER, S.S.; WENGER, A.; WIELAND-BERGHAUSEN, S.; GOEBEL, T.; GAUVRY, N.; PAUTRAT, F.; SKRIPSKY, T.; FROELICH, O.; KOMOIN-OKA, C.; WESTLUND, B.; SLUDER, A.; MÄSER, P. 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature.* 452(7184):176-180
- KAPLAN, R.; BURKE, J.; TERRIL, T.; MILLER, J.; GETZ, W.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M.; WILLIAMSON, L.; LARSEN, M.; VATTA, A. 2004. Validation of FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in southern United States. *Vet parasitol.* 123:105-120
- KLOOSTERMAN, A.; BORGSTEEDE, F. ; EYSKER, M. 1984 The effect of experimental *Ostertagia ostertagi* infections in started milking cows on egg output, serum pepsinogen levels, antibody titers and milk production. *Vet Parasitol.* 17:299-308
- LANUSSE, C.E. ; PRICHARD, R.K. 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metab Rev.* 25(3):235-79
- LANUSSE, C .1994. Bases Farmacológicas de la terapéutica antihelmíntica. En: Nari, A y Fiel, C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Hemisferio Sur. Cap 1.3. pp 33-66.
- LANUSSE, C.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SANCHEZ, S.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M. 1997. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 20:91-99
- LAPAGE, G. 1962. *Veterinary Helminthology and Entomology.* 5<sup>th</sup> Ed. The Williams and Wilkins company. Baltimore. Pp. 212 – 260
- LARSEN, M. 2000. Prospect for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology.* 120:121-131
- LARSEN, M. 2002. Biological control in a global perspective- A review with emphasis in *Duddingtonia flagrans*. En: *Biological Control of Nematode parasites of small ruminants in Asia.* FAO Animal Production and Health Paper. Pp 18-37.

- LEJAMBRE, L.F.; SOUTHCOTT, W.E., DASH, W. 1976. Resistance of selected lines of *Haemonchus contortus* to Thiabendazole, Morantel and Levamisole. *Int J Parasitol.* 6:217-222.
- LICHSTENFELS, J.R. ; PILITT, P.A.; HOBERG, E.P. 1994. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus spp.* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *J Parasitol.* 80:107–119
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; PIS, A.; IMPERIALE, F.; SANCHEZ, S.; ALVAREZ, L.; KUJANEK, R.; LANUSSE, C. 1999a. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet parasitol.* 86 :203-215
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERIALE, F.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; LANUSSE, C.; ALVINERIE, M. 1999b. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition kinetics. *J Vet Pharm Ther.* 22:266-273
- LIFSCHITZ, A. 2000. Cinética plasmática y distribución tisular de fármacos endectocidas en bovinos. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Centro de la Provincia de Buenos Aires. 192 p.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J.; SUTRA, J.F.; GALTIER, P.; ALVINERIE, M., LANUSSE, C. 2000. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasite location in cattle. *Vet parasitol.* 87 :327-338
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; IMPERIALE ,F.; PIS, A.; LANUSSE, C. 2002. Fármacos endectocidas: Avermectinas y Milbemicinas. Cap. 41. En: BOTANA, LM; LANDONI, F; MARTIN-JIMENEZ,T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* Mc Graw Hill. Interamericana. pp 545-558.
- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G., BALLENT, M., SALLOVITZ, J.; PIS, A.; LANUSSE, C. 2005. Moxidectin and ivermectin metabolic stability in sheep ruminal and abomasal contents. *J Vet Pharm Ther.* 28:411-418
- MAINGI, N.; SCOTT, M.E.; PRICHARD, R.K. 1990. Effect of selection for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology.* 100;327-335
- MC CLURE, S. 2000. Sheep immunity to gastrointestinal nematode parasites. CSIRO livestock industries D.D. Mc Master Laboratory, Locked bag 1, Armidale NSW 2350, Australia.
- MC KELLAR, Q. y BENCHAOUI, H. 1996. Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharma Ther.* 19:331-351
- MICHEL, J. F. 1963. The phenomenon of host resistance and the cause of *Ostertagia ostertagi* in calves. *Parasitology.* 53:63-84

