



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE
NEMATODOS GASTROINTESTINALES RESISTENTES A LOS
ANTHELMÍNTICOS EN BOVINOS EN SISTEMAS EXTENSIVOS, EN
URUGUAY**

CELESTE SERRANO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2022

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE
NEMATODOS GASTROINTESTINALES RESISTENTES A LOS
ANTHELMÍNTICOS EN BOVINOS EN SISTEMAS EXTENSIVOS, EN
URUGUAY**

CELESTE SERRANO

América Esther Mederos
Directora de Tesis

Claudio Giudici
Co-director

María Teresa Armúa
Co-directora

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Carlos Oscar Descarga; MS
Estación Experimental Marcos Juárez, INTA
República Argentina

Andrés Gil; MS, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

Jaime Sanchis; DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

2022

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: viernes 09 de diciembre de 2022, 11:00 am,
Plataforma Zoom

TRIBUNAL: Carlos Descarga, Andrés Gil, Jaime Sanchiz

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
(ARG) D.I. 35128395	SERRANO, CELESTE	S.S. S	12

TRIBUNAL

Carlos Descarga

Andrés Gil

Jaime Sanchis

FIRMA

JAIME SANCHIS
C.I. 3.653.906-1

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Agradecimientos

A mi tutora América Mederos por brindarme la posibilidad de ser parte del proyecto y por su apoyo continuo a lo largo de la etapa experimental y posterior escritura a la distancia.

A mis co-tutores Teresa Armúa y Claudio Giudici.

A Carlos Descarga, que gracias a él pude introducirme en la temática del fenómeno de resistencia antihelmíntica, y por su generosa colaboración con sus extensos conocimientos y cordial predisposición.

A la plataforma de Salud Animal de INIA, Cecilia Miraballes, Franklin Riet-Correa, Fabiana Boabaid, Luis de Oliveira, Carlos Schild, por compartir sus amplios estudios, ayuda y asados.

A mis compañeros de laboratorio Sabrina Pimentel, Yovana Martínez y Gonzalo Escayola por compartir la diaria y ayuda en el trabajo de campo.

A los productores que desinteresadamente nos confiaron el ingreso para permitirnos trabajar. A Rafael Martínez por su colaboración en la búsqueda de establecimientos.

A INIA que hizo económicamente posible la realización de la tesis, y a su afectuoso personal que fueron tan atentos conmigo.

Principalmente a mis padres que me apoyaron desde el comienzo de este camino y que siempre estuvieron presentes, alentado a la distancia desde Rosario.

Gracias, querido Uruguay por concederme esa etapa tan linda, espero pronto volver, y lo primero que aprendí: VAMO ARRIBA! Una frase con tanta fuerza, que me encantó y repito siempre.

Índice

RESUMEN	9
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	166
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos.....	19
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1. Diseño experimental del estudio epidemiológico.....	21
7.2. Metodología de campo	21
7.3 Metodología de laboratorio	22
7.4. Análisis Estadístico	26
8. RESULTADOS	28
8.1. Estadística descriptiva	28
8.2. Resultados de la eficacia antihelmíntica.....	30
8.3 Resultado de la prueba de inhibición de eclosión de huevos (EHT).....	31
8.4. Resultados de la tipificación morfológica de los géneros parasitarios resistentes ...	32
8.5. Resultados de tipificación molecular de los géneros parasitarios resistentes.....	32
8.6. Resultados del acuerdo estadístico entre técnicas morfológicas y moleculares.....	38
9. DISCUSIÓN.....	40
10. CONCLUSIONES.....	43
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
12. ANEXOS	49

GUIA DE ABREVIACIONES

RA resistencia a las drogas antihelmínticas

NGI nematodos gastrointestinales

RCH test in vivo de reducción del conteo de huevos

L3 tercer estado larval

ITS-2 segundo espaciador transcrito interno

PCR reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

En los últimos años ha comenzado a ser una preocupación la falta de eficacia de algunas drogas, en Uruguay la resistencia a las drogas antihelmínticas (RA) es un fenómeno menos estudiado que en ovinos.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la prevalencia de la RA en los nematodos gastrointestinales (NGI) en rodeos de cría en Uruguay. Adicionalmente, se determinó poner a punto los protocolos de PCR disponibles en la literatura para la tipificación de aquellos NGI participantes en la resistencia.

La RA fue estudiada utilizando el test in vivo de reducción del conteo de huevos (RCH) de NGI en materias fecales en 37 establecimientos de cría vacuna. Las drogas estudiadas fueron: Ivermectina (IVM, 0.2mg/kg peso vivo), Levamisol (LEV, 10.0mg/kg peso vivo), Ricobendazol (RBZ, 3.75mg/kg peso vivo) y Fenbendazol (FBZ, 5mg/kg peso vivo).

