

# PRECISIÓN DEL TEST DE ECLOSIÓN DE HUEVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA EN CONDICIONES DE CAMPO.

Calvete, C., Calavia, R. y Uriarte, J.

CITA de Aragón. Avda de Montañana 930. 50059-Zaragoza. ccalvete@aragon.es

## INTRODUCCIÓN

La administración de compuestos antiparasitarios constituye el método más extendido para el control de las infecciones por nematodos gastrointestinales en los sistemas de producción ovina y caprina en pastoreo, lo que ha ocasionado la aparición de fenómenos de resistencia en las poblaciones de parásitos.

El test de eclosión de huevos, también denominado EHA (*egg hatch assay*), es una de las técnicas *in vitro* frecuentemente utilizadas para el diagnóstico de la resistencia frente a bencimidazoles. Esta técnica es, básicamente, un ensayo de dosis-respuesta con el que se calcula la concentración de antihelmíntico, normalmente tiabendazol, capaz de inhibir la eclosión del 50% de los huevos, si bien también se utiliza un protocolo simplificado en el que se estima la proporción de huevos eclosionados a una única concentración, o dosis discriminante, de tiabendazol, típicamente 0,1 µg/ml. La *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) recomienda que el test se realice con dos réplicas al menos (Coles *et al.*, 1992).

Algunos trabajos (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009) han estudiado la variabilidad de la técnica en condiciones de laboratorio, sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ninguna valoración de su variabilidad en condiciones de campo. Por este motivo en el presente trabajo se ha tratado de estimar la precisión del EHA aplicado a la monitorización de los niveles de resistencia de dos poblaciones parasitarias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Desde diciembre de 2011 a noviembre de 2012 se midieron con frecuencia mensual, los niveles de resistencia frente a bencimidazoles de las poblaciones parasitarias de dos grupos de 18 ovejas adultas cada uno, mantenidos en dos praderas permanentes de aproximadamente 1,3 ha de extensión. Una pradera estuvo ubicada en la finca experimental de montaña, perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), localizada en Bescós de la Garcipollera (Huesca), a 930 m de altitud, mientras que la otra, mantenida en regadío, se localizó en las instalaciones del mencionado Centro, en el Valle del Ebro, a 240 m de altitud y próxima a la ciudad de Zaragoza (Campus de Aula Dei). Durante todo el estudio las ovejas estuvieron fuera del ciclo productivo de sus respectivos rebaños (no fueron cubiertas), permaneciendo constantemente recluidas dentro de sus respectivas praderas sin que les fuese aplicado ningún tratamiento antiparasitario.

Cada mes se procedió a la extracción de heces, directamente del recto, de todas las ovejas de cada grupo. El total de heces recogidas por grupo fue homogeneizado y una fracción se utilizó para la realización de un coprocultivo con el que estimar la abundancia relativa de los diferentes géneros parasitarios. El resto del homogeneizado fue procesado para la obtención de los huevos utilizados en la realización del EHA en placa de 24 pocillos, con un pocillo control (sin antihelmíntico) y un pocillo con dosis discriminante de tiabendazol (0,1 µg/ml), replicándose ambos tres veces en la misma placa. Este mismo proceso de muestreo y análisis se realizó durante tres días consecutivos cada mes, de tal manera que para cada población parasitaria y mes se realizaron tres ensayos (uno por día) con tres réplicas cada uno. El nivel de resistencia se valoró a las 48 horas como la proporción de huevos eclosionados a dosis discriminante (Pdd), una vez corregida por la mortalidad natural (no eclosión) estimada en los pocillos control. La manipulación de la muestra de huevos de parásitos y la preparación del EHA se ajustó a las recomendaciones de la W.A.A.V.P. (Coles *et al.*, 1992).

Para comprobar la asociación entre la variación mensual de Pdd y la variación de las abundancias relativas de los diferentes géneros parasitarios se ajustaron modelos de regresión lineal. Con el fin de evaluar la precisión inherente al EHA, se calcularon los componentes de la varianza correspondiente a los meses, los días de muestreo y las réplicas de EHA efectuadas dentro de cada placa. El componente de la varianza correspondiente a los meses se consideró una estimación de la variabilidad extrínseca al método, mientras que los dos últimos, correspondientes a la variabilidad entre- e intra-

muestreo, se consideraron como la variabilidad propia del método. El cálculo de los componentes de la varianza se realizó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud restringida (REML) y fue realizado separadamente para cada población parasitaria.