- MILLER, H.R. 1984. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodos in ruminant and laboratory animals. *Vet Immunol Immunop.* 6:17-259
- MILLER, H.P. 1996. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodos: natural immunity can be harnessed?. *Int J Parasitol.* 26(8-9):801-811
- MIN, B. y HART, S. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J An Sci.* 81(2):102-109
- MITCHEL, J.; LANCASTER, M.; HONG, C. 1971. Host induced effects on the size and body proportions of *Ostertagia ostertagi*. *J Parasitol.* 57:1185-1189
- NARI, A Y EDDI, C. 2002. Control integrado de parasitosis. En: Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas integrados de control de parásitos. FAO, Animal Production and Health Paper. Pp 11-16.
- NIEC, R., 1968. Cultivo e identificación de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. INTA, Bs. As., Argentina. Manual técnico No. 3, pp. 32
- OLAECHEA, F.V.; LARROZA, M.; CABRERA, R.; LEIVA, D.; PARAMIDANI, M.; REYNALS, J.; LISI, M.; MUJICA, G; CARACOSTANTOGOLO, J. 2007. Hallazgos de resistencia antihelmíntica en rumiantes en la patagonia Argentina. *Vet. Arg.* 24(234) 257-268.
- POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.K.; GEORGES, E. 1997. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem Pharmacol.* 53(1):17-25.
- PRICHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D., MARTIN, I.C.A.; DONALD, A.D. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodos. *Aust Vet J.* 56:239-250
- PRICHARD; R. 1999 Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 54: 259-268.
- ROBERTS, F.H.S. y O'SULLIVAN, P.J. 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agr Res.* 1:99-102
- ROJO VAZQUEZ, F. 1976. Effect of temperature on the development of free parasitic stages of *trichostrongylus axei* and *trichostrongylus colubriformis*. *Rev Iber. Parasitol.* 36:249-255
- ROMERO, J. ; ESPINOSA, G.; VALERA, A. 1992. Demostración de la resistencia a oxfendazole en *trichostrongylidos* de ovinos de la zona deprimida del Salado. *Rev. De Med. Vet.* 73(2): 82-86.
- ROMERO, J. 2005. Alternativas al control químico de los parásitos en lanares. En: FAO Producción y Sanidad Animal. Resistencia a los antiparasitarios internos en la Argentina. FAO Producción y Sanidad Animal. Pp 66-73.
- ROMERO, J.; SÁNCHEZ, R.; BOERO, C. 2007. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en la Pampa húmeda y la mesopotámica. Cap. 3.1. En: SUAREZ, V; OLAECHEA,F; ROMERO, J.; ROSSANIGO, C. Enfermedades

- parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp 33 – 42.
- ROSE, A. J. Y SMALL, J. H. 1985. Observations on the bionomics of the free living stages of *trichostrongylus vitrinus*. J. Helminthol. 58:49-58
- SÁNCHEZ, R.; ROMERO, J. 2005 Observaciones sobre la dinámica del parasitismo gastrointestinal en corderos de destete de la Pampa húmeda. Rev Med Vet. 86(1):17–26
- SAS On lineDoc® 9.1 2002-2003 SAS Institute INC., Cary NC 27513.
- SAS/ STAT 9.1 User's Guide. Virginia Clark. SAS Institute. SAS Publishing. 2004. Pp 3175-3194
- SAUMELL, C.; FUSE, L.; IGLESIAS, L.; STEFFAN, P.; FIEL, C. 2005. Alternativas adicionales de control químico de nematodos gastrointestinales en animales domésticos. FAO. Producción Animal, Resistencia a los antiparasitarios internos en la Argentina. pp 80-84
- SHOOP, W.; MROZIK, H.; FISHER, M.; 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Vet parasitol. 59:39-156
- SKERMAN, K.D. ; HILLARD, J.J. 1966. A Handbook for Studies of Helminth Parasites of Ruminants. Near East Animal Health Institute, Iran Unit, UNDP, FAO, Rome. S.p.
- SMITH, H. ; CAMPBELL, W. 1996. Effect of ivermectin on *Caenorhabditis elegans* larvae previously exposed to alcoholic immobilization. J. Parasitol. 82:187–188
- SMOTHERS, C. D. ; SUN, F. ; DAYTON A. D. 1999. Comparison of arithmetic and geometric means as measures of a central tendency in cattle nematode populations. Vet parasitol. 81 :211-224
- SNYDER, L. ; KIRKLAND, J. ; GLAJCH, J. 1997. Practical HPLC method development. Wiley, J. and Sons INC, 2<sup>nd</sup> Editions, 605 3<sup>rd</sup> Avenue, New York. S.p.
- SOULSBY, E.J.L. 1988. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7<sup>o</sup> Ed. Mc Graw-Hill. pp 136 – 354
- STTEFAN, P. y FIEL, C. 1986. Bioecología de ls nematodos gastrointestinales de los bovinos. Rev Arg Prod An. 6(1):139-140
- SUAREZ, V.H. 2007. Resistencia antihelmíntica en nematodos ovinos. En SUAREZ, V; OLAECHEA, F; ROMERO, J; ROSSANIGO, C. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Ed. INTA. Cap. 1.4. 85-106.
- SYKES, A.R. 1982. Nutritional and Physiologycal Aspect of Helminthiasis in Sheep. En: SYMONS, L.E.A; DONALD, A.D.; DINEEN, J.K. Biology and Control of Endoparasites. Academic Press. Pp 217-234.