La selección de los establecimientos fue realizada por conveniencia basado principalmente en el número de terneros y carga parasitaria. En cada establecimiento. Al día “0”, se seleccionaron 75 animales que fueron asignados al azar a cada uno de los grupos de tratamientos (T) y al control (C). Luego, se tomaron muestras individuales de materia fecal del recto y se aplicó el tratamiento correspondiente. Al día “14” se volvió a tomar muestras. Se definió RA presente cuando el % RCH fue <95%. El mismo se estimó mediante la fórmula: $[1 - ((T14/T0) / (C0/C14))] * 100$. En cada establecimiento y para cada grupo tratamiento y el control, se realizó un coprocultivo con un pool de las muestras del grupo. Las larvas 3 (L3) obtenidas fueron clasificadas morfológicamente y almacenadas para luego extraer ADN de una alícuota al azar de L3 para los trabajos moleculares.

Los PCR fueron realizados en forma única utilizando los cebadores descritos en la literatura dirigidos a la región del ITS 2 (por su sigla en inglés, internal transcript spacer, espaciador transcrito interno) the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2) de *Haemonchus* sp., *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi* y *Trichostrongylus* spp.

La resistencia antihelmíntica fue detectada en 100%, 29,7%, 27,0% y 9,7.0% de los establecimientos para IVM, LEV, RBZ y FBZ, respectivamente.

Del ADN extraído de 94 coprocultivos de un total de 20 establecimientos, en 82,3% (n=78) se obtuvo un amplicón de 226pb correspondiente a lo esperado para *Haemonchus* spp. En el 88,3% (n=78) de las muestras se obtuvieron amplicones de 106pb definidos para *Trichostrongylus* spp; en 46,8% (n=44) se identificaron amplicones de entre 192pb y 200pb esperados para *Cooperia oncophora* y en un 13,8% (n=13) amplicones de 124pb

esperados para *Ostertagia ostertagi*. La prueba estadística de Cohen's kappa mostró un acuerdo general aceptable ($k=0.22$, $p<0.01$) entre la clasificación morfológica y el PCR. Al discriminar por parásito, el estadístico kappa mostró acuerdo aceptable para *Haemonchus* sp ($k=0.30$; $p<0.01$), acuerdo leve para *Ostertagia ostertagi* ($k=0.17$) y *Cooperia oncophora* ($k=0.085$, $p=0.10$) y un acuerdo pobre para *Trichostrongylus* spp ($k= -0.14$) Estos resultados muestran que la RA está ampliamente difundida en los establecimientos de cría vacuna y los métodos de control químico deben complementarse con alternativas más sustentables.

Los protocolos de PCR utilizados acá, mostraron ser eficaces en identificar a los géneros/especies parasitarios para los cuales fueron diseñados sin haberse detectado reacciones cruzadas al usar infestaciones mixtas. De todos modos, más estudios son necesarios para mejorar la clasificación a nivel de especie parasitaria y el acuerdo entre clasificaciones morfológicas y moleculares.

Palabras claves: parásitos gastrointestinales, resistencia antihelmíntica, prevalencia.

SUMMARY

The objective of this work was to study the prevalence of anthelmintic resistance (AR) in gastrointestinal nematodes (GIN) in beef cattle in Uruguay and to set up molecular tests to identify the main gastrointestinal nematodes (GIN) identified as resistant by coprocultures when performing the fecal egg count reduction test (FECRT).

Drug efficacy was evaluated using the in vivo Fecal Egg Reduction Test (FECRT) on 37 farms for the following drugs: Ivermectin (IVM, 200 μ g/kg bodyweight), Levamisole (LEV, 10.0mg/kg bodyweight), Ricobendazole (RBZ, 4mg/kg bodyweight) and on 30 farms for Fenbendazole (FBZ, 5mg/kg bodyweight). At each farm on Day 0, 15 animals were assigned randomly to each of the treatment groups (T) and to one untreated control group (C). Individual fecal samples were collected at days 0 and 14 and resistance was defined by a fecal egg count reduction of <95% the using formula $[1 - ((T14/T0) / (C0/C14))] * 100$.

Third stage larvae (L3) were obtained from the coprocultures and morphological and molecular identification was done using L3 obtained for each drug group untreated control. A commercial kit NucleoSpin® Soil DNA (Macherey-Nagel) was utilized to extract DNA from a mixed pool of L3 from each FECRT group. Uniplex PCR reactions were conducted with primer pairs described in the literature specific for regions in the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2) of *Haemonchus* sp., *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi* and *Trichostrongylus* spp.

