

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DOSIS PROPORCIONALIDAD Y EFICACIA ANTIHELMÍNTICA DEL
NAFTALOFOS EN OVINOS**

Por

**MARTÍNEZ ESTÉVES, Ignacio María
MONTERO TRIAS, Juan Pablo
SALADA MORALES, Sofía**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tutor de Tesis de Grado:

Dr. Gonzalo Suárez

Tesis de Grado aprobado por:

Presidente de Mesa

Dr. Daniel Castells Montes

Segundo Miembro

Dr. Gonzalo Suárez

Tercer Miembro

Dra. María Laura Sorondo

Cuarto Miembro

Prof. Oscar Correa

Fecha: 27 de Marzo de 2015

Autores:

Juan Pablo Montero Trias

Ignacio María Martínez Estéves

Sofía Salada Morales

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República y a todos los docentes, funcionarios que hicieron posible nuestra formación profesional y humana.

A nuestro tutor Dr. Gonzalo Suárez por brindarnos tiempo, materiales, enseñanzas, conocimientos.

A nuestro co-tutor Oscar Correa por el tiempo dedicado a esta tesis.

A los Administradores del establecimiento Caja Bancaria, especialmente al Dr. José Luis Callero y funcionarios por el aporte de recursos y logística.

A las funcionarias de Biblioteca por la disposición, colaboración, amabilidad y tiempo en la búsqueda de materiales y corrección de la bibliografía.

A Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del estudio.

A la Compañía Cibeles por la colaboración brindada.

A todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible este día.

Y en especial, a nuestras familias por el apoyo incondicional brindado en todo momento, porque sin ellos no hubiera sido posible nuestra formación profesional y en especial por inculcarnos valores que nos hacen mejores personas cada día.

TABLA DE CONTENIDO	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE GRÁFICOS, CUADROS Y FOTOS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
Epidemiología de nematodos gastrointestinales	11
- Principales parásitos gastrointestinales	13
- Ciclo biológico	14
- Presentación estacional	16
Métodos de control de los nematodos gastrointestinales	17
- Formas de Control	17
Medicamentos antihelmínticos	18
- Breve reseña histórica	18
- Antihelmínticos de uso contemporáneos	20
- Naftalofos	21
Resistencia antihelmíntica	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Instalaciones y Equipamientos	27

Animales Experimentales	27
Grupos experimentales	28
-Muestreo farmacológico	29
-Muestreo parasitológico	29
Análisis de Muestras	30
-Estudio farmacológico	30
-Estudio parasitológico	30
Análisis de datos	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	41
ANEXO	42
Técnica de Famacha	42
Condición corporal	43
Equipo de trabajo	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	45

LISTA DE FIGURAS, CUADROS Y FOTOS	Página
Figura I: Distribución de ovinos (Porcentaje del total nacional)	12
Figura II: Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales	15
Figura III: Presentación estacional (aproximada) de los nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay	16
Figura IV: Distribución de la actividad normal AChE, en corderos parasitados en condiciones naturales	32
Figura V: Escala FAMACHA	42
Figura VI: Escala de Condición Corporal	43
Cuadro 1: Actividad acetilcolinesterasa ($\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$), desviación y porcentaje de actividad inicial (entre paréntesis), en muestras obtenidas en los días 0, 5, 14 y 28 del tratamiento, clasificando en 5 grupos.(mg/kg)	35
Cuadro 2: Cuantificación de la evolución de la carga parasitaria y eficacia antihelmíntica por medio del Test de reducción en el conteo de huevos (TRCH) de nematodos gastrointestinales (NGI), luego del tratamiento con diferentes dosis orales (mg/kg) de naftalofos a ovinos naturalmente parasitados con NGI	36
Cuadro 3: Determinación de los principales géneros parasitarios presentes en los cultivo de larvas de nematodos gastrointestinales (NGI), luego del tratamiento con diferentes dosis orales (mg/kg) de naftalofos a ovinos naturalmente parasitados con NGI.Cultivo de larvas obtenido luego de cada tratamiento	37
Foto 1: Animales experimentales	28
Foto 2: Grupos experimentales	28
Foto 3: Extracción de sangre	29

RESUMEN:

El presente ensayo experimental evalúa la eficacia de la administración de dosis crecientes de Naftalofos (NFT), y su efecto en los niveles de actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) en corderos Corriedale, naturalmente infectados, con nematodos gastrointestinales. Ciento cincuenta animales experimentales fueron asignados al azar a 5 grupos (n=30). Uno de los grupos no recibió tratamiento farmacológico (control), mientras que, los restantes cuatro grupos, fueron dosificados por vía oral con NFT, a la dosis de 10 (NFT10), 30 (NFT30), 50 (NFT50) y 70 (NFT70) mg/kg. Muestras individuales de sangre entera y materia fecal, fueron obtenidas los días 5, 14 y 28 post-tratamiento, con el fin de evaluar la actividad de la AChE, mediante espectrofotometría y la eficacia clínica del tratamiento, mediante el test de reducción del conteo de huevos en materia fecal (TRCH). Los valores normales de la actividad de AChE previo al tratamiento con NFT, fueron de 1.695 ± 0.363 $\mu\text{mol/mL/min}$. Estos valores se vieron disminuidos, al día 5 en los grupos de 30, 50 y 70 mg/kg, con respecto al grupo control. A partir del día 14, los valores de la actividad de AChE volvieron a los niveles iniciales, independientemente de la dosis administrada. La eficacia obtenida (TRCH), al día 5, fue de 85% (IC₉₅ 74:92) para NFT10; 99% (IC₉₅ 99:100), para NFT30 y 100% para NFT50 y NFT70. Similares resultados fueron obtenidos al día 14 post-tratamiento. Independientemente del grupo tratado, al día 28, el TRCH se ubicó en el rango de 49- 60%. Se cuantificó que, todos los grupos presentaban una menor proporción de L₃ de *Haemonchus spp.* en relación al grupo control (>95%). A través del cultivo de larvas, se demostró, un incremento en el espectro de acción contra otros géneros parasitarios, a dosis de 50 y 70 mg/kg de NFT. En todas las evaluaciones realizadas, los grupos de NFT30, NFT50 y NFT70 no presentaron diferencias significativas, en torno a la toxicidad y al TRCH. Los resultados obtenidos, indican que la dosis de 30 mg/kg resulta suficiente para alcanzar eficacias superiores al 95% en el TRCH.

SUMMARY

This experimental trial evaluates the efficacy of the administration of increasing doses of naphthalophos (NFT), and their effect on the activity levels of erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in Corriedale lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes. One hundred and fifty experimental animals, randomly assigned into 5 groups (n=30). One group received no drug treatment (control), while the remaining four groups were dosed orally with NFT, at doses of 10 (NFT10) 30 (NFT30), 50 (NFT50) and 70 (NFT70) mg/kg. Individual samples of whole blood and feces were obtained on days 5, 14 and 28 post-treatment, in order to evaluate the activity of AChE, spectrophotometrically and the clinical efficacy of treatment using the test reduction counting fecal egg (TRCH). In regard to the normal values of AChE activity prior to treatment were $1.695 \pm 0.363 \mu\text{mol/mL/min}$. These values were diminished at Day 5 in groups 30, 50 and 70 mg/kg, compared to control group. From day 14, the values of AChE activity returned to baseline levels, regardless of the dose administered. The efficacy obtained (TRCH), on day 5, was 85 % (IC₉₅ 74:92) for NFT10; 99 % (IC₉₅ 99:100), and 100% for NFT30 NFT50 and NFT70. Similar results were obtained at day 14 post- treatment. Regardless of the treated group at day 28, the TRCH was located in the range of 49- 60 %. All groups presented a lower proportion of L3 of *Haemonchus spp.* relative to the control group (> 95 %). Through the larvae culture an increase in the action spectrum against other parasite genera, at doses of 50 and 70 mg/kg of NFT was demonstrated. In all evaluations completed, NFT30, NFT50 and NFT70 groups showed no significant differences regarding the toxicity and TRCH. Results indicate that 30 mg/kg are sufficient to achieve higher efficiencies than 95% in the TRCH.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el stock ovino en el Uruguay es de 8.200.000 de cabezas (DICOSE, 2013). La producción ovina se realiza principalmente a cielo abierto sobre pasturas naturales, con las máximas garantías en cuanto a la salud y al bienestar animal (SUL, 2010). Los principales productos son la lana, la carne y pieles, los cuales alcanzan valores de alta significación para la dinamización de toda la economía pecuaria.

Las principales razas ovinas de acuerdo al número de ejemplares que hay en el país son: Corriedale, Merino Australiano, Ideal, Merilín, Romney Marsh, dentro de las cuales el Corriedale es el que se encuentra en mayor proporción (65%). Existen también otras razas como el Texel, Ile de France, Hampshire Down, Southdown, Suffolk, Poll Dorset y Dohne Merino, que se utilizan para cruzamientos en busca de producción de carne (SUL, 2010).

El efecto que producen los nematodos gastrointestinales (NGI) sobre los ovinos, ha sido cuantificado a nivel de la recria ovina, determinando pérdidas potenciales de hasta el 23,6% en la ganancia de peso vivo, 29,4% de reducción en el peso de vellón sucio (Steel et al., 1978; Familton, 1983; Castells et al., 1995; Castells et al., 1997) y una tasa de mortalidad de hasta un 50% (Castells, D. et al., 2002; 2004; Mederos et al., 2002). Estos datos llevan a catalogar a los NGI como una de las principales limitantes sanitarias-económicas de los sistemas de producción ovina en Uruguay. En Uruguay, se ha determinado que las dos especies mayormente involucradas son *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (Nari et al., 1987).

Diferentes medidas de control dirigidas a contrarrestar el efecto nocivo de las parasitosis son factibles de emplear y/o se encuentran en desarrollo en la actualidad. Entre ellas, la más utilizada, se basa en el uso de tratamientos antihelmínticos de forma adecuada. Un inadecuado uso de los mismos, favorecería la aparición más temprana de cepas de parásitos resistentes (resistencia antihelmíntica). En la actualidad, el desarrollo masivo de resistencia

a distintos principios activos es un fenómeno preocupante, lo que ha determinado cambios en las estrategias farmacológicas de control parasitario.