- VAN VYK, J.A. y BATH, G.F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet Res.* 33(5):509-529.
- VERCRUYSSSE, J. Y DORNY, P. 1999. Integrated control of nematode infection in cattle: A reality? A need? A future?. *Int J Parasitol.* 29:165-175
- VERMUNT, J.; WEST, D.; POMROY, W. 1995. Multiple resistance to Ivermectin and Oxfendazole in *Cooperia* species of cattle in New Zealand. *Vet Rec.* 137:43-45
- WALLER, P. 1985. Resistance to anthelmintics and the implications for animal production. In: ANDERSON, N y WALLER, P. Resistance in nematodos to anthelmintics drugs. CSIRO. Division of Animal Health., Australian Wood Corporation. Pp 1- 12.
- WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENNESSY, D.R. 1994. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet parasitol.* 51(3-4):289-299
- WALLER, P.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites in sheep of Southern América: General Overview. *Vet parasitol.* 62:181-187
- WILLIAMS, J. 1983. Ecology and control of gastrointestinal nematodos of beef cattle. *Vet Clin N Am: Large.* 5(1):183-205
- WITTY, M. 1999. Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. *Int J Parasitol.* 29 :95-103.
- WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M. 1996. Toward practical biological control of parasitic nematodos in domestic animals. *J Nematol.* 28(2): 129-132
- WOOD, I.B.; AMARAL, N.K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L.; KASSAI, T.; MALONE, JR., J.B.; PANKAVICH, J.A.; REINECKE, R.K. ; SLOCOMBE, O.; TAYLOR, S.M.; VERCRUYSSSE, J. 1995. World Association for the Advancement of Vet parasitol (WAAVP) 2<sup>nd</sup> ed. of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol.* 58:181-213
- YOUNG, R. Y ANDERSON, N. 1981. The ecology of the free living stages of *Ostertagia ostertagi* in a winter rainfall region. *Aust J Agric Res.* 32:371-388



## 7. APÉNDICE

## APENDICE I

### Recuento de huevos por gramo en materia fecal (hpg)

Para la cuenta de hpg se utilizó la técnica de Mc Master modificada (Robert y O`Sullivan, 1950). Se colocó 1 g de materia fecal de cada muestra en un mortero, se mezcló con 59 cm<sup>3</sup> de solución sobresaturada de cloruro de sodio (densidad 1200), la cual fue luego filtrada a través de un colador común. El contenido se trasvasó a un vaso de precipitado, y tras la agitación lenta para evitar la formación de burbujas, se tomaron con una pipeta Pasteur alícuotas del contenido para cargar la cámara de Mc Master modificada. Luego de unos segundos de reposo se procedió a la lectura de la cámara al microscopio óptico como indica la técnica.

Para minimizar los errores de dilución de una mayor cantidad de agua en la materia fecal, se utilizaron los siguientes factores de corrección (Skerman y Hillard, 1966)

Factor 1: materia fecal normal

Factor 1,5: boñigas pegadas

Factor 2: materia fecal semiblanda (sin boñigas)

Factor 3: materia fecal líquida (diarrea)

## APENDICE II

### Necropsias parasitológicas

A los 15 días post tratamiento se realizaron las necropsias de los 18 animales del estudio, mediante noqueo y desangrado. Durante la misma se realizó una ligadura en ambos extremos del abomaso, (omasal y pilórico), como así también en la válvula ileocecal. El abomaso, el intestino delgado y el grueso fueron desbridados y separados de los omentos.

El abomaso fue seccionado longitudinalmente y el contenido, al igual que el agua de lavado de la pared, fue colectado en un balde plástico graduado. Se tomó una alícuota del 10 % de dicho contenido y se reservó en un recipiente, para la recuperación de nematodos adultos con el agregado de unas gotas de formol al 10 %.

El intestino delgado se seccionó longitudinalmente con raspado profundo de la mucosa mediante un seccionador de intestino ("gut runner") (Skerman y Hillard, 1966) y el contenido junto con el agua del lavado fue colectado en un balde plástico graduado. De la misma manera que el contenido abomasal, un 10% de la muestra colectada se reservó en un frasco plástico para la recuperación de nematodos adultos con unas gotas de formol.

El intestino grueso fue sometido al mismo procedimiento del intestino delgado (Wood, *et al.*, 1995)

Adicionalmente, 4 animales del Grupo II y 3 animales del Grupo III fueron sacrificados a las 72 hs post tratamiento. Se tomaron muestras de contenidos y mucosas gastrointestinales y material parasitario para la cuantificación de IVM, la identificación y el recuento de parásitos nematodos adultos.