Anthelmintic resistance was detected on 100%, 29,7%, 27,0% and 9,7.0% of farms for IVM, LEV, RBZ and BZ, respectively.

From 94 coprocultures obtained from 20 farms, where *Haemonchus* spp was morphologically classified, 82,3% (n=78) gave an amplicon of 226 base pairs (bp) corresponding to the expected size for this parasite. Amplicons of 106bp reported for *Trichostrongylus* spp. was typified in 88,3% (n=88) of the samples, 46,8% (n=44) gave amplicons of between 192bp and 200bp where *Cooperia oncophora* was typified and 13,8% (n=13) samples gave amplicons of 124 bp expected for *Ostertagia ostertagi*.

The Cohen´s kappa statistics showed a fair agreement (k value=0.22, p<0.01) between morphological typification and PCR on 94 mixed L3 samples. Stratifying by nematode, kappa statistics indicated fair agreement for *Haemonchus contortus* (k=0.30; p<0.01), low

agreement for *Ostertagia ostertagi* (k value=0.12) and *Cooperia oncophora* (k value=0.14, p=0.10).

These results indicates that AR is highly spread among beef cattle farms and that more sustainable control strategies must be implemented. The applied PCR protocols successfully identify L3 from mixed GIN samples and more studies are needed to improve the agreement between both morphological and molecular tests.

Keywords: bovines, gastrointestinal nematodes, anthelmintic resistance, prevalence.

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería vacuna y ovina juega un rol destacado en el sector agropecuario en Uruguay, tanto a nivel social como económico. La existencia ganadera es de 11.7 millones de vacunos y cuenta con 44.781 establecimientos ganaderos en el año 2017. El consumo es de 46 kg/persona sin tener en cuenta menudencias o subproductos. La exportación mundial de carne vacuna durante el año 2018 se estimó en el 4% del mercado (OPYPA, 2018).

Uruguay presenta un escenario favorable para desarrollar la actividad ganadera, ya sea por su clima, topografía y suelos. Su clima es templado, con mínimas diferencias dentro de su territorio, pero con variaciones climáticas entre años (Castells 2004) y con precipitaciones de considerable variabilidad interanual. Los sistemas de producción más típicos son mixtos, con pastoreo conjunto y continuo de bovinos y ovinos, mayoritariamente sobre pasturas nativas (Castells et al., 2013). En este contexto de sistemas pastoriles predispone al desarrollo de nematodos gastrointestinales (GIN) (Salles, 2002), los cuales representan un obstáculo para la producción de bovinos en sistemas pastoriles. Las parasitosis sub-clínicas pueden generar reducción de la ganancia diaria de peso de hasta un 20% sin ser acompañada de signos clínicos, siendo su principal causa la depresión del consumo (Suárez, 2005). En los animales en crecimiento, la parasitosis produce alteraciones en la ingesta, digestión, absorción de nutrientes, deposición de proteína, grasa y minerales (huesos), afectando también el desempeño reproductivo e inmunitario (Giudici et al., 2013).

Los NGI dejan secuelas sobre el desarrollo musculo esquelético de los huéspedes, con consecuencias considerables en el rendimiento de la res y afectan el desarrollo de las vaquillonas de reposición anual en el sistema, ya que la enfermedad condiciona vientres chicos, causando problemas durante el parto (Steffan et al. 2012).

Las especies de NGI más comunes en bovinos son *Cooperia* spp, *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus placei* y *Trichostrongylus axei* (Nari y Risso, 1994). Los nematodos del género *Cooperia* spp se localizan en intestino delgado y los restantes nematodos se ubican en el abomaso. Los mencionados NGI pertenecen a la familia de los Trichostrongylidae, con un ciclo evolutivo directo, desarrollan cuatro mudas de cutícula y poseen cinco estados entre larvas y parásitos adultos. Todos los NGI en general tienen un modelo similar de transmisión y evolución. Los huevos son eliminados con las heces, y cuando se dan las

condiciones adecuadas de temperatura y humedad evolucionan a larva de primer estadio, pasando por dos mudas hasta alcanzar la larva 3 infestiva (L3), la cual conserva la vaina del segundo estadio larval, otorgándole capacidad de supervivencia (Giudici et al.; 2013). Esta última es ingerida por los hospedadores, continuando su ciclo hasta parásito adulto en el tracto gastrointestinal (Figura 1).