A partir de los componentes de la varianza entre- e intra-muestras se estimó la precisión del método como el valor absoluto del semi-intervalo de confianza del 95% (SIC-95%) calculado para las condiciones del presente ensayo (tres muestreos consecutivos con tres réplicas cada uno), así como para las siguientes combinaciones de diseño muestral: de 1 a 5 muestreos consecutivos con 1 a 6 réplicas cada uno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de géneros y su variación difirió notablemente entre ambas poblaciones parasitarias (Fig. 1). La Pdd mensual fue superior en la población de montaña (0,81; SD=0,05) que en la del Valle del Ebro (0,47; SD=0,23), si bien esta última mostró una variación mayor (CV=48,91%) que la anterior (CV = 6,46%). Los modelos de regresión lineal no detectaron ninguna asociación entre la variación mensual de Pdd y la variación de los géneros parasitarios en la población de montaña, mientras que la asociación detectada en la población del valle del Ebro fue moderada ( $R^2 = 0,47$ ;  $P=0,055$ ), debido principalmente a una relación directa entre Pdd y la abundancia relativa de *Teladorsagia sp.* (Beta=0,72; SE=0,30) e inversa con la abundancia relativa de *Trichostrongylus sp.* (Beta=-0,81; SE=0,30), lo que sugiere que la tolerancia o la resistencia al antihelmíntico difirió entre géneros.

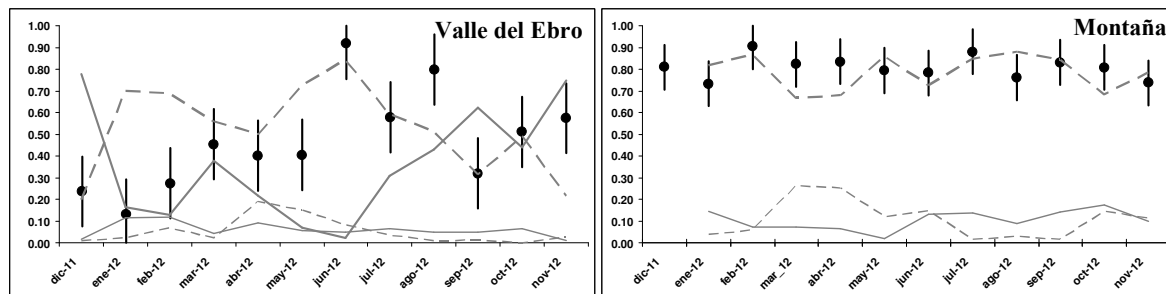
El análisis de componentes de la varianza para la población de montaña, puso de manifiesto que sólo el 6,6% de la varianza total fue debida a la variación entre-meses, mientras que el 50,1% y el 43,3% se debió a la variación entre- e intra-muestras respectivamente, siendo el SIC-95% estimado del 0,10. Por el contrario, para la población del Valle del Ebro, los componentes de la varianza estimados fueron 62,4%, 25,6% y 12%, respectivamente, cuando la variación debida a los cambios en la composición de géneros parasitarios no fue controlada en el análisis, mientras que fueron del 72,7%, 16,7% y 10,6% cuando esta variación fue eliminada de los componentes de varianza. Ello supuso un SIC-95% estimado del 0,16 en el primer caso y del 0,14 en el segundo. La representación (Fig. 1) de los valores mensuales medios de Pdd junto a su IC-95% (a partir del SIC-95%=0,16) muestra que los valores fueron claramente mayores en verano que en invierno, lo que sugiere que los valores observados de Pdd en esta población parasitaria variaron entre meses no sólo debido a la variación entre géneros y a la propia imprecisión del método, sino a otros factores no controlados en el presente estudio y que no están asociados a la resistencia antihelmíntica, lo que pone en duda la validez del EHA para cuantificar este fenómeno.