### APENDICE III

#### Extracción físico-química y análisis cromatográfico con detección de fluorescencia

Para la extracción físico química de la muestras de plasma se colocó una alícuota de 1 ml de éstas con 1ml de acetonitrilo y 100 µl de una solución de ABA 100 ng/ml (10 ng) como estándar interno. Se agitó la mezcla durante 20 minutos. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm y el sobrenadante se recuperó para inyectarlo posteriormente en cartuchos C 18 (Strata, Phenomenex, Torrance, CA, USA), previamente acondicionados con 2ml de metanol y 2 ml de agua. La extracción en fase sólida se realizó en forma automática utilizando el autoprocador Aspec XL (Gilson, Villiers Le Bell, France), donde se montaron los cartuchos y tras la inyección del sobrenadante, se lavaron los cartuchos con 1ml de agua seguido de 1 ml de agua/metanol (75:25). Posteriormente la IVM se eluyó con 1 ml de metanol, que luego se evaporó a sequedad en atmósfera de nitrógeno a 45 °C. Como la IVM no es una molécula fluorescente, fue necesario derivatizarla, para poder analizarla con detector de fluorescencia. Para ello se utilizó 100 µl de una solución de N-metilimidazole (Sigma, St. Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:1) y una solución de ácido trifluoro-acético anhídrido (Sigma, St. Louis, MO, USA) en acetonitrilo (1:2) (Alvinere, *et al.*, 1993; Lifschitz , *et al.*, 2000)

El análisis por HPLC se realizó utilizando una columna de C18 (Kromasil, Eka Chemicals, Bohus, Sweden (fase reversa, 5 µm de tamaño de partícula, 250 mm de largo y 4,6 mm de diámetro) mantenida en un horno a 30 °C, una fase móvil compuesta de acetonitrilo, metanol y ácido acético (0,2 %) (39.5:60:0.5), con un flujo de 1,5 ml/min. La detección se realizó mediante un detector de fluorescencia (RF-10 A) en un cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu-10A, Kyoto Japón), leyendo a una excitación de 365 nm y una emisión de 475 nm (Lifschitz, *et al.*, 1999 y 2000). Las muestras de mucosa y contenido abomasal e intestinal fueron procesadas bajo un protocolo similar, partiendo de una alícuota de 0.25 g/0.25 ml con el agregado de 0.5 ml de acetonitrilo. Posteriormente se agitó durante 15 minutos y la solución fue sonicada en un baño de ultrasonido (Transsonic 570/H, Lab Line Instruments Inc., USA) por 5 minutos y finalmente se centrifugó durante 15 minutos a 3500 rpm. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo colector y se repitió todo el proceso. Se juntaron los sobrenadantes y se ajustó el volumen

con agua. Dicho sobrenadante se inyectó en cartuchos Superclean LC<sub>18</sub> en forma automática utilizando el autoprocador Aspec XL (Gilson, Villiers Le Bell, France). Los mismos fueron lavados con agua (1ml) y con 2 ml de agua/etanol (75:25). La droga fue eluída con 1.5 ml de metanol. El metanol eluído se evaporó en una atmósfera de nitrógeno y se realizó la derivatización de los fármacos y el análisis por HPLC tal lo antes descrito. Las muestras de *H. contortus* fueron analizadas siguiendo un protocolo similar al de las mucosas gastrointestinales partiendo de una alícuota de 50 a 100 mg de muestra.

## APENDICE IV

### Cuantificación de concentraciones y validación de la metodología analítica

Acorde con los parámetros internacionalmente aceptados para métodos cromatográficos se realizó la validación de la metodología analítica. Se determinó la especificidad, linealidad, porcentaje de recuperación, precisión analítica y límites de cuantificación y detección.

Especificidad: Es la habilidad del método cromatográfico de medir el analito en presencia de compuestos endógenos, así como también la capacidad de separar el analito de los metabolitos y/u otros compuestos que hayan sido co-administrados. La especificidad y selectividad del método fueron probadas mediante el análisis cromatográfico de muestras blanco de plasma y a través del análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones cromatográficas. (Snyder, *et al.*, 1997; Lifschitz, 2000).

Linealidad: La linealidad se analizó midiendo la relación concentración de droga/respuesta del detector. Se corrieron estándares de IVM extraídos desde plasma, en un rango entre 0.1 y 50 ng/ml por triplicado. Se realizaron análisis de regresión lineal utilizando el método de los cuadrados mínimos (INSTAT Graph Pad Software Inc. San Diego, USA), obteniéndose los respectivos coeficientes de correlación.

La cuantificación de concentraciones de IVM se realizó basándose en las áreas bajo el pico cromatográfico de la misma, utilizando el software Class CR 10 (Shimadzu-10<sup>a</sup>, Kyoto, Japón).

Las concentraciones de IVM se calcularon comparando las áreas bajo el pico de la misma con la del estándar interno (ABM). Las áreas o relaciones de áreas fueron interpoladas en las respectivas curvas de calibración y las concentraciones calculadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$Y = \text{pendiente de la línea de regresión} \cdot X + \text{intercepción de la recta}$

Donde, Y= área del desconocido/área del estándar interno

y X= concentración de droga

Porcentaje de recuperación: Para obtener el porcentaje de recuperación absoluto de IVM desde el plasma se estableció la comparación de las áreas obtenidas de estándares extraídos del plasma a diferentes concentraciones con aquellas obtenidas por estándares en metanol. Se obtuvo el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recuperación de IVM desde el plasma a diferentes concentraciones.