Hoy en día, en nuestro país, Naftalofos (NFT), es una de las alternativas en el control antihelmíntico, de cepas resistentes a bencimidazoles (BZS), imidazotiazoles (IZS), avermectinas (AVS) y salicilanidas (Castells *et al.*, 2002; Lorenzelli *et al.*, 1996; Suárez, datos no publicados).

De los aspectos a considerar en el uso de NFT como alternativa terapéutica, se destaca lo relacionado a la dosis utilizada, el impacto toxicológico sobre el ovino y el efecto antihelmíntico alcanzado.

Desde el punto de vista de la farmacodinamia, sabemos que el mecanismo de acción del NFT, es a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa (ACh) en forma irreversible, provocando la inhibición de la misma (Martin, 1997). Si bien los efectos parasimpáticos se producen a nivel del parásito, signos de toxicidad pueden presentarse en animales que reciben el fármaco en particulares condiciones (animales debilitados, ayunados, etc.). Esto ha determinado que el biomarcador de elección para utilizar en sistemas de vigilancia de exposiciones crónicas y en intoxicaciones agudas por órganos fosforados, sea la cuantificación de la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) (Obiols, 2004).

En ovinos, no se conocen datos que correlacionen variaciones en la posología de NFT con los niveles de inhibición de la AChE, ni el período mínimo de recuperación de los niveles basales de la enzima; siendo esto último, un aspecto crucial para determinar un rango mínimo de intervalo para la re dosificación con NFT.

En relación a lo mencionado anteriormente, consideramos que, la falta de estudios que evalúen el impacto toxicológico y el efecto antihelmíntico del NFT en el ovino, así como el ajuste de dosis del NFT en condiciones de producción, son aspectos de gran relevancia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

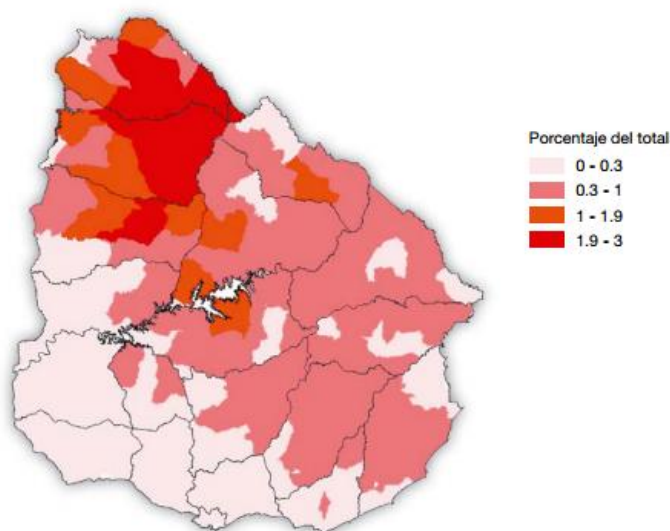
Epidemiología de nematodos gastrointestinales

El conocimiento de la dinámica del parasitismo es fundamental, para proponer estrategias de control. Para esto se debe determinar la presencia, prevalencia, distribución espacial (regional o dentro de un determinado lugar) y temporal (estacionalidad) de las principales especies. Estos aspectos, están influenciados por cuatro grupos de factores: dependientes de los parásitos, del ambiente, de los hospedadores y del manejo.

Dentro de los aspectos dependientes de los parásitos, debemos enfatizar que son parásitos de ciclo directo que sobreviven a dos ambientes durante su ciclo vital: a) medio externo, donde evolucionan las formas infectivas, expuestas a condiciones climáticas variables, y b) el medio interno, dado por el hospedador, en el que enfrentan la respuesta inmune, la competencia entre especies parasitarias y los tratamientos farmacológicos. Con factores de adaptación genéticos, predeterminados en cada especie y determinante para su presencia en distintos ambientes.

Con relación al ambiente, este condiciona la prevalencia, la estacionalidad y es fundamental para determinar el nivel de riesgo parasitario para las poblaciones ovinas.

Respecto a los hospedadores (ovinos), se encuentran principalmente en los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Tacuarembó y Durazno, con una distribución mayoritaria sobre las regiones de basalto. (Figura I)



Fuente: elaborado por DIEA, con información de DCOSE.

ANUARIO ESTADÍSTICO AGROPECUARIO 2013

Figura I: Distribución de ovinos (Porcentaje del total nacional). (Fuente: MGAP, DIEA, 2013).

Las poblaciones ovinas condicionan, por su nivel de susceptibilidad, el desarrollo de las poblaciones parasitarias. La capacidad de respuesta inmune evoluciona con la edad y las experiencias de parasitismo; es así que, los individuos adultos alcanzan un nivel de resistencia moderado. Los niveles de susceptibilidad individual, varían genéticamente entre individuos de igual categoría y a los fines prácticos, se estudian desde dos puntos de vista: la tolerancia o resiliencia, que es la capacidad de algunos hospedadores de albergar gran cantidad de parásitos sin sufrir sus efectos en la producción o salud y la resistencia, que es la aptitud de algunos hospedadores, para interrumpir total o parcialmente el ciclo y la reproducción de las poblaciones parásitas a que es expuesto. Está demostrado en poblaciones no seleccionadas, que el 25 % de los animales pueden generar más del 75% de la contaminación, esto justificaría la segregación de los individuos susceptibles (Oleachea, 2005).

La variación en la susceptibilidad de los ovinos expuestos, y el pastoreo simultáneo o alterno con especies no susceptibles afecta la dinámica y

diversidad natural de las poblaciones. Las cargas elevadas en sistemas intensivos, aún con niveles iniciales bajos de eliminación de huevos, generan altas tasas de contaminación que son desencadenantes de pérdidas productivas (Oleachea 2005).

Principales parásitos gastrointestinales

Dentro de las principales especies de NGI que se desarrollan en ovinos, encontramos: *H. contortus* (43%), *T. colubriformis* (26%), *T. axei* (12%), *Nematodirus spp.* (11%), *Teladorsagia circumcincta* y otros (8%) (Castells, 2004).

H. contortus es un nematodo que se ubica en el abomaso (cuajo), los machos adultos miden 10 a 20 mm mientras que las hembras son más grandes, 18 a 30 mm de longitud. Son parásitos hematófagos, ya que poseen una lanceta dorsal que les permite erosionar la mucosa del abomaso. El potencial biótico es elevado, siendo de 5000 a 10000 huevos/hembra/día. Tiene un período pre patente de 14 días (Lapage, 1971).

T. colubriformis, parásito del intestino delgado. El macho mide de 4 a 4,5 mm y la hembra entre 5 y 7 mm de longitud. Se alimentan de tejido intestinal. Tiene un potencial biótico moderado, entre 100 y 200 huevos/hembra/día. Presenta un período pre patente de 21 días (Lapage, 1971).

T. circumcincta, se encuentra ubicado en el abomaso. El macho tiene entre 7,5 y 8,5 mm y la hembra 9,8 a 12,2 mm de largo. La enfermedad causada por este parásito se denomina ostertagiasis, la cual no es muy común en ovinos (Lapage, 1971).

C. curticei, se encuentra en el intestino delgado. Los machos miden 4,5 a 5,4 mm y las hembras 5,8 a 6,2 mm de longitud. Esta especie aumenta su número en la primavera. *Cooperia spp.* succiona sangre del intestino delgado (Lapage, 1971).

O. columbianum y *O. venulosum*, son parásitos del colon de los ovinos. Los machos tienen de 12 a 16,5 mm y las hembras de 14 a 21,5 mm de longitud. El huésped genera inmunidad frente a este parásito, de tal forma que los envuelve en fibrina formando los llamados nódulos oesofagostominos en el intestino delgado (donde mudan de L3 a L4) (Lapage, 1971).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de los NGI es de tipo directo (como muestra la figura II); consta de una fase que se desarrolla sobre el hospedador (relación parásito-animal) y otra de vida libre en el ambiente (relación parásito-medio ambiente).

La fase de vida libre comienza cuando los huevos caen al suelo con la materia fecal. Dentro de la deposición fecal, en condiciones apropiadas de temperatura, humedad y oxigenación evolucionan (pasando por mórula, gástrula, larva pre-eclosionada) hasta dar origen a la larva 1 (L₁), que abandona el huevo y después de un período de actividad, muda a larva 2 (L₂). La L₁ y L₂ tienen muy escasa movilidad y son los estados más vulnerables a las condiciones climáticas desfavorables. Luego de un período de reposo adquiere el estado de larva 3 (L₃) infectante, la cual presenta gran movilidad y mayor resistencia a condiciones climáticas adversas que las anteriores. La fase de eclosión de huevo y desarrollo de larvas se incrementa en forma lineal en el rango de 5 a 35 ° C (Williams y Bilkovich, 1973). Fuera de estos límites ocurre una alta tasa de mortalidad (Levine, 1963). Si existe suficiente humedad, las L₃ son arrastradas fuera de la materia fecal, permaneciendo en la pastura hasta que son ingeridas por el hospedador o mueren (Levine, 1963). Se concentran en cercanías de la materia fecal, y son capaces de trepar por tallos y hojas hasta una altura de 20 a 25 cm, favorecidas por el micro clima propicio (humedad), que se forma entre el suelo y el extremo de la planta (Williams y Bilkovich, 1973). En términos generales el tiempo requerido para llegar al estado infectivo depende de la temperatura, la humedad (provista por las heces) y el grado de oxigenación pudiendo ser tan corto como 2,5 días (para *Haemonchus spp.* en condiciones ideales de laboratorio a 33 °C), hasta varias semanas.