Figura 1. Ciclo de los trichostrongilídeos. Los huevos eliminados con las heces, su evolución en la pastura a larva 1 (L1), larva 2 (L2) y luego a larva infestante (L3).

Las categorías bovinas más susceptibles a dichos NGI son los terneros al destete y hasta los dos años, edad a la cual desarrollan buena inmunidad. Los daños que causan dichos NGI en esas categorías pueden ser irreversibles y no compensables a futuro. Las vaquillonas al parto y en lactancia también son susceptibles. Las categorías mayores luego de haber tenido contacto con los parásitos adquieren inmunidad (Suárez, 2005). El control de los NGI, se realiza principalmente mediante el uso de drogas de síntesis química (Anziani y Fiel, 2015).

Los principales grupos químicos de drogas antihelmínticas disponibles hasta el presente son: benzimidazoles (albendazol, fenbendazol y oxfendazol), imidazothiazoles (levamisoles) y las lactonas macrocíclicas que incluye las subfamilias avermectina y milbemicina. El uso de drogas químicas casi en forma exclusiva durante muchos años ha llevado al desarrollando del fenómeno de resistencia antihelmíntica (RA).

La RA está presente cuando en una población hay una mayor frecuencia de nematodos capaces de tolerar la dosis terapéutica recomendada de una droga, en relación con una población normal de la misma especie. Esto sucede a causa de una modificación genética mediada por el incremento en la frecuencia de expresión de un carácter hereditario (Prichard et al, 1980).

En Argentina, un estudio realizado por Suárez y Cristel (2014), encontró que los principales factores de riesgo para el desarrollo de RA fueron las prácticas de control, ya sea por la frecuencia de tratamientos, falta de rotación de grupos químicos o por tratamientos inadecuados durante el año. Muchos productores desparasitan a categorías adultas que poseen muy baja carga parasitaria. Este manejo junto a otros tales como utilización de una sola droga, tratamientos a fechas fijas, contribuyen al desarrollo de NGI resistentes (Descarga et al.; 2019).

Al contrario de lo que ocurre en ovinos, en Uruguay la situación de RA fue estimada de presentación ocasional, sin embargo, el número de casos estudiados reportando dicho fenómeno ha ido incrementando en el tiempo.

Los primeros casos de RA que se reportaron en Sudamérica, fueron en la República Argentina en el año 2000, inicialmente en las provincias de Santa Fe y Buenos Aires (Anziani et al., 2001; Fiel et al., 2001), para el género de *Cooperia* spp, particularmente con las especies *C.pectinata* y *C.oncophora*, resistentes a ivermectina y doramectina respectivamente. La mencionada situación, fue detectada posteriormente en otras provincias de la República Argentina.

En Brasil, en el año 1990, se reportó resistencia del género *Haemonchus* spp. a los bencimidazoles (Pinheiro y Echevarria.; 1990) y posteriormente en el 2001 *Haemonchus placei* y *Cooperia punctata* fue reportada presentando resistencia al grupo ivermectina (Paiva et al., 2001).

En Uruguay, el primer reporte de RA en bovinos fue en el año 2003, en un predio ganadero al suroeste del departamento de San José donde se detectó resistencia a los grupos ivermectina (10% de eficacia) y moxidectina (67% de eficacia). Dicha resistencia estuvo presente en el género *Cooperia* spp (Salles et al., 2004). Posteriormente, en el año 2009 se realizó un trabajo en la zona este del país, con la participación de 12 establecimientos. Dicho estudio reveló prevalencias de 8.3% de establecimientos con resistencia a levamisol, 75% a ivermectina, 8.3% a bencimidazol y 20% a abamectina (García y Gil., 2009).

En un estudio utilizando la metodología de revisión sistemática-meta-análisis sobre la prevalencia de RA en bovinos, de un total de 483 establecimientos localizados en

diferentes lugares del mundo, un 82% de los mismos presentaba resistencia a lactonas macrocíclicas, 48% a los bencimidazoles y 37% a levamisoles. El principal genero comprometido en la resistencia fue *Cooperia* spp (Mederos et al., 2018).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El control de los NGI se lleva a cabo fundamentalmente mediante el uso de drogas antihelmínticas. Su uso sustentable se basa en los diagnósticos frecuentes de la eficacia de dichas drogas en los establecimientos. Para ello, se desarrollaron diferentes métodos de evaluación tanto *in vivo* como *in vitro*. En los últimos años se han estado desarrollando técnicas moleculares para la detección de poblaciones de nematodos resistentes a los grupos antihelmínticos disponibles comercialmente.