Límite de detección y cuantificación: se consideró límite de detección (LD) al promedio del ruido de la línea de base más 3 desvíos estándar y límite de cuantificación (LC) al promedio del ruido de la línea más 6 desvíos estándar, luego de correr blancos en plasma.

Precisión analítica: La reproductibilidad de los métodos analíticos descritos se evaluó analizando durante diferentes días de trabajo, estándares extraídos desde plasma (n=4). El CV fue el indicador del grado de precisión del método. Los correspondientes CV se obtuvieron según la ecuación aceptada internacionalmente:

$$CV = \text{Desvío estándar} / \text{media aritmética} * 100$$

**TABLA I:** Peso inicial y hpg inicial

ANIMAL	CONTROL		SC		IR	
	hpg	PV	hpg	PV	hpg	PV
1	4980	26.0	4680	33.2	4280	21.0
2	3360	32.8	3900	33.6	4200	22.8
3	3180	23.8	3180	28.6	3000	27.8
4	2200	27.0	2340	26.0	2640	35.6
5	1980	23.8	1920	28.0	1620	22.0
6	1500	20.4	1560	29.0	1560	27.8
$\Sigma$	17200	153.8	17580	178.4	17300	157

PV: peso vivo inicial;  $\Sigma$ : sumatoria

**TABLA II:** Cuenta de hpg inicial y peso inicial de los animales de los grupos destinados a la necropsia el día 3 post tratamiento.

ANIMAL	SC		IR	
	hpg	PV	hpg	PV
1	7260	31.8	3600	16.8
2	1020	29.9	1200	30.0
3	900	24.0	720	21.2
4	.	.	480	33.2
$\Sigma$	9180	85.7	6000	101.2

PV: peso vivo inicial;  $\Sigma$ : sumatoria



**TABLA III:** Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg), sumatoria, media aritmética, desvío estándar, intervalo de confianza y porcentaje de reducción del hpg de los 3 grupos (Control, SC e IR) al día 3 post-tratamiento

<b>hpg DIA 3</b>			
	<b>CONTROL</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	6300	1560	1440
<b>2</b>	1920	2280	2760
<b>3</b>	5400	3840	480
<b>4</b>	3900	600	0
<b>5</b>	7680	780	600
<b>6</b>	1321	4980	660
<b>∑</b>	26520	14040	5940
<b>Xa</b>	4420 <sup>a</sup>	2340 <sup>a</sup>	990 <sup>b</sup>
<b>DE</b>	2500.1	1748.9	983.5
<b>IC</b>	64.0	25.2	44.8
<b>% reducción</b>		<b>47.1</b>	<b>77.6</b>

∑: sumatoria; Xa: media aritmética; DE: desvío estándar; IC: intervalo de confianza, % reducción: reducción del hpg en porcentaje. A letras iguales: no hay diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**TABLA IV:** Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg), sumatoria, media aritmética, desvío estándar, intervalo de confianza y porcentaje de reducción del hpg para cada tratamiento al día 9

<b>hpg DIA 9</b>			
	<b>CONTROL</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	8640	1320	1140
<b>2</b>	1760	3000	1200
<b>3</b>	4560	3360	900
<b>4</b>	4020	300	1440
<b>5</b>	3840	5040	1380
<b>6</b>	3000	480	1080
$\Sigma$	25820	13500	7140
<b>Xa</b>	4300 <sup>a</sup>	2250 <sup>b</sup>	1190 <sup>b</sup>
<b>DS</b>	2342.5	1864.3	198.7
<b>IC</b>	60.0	5.1	47.7
<b>% reducción</b>		<b>47.7</b>	<b>72.3</b>

$\Sigma$ : sumatoria; Xa: media aritmética; DE: desvío estándar; IC: intervalo de confianza, % reducción: reducción del hpg en porcentaje. Letras iguales: no hay diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**TABLA V:** Recuento de huevos por gramo de materia fecal (hpg), sumatoria, media aritmética, desvío estándar, intervalo de confianza y porcentaje de reducción del hpg para cada tratamiento al día 15.

<b>hpg DIA 15</b>			
	<b>CONTROL</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	11220	1860	3400
<b>2</b>	4860	3660	3720
<b>3</b>	2420	2700	1860
<b>4</b>	2100	840	480
<b>5</b>	6420	1260	3560
<b>6</b>	1800	5400	900
<b><math>\Sigma</math></b>	28820	15720	13920
<b>Xa</b>	4803.3 a	2620 a	2320 a
<b>DE</b>	3627.6	1697.8	1433.7
<b>IC</b>	92.9	36.7	44.8
<b>% reducción</b>		<b>45.5</b>	<b>51.7</b>

$\Sigma$ : sumatoria; Xa: media aritmética; DE: desvío estándar; IC: intervalo de confianza, % reducción: reducción del hpg en porcentaje. Letras iguales: no hay diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