En la fase parasitaria los animales adquieren la infección ingiriendo forraje con L₃, estas se desprenden de su envoltura externa en el rumen o abomaso (ya sean parásitos abomasales o intestinales) y luego transcurren una fase histotropa, en la que aumentan su tamaño. En el término de cuatro días alcanzan el cuarto estado (L₄), y a los diez días luego de la ingestión se convierten en larva 5 (L₅). Emergen a la luz en el abomaso/intestino alcanzando el estado adulto (diferenciándose en macho y hembra); se produce la cópula, y las primeras hembras grávidas pueden encontrarse alrededor del día quince, mientras que los primeros huevos podrán ser hallados en las heces alrededor de las tres semanas de la infección. Cada hembra podrá expulsar varios miles de huevos a lo largo de su vida, que varía desde unas cuatro semanas hasta doce meses (Armour, 1974), estableciéndose diferencias en el potencial biótico de cada género de parásito, debido a diferencias en la oviposición.

El estudio de la dinámica de los estados de vida libre, adquiere especial relevancia a partir de la demostración de que el 95 % de la población parasitaria se encuentra en esta fase y solamente el 5% en los animales. Por tanto, el conocimiento de dicha dinámica resulta esencial para la elaboración de programas de control sustentables.

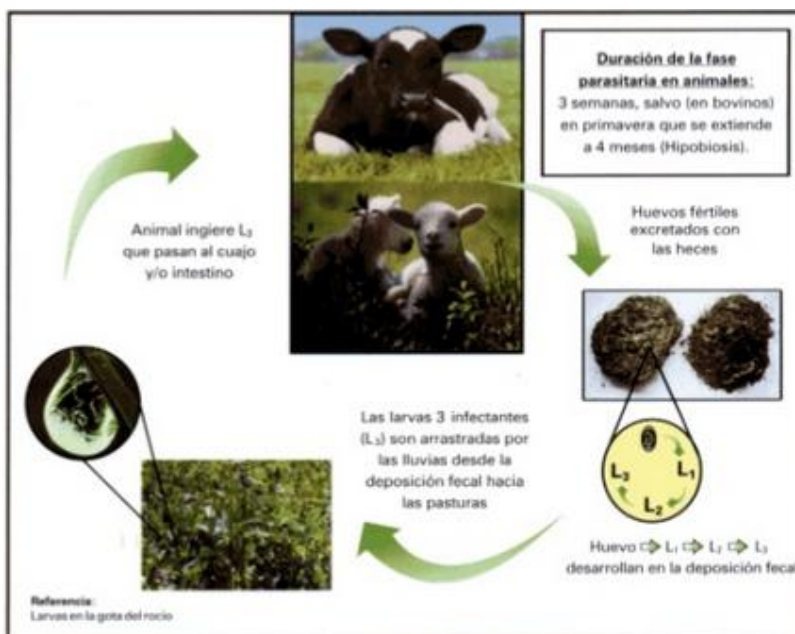


Figura II: Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales. (Fuente: Fiel, 2005)

Presentación estacional

Los diferentes géneros de NGI del ovino en el Uruguay, aparecen con variada frecuencia a lo largo del año, dependiendo fundamentalmente de las condiciones climáticas. De este modo, *H. contortus* por ser de clima cálido, aparece principalmente en primavera y otoño. En el verano lo hace en proporciones importantes si se dan condiciones elevadas de humedad y temperatura, en invierno disminuye su aparición, salvo cuando se dan condiciones cálidas (veranillos). En caso del *T. colubriformis* es diferente (por ser de clima frío), por lo que es de otoño, invierno (fundamentalmente) y primavera. En verano en general, las poblaciones de *T. colubriformis* son bajas. *T. circumcincta* se presenta fundamentalmente en invierno, mientras que *Oesophagostomum spp.* está presente todo el año y *Cooperia spp.* entre los meses de Octubre y Noviembre. De todas maneras, esta presentación estacional es solo orientativa, ya que una de las características más salientes del clima en Uruguay es su irregularidad (Castells, 2004).

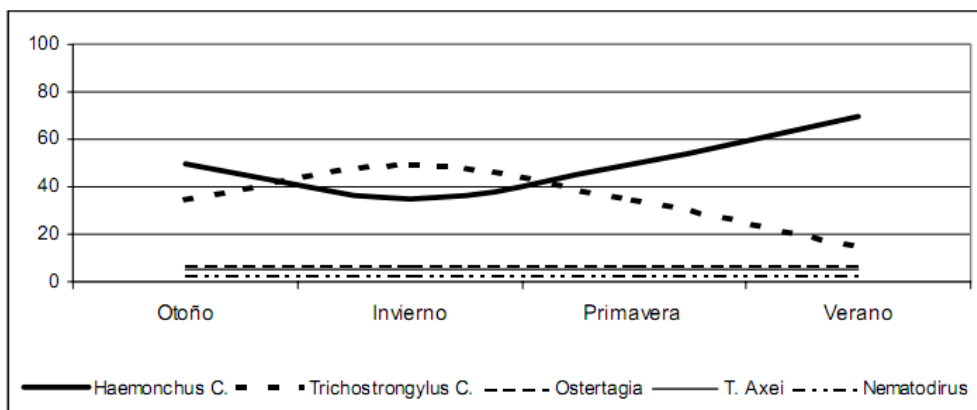


Figura III: Presentación estacional (aproximada) de los nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. (Fuente: Nari et al., 1986)

La temperatura y la humedad influyen en la supervivencia y velocidad del desarrollo del huevo a larva 3 (L₃), variando de 8 a 60 días. Un desarrollo rápido y altas tasas de supervivencia ocurren durante períodos de climas cálidos (más de 10°C) y húmedos. El frío, el calor extremo y seco bajan la tasa de supervivencia de las larvas (Mederos, 2002).

La materia fecal, es la principal protección de las formas de vida libre, ofreciéndoles las condiciones de humedad y temperatura para su desarrollo inicial y su posterior supervivencia. Las excretas de los lanares en forma de grano, ofrecen en comparación con la de los bovinos, poca protección a los estadios de vida libre (Suárez et al., 2007). Las larvas infectantes, pueden desplazarse vertical u horizontalmente, siendo la lluvia el principal factor de dispersión de las mismas, desde la materia fecal a la pastura. De este modo las larvas infectantes se presentan accesibles al ovino que pasta (Suárez et al., 2007).

Resulta oportuno remarcar, que los ovinos son altamente sensibles a las parasitosis durante toda la vida, en especial las categorías jóvenes (corderos y borregos) y las hembras próximas al parto y durante el alza de lactación. Esta última categoría es la responsable de contaminar las pasturas con parásitos, que luego actuarán sobre sus propias crías (Fiel, 2005).

Métodos de control de los nematodos gastrointestinales

Formas de control

Los métodos de control de NGI apuntan a eliminar el parásito en alguna de las etapas de su ciclo. El grado de control parasitario debe ser compatible con una producción económicamente rentable. Tal cual lo cita Castells (2002), existen diversas formas de clasificar y estudiar las medidas de control de los NGI en ovinos:

- I. Control químico: o sea el uso de productos químicos (uso de antihelmínticos), que a las dosis utilizadas, ejercen su efecto letal sobre las formas parasitarias y mínimos a nulos efectos sobre el hospedador al cual ha sido destinado (ovinos).
- II. Manejo antiparasitario: a través de la obtención y el uso de pasturas seguras; entendiéndose por estas a aquellas que tienen niveles de

contaminación/infestación bajos, permitiendo el pastoreo de animales sin riesgo inmediato de infección parasitaria.

III. Control Genético: a través de la selección de aquellos ovinos que son más resistentes a las parasitosis por NGI.

IV. Control Inmunitario: a través de la utilización de vacunas, que estimulando el sistema inmunitario permitan frenar el establecimiento y mantenimiento de poblaciones parásitas sobre el animal.

V. Control Biológico: es el uso de organismos vivos (principalmente hongos), que controlan las formas parasitarias en diferentes etapas (fundamentalmente estados libres).

En la presente tesis haremos foco sobre la aplicación racional de las medidas químicas de control.

Medicamentos antihelmínticos

Breve reseña histórica

En la primera mitad del siglo XX, el control de NGI estuvo dominado por el uso de la fenotiazina, los Organofosforados (OF) y algunas sales de nicotina y cobre. En 1961 se incorpora al mercado el primer antihelmíntico moderno, el tiabendazol que combina algunas características resaltables para este momento como ser la alta eficiencia, amplio espectro, buen margen de seguridad, bajo volumen de dosis y ser relativamente económico. Luego surgieron algunas modificaciones de la molécula original, que la mejoraron aún más, en relación a la persistencia y al perfil de eficacia y es así que aparecen en el mercado: albendazol, fenbendazol, oxibendazol, oxfendazol y parbendazol dentro del grupo de los carbamatos de Benzimidazol (BZS) de aplicación en ovinos.

El mecanismo de acción de los BZS está bien determinado a través de la unión con receptores específicos de BZS a la β - tubulina. Las tubulinas α y β se ensamblan y generan los microtúbulos que son componentes del citoesqueleto de los eucariotas e intervienen en diversos procesos fundamentalmente

vinculados a la dinámica microtubular (desplazamiento, movimiento y transporte de sustancias). El bloqueo de la β - tubulina por parte del BZS lleva a la muerte celular.

Mientras los BZS se utilizaban en forma masiva en 1971 aparecía en el mercado de los antihelmínticos un nuevo principio activo, el Levamisol (LVM), perteneciente al grupo de los Imidazotiazoles (IZS). El principal mecanismo de acción del LVM es el estímulo nicotínico, por lo que se produce parálisis espástica y muerte del nematodo por contracciones musculares permanentes. Más tarde, se incorporan nuevos grupos para ser utilizados en ovinos con mecanismos similares, tal cuál es el caso del principio activo Morantel.

A mediados de la década de 1980 aparece en el mercado un nuevo grupo de antihelmínticos, el de las LM, que dentro de las características antes mencionadas amplía aún más el espectro y pasa a ocupar el grupo de los denominados endectocidas. En este grupo encontramos las Avermectinas (AVS), (ivermectina, abamectina y doramectina) y las milbemicinas (moxidectina). El mecanismo de acción de este grupo es a través de la modificación de los canales de cloro regulados por el glutamato, que aumenta la permeabilidad, producen una hiperpolarización que determina parálisis y la muerte del nematodo. Fiel, C y Nari, A (2013).