Los dos métodos más aceptados en bovinos para el diagnóstico de RA por la Asociación Mundial para el Avance de Parasitología Veterinaria (WAAVP) son los test *in vivo* de reducción del conteo de huevos (TRCH) y el test de eficacia controlada (Coles et al.1992; Coles et al. 2006). Este último requiere que los animales sean sacrificados para comparar el número de nematodos adultos provenientes de necropsia entre animales tratados y controles. El TRCH es el más utilizado actualmente y consiste en comparar el conteo de huevos por gramo de materia fecal (HPG) antes y después de aplicado el tratamiento antihelmíntico. Este método tiene como ventaja que se puede evaluar todos los grupos antihelmínticos al mismo tiempo, pero tiene como desventaja que detecta RA cuando la proporción de NGI resistentes en una población es superior al 25% (Martin et al. 1989).

Por otro lado, se dispone de métodos *in vitro*, como el Test de eclosión de huevos (EHT) que solamente evalúa la resistencia a bencimidazoles (Coles et al. 1992), determinando la proporción que falla a la embrionación y/o eclosión de huevos a larva de primer estadio.

El test de inhibición de la migración larval (LMIA, Larval Migration Inhibition Assay) se utiliza para el diagnóstico de resistencia a las ivermectinas y se basa en la parálisis muscular del parásito inducida por la droga lo que le impide migrar a través de un filtro. Dicha prueba determina el porcentaje de L3 que migran luego de haber sido incubadas en diferentes concentraciones de ivermectina (Demeler et al. 2010).

Para la identificación de géneros de NGI resistentes a las diferentes drogas, por muchos años se ha utilizado la técnica de cultivo de larvas y clasificación morfológica de las larvas infestantes (L3). Dicho método consiste en incubar materia fecal a 24- 27°C durante 10-14

días, recuperando y clasificando las L3 empleando diferentes claves publicadas en la literatura (MAFF, 1986; Niec, 1968; van Wyk & Mayhew, 2013). Sin embargo, dicho método de coprocultivos y clasificación de larvas tiene sus limitaciones pues requiere de personal capacitado. Por otro lado, la identificación de determinados géneros de nematodos de acuerdo con las características morfológicas de las L3, resultan subjetivas y sujetas a errores (Bailey, 2008).

En los últimos años se vienen desarrollando nuevos mecanismos de tipificación de los NGI en sus diferentes estadios basadas en identificación de ADN, lo cual contribuiría a un mejor diagnóstico de cuáles son los NGI presentes en la RA (Roeber et al., 2013)

Los primeros autores que incursionaron en esta área comenzaron en la década de 1990 inicialmente en ovinos. Höglund et al. (2014), trabajó en la identificación por PCR en tiempo real de *Cooperia oncophora* y *Ostertagia ostertagi* aisladas de heces bovinas utilizando marcadores dirigidas al segundo espaciador transcrito interno de ADN ribosómico nuclear (ITS2) región (ADNr), el cual fue el primer trabajo informado en la detección de ambos parásitos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la situación de la resistencia antihelmíntica en bovinos para carne en sistemas de producción extensivos de Uruguay y poner a punto protocolos de PCR convencional, para la tipificación de géneros de NGI de bovinos resistentes a los diferentes grupos de antihelmínticos. Los resultados obtenidos serán comparados con las clasificaciones morfológicas realizadas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal forma de controlar los NGI es mediante el uso de drogas antihelmínticas. Sin embargo, los casos reportados de RA en bovinos en diferentes partes del mundo se han incrementado en los últimos años. El uso razonable de las drogas amerita la evaluación periódica de su eficacia para identificar poblaciones de nematodos resistentes en los sistemas de producción ganadera. Los métodos de diagnóstico de RA disponibles actualmente son técnicas *in vitro* e *in vivo*, cada una de ellas con sus ventajas y desventajas. Como se mencionó anteriormente, el TRCH es el test más utilizado en muchas partes del mundo, se trata de una técnica laboriosa que requiere de personal capacitado y permite la identificación de los NGI resistentes a nivel de género en la mayoría de los casos, sin alcanzar a la determinación de especie.

En los últimos años se han generado avances en el campo de la biología molecular enfocadas en estudiar el fenómeno de RA. Este adelanto tecnológico puede aportar y complementar a los métodos fenotípicos tradicionales de diagnóstico de NGI resistentes a partir de TRCH, identificando cuales son los géneros/especies participantes de la RA con mayor rapidez y precisión. De esta forma permite anticipar el diagnóstico de RA en sus etapas iniciales y así de esta manera preservar a futuro el uso sustentable de antihelmínticos.