TABLA VI: Comparación de la cuenta de hpg entre grupos y entre días

Animal	hpg Día 3	hpg Día 9	hpg Día 15
<b>CONTROL</b>			
1	6300	8640	11220
2	1920	1760	4860
3	5400	4560	2420
4	3900	4020	2100
5	7680	3840	6420
6	1321	3000	1800
$\Sigma$	<b>26520</b>	<b>25820</b>	<b>28820</b>
<b>SC</b>			
1	1560	1320	1860
2	2280	3000	3660
3	3840	3360	2700
4	600	300	840
5	780	5040	1260
6	4980	480	5400
$\Sigma$	<b>14040</b>	<b>13500</b>	<b>15720</b>
<b>IR</b>			
1	1440	1140	3400
2	2760	1200	3720
3	480	900	1860
4	0	1440	480
5	600	1380	3560
6	660	1080	900
$\Sigma$	<b>5940</b>	<b>7140</b>	<b>13920</b>

TABLA VII: Total de parásitos adultos por grupo

<b>Total de parásitos adultos</b>			
N° Animal	CONTROL	SC	IR
1	3560	660	450
2	8580	6350	530
3	8870	9830	450
4	8420	520	70
5	3740	470	40
6	11040	1700	510

**TABLA VIII:** Parásitos adultos al día 15 post-tratamiento en abomaso

<b>Parásitos adultos en abomaso</b>				
<b>N° Animal</b>	<b><i>Haemonchus sp</i></b>	<b><i>Teladorsagia sp</i></b>	<b><i>T. axei</i></b>	<b>Total Abomaso</b>
<b>CONTROL</b>				
<b>1</b>	620	520	120	<b>1260</b>
<b>2</b>	310	430	220	<b>960</b>
<b>3</b>	440	860	690	<b>1990</b>
<b>4</b>	220	620	680	<b>1520</b>
<b>5</b>	880	1240	160	<b>2280</b>
<b>6</b>	980	1640	560	<b>3180</b>
<b>SC</b>				
<b>1</b>	450	40	10	<b>500</b>
<b>2</b>	1090	10	10	<b>1110</b>
<b>3</b>	700	850	400	<b>1950</b>
<b>4</b>	230	110	100	<b>440</b>
<b>5</b>	350	0	20	<b>370</b>
<b>6</b>	1640	60	0	<b>1700</b>
<b>IR</b>				
<b>1</b>	420	10	0	<b>430</b>
<b>2</b>	520	10	0	<b>530</b>
<b>3</b>	450	0	0	<b>450</b>
<b>4</b>	50	0	0	<b>50</b>
<b>5</b>	.	.	.	<b>.</b>
<b>6</b>	490	10	10	<b>510</b>

**TABLA IX:** Parásitos adultos al día 15 post-tratamiento en intestino

<b>Total de parásitos Adultos en Intestino</b>			
	<b>CONTROL</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	1150	80	10
<b>2</b>	3810	2620	0
<b>3</b>	3440	3940	20
<b>4</b>	3450	40	0
<b>5</b>	730	50	10
<b>6</b>	3930	0	0

**TABLA X:** Parásitos adultos por género al día 15 post-tratamiento en intestino delgado

<b>Parásitos adultos en Intestino delgado</b>			
<b>N° Animal</b>	<b><i>T. colubriformis</i></b>	<b><i>Cooperia sp</i></b>	<b><i>Nematodirus sp</i></b>
<b>CONTROL</b>			
<b>1</b>	750	90	220
<b>2</b>	3230	60	470
<b>3</b>	2370	610	340
<b>4</b>	1910	640	650
<b>5</b>	370	90	140
<b>6</b>	2700	600	500
<b>SC</b>			
<b>1</b>	80	0	0
<b>2</b>	2020	200	400
<b>3</b>	2430	290	1200
<b>4</b>	40	0	0
<b>5</b>	50	0	0
<b>6</b>	0	0	0
<b>IR</b>			
<b>1</b>	10	0	0
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0
<b>4</b>	0	0	10
<b>5</b>	20	0	0
<b>6</b>	0	0	0

**TABLA XI:** Parásitos adultos al día 15 post-tratamiento en intestino grueso

<b>Parásitos adultos en Intestino grueso</b>			
<b>N° Animal</b>	<b><i>Oesophagostomum sp</i></b>	<b><i>Chabertia sp</i></b>	<b><i>Trichuris sp</i></b>
<b>CONTROL</b>			
1	40	10	40
2	10	10	30
3	80	30	10
4	140	70	40
5	90	30	10
6	60	60	10
<b>SC</b>			
1	0	0	0
2	0	0	0
3	20	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
<b>IR</b>			
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0

**ANIMALES SACRIFICADOS AL DIA 3 POST- TRATAMIENTO**

**TABLA XII:** Total de parásitos al día 3 post-tratamiento

<b>Total de Parásitos adultos: día 3</b>		
<b>N° Animal</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	330	30
<b>2</b>	1880	720
<b>3</b>	130	50
<b>4</b>	.	18