En 2009 un nuevo grupo químico aparece en el mercado mundial, el de los derivados amino acetonitrilo, con la molécula de Monepantel que rápidamente se introdujo en el mercado uruguayo. El mecanismo de acción es por interferencia de los receptores de acetilcolina MPTL1 del sistema nervioso gobernados por el gene Acr-23, produciendo contracciones y parálisis del nematodo (Kaminsky et al., 2008).

A estos cuatro grupos de amplio espectro disponibles en Uruguay se le deben agregar dos grupos de espectro reducido/medio fundamentalmente con acción sobre *H. contortus*, y por lo tanto de suma utilidad en ovinos: las Salicilanilidas, Nitrofenoles y los OF. El grupo de las Salicilanilidas y Nitrofenoles tiene como

principios activos disponibles en el mercado al Closantel (CLT), Nitroxinil y Rafoxanide, y el mecanismo de acción no está bien determinado, aunque algunos estudios indican que su acción a nivel de los nematodos es la fosforilación oxidativa y la interferencia con la formación de energía a través del desacople de ADP/ATP.

El grupo de los OF, estuvo disponible en el mercado desde la década de 1950, pero luego, la aparición de nuevas moléculas antihelmínticas lo dejó segregado por mucho tiempo, hasta que reapareció en el mercado veterinario con dos moléculas: Triclorfón y NFT. El mecanismo de acción de este grupo químico es a través de la asociación de una de las uniones del fósforo con la acetilcolinesterasa, lo que determina que no se degrade la acetilcolina y el nematodo muera por hiperactividad nerviosa.

Se debe mencionar, que existe la aplicación simultánea de más de un principio activo, ya sea administrando dos formulaciones comerciales en el mismo acto de tratamiento o, principios activos combinados, en un mismo producto comercial. Las combinaciones en un principio asociaron LVM+IVM o CLT (Closantel) +IVM y triples combinaciones conteniendo los tres grupos químicos de amplio espectro disponibles en ese momento, ABZ+LVM+IVM.

Con tres grupos de amplio espectro, muchas moléculas dentro de cada grupo y varios compuestos de espectro reducido, con eficacia y persistencia en el control de *H. contortus*, el combate de nematodos por la vía química, parecía ser fácil. Sin embargo, los nematodos han disminuido la acción de los antihelmínticos a niveles inferiores a los originalmente alcanzados, a través de lo que se conoce como el fenómeno de “Resistencia Antihelmíntica” (Castells, 2004).

Antihelmínticos de uso contemporáneo

Un fármaco antihelmíntico debe ser tóxico sólo para el parásito, sin afectar la función celular del mamífero hospedador, este es el gran desafío de la búsqueda de las nuevas drogas antihelmínticas (Lanusse, 1994). El antihelmíntico ideal tendría que tener eficacia en la expulsión del parásito, bajo

costo, tratamiento de única dosis (Meyer, 1959), amplio espectro de actividad antiparasitaria, amplio índice terapéutico, facilidad de administración y eficacia sobre todas las etapas (adulto, inmaduro y huevos) (Meyer, 1959) (Pérez, 2010).

En resumen, los diferentes grupos de los fármacos antihelmínticos disponibles en la actualidad son: 1) compuestos benzimidazoles (albendazol, fenbendazol); 2) compuestos imidazotiazoles (levamisol); 3) lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas); 4) tetrahidropirimidinas (morantel y pirantel); 5) compuestos orgánicos fosforados (triclorfón y naftalofos); 6) salicilanilidas (oxiclosanida, rafoxanide, closantel, clioxanida); 7) nitrofenoles y bifenoles (nitroxinil, niclofolan, hexaclorofeno) (Botana, 2002; Pérez, 2010); 8) derivados del amino-aceto-nitrilo (AAD-1566-monepantel) (Rufener et al., 2009) y 9) el derivado espiroindol (derquantel).

Naftalofos

Es un antihelmíntico de la familia de los OF. Su empleo es con la finalidad de controlar principalmente *H. contortus*. En nuestro país, NFT es una de las alternativas actuales de control antihelmíntico de cepas resistentes a BZS, LVM y AVS (Castells et al., 2002; Lorenzelli et al., 1996).

A nivel comercial se dispone de diferentes formulaciones registradas y presentaciones de NFT. Dentro de ellos encontramos a Baymetin[®] (Bayer, Argentina), el cual viene en presentación en bidón de 10 litros con 1.5 kg de polvo de NFT al 80%. Al completar el restante del bidón con agua se obtiene una solución de NFT 15% que debe usarse inmediatamente. La dosis recomendada es de 50 mg/kg en Uruguay y 30 mg/kg en Australia. Por otra parte se encuentra el Tritom NF[®] (Compañía Cibeles, Uruguay) que viene en presentación en solución pronta para uso al 15% y se recomienda dosis de 50 o 30 mg/kg, según espectro deseado. Otras opciones comercialmente disponibles son el Micronaph[®] (Laboratorio Microsules, Uruguay), Vermkon[®] (Laboratorio König, Argentina) y Sofalon (Laboratorio Dispert).

Los compuestos pertenecientes a categorías de OF presentan mecanismos basados en la inhibición de la AChE (Silva et al., 2001). Los cuales conducen a la inhibición de la colinesterasa por medio de compuestos fosforados provocando acumulo de acetilcolina en la terminación nerviosa. La AChE es sintetizada durante la hematopoyesis. La mejor forma de diagnóstico de intoxicación por fosforados es por medio de monitoreo con determinación de la actividad colinesterasica, verificando el nivel de la acetilcolinesterasa en sangre (OPAS-OMS, 1996).

Hay dos tipos de AChE: la AChE eritrocitaria o verdadera (presente en eritrocitos y en tejido nervioso) y las AChE sérica o pseudocolinesterasa (presente en hígado y plasma). La enzima AChE liberada desde las terminaciones nerviosas hidroliza la acetilcolina a dos fragmentos inactivos, colina y ácido acético. La acetilcolina actúa como neurotransmisor de todas las fibras autonómicas pre ganglionares, de todas las fibras parasimpáticas post ganglionares y de algunas fibras simpáticas post ganglionares; además es un neurotransmisor de la placa motora y de algunas sinapsis inter neuronal del SNC.

Los OF son ésteres, amidas o derivados tioles de ácidos fosfóricos, fosfónicos, fosfotioicos o fosfonotioicos. Estos presentan una estructura química inestable y se hidrolizan con rapidez. Su toxicidad es muy variable. Los compuestos OF pueden producir cuatro tipos de efectos tóxicos sobre el animal:

1. Inhibición de la enzima AChE, produciendo una sobre estimulación colinérgica, que se denominara "síndrome colinérgico".
2. Acción tóxica directa sobre distintos parénquimas, al igual que cualquier otro tóxico.
3. Disfunción de la placa neuromuscular post sináptica, dando lugar al llamado síndrome intermedio.
4. Inhibición de la enzima esterasa neurotóxica produciendo una neuropatía retardada.

Los estudios de toxicidad que evaluaron la formulación de Rametin[®] (Bayer[®]) como antihelmíntico en ovinos, concluyeron que a una dosis de 200 mg/kg en animales en mal estado corporal y con limitada oferta forrajera (pastura natural), manifestaban signos de toxicidad. No obstante, animales en buen estado corporal y con excedente de oferta forrajera (pastura natural) y sometidos a la misma dosis (200 mg/kg), no manifestaron signos de toxicidad (Smith and Thomas 1964). Sin embargo, se encontró que a una dosis de 400 mg/kg, presentaban diarrea, signo que remitía a los 4 días, indicando bajo nivel de toxicidad.

Desde el punto de vista general, los tiempos de aparición de signos de intoxicación a los OF son variables dependiendo del tipo OF involucrado, la dosis ingerida y la especie involucrada. En general, los signos clínicos observados en los animales intoxicados, se puede dividir en efectos locales y sistémicos. Los locales implican ojos y pulmones, debido a la exposición a vapores o gotas de los insecticidas. Estos efectos, revisten mayor importancia cuando la exposición es a través de la pulverización. Los efectos sistémicos son principalmente en el cerebro, los músculos esqueléticos, pulmones, corazón y otros órganos.

Los signos clínicos también se pueden clasificar como muscarínicos, nicotínicos y centrales. Los efectos asociados al receptor muscarínico se manifiestan por vómitos, dolor abdominal, salivación, lagrimeo, micción, diarrea, miosis (pupilas), secreción traqueobronquial, edema pulmonar y cianosis. Los asociados al receptor nicotínico por su parte, produce efectos asociados a receptores en ganglios y músculos esqueléticos. En los animales afectados se presentan espasmos de los músculos, temblores, seguido de convulsiones, las que puede llevar a la parálisis. Los efectos centrales incluyen aprehensión y estimulación, seguido por depresión. Los animales afectados pueden también mostrar inquietud, ataxia, rigidez del cuello y finalmente coma. La muerte se produce por insuficiencia respiratoria y cardiaca.

En humanos la exposición continua a insecticidas OF de alto poder tóxico llevan a graves intoxicaciones. Los insecticidas OF son sustancias altamente solubles en lípidos, pueden ser absorbidos por piel, por ingestión o inhalación.

Se distribuyen en tejido adiposo atravesando la barrera hematoencefálica y placentaria y generalmente son metabolizadas en el hígado (Almeida, 2002). La principal causa de muerte es la insuficiencia respiratoria que suele estar acompañada de un componente cardiovascular secundario (Taylor, 2003). También se puede ver comprometida la musculatura esquelética, sobre todo la musculatura respiratoria (Cavaliere et al 1996).

Resistencia Antihelmíntica

La resistencia a fármacos se define como un estado de no susceptibilidad o susceptibilidad disminuida al efecto de una concentración determinada de un fármaco, que en condiciones normales, causa inhibición del crecimiento o muerte celular (Mottier y Lanusse, 2001). Otra definición similar propuesta por la FAO es, la detección por medio de ensayos sensibles, de un aumento significativo en el número de individuos, dentro de una población única de una especie de parásito, que puede tolerar dosis de medicamento(s), que han demostrado ser letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (Nari, 2001).