4. HIPÓTESIS

Contar con protocolos de técnicas moleculares, permitirá la identificación de los NGI resistentes a las diferentes drogas a partir del TRCH, con mayor precisión y rapidez que la identificación morfológica utilizada actualmente.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Puesta a punto de técnicas moleculares como herramientas para la identificación de nematodos gastrointestinales resistentes. Evaluar la contribución de dichas técnicas en un estudio de resistencia a los antihelmínticos en bovinos para carne.

Objetivos específicos

1. Realizar diagnóstico de resistencia antihelmíntica en bovinos mediante el test in vivo de reducción de conteo de huevos.
2. Poner a punto de técnicas de PCR para tipificación de especie de NGI en bovinos a partir de TRCH.
3. Realizar diagnóstico de resistencia a bencimidazoles mediante la prueba in vitro de eclosión de huevos (EHT).

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un muestreo de establecimientos productores de bovinos para carne en sistemas de producción extensivo, en colaboración con los Médicos Veterinarios asesores.

El diagnóstico de RA se realizó mediante el test in vivo de Reducción de Conteo de Huevos (RCH) para las drogas de los grupos bencimidazol (BZ), levamisol (LEV) e ivermectina (IVM) y el método in vitro denominado test de eclosión de huevos (sigla en inglés, egg hatch test, EHT) para diagnóstico de resistencia a los BZ.

Para el conteo de huevos se utilizó el método de mini-Flotac descrito por Cringoli et al (2010) que, al tener un límite de detección de 5 huevos por gramo, permite mejorar la sensibilidad del diagnóstico de resistencia in vivo.

Para la identificación de géneros de NGI resistentes a los diferentes grupos químicos, se realizaron coprocultivos. Las L3 recuperadas de dichos coprocultivos fueron utilizadas para identificación morfológica y para obtención de ADN para las pruebas moleculares.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial Nucleos Spin Tissue Macherey-Nagel y su material obtenido se cuantificó en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific Nano Drop 2000c).

Posteriormente, se procedió a poner a punto los diferentes protocolos de PCR convencional utilizando primers específicos para los géneros de *Cooperia* spp, *Ostertagia* spp, *Trichostrongylus* spp y *Haemonchus* spp. de acuerdo con los protocolos descritos por Demeler et al. (2013).

Con los resultados obtenidos se realizaron las estadísticas descriptivas de presencia de RA a los diferentes grupos de antihelmínticos evaluados, comparación de técnicas para

identificación de géneros resistentes y dosis de inhibición del 50% de la eclosión de huevos de NGL.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Diseño experimental del estudio epidemiológico

Este trabajo se realizó en el marco de las actividades del proyecto INIA CL_37: "Estudio de resistencia a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales en bovinos, en Uruguay".

Se utilizó un diseño de estudio transversal y el número de establecimientos a muestrear fue considerado teniendo en cuenta una prevalencia estimada de RA en bovinos del 20%, un error estimado de 10% y un intervalo de confianza de 95%, lo cual resultó en un número de 35-40 establecimientos a muestrear. Los mismos fueron seleccionados de conveniencia cumpliendo con los siguientes requisitos: lote mínimo de 75 terneros menores a 15 meses de edad (entre 8 a 15 meses) y sin tratamiento con ivermectinas u otra droga de larga acción en los últimos 60 días previo al muestreo.

7.2. Metodología de campo

En los establecimientos que cumplieron con los requisitos antes mencionados, se comenzó con chequeos preliminares de 10-15 terneros hembras o machos seleccionados al azar para evaluar la carga parasitaria. El umbral mínimo establecido para iniciar el trabajo fue de 150 huevos por gramo (HPG) en promedio del grupo, sin animales con valores de cero.

Una vez cumplido con esto, se concurre al establecimiento en dos oportunidades. Durante la primera visita, llamado Día "0", se seleccionaron al azar 75 animales, los cuales se distribuyeron en 5 grupos de 15 animales cada uno a medida que pasaron por las

instalaciones. Cada grupo fue asignado al azar a cada uno de los grupos: Grupo 0= control sin dosificación, Grupo 1= tratamiento con ivermectina al 1% (0,2 mg ivermectina/kg de peso vivo, subcutáneo, Ivomec, Boehringer-Ingelheim); Grupo 2= tratamiento con ricobendazol (3,75 mg de ricobendazol/kg de peso vivo, subcutáneo, Ricovertm, König); Grupo 3=tratamiento con levamisol (10 mg de levamisol/kg de peso vivo, subcutáneo, Ripercol, Magnis); Grupo 4=tratamiento con fenbendazol (5 mg de fenbendazol/kg de peso vivo, oral, Panacur, MSD Animal Health). En ese momento se tomaron muestras individuales de materia fecal de los animales directamente del recto y se aplicó la dosis de antihelmíntico correspondiente a cada grupo, estimada según el peso vivo de los mismos. Las muestras fueron identificadas con la caravana y grupo correspondientes y los animales fueron también identificados con pintura de colores para identificar al grupo al cual pertenecían.