**TABLA XIII:** Parásitos adultos en abomaso al día 3 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos en abomaso: día 3</b>				
<b>N° Animal</b>	<b><i>Haemonchus sp.</i></b>	<b><i>Teladorsagia sp.</i></b>	<b><i>T.Axei</i></b>	<b>Total Abomaso</b>
		<b>SC</b>		
<b>1</b>	330	0	0	330
<b>2</b>	1680	0	100	1780
<b>3</b>	130	0	0	130
		<b>IR</b>		
<b>1</b>	30	0	0	30
<b>2</b>	720	0	0	720
<b>3</b>	50	0	0	50
<b>4</b>	18	0	0	18



**TABLA XIV:** Parásitos adultos en intestino al día 3 post-tratamiento

<b>Parásitos adultos Intestino: día 3</b>							
<b>N° Animal</b>	<i>T. colubr.</i>	<i>Coop.</i>	<i>Nematod.</i>	<i>Oesph.</i>	<i>Chab.</i>	<i>Trichur.</i>	<b>Total intestino</b>
<b>SC</b>							
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>2</b>	0	0	100	0	0	0	<b>100</b>
<b>3</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>IR</b>							
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>3</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>4</b>	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>

**TABLA XV:** Concentraciones plasmáticas individuales de ivermectina tras su administración por vía intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos.

<b>IVM IR</b>								
<b>Tiempo</b>	<b>An1</b>	<b>An2</b>	<b>An3</b>	<b>An4</b>	<b>An5</b>	<b>An6</b>	<b>Prom.</b>	<b>DE</b>
<b>0.125</b>	0.33	0.38	0.46	0.60	0.26	0.37	<b>0.40</b>	0.12
<b>0.25</b>	1.56	2.90	2.57	2.00	2.05	2.24	<b>2.22</b>	0.47
<b>0.37</b>	7.76	8.86	7.76	4.1	6.90	4.89	<b>6.71</b>	1.84
<b>1</b>	12.7	20.5	11.1	16.2	15.1	12.3	<b>14.6</b>	3.41
<b>2</b>	13.5	14.6	8.53	30.5	12.0	10.4	<b>14.9</b>	7.93
<b>3</b>	10.6	9.74	5.11	8.86	10.9	8.31	<b>8.93</b>	2.13
<b>5</b>	5.00	3.89	1.61	3.34	4.52	4.45	<b>3.80</b>	1.22
<b>7</b>	2.02	1.88	0.60	1.61	2.01	2.24	<b>1.73</b>	0.59
<b>9</b>	0.90	1.02	0.26	0.89	0.87	1.36	<b>0.88</b>	0.36
<b>12</b>	0.44	0.53	0.18	0.36	0.33	0.59	<b>0.40</b>	0.15
<b>15</b>	0.11	0.27	0.18	0.17	0.14	0.26	<b>0.19</b>	0.06

**TABLA XVI:** Concentraciones plasmáticas individuales de ivermectina tras su administración por vía subcutánea (SC) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos.

<b>IVM SC</b>								
<b>Tiempo</b>	<b>An1</b>	<b>An2</b>	<b>An3</b>	<b>An4</b>	<b>An5</b>	<b>An6</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>0.125</b>	3.23	3.01	4.67	2.60	1.77	5.99	<b>3.54</b>	1.53
<b>0.25</b>	6.54	8.09	9.97	5.27	4.56	9.74	<b>7.36</b>	2.28
<b>0.37</b>	10.96	12.1	12.4	10.0	5.88	12.3	<b>10.6</b>	2.49
<b>1</b>	15.59	26.0	24.3	21.7	6.99	18.0	<b>18.8</b>	6.94
<b>2</b>	19.79	12.9	30.4	31.0	6.88	18.8	<b>20.0</b>	9.5
<b>3</b>	19.57	16.5	19.8	28.6	6.10	18.2	<b>18.1</b>	7.23
<b>5</b>	14.49	8.86	11.0	20.0	4.23	13.1	<b>11.9</b>	5.33
<b>7</b>	6.88	4.34	4.89	12.6	3.67	8.97	<b>6.88</b>	3.39
<b>9</b>	1.94	2.68	2.46	8.13	3.45	4.78	<b>3.91</b>	2.29
<b>12</b>	0.95	1.26	0.93	3.98	3.12	1.85	<b>2.02</b>	1.27
<b>15</b>	1.198	0.48	0.47	2.00	1.91	0.49	<b>1.09</b>	0.72

**TABLA XVII:** Parámetros farmacocinéticos individuales de ivermectina en plasma tras su administración por vía intraruminal (IR) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos

<b>IVM IR</b>								
<b>Parámetros</b>	<b>An1</b>	<b>An2</b>	<b>An3</b>	<b>An4</b>	<b>An5</b>	<b>An6</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>T 1/2 ab</b>	0.40	0.46	0.16	0.37	0.32	0.27	<b>0.33</b>	0.11
<b>Tmax</b>	2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	<b>1.33</b>	0.52
<b>Cmax</b>	13.5	20.5	11.1	30.5	15.1	12.3	<b>17.1</b>	7.30
<b>ABC</b>	61.0	66.5	34.9	72.7	60.3	54.8	<b>58.4</b>	13.0
<b>ABMC</b>	208	220	101	215	201	219	<b>194</b>	46.1
<b>TMR</b>	3.42	3.31	2.90	2.96	3.33	3.99	<b>3.32</b>	0.39
<b>T1/2 el</b>	1.86	2.25	2.11	1.86	1.92	2.41	<b>2.07</b>	0.23