La resistencia puede clasificarse como intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca puede deberse a la falta del receptor o, a que la droga no puede entrar a la célula y así llegar a su sitio de acción. La resistencia adquirida se da cuando poblaciones que son inicialmente susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación. La resistencia adquirida es percibida cuando una droga que es inicialmente efectiva para un fin terapéutico determinado deja de serlo (Mottier y Lanusse, 2001).

El uso de antiparasitarios de relativo bajo costo, efectivos y de fácil aplicación ha hecho posible, el control de las plagas que afectan las especies productivas del mundo entero. De esta forma el uso sistemático de químicos por parte de los productores, sin asesoramiento específico, ha conducido al desarrollo de resistencia parasitaria (Nari y Eddi, 2003). A pesar de los intentos por introducir un control antiparasitario integrado, las medidas de control continúan siendo basadas, casi exclusivamente en el tratamiento químico. Los tratamientos

supresivos frecuentes, la subdosificación y la falta de utilización intercalada de drogas de distinta clase, son causas primarias en el desarrollo de resistencia antihelmíntica (Lanusse, 1994).

El primer reporte de resistencia antihelmíntica ocurrió en el año 1957, con el advenimiento de la fenotiazina. Aparentemente el fenómeno ocurre unos pocos años luego de introducir la nueva droga (FAO, 2004). Un relevamiento de carácter nacional llevado a cabo en 1994, reportó que, el 92,5% de los establecimientos dedicados a la cría de ovinos presentaban algún grado de resistencia. En dicho relevamiento se encontró un 80% de resistencia a bencimidazoles (BZS), un 71% a imidazotiazoles (IZS) y un 1,2% a las avermectinas (AVS) (Nari *et al.*, 1996). En los diagnósticos parasitarios, existentes en la época (1994), se diagnosticó que la mayor prevalencia de los parásitos gastrointestinales estaba dada por el género *Haemonchus spp.* A partir de ese momento, son diagnosticados nuevos casos, lo cual determina que se advierta sobre la problemática del control de las parasitosis gastrointestinales en ovinos.

Actualmente los antihelmínticos de espectro reducido, utilizados fundamentalmente en el control de *H. contortus*, presentan varios diagnósticos de resistencia al grupo de las salicilanilidas y fenoles sustituidos (closantel y nitroxinil) y casos de resistencia al triclorfón, aunque no hay reportes claros de resistencia al NFT (Castells, 2011).

El aporte que hicieron y harán los antihelmínticos es indiscutible, sin embargo la gran eficacia de estos antihelmínticos se ve seriamente afectada por el desarrollo, por parte de los nematodos, de resistencia. Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta es que la situación de la resistencia antihelmíntica es diferente en cada establecimiento, lo que hace arriesgado elaborar propuestas generales. Por otro lado, también es diferente según el género parasitario en cuestión. Esta situación determina un cambio de enfoque en el control de nematodos donde los antihelmínticos siguen ocupando un lugar preponderante, pero otros métodos de control deben ser incorporados apuntando a lo que se denomina, Control Integrado de Parásitos (CIP).

HIPOTESIS

La variación en la dosis administrada de NFT repercute directamente en la eficacia parasitaria sobre NGI en ovinos, e indirectamente, a través de la inhibición de la AchE, en el grado de intoxicación. A mayor dosis, se incrementa la residualidad del NFT, con respecto a su eficacia parasitaria.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el impacto de distintos niveles de dosificación de NFT, considerando la variable de infección parasitaria y el perfil de inhibición de la AChE, con el fin de determinar el grado de eficacia antihelmíntica alcanzado en corderos en condiciones naturales.

Objetivos específicos

- 1) Cuantificar la eficacia y persistencia antihelmíntica de distintos niveles de dosificación de NFT en corderos parasitados en condiciones naturales.

- 2) Determinar la distribución de los valores normales de la actividad de AChE, en corderos parasitados en condiciones naturales.

- 3) Caracterizar los tiempos de recuperación y la persistencia parasitológica, en función de los niveles basales de la actividad AChE en corderos, luego del tratamiento oral con NFT a diferentes dosis en condiciones naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instalaciones y Equipamientos

Instalaciones: La fase de campo se realizó en el establecimiento rural de la Caja Bancaria, ubicado en el Departamento de Durazno, R14 km 47. Las instalaciones fueron adecuadas para el manejo de los animales, disponiendo para tal fin de potreros con disponibilidad de pastura, sombra, agua y corrales así como tubo, balanza y elementos de sujeción para los ovinos.

Equipamientos: Para la fase analítica, el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, dispuso de equipamiento especializado para la preparación de las muestras y para el análisis toxicodinámico por espectrofotometría (Metrolab 1600). Asimismo, el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, dispuso de equipamiento necesario para el análisis parasitológico.

Animales Experimentales

Previo al inicio del ensayo (otoño 2014), se seleccionaron e identificaron individualmente a 150 corderos Corriedale de una misma majada en condiciones naturales de pastoreo, caracterizando peso (32.0 ± 4.20 kg), condición corporal (2:3 rango) y FAMACHA (1:2 rango). Los animales se agruparon en 5 grupos experimentales con un total de 30 animales por grupo ($n=30$). Los animales fueron adjudicados de forma aleatoria a los distintos grupos experimentales a medida que ingresaban al corral. En todo el periodo de tiempo que duró el experimento, los animales se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales.

Foto 1: Animales experimentales



Grupos experimentales

Cuatro grupos fueron dosificados con una única dosis por vía oral de NFT (15%, Tritom NF[®], Compañía Cibeles S.A., Uruguay) de 70, 50, 30, 10 mg/kg (NFT70; NFT50; NFT30 y NFT10, respectivamente) (rango del 140% al 20% de la dosis comercialmente históricamente sugerida [50mg/kg]), mientras que uno de los grupos no recibió tratamiento farmacológico (control).

Foto 2: Grupos experimentales



Muestreo farmacológico:

Previo al inicio del tratamiento farmacológico, al total de los animales se les determinó el nivel basal de AChE mediante una muestra individual de sangre (0.5 mL sangre heparinizada). Una vez administrado el fármaco se colectó una nueva muestra individual de sangre a los 5 (D5), 14 (D14) y 28 (D28) días post-tratamiento.

Luego de colectadas las muestras, se realizó una dilución 1/10 con agua destilada para posteriormente ser congelada a -18°C hasta el momento de su análisis mediante espectrofotometría dentro de los 30-60 días de extraída.

Foto 3: Extracción de sangre



Muestreo parasitológico:

La extracción de materia fecal se realizó desde el recto en forma manual para su posterior colocación en bolsas de polietileno, teniendo la precaución de que estuvieran cerradas con la menor cantidad de aire posible, identificadas con el número del animal y refrigeradas hasta su procesamiento.

Se realizó el seguimiento de la carga parasitaria de todos los animales, mediante examen coprológico individual seriado (días 0, 5 (D5), 14 (D14), 28 (D28)) y la determinación de Condición corporal (ver anexo), Famacha (ver anexo) y peso (previo a la dosificación).

Análisis de las muestras

Estudio farmacológico:

Para determinación de la actividad de AChE se utilizó una modificación del método de Ellman (Cerón *et al.*, 1999) a partir de lisis de eritrocitos (López et al., 1987). El valor de la actividad de la AChE se expresó como porcentaje de reducción de la actividad basal individual de cada animal experimental previo al tratamiento.

Estudio parasitológico:

Recuento de huevos por gramo en materia fecal y cultivo de larvas:

Se utilizó la técnica cuantitativa McMaster modificada. Para esta prueba se utilizó una solución saturada de cloruro de sodio (densidad 1,20), lo que produce la flotación de los huevos de la mayoría de los géneros parasitarios de NGI, permitiendo así su recuento en cámaras con una sensibilidad de 40 huevos por gramo (HPG), utilizada en este estudio.

Para determinar la carga parasitaria (%) se utilizó el Test de reducción en el conteo de huevos de NGI por gramo de materia fecal (TRCH) (Coles et al., 1992).

$$\text{TRCH (\%)} = 100 * (1 - X_t / X_c)$$

Donde X_t es el recuento de huevos grupo tratado y X_c es el grupo de control a los 5, 14 y 28 días post-tratamiento

Adicionalmente, se realizó un coprocultivo a cada grupo, extrayendo 10 gr de materia fecal (obtenido de un "pool" de materia fecal de cada grupo), mediante la técnica de Roberts-O' Sullivan, garantizando las condiciones necesarias de temperatura (27°C), oxígeno y humedad (75%) para el desarrollo de huevos a L3, permitiendo conocer así los géneros parasitarios predominantes. Luego de 8 días se recuperaron las larvas para su posterior identificación (observadas en forma directa al microscopio) empleando las claves de Niec (1968).