Adicionalmente, para el EHT, fue recolectado un pool de muestras colectivas, la cual fue acondicionada en un frasco al cual se completó con agua para eliminar el oxígeno y crear condiciones de anaerobiosis hasta el momento de su análisis.

Las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio de Sanidad Animal de INIA Tacuarembó.

A los 14 días post tratamiento se realizó la segunda visita, llamada Día “14” y en este momento se recolectó materia fecal de manera individual a los animales de cada grupo previamente seleccionados.

En cada establecimiento se realizó un cuestionario al veterinario o encargado del mismo, con el fin de recaudar datos sobre aspectos demográficos, manejo animal y sanitario y potenciales factores que contribuyan al desarrollo de resistencia antihelmíntica.

(ver Anexo 1).

7.3 Metodología de laboratorio

Una vez en el laboratorio, se realizaron las siguientes técnicas:

7.3.1. Recuento de huevos de nematodos gastrointestinales en materias fecales (HPG)

Para la determinación de HPG se utilizó el método de mini-Flotac descrito por Cringoli et al. (2010) el cual tiene un límite de detección de 5 HPG para bovinos. Brevemente, se pesaron 5g de materia fecal en el vaso de “Fill-Flotac” (Figura 1), al cual se le agregó 45 ml de solución sobresaturada de NaCl con una densidad de 1200g/l. Luego de homogeneizar la muestra, se llenó la cámara de Mini-FLOTAC, se dejó reposar 10 minutos y se leyó en microscopio óptico con un aumento 10x.



Figura 1. Kit Mini-Flotac con sus dos componentes. Fill-Flotac es utilizado para pesar la muestra, colocar la solución sobresaturada y homogeneizar. Mini-Flotac es utilizado para realizar la lectura de la muestra.

7.3.2. Coprocultivos

Durante el “Día 0” se realizó un coprocultivo con un pool de muestras para cada grupo tratamiento y el grupo control, utilizando la técnica de Corticelli y Lai (1963), la cual es una modificación del de Roberts y O'Sullivan (1950), para la obtención de larvas infestantes L3. Para ello, en frasco estéril, se pesaron aproximadamente 10gr de materia fecal y se agregó un mismo volumen de vermiculita estéril con el fin de proporcionar aireación a la muestra. La mezcla fue humedecida con agua destilada y los frascos puestos a incubar en estufa a 26-27°C durante 10 días. Luego de retirados de la estufa, los frascos se llenaron con agua destilada, se colocó una placa de petri en la boca los mismos y fueron invertidos. Se dejó decantar durante unas horas para luego recuperar las larvas en tubo Falcon de 15ml, los cuales fueron conservados en heladera a 4°C hasta su posterior lectura.

El día 14 se realizaron coprocultivos con un pool de muestras por cada grupo de droga en estudio y otro para el grupo control (n=5). Las L3 fueron clasificadas siguiendo las claves descritas por Niec (1968) y VanWyk (2013).

7.3.3. Test de eclosión de huevos (EHT)

Además del TRCH, para el diagnóstico de resistencia a los bencimidazoles se utilizó el test de eclosión de huevos (EHT) descrito por Coles et al. (1992) y modificado por Demeler et al. (2013).

Para la extracción de los huevos de la muestra de materias fecales conservada en anaerobiosis se mezcló en un balde con agua de canilla y se filtró por un tamiz de 150 μm debajo del cual se colocó otro tamiz de 25 μm . El material retenido en el tamiz de 25 μm se volcó en tubos Falcon de 50 ml. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y luego se descartó el sobrenadante. Luego se agregó solución salina sobresaturada al sedimento que quedó en los tubos y se repitió la centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se vertió en el tamiz de 25 μm y se lavó varias veces para retirar restos de sal. Luego el contenido se colocó en tubos de 15ml. Posteriormente, en tubos Falcon de 50 ml se preparó un gradiente de azúcar con concentraciones de 10% (parte superior del tubo), 25% (parte media del tubo) y 40% (parte inferior del tubo). Los 15 ml de la suspensión de huevos se agregaron encima de la capa de 10% del gradiente de azúcar y luego se centrifugó a 1500rpm durante 7 minutos. Los huevos que quedaron entre las capas de 10% y 25% fueron recuperados y vertidos en el tamiz de 25 μm y lavados para remover restos de azúcar. Los huevos recolectados fueron contados en 6-10 alícuotas de 10 μl cada una para estimar la cantidad de huevos recuperados en el volumen final.