**T ½ ab (días):** tiempo medio de absorción. **Tmax (días):** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **Cmax (ng/ml):** pico de concentración plasmática. **ABC (ng.d/ml):** área bajo la curva concentración vs tiempo. **ABMC (ng.d<sup>2</sup>/ml):** área bajo el momento de la curva concentración vs tiempo. **MRT(días):** tiempo medio de residencia **T ½ el:** tiempo medio de eliminación.

**TABLA XVIII:** Parámetros farmacocinéticos individuales de ivermectina en plasma tras su administración por vía subcutánea (SC) a razón de 0.2 mg/kg en ovinos.

<b>IVERMECTINA SC</b>								
<b>Parámetros</b>	<b>An1</b>	<b>An2</b>	<b>An3</b>	<b>An4</b>	<b>An5</b>	<b>An6</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>T 1/2 ab</b>	0.61	0.30	0.56	0.64	0.15	0.97	<b>0.54</b>	0.28
<b>Tmax</b>	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	2.00	<b>1.67</b>	0.52
<b>Cmax</b>	19.7	25.9	30.3	30.9	6.98	18.7	<b>22.2</b>	9.03
<b>ABC</b>	124	104	129	205	83.2	131	<b>129</b>	41.5
<b>ABMC</b>	570	422	475	1129	953	608	<b>693</b>	283.2
<b>TMR</b>	4.60	4.06	3.68	5.50	11.4	4.63	<b>5.65</b>	2.90
<b>T1/2 el</b>	2.53	2.57	2.16	3.09	7.94	2.30	<b>3.43</b>	2.23

**T ½ ab (días):** tiempo medio de absorción. **Tmax (días):** tiempo en alcanzar el pico de concentración plasmática. **Cmax (ng/ml) :** pico de concentración plasmática. **ABC (ng.d/ml):** área bajo la curva concentración vs tiempo. **ABMC (ng.d<sup>2</sup>/ml):** área bajo el momento de la curva concentración vs tiempo. **MRT(días):** tiempo medio de residencia T **½ el:** tiempo medio de eliminación.

**TABLA XIX:** Concentración de IVM en el contenido abomasal expresado como ng/ml cuando fue administrada por vía SC o IR

<b>IVM Contenido Abomasal (ng/ml)</b>		
<b>Tratamiento/ Animal</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	2.66	60.9
<b>2</b>	2.66	31.5
<b>3</b>	2.26	409
<b>4</b>	.	71.3
<b>X</b>	<b>2.53</b>	<b>143</b>
<b>DE</b>	0.23	178

**TABLA XX:** Concentración de IVM en el contenido intestinal expresado como ng/ml cuando fue administrada por vía SC o IR

<b>IVM contenido Intestinal (ng/ml)</b>		
<b>Tratamiento/ Animal</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	76.8	53.2
<b>2</b>	35.1	30.3
<b>3</b>	55.0	345
<b>4</b>	.	50.9
<b>X</b>	<b>55.6</b>	<b>120</b>
<b>DE</b>	20.8	150

**TABLA XXI:** Concentración de IVM en la mucosa expresado como ng/ml cuando fue administrada por vía IR o SC

<b>Concentración Mucosa Abomasal</b>		
<b>Tratamiento/ Animal</b>	<b>IR</b>	<b>SC</b>
<b>1</b>	20.8	47.5
<b>2</b>	16.7	32.2
<b>3</b>	104	37.9
<b>4</b>	22.8	.
<b>X</b>	<b>41</b>	<b>38.6</b>
<b>DE</b>	41.8	6.76

**TABLA XXII:** Concentración de IVM en la mucosa intestinal expresado como ng/ml cuando fue administrada por vía IR o SC.

<b>Concentración Mucosa Intestinal</b>		
<b>Tratamiento/ Animal</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	49.7	31.0
<b>2</b>	34.6	19.1
<b>3</b>	33.8	195
<b>4</b>	.	17.9
<b>X</b>	<b>39.4</b>	<b>65.6</b>
<b>DE</b>	8.96	86.2

**TABLA XXIII:** Concentración de IVM en los parásitos expresado como ng/0.1 g cuando fue administrada por vía IR o SC

<b>Concentración de IVM en parásitos (ng/0.1 g)</b>		
<b>Tratamiento/ Animal</b>	<b>SC</b>	<b>IR</b>
<b>1</b>	3.61	45.8
<b>2</b>	5.08	23.3
<b>3</b>	6.88	201
<b>4</b>	.	28.5
<b>X</b>	5.19	74.8
<b>DE</b>	1.64	85.0