Se diagnostica resistencia antihelmíntica cuando: el TRCH es inferior a 95%, o, el nivel de confianza del 95%, es inferior a 90%. Si sólo uno de estos parámetros se cumple, se está frente a la sospecha de resistencia antihelmíntica. (Coles et al., 1992)

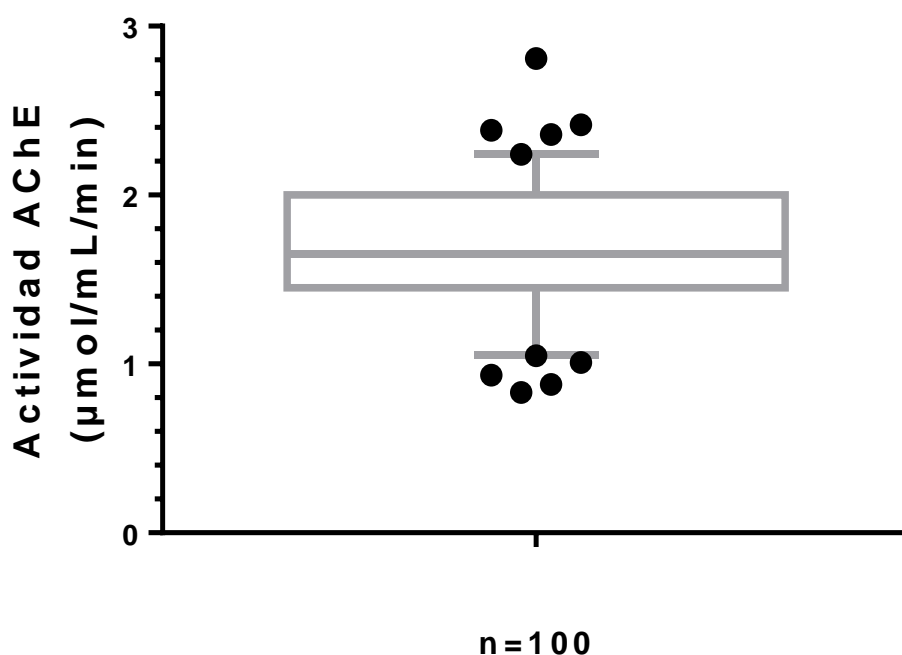
Análisis de datos:

Los datos cuantitativos fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. Los parámetros farmacodinámicos y parasitológicos obtenidos en los diferentes grupos experimentales se promediaron y expresaron como media \pm desvío estándar (DE) o media \pm rango. Para verificar diferencias entre los valores se realizó un análisis previo de los datos para establecer su distribución. En base a estos resultados, fueron aplicados análisis paramétricos (ANOVA + Bonferroni o modelos lineales generalizados) o no paramétricos (Wilcoxon o Kruskal Wallis). En los diferentes test estadísticos empleados, se consideró un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Para el ajuste estadístico de los datos se utilizó el programa R (R Development Core Team 2012).

Resultados y Discusión

En la Figura IV, se observa la distribución de la actividad normal AChE previo a la administración de NFT en los 100 animales muestreados en el estudio farmacológico. La media de la actividad normal de la AChE se ubicó en 1.695 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ con un intervalo de confianza del 1.623 – 1.767 $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$. Frecuentemente, al evaluar la actividad de la AChE, los resultados no son presentados en términos absolutos de la actividad, sino en función del porcentaje de la inhibición hallada. Es un avance importante disponer de valores de referencia nacionales, a partir de una muestra representativa de una población aleatoria siguiendo un diseño experimental.

Figura IV: Distribución de la actividad normal AChE, en corderos parasitados en condiciones naturales.



En el cuadro 1, se presentan los resultados obtenidos de la actividad de AChE, demostrando que al día 0 los valores de los 5 grupos son similares, encontrándose dentro de los parámetros reflejados en los intervalos de confianza reportados en la figura IV. Al día 5 (D5) luego de administrar NFT, se visualiza una disminución significativa de la actividad de dicha enzima en los grupos de 30, 50 y 70 mg/kg con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Al día 14 post tratamiento, se restablecen los valores dentro de los parámetros iniciales (D0), independientemente del grupo y la dosis administrada.

La AChE es el biomarcador de elección para la exposición aguda y crónica a los OF. Considerándose de suma relevancia para los sistemas de vigilancia en intoxicaciones en el hombre, por permanecer deprimida mayor tiempo y un buen biomarcador del índice de exposición (Obiols, 2004). No obstante, en ovinos no se conocen datos que correlacionen variaciones en la posología del NFT con los niveles de inhibición de la AChE, ni el período mínimo de recuperación de los niveles basales de la actividad de la AChE ovina. Esto último representa un aspecto crucial para determinar el mínimo intervalo para la re-dosificación del NFT. Nuestros resultados indicarían que el intervalo de dosificación de al menos 14 días, se ajusta a los niveles de recuperación de la actividad enzimática ovina post-dosificación.

La carga parasitaria promedio en el total de los animales previo al inicio del ensayo, fue de 1574 ± 1184 HPG, indicando que el nivel de infestación parasitario era adecuado para evaluar la eficacia antihelmíntica del NFT a las diferentes dosis. Luego de asignar aleatoriamente los animales a cada grupo experimental, se registraron similares cargas parasitarias promedio previo al inicio de los tratamientos (Cuadro 2). Al día 5, independientemente de la dosis administrada de NFT al día 0 (D0), todos los grupos tratados disminuyeron significativamente la cantidad de HPG ($p < 0.05$), con respecto al grupo control. Se mantuvieron similares niveles hasta el día 14, retornando a los valores iniciales (pre-tratamiento) al día 28 (Cuadro 2).

De los aspectos a considerar en el uso de NFT como alternativa terapéutica, se destaca lo relacionado a la dosis utilizada, el impacto toxicológico sobre el ovino y el efecto antihelmíntico alcanzado. NFT en Australia y Uruguay actualmente está indicado a la dosis de 30 a 50 mg/kg (Rametin[®], Australia, www.bayer.com.au y Baymetin[®], Tritom[®], Micronaph[®], Uruguay). Si bien en ovinos, en la actualidad no se reportan estudios recientes de eficacia parasitaria, un número importante de estudios fueron realizados para confirmar la eficacia antihelmíntica de NFT en la década de los 70-80. Los rangos de dosis evaluados se describen entre 25 a 75 mg/kg (Nickel *et al.*, 1974); 35 y 50 mg/kg (Lorenzelli *et al.*, 1996), 6,25 a 25 mg/kg (Le Jambre y Martin, 1979), 50 y 75 mg/kg (Thomas, 1964), 50 mg/kg (Castells *et al.*, 2002). Los resultados de eficacia antihelmíntica, obtenidos en el grupo 10 (20% de la dosis históricamente recomendada), para los días 5 y 14, presentaron una menor eficacia (86% y 81%, respectivamente), en la reducción de contaje de huevos. El resto de los grupos tratados alcanzó un 99-100% de eficacia ($p < 0,05$) (Cuadro 2). Estos resultados son coincidentes con lo reportado en trabajos anteriores.

Al día 28, independientemente de la dosis administrada, la reducción en todos los grupos tratados se mostró entre 49 y 60% ($p > 0.05$), pero significativamente inferior al grupo control. Estos resultados podrían ser adjudicados a la posibilidad de re-infestación de los animales por una elevada oferta de L₃ a nivel de pasturas. Dado que los animales permanecieron siempre en el mismo potrero infectado y que previo al tratamiento, los resultados del cultivo de larvas indicaron que en todos los grupos, que población parasitaria predominantemente era 100% *Haemonchus spp.*, podemos considerar que las condiciones epidemiológicas fueron las favorables para el mencionado género (primavera) y para su presencia en los cultivos de larvas (elevado potencial biótico – limitaciones de la técnica para cuantificar otro género parasitario) al día 28 (Cuadro 3).

Cuadro 1. Actividad acetilcolinesterasa ($\mu\text{mol/mL/min}$), desviación y porcentaje de actividad inicial (entre paréntesis), en muestras obtenidas en los días 0, 5, 14 y 28 del tratamiento, clasificando en 5 grupos.(mg/kg).

Tratamiento (mg/kg)	Tiempo de muestreo (días)			
	D0	D5	D14	D28
10	1.74 \pm 0.32 (100)	1.59 \pm 0.29 ^{bc} (93)	1.78 \pm 0.32 ^a (105)	1.70 \pm 0.35 ^a (101)
30	1.63 \pm 0.39 (100)	1.35 \pm 0.22 ^{ab} (86)	1.54 \pm 0.38 ^a (101)	1.49 \pm 0.27 ^a (98)
50	1.60 \pm 0.33 (100)	1.20 \pm 0.24 ^a (77)	1.73 \pm 0.51 ^a (110)	1.50 \pm 0.23 ^a (96)
70	1.68 \pm 0.73 (100)	1.19 \pm 0.29 ^a (75)	1.67 \pm 0.96 ^a (105)	1.58 \pm 0.30 ^a (101)
Control	1.80 \pm 0.29	1.77 \pm 0.50 ^c	1.81 \pm 0.38 ^a	1.72 \pm 0.46 ^a

^{a, b, c} Letras diferentes dentro de una misma columna, indican diferencias estadísticamente significativas a $P < 0.05$.

Cuadro 2. Cuantificación de la evolución de la carga parasitaria y eficacia antihelmíntica por medio del Test de reducción en el conteo de huevos (TRCH) de nematodos gastrointestinales (NGI), luego del tratamiento con diferentes dosis orales (mg/kg) de naftalofos a ovinos naturalmente parasitados con NGI.

Tratamiento (mg/kg)	HPG (media)				TRCH (IC 95%)		
	Pre- tratamiento	D5	D14	D28	D5	D14	D28
10	1297	202 ^b	242 ^b	952 ^b	86 (75:92)	81 (69:88)	53 (18:73)
30	1754	38 ^c	14 ^c	1030 ^b	100 (99:100)	99 (98:99)	49 (17:68)
50	1745	0 ^c	7 ^c	990 ^b	100 (100)	99 (98:100)	51 (22:69)
70	1593	0 ^c	5 ^c	801 ^b	100 (100)	100 (99:100)	60 (43:72)
Control	1490	1374 ^a	1272 ^a	2013 ^a	-	-	-

Pre-tratamiento: día en el que se aplica el tratamiento; **D5**= cinco días post dosificación; **D14**= catorce días post dosificación; **D28**= veintiocho días post dosificación. HPG= huevos por gramo. IC= Intervalo de confianza. ^{a, b, c}Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas a P<0.05.

Cuadro 3. Determinación de los principales géneros parasitarios presentes en los cultivo de larvas de nematodos gastrointestinales (NGI), luego del tratamiento con diferentes dosis orales (mg/kg) de naftalofos a ovinos naturalmente parasitados con NGI.