En la Figura 2 se ha representado el valor del SIC-95% estimado para diferentes combinaciones de diseño muestral. En el caso de la población del Valle del Ebro se utilizó el SIC-95% estimado tras controlar la variación debida a los géneros parasitarios. Como era de esperar, ambas gráficas difieren ligeramente en función de los datos de la población a partir de la que han sido calculadas, sin embargo se pueden inferir dos claras directrices. En primer lugar, la realización de un único muestreo con dos réplicas, tal y como recomienda la W.A.A.V.P. (Coles *et al.*, 1992), parece resultar insuficiente para cuantificar la resistencia antihelmíntica en una población parasitaria, pues la imprecisión del método conlleva un SIC-95% de 0,20, demasiado amplio como para detectar cambios con significación biológica en el fenómeno de la resistencia antihelmíntica. En segundo lugar, la obtención de mediciones con errores absolutos más pequeños parece sujeta a un gran esfuerzo de muestreo, de tal manera que, por ejemplo, para obtener un SIC-95% de 0,1 sería necesario realizar cuatro muestreos con, al menos, 2 réplicas del test cada uno en el caso de la población parasitaria con el Pdd más variable. Este escenario se complica en el caso de que los valores de Pdd varíen a lo largo del ciclo biológico anual (tal y como ha ocurrido en la población del Valle del Ebro). En ese caso, una simple estimación localizada en el tiempo no sería representativa del verdadero valor de Pdd de esa población parasitaria.

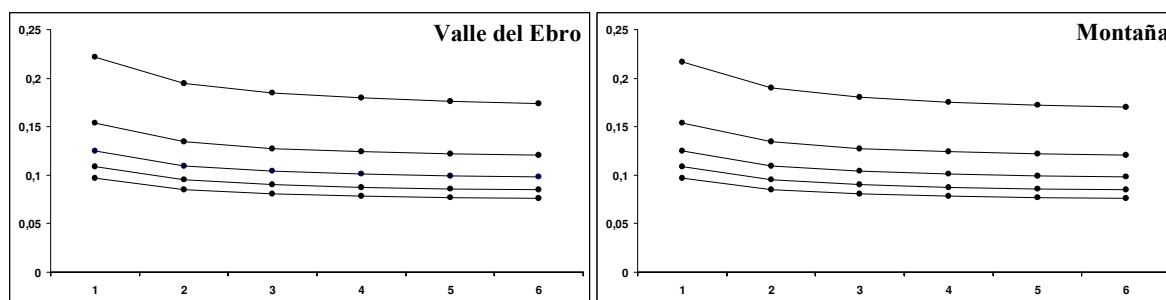
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coles et al., 1992. Vet. Parasitol. 44: 35-44.
- von Samson-Himmelstjerna, G., et al., 2009. Parasitol. Res. 105: 825-834.

**Agradecimientos:** El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA\_MEC RTA2010-00094-C03-01. Rebeca Calavia ha recibido una beca de formación de investigadores de tipo predoctoral de INIA.



**Figura 1.** En negro, Pdd media mensual y su intervalo de confianza 95%. En gris, proporción media mensual de cada género parasitario: línea gruesa discontinua, *Teladorsagia sp.*; línea gruesa continua, *Haemonchus sp.*; línea fina discontinua, *Chabertia sp.*; línea fina continua, *Trychostrongylus sp.*



**Figura 2.** En el eje de ordenadas, precisión del EHA (medida como la amplitud del semi-intervalo de confianza del 95%) para cada una de las combinaciones de diseño muestral. En el eje de abscisas número de réplicas del ensayo dentro de un mismo muestreo. Las líneas horizontales representan combinaciones desde 1 (línea superior) hasta 5 muestreos (línea inferior).

## PRECISION OF THE EGG HATCH ASSAY TO QUANTIFY ANTHELMINTIC RESISTANCE IN FIELD CONDITIONS

**ABSTRACT:** Benzimidazole resistance was monthly estimated in two natural sheep parasite populations during one year. Egg hatch assay (EHA) was used to estimate proportion (Pdd) of hatched eggs at a discriminant dose of 0.1  $\mu\text{g/ml}$  of thiabendazol after controlling by natural mortality. Every month, each population was sampled during three consecutive days, and EHA was replicated three times every day. Variance component analysis was performed to estimate precision of EHA (measured as length of the 95% confidence semi-interval, CSI-95%). Results showed that EHA was notably imprecise, since performing EHA with a single sampling with two replicates, such as it is advised by *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)* yielded a  $\text{CSI-95\%}=0.2$ , whereas four samplings with two replicates each or three samplings with five replicates each, were needed to reach a  $\text{CSI-95\%} = 0.1$ . Monthly mean Pdd was modulated by variation in relative abundances of parasite genera but, also, by other confounding factors not controlled in the survey.

**Keywords:** anthelmintic resistance; benzimidazoles; egg hatch assay; sheep.