Especies / Tratamiento	Día 5					Día 14					Día 28				
	Control	10	30	50	70	Control	10	30	50	70	Control	10	30	50	70
<i>Haemonchus spp.</i>	98	72	8	11	98	93	65	18	26	0	97	94	98	95	96
<i>Trichostrongylus spp.</i>	0	4	32	29	0	1	16	15	38	12	3	4	1	2	3
<i>Ostertagia spp.</i>	1	20	36	28	2	5	16	48	13	8	0	2	1	3	1
<i>Cooperiaspp.</i>	1	2	20	10	0	0	0	13	6	3	0	0	0	0	0
<i>Oesophagostomum spp.</i>	0	2	4	22	0	1	3	6	17	9	0	0	0	0	0

Cuando estudiamos cada dosis en particular, visualizamos que la dosis (50 mg/kg) históricamente utilizada en nuestro país al día 5, disminuyó la población de *Haemonchus spp.* Si bien el HPG en este día resultó 0, el resultado del cultivo de larvas nos indicó que la proporción de *Haemonchus spp.* era solo del 10 % con respecto al resto de los géneros parasitarios sobrevivientes, indicando una menor eficacia relativa entre géneros de NGI del NFT (a esta dosis).

Los datos encontrados al día 14 se corresponden a los del día 5, lo cual nos da indicio de que el fármaco utilizado actuó sobre formas inmaduras (L3, L4 y L5) y adultas, por esta razón al día 14 no fue posible percibir cambios en el HPG (atribuible al período pre patente del parásito). No obstante, al día 28 debido a que la droga no presenta residualidad y que las condiciones epidemiológicas se mantuvieron ideales para este género parasitario, hubo un aumento significativo del HPG, observándose una marcada predominancia de *Haemonchus spp.* cuando se realizó el cultivo de larvas (Cuadro 3), restableciéndose la situación inicial del ensayo.

Los resultados obtenidos cuando se administró un 40 % menos de la dosis (30 mg/kg) se corresponden con los resultados anteriormente discutidos. Nótese que si bien el HPG de ambos tratamientos (30 y 50 mg/kg) no presentó diferencias significativas, el grupo con una dosis 30mg/kg presentó un conteo promedio de 38 HPG. Si bien en el presente estudio, no se realizaron necropsias parasitarias, trabajos previos realizados por Lorenzelli et al (1996) comprobaron que, al aumentar la dosis de NFT en ovinos aumenta el espectro de acción.

Lorenzelli et al (1996), a dosis de 50 mg/kg obtuvo una eficacia contra *Haemonchus spp.* que varió en un rango 81% - 93%. La necropsia parasitaria realizada sobre los animales tratados con NFT, reafirman su mejor actividad sobre nematodos de abomaso que de intestino delgado. De esta manera NFT 35 mg/kg presentó una eficacia siempre superior (rango= 81.5 - 93.8%) contra parásitos de abomaso que de intestino delgado (rango= 38.3 - 80.5%). Esto es debido a la buena actividad de la droga sobre *Haemonchus spp.*, incluso a bajo niveles de dosificación. La utilización de NFT a 50 mg/kg incrementó la eficacia sobre los nematodos del abomaso (rango= 86.6 - 97.2%) mejorando el control sobre *T. axei* (rango = 91.9 - 98.1%) y *T. circumcincta* (rango= 69.3 - 80%). Para el caso de intestino delgado se observó una mejor eficacia de NFT 50 mg/kg (rango= 83.9 - 92.6%) (Lorenzelli et al., 1996).

Cuando se utilizó una dosis 140% (70 mg/kg) mayor que la históricamente recomendada en nuestro país (50 mg/kg), no se observaron diferencias

significativas ($p > 0,05$) en los conteos de HPG con respecto a los grupos de 50 y 30 mg/kg, ni efectos toxicológicos clínicos en los animales experimentales de ninguno de los tratamientos realizados.

Cuando en nuestro estudio se utilizó un 80 % menos (10 mg/kg) de la dosis recomendada, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el HPG a lo largo de todo el ensayo con respecto al resto de los grupos, con niveles inferiores de eficacia antihelmíntica (TRCH inferior al 95% y un nivel de confianza inferior a 90%). Este hecho se refleja en los cultivos de larvas con una presencia predominante de *Haemonchus spp.* y otras especies parasitarias. Resultados que concuerdan con los niveles de acetilcolinesterasa similares entre el grupo control y el grupo de 10 mg/kg, al contrario de lo sucedido con los grupos de 30, 50 y 70 mg/kg ($p < 0,05$).

En sistemas de cría extensivos y semi-extensivos es frecuente, por distintas razones, someter a los parásitos que se encuentran en el animal a dosis sub-letales del antihelmíntico. El uso habitual de la estimación subjetiva (“a ojo”) del peso de una majada conduce a errores. La presencia de lana larga, la diferente condición corporal y estado fisiológico de una población de lanares puede conducir a error en la determinación subjetiva de peso. Se debe tener en cuenta que tomar el peso promedio de la majada es inadecuado para decidir la dosis de antiparasitario a administrar. Los animales más pesados del lote que contribuyen a la determinación del promedio, son sistemáticamente subdosificados. El uso de la balanza, para determinar el peso de los animales más grandes, es indispensable al momento de definir la dosis a utilizar. En caso que la dispersión de peso de una categoría lanar sea muy importante, se recomienda apartar los animales más livianos y ajustar adecuadamente la dosis.

Otra causa de subdosificación habitual es debida al incorrecto funcionamiento del instrumental utilizado. El chequeo rutinario del mismo y su calibración, nos asegurará la administración de la dosis deseada. En el caso de los BZM (drogas blancas o lechosas), es altamente probable el riesgo de sedimentación del principio activo de la suspensión, si no se realizan agitados periódicos. Por último, es inadmisibles cualquier manipulación artesanal de las drogas en cuanto a diluciones/concentraciones, mezclas o vías de administración. Cualquier alteración “casera” que se realice de los químicos, modificará sustancialmente su delicada composición y farmacocinética, afectando muy probablemente su eficacia, contribuyendo a la resistencia de los parásitos. (Castells, 2004).

Al concluir el ensayo (35 días) se re-verificó la eficacia del NFT a 30 mg/kg, mediante la dosificación de la totalidad de los animales. Demostrando a los 7 días posteriores un resultado de HPG de 0 para todos los individuos y una

elevada eficacia, independientemente del grupo al que pertenecían anteriormente.

Conclusiones

Podemos afirmar que las dosis de NFT utilizadas en Uruguay resultaron eficaces en el control de NGI en ovinos, verificando que el uso de una dosis de 30 mg/kg brinda una eficacia similar a la alcanzada por una dosis de 50 mg/kg.

El incremento de la dosis del NFT (70 mg/kg) implica un aumento en el espectro parasitario, mientras que a una dosis de 10mg/kg, la eficacia disminuye significativamente.

Se establecieron niveles basales y cinética de la actividad de la AChE en ovinos. La inhibición resultó mayor en los grupos a dosis NFT30, NFT50 y NFT70, mientras que el grupo control y el NFT10 se comportaron de manera similar. Los 5 grupos retornaron a los niveles basales al mismo tiempo, indicando similar persistencia en sangre del NFT, independientemente del incremento de la dosis.

Anexo

Técnica de FAMACHA

Se basa en la comparación del color de la conjuntiva ocular con una escala de 5 colores (1 al 5), los cuales se correlacionan con los diferentes grados de anemia visualizados a través de la mucosa ocular. El método presupone que la anemia es causada por la infección de *Haemonchus spp.* El objetivo principal de FAMACHA es controlar *H. contortus* en ovinos, dosificando solamente aquellos animales que en base a la inspección clínica de la mucosa ocular muestren grados de anemia considerables (Van Wyk, 2012).

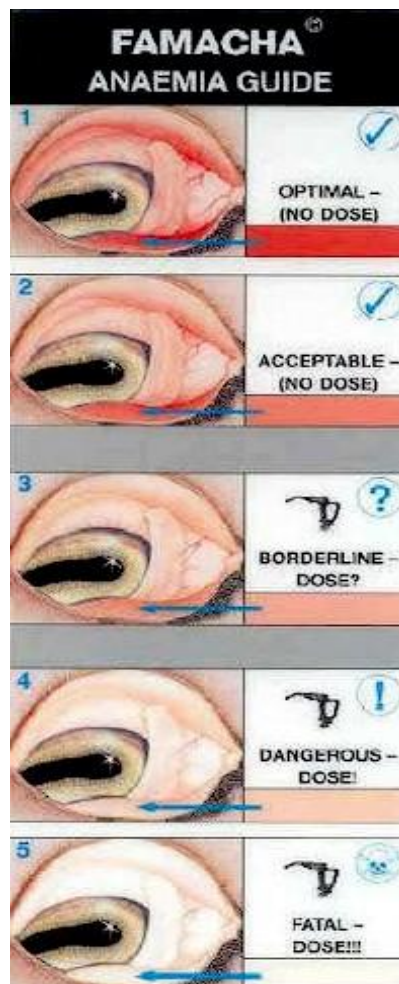


Figura V: Escala FAMACHA






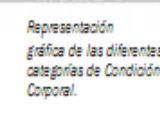
Condición Corporal:

La técnica de estimación de la condición corporal que se realiza por una simple palpación en la zona lumbar del ovino en pie, detectándose el grado de recubrimiento de grasa subcutánea de los huesos de la zona a través de la piel. Mediante esta técnica lo que se está estimando es el estado nutricional a través de la proporción de grasa en el animal. Es una técnica muy sencilla y bastante precisa, se dan puntuaciones de 0 a 5, o sea de animal muy flaco a muy gordo (Jefferies, 2004).

ESCALA DE CONDICIÓN CORPORAL

Características físicas del ovino en las diferentes categorías de condición corporal

(AE= apófisis espinosas; AT = apófisis transversas; ML = músculos del lomo).

CONDICIÓN	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	
0	Animal extremadamente flaco; próximo a morir. No se detecta músculo ni tejido adiposo entre piel y hueso.	
1	AE: Se sienten prominentes y agudas. AT: También son agudas. Los dedos pasan fácilmente debajo de los extremos. Los espacios entre las vértebras se palpan fácilmente. ML: Superficiales y sin cobertura de grasa.	
2	AE: Se sienten prominentes pero suaves. Las apófisis individuales sólo se palpan como corrugaciones finas. AT: Son suaves y redondeadas. Es posible pasar los dedos debajo de los extremos con una leve presión. ML: Tienen una profundidad moderada y poca cobertura de grasa.	
3	AE: Se detectan sólo como elevaciones pequeñas. Son suaves y redondeadas y los individuales sólo se palpan presionando. AT: Son suaves y están bien cubiertas. Es necesario presionar firmemente para palpar los extremos. ML: Están llenos y tienen una moderada cobertura de grasa.	
4	AE: Se detectan presionando como una línea dura entre la cobertura de grasa del área del ojo del lomo. AT: No se pueden palpar sus terminaciones. ML: Están llenos y tienen una gruesa capa de grasa.	
5	AE: No se pueden palpar, aún presionando con fuerza. Hay una depresión entre las capas de grasa en el lugar donde normalmente sienten las apófisis espinosas. AT: Están completamente llenos y tienen una capa de grasa muy gruesa. ML: Pueden haber grandes depósitos de grasa sobre el anca y la cola.	

Representación gráfica de las diferentes categorías de Condición Corporal.

AE = Apófisis espinosas.
ML = Músculos del lomo
AT = Transversas

Figura VI: Escala Condición Corporal

Equipo de trabajo:



Foto 4: Equipo de Trabajo

Bibliografía

1. **Antúnez, P (2012)**. Rubro ovino apuesta a crecer con Ovimpíadas 2012. Disponible en <http://historico.elpais.com.uy/120429/pecono-638690/economia/rubro-ovino-apuesta-a-crecer-con-ovimpiadas-2012/> . . Fecha de consulta: 28 de Octubre de 2014.
2. **Bonino, J, Bonino, L, Pereira Neto, O. (2010)**. Efficacy of monepantel (zolvix®) on internal parasite control on sheep production systems from Uruguay. Congreso mundial de Buiatria.
3. **Nari Henrioud, A, Cardozo Estrela, H. (1987)**. **Nematodes Gastrointestinales** .En: Enfermedades de los lanares internos. Bonino, J, Durán del Campo, A, Mari, J. Enfermedades de los Lanares. Montevideo, Hemisferio Sur, v 1, p. 1 -57.
4. **Castells, D, Nari, A, Rizzo, E, Marmol, E, Acosta, D. (1995)**. Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos del ovino en la etapa de recría. Producción Ovina 8:17-32.
5. **Castells, D, Mederos, A, Lorenzelli, E, Macchi, I. (2002)**. Diagnósticos de resistencia antihelmíntica de Haemonchus spp a las Ivermectinas en el Uruguay. En Castells Montes, D. Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos. Montevideo, FAO, p. 61-66.
6. **Castells, D. (2004)**. Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. INIA. Serie de Actividades de Difusión N° 359: Nematodos gastrointestinales de los ovinos y saguipé en ovinos y bovinos. INIA Tacuarembó, Uruguay, 32 p.
7. **Castells D. (2005)**. Métodos de control de nematodos gastrointestinales con especial énfasis en resistencia genética. Situación actual y perspectivas. Revisión. Producción Ovina 17 :21-36.
8. **Castells D. (2005)**. Adaptación de genotipos a ambientes adversos: resistencia genética del ovino a parásitos gastrointestinales. Agrociencia 9 (1 -2): 587-593.

9. **Cavalari Cotrim Ribeiro, A. (2007).** Intoxicacao ocupacional por organofosforados - a importancia da dosagem de colinesterase. Inicacao Científica CESUMAR 9(2):125-134.
10. **Cerón, J, Tecles, F, Espín, J.C. (1999).** Comparison of different diluents and chromophores for spectrophotometric determination of livestock blood cholinesterase activity. *Research in Veterinary Science*, 67: 261 -266.
11. **Coles, G, Bauer, C, Borgsteede, F, Geerts, S, Klei, T, Taylor, M , Waller, P. (1992).** World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44: 35-44.
12. **Ellman, G, Courtney, K.D, Valentino, A, Featherstone, R. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemcol Pharmacology.*, 7:88:95.
13. **Fiel, C, Nari, A. (2013).** Epidemiología e impacto productivo de nematodos en la pampa húmeda. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Montevideo, Hemisferio Sur, 752 p.
14. **Fiel, C. (2005).** Manual técnico: antiparasitarios internos y endectocidas de bovinos y ovinos. Disponible en: www.producción-animal.com.ar. Fecha de consulta: 30 de enero de 2012.
15. **Gibaldi, M, Perrier, D. (1982).** Pharmacokinetics, 2a ed. NewYork ,Dekker, pp. 145–198.
16. **Jabbar, A, Iqbal, Z, Kerboeuf, D, Muhammad, G, Khan, M, Afaq, M. (2006).** Anthelmintic resistance: The state of play revisited. *Life Sciences*, 79: 2413–2431.
17. **Kotze, A, Stein, P, Dobson, R. (1999).** Investigation of intestinal nematode responses to naphthalophos and pyrantelusing a larval development assay. *International Journalfor Parasitology*, 29:1093-1099.
18. **Le Jambre, L, Martin, P. (1979).** Effectiveness of Morantel tartrate and Naphthalophos against Levamisole resistant *Ostertagia* in sheep. *Veterinary Science Communications*, 3:153- 158.

19. **Lees, P, Cunningham, F.M, Elliot, J. (2004).** Principles of Pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *Journal Veterinary Phamacology and Therapectis*. 27:397- 414.
20. **Lopez, M.C, Thomas, L, Hermoso, R, Monteoliva, M. (1987).** Estudio in vitro del poder inhibidor de diferentes plaguicidas organofosforados sobre la actividad acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado porcino y vacuno. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 13:119-123.
21. **Lorenzelli, E, Nari, A, Macchi, I, Dondo, E. (1996).** Prueba controlada de eficacia del Naftalofos en establecimientos con antecedentes de Resistencia antihelmíntica en ovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 77:173-180.
22. **Martin, R. (1997).** Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154: 11-34.
23. **Meyer J. (1959).** *Farmacología y Terapéutica Veterinarias*. Zaragoza. Acribia. 929p.
24. **Mederos A, Gallinal M, González H, Silva L ,Rodríguez, S. (2005).** Diagnósticos de Resistencia a los antihelmínticos en Uruguay. Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnostico Veterinario .Montevideo, Uruguay, CD-ROM.
25. **MGAP, DICOSE (2013).** División Contralor Semovientes. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2013/DJ2013_TotalNacional.pdf . Fecha de consulta: 3 de Noviembre de 2014.
26. **Molento, M, Silva, F,Araujo, D, de Almeida, F, de Souza, A, Torres-Acosta, F, Geldhof, P. (2011).** Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*, 180:126-132.
27. **Mottier L, Lanusse C. (2001).** Base moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. Disponible en: <http://cnia.inta.gov.ar/helminto/pdf%20resistencia/Mottier2.pdf>. Fecha de consulta 23/11/2014.
28. **Nari A, Herrmann, P, Lorenzelli E, Rizzo E, Macchi,I. (1990).** Resistencia de *Trichostrongylus colubriformis* Oxfendazole. Primera comunicación en Uruguay. *Veterinaria* 26 :5-9.

29. **Nari A, Salles J, Gil A, Waller P, Hansen, J. (1996).** The prevalence of resistance in nematode parasite of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 62: 213-222.
30. **Nickel, W, Morton, D, Wachtel, T. (1974).** A dose-response evaluation of Naftalofos against *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia circumcincta* and *Nematodirus* pathiger in Sheep. *Veterinary Medical Review*, 1: 67-78.
31. **Obiols, J. (2004).** Control biológico de trabajadores expuestos a plaguicidas (II). Técnicas específicas. INSHT. Colección Notas Técnicas de Prevención (NTP) 661. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/601a700/ntp_661.pdf. Fecha de consulta 25/11/2014.
32. **Prichard, R, Hall, C, Kelly, J, Martin, C, Donald, D. (1980).** The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56: 239-251.
33. **Prichard, R. (1994).** Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54: 259-268.
34. **Prichard, R. (1999).** Drug resistance. *International Journal for Parasitology*, 29:137-138.
35. **R Development Core Team (2012).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <http://www.R-project.org/>.
36. **Smith, B, Thomas, P. (1964).** Toxicity of 0,0-Diethyl-0-Naphthal-Oximido-Phosphate (Bayer S.940). *The New Zealand Veterinary Journal*, 12:21.
37. **Suárez G, Alvarez L, Castells D, Faggiolino P, Correa O, Lanusse C. (2011).** Comparative drug systemic exposure and clinical efficacy against resistant nematodes in lambs treated with different albendazole formulations. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34:557–564.
38. **Suárez, G, Alvarez, L, Castells, D, Moreno, L, Faggiolino, P, Lanusse, C. (2009).** Pharmacological evaluation of a combined albendazole, ivermectin and levamisole formulation in lambs. *22 International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, Calgary, Canada.

39. **Suárez, V, Olaechea, F, Rossanigo, C, Romero, J. (2007).** Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. Anguil, INTA, 296 p.
40. **S.U.L (Secretariado Uruguayo de la Lana).** Producción Ovina. Disponible en: www.sul.org.uy/lana_produccion_ovina.asp. Fecha de consulta: 3 de Noviembre 2014.
41. **Waller, P, Echevarria, E, Eddi, C, Maciel, S. Nari, A, Hansen, J. (1996).** The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*, 62:181-187.
42. **Waller, P. (2003).** Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control. *Animal Health Research Reviews*, 4: 35-43.
43. **Wood, I.B, Amaral, N.K, Bairden, K, Duncan, J. I, Kasai, T, Malone, J.B, Pankavich, J.A, Reinecke, R.K, Slocombe, O, Taylor, S.M, Vercruysse, J. (1995).** World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 58: 181-213.
44. **Wolstenholme, A, Fairweather, I, Prichard, R, Samson-Himmelstjerna, G, Sangster, N. (2004).** Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20:469-476.