Luego, en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Thermo Scientific, Nunc A/S) se colocaron 200 huevos en 1.990 μl de solución de agua desionizada en cada pocillo a los cuales se les agregó 10 μl de Thiabendazol disuelto en DMSO a las concentraciones de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,185; 0,25; 0,3 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Cada dilución se corrió en triplicado. Como control negativo se utilizó una dilución de 0,5% de DMSO y como control positivo una dilución 1mg/ml de Thiabendazol. Las placas se incubaron en estufa a 25°C durante 48 horas. Al final de la incubación se colocó una gota de Lugol a cada pocillo para frenar la reacción y bajo microscopio invertido (Olympus CK2), se contó la cantidad de larvas y huevos (larvados y embrionados). Luego se calculó la concentración efectiva de droga requerida para inhibir la eclosión del 50% de los huevos (EC_{50}) mediante el programa

GraphPad Prism 7.04. El punto de corte para considerar resistencia positiva fue un valor de $EC_{50} > 0.1 \mu\text{g/ml}$.

7.3.4. Diagnóstico por PCR basado en caracterización de la región ITS-2

La puesta a punto de la PCR convencional para caracterización de especies de nematodos gastrointestinales se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Demeler et al. (2013). En la Tabla 1 se muestran las secuencias de primers utilizados para los nemátodos estudiados.

Tabla 1. Descripción de los primers utilizados para identificación de *Haemonchus spp*; *Cooperia spp* y *Ostertagia ostertagi*, temperatura de elongación (temp.elong) y tamaño de los fragmentos esperados (pb).

Nombre	Parásito	Secuencia	Temp.elong	Tamaño (pb)
Hc-SH-for ¹	<i>Haemonchus</i> ITS-2	CCATATACTACAATGTGGCTAATTC	62	226
Hc-SH-rev ²		TACAAATGATAAAAAGAACATCGTCGC		
Coop-SH-For ³	<i>Cooperiaspp</i> ITS-2	ATGGCATTGTCTACATCTGTTT	62	192
Coop-SH-Rev ⁴		AAATGATAACGAATACTACTATCTCCA		
Ost.ost-SH-For ⁵	<i>O. ostertagi</i> ITS-2	TAACATTGTTAACGTTACTGAATGATACTG	50	124
Ost.ost-SH-Rev ⁶		ATATAAATGATACATCGAATATACAATAC		

¹=*Haemonchus contortus* forward; ²=*Haemonchus contortus* reverse; ³=*Cooperia* forward; ⁴=*Cooperia* reverse; ⁵=*Ostertagia ostertagi* forward; ⁶=*Ostertagia ostertagi* reverse

La extracción de ADN se realizó a partir de L3 obtenidas de los coprocultivos empleando el kit comercial Núcleo Spin Tissue (Macherey Nagel®).

Para cada PCR se empleó 2 μ de ADN de un pool de L3 provenientes de los coprocultivos de cada grupo procesado el Día 14 (5 grupos por establecimiento muestreado).

La master mix de PCR se preparó mezclando 200 μM de cada dNTP, 0,5 μM de cada primer, 0,4 U de Phusion Hot Start II High Fidelity DNA polymerase (ThermoScientific) y 1X Phusion HF buffer en 20 μl de volumen final.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador Bio-Rad T100 o Corbett Gradient Palm-Cycler con el siguiente programa:

- desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos
- seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos,
- 30 segundos de temperatura de hibridación específica de cada primer (ver Tabla 1)
- 30 segundos de extensión a 72°C,
- una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los resultados fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X y también TAE 50X con adición de colorante (Biotium Gel Red Nucleic Acid Stain).

Como control positivo se utilizó ADN extraído de nematodos adultos recuperados en necropsias parasitarias y como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Se seleccionó el producto de PCR de una muestra por género parasitario para realizar análisis de secuenciación de fragmentos. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas utilizando el servicio de la empresa Macrogen (Seoul, Korea del Sur).

7.4. Análisis Estadístico

Se confeccionarán planillas de Excel para el registro de los diferentes resultados obtenidos y en una primera etapa se realizaron las estadísticas descriptivas.

Para calcular las reducciones en los conteos de huevos se utilizó la fórmula descrita por Dash y col (1988) $[1 - ((T14/T0) / (C0/C14))] * 100$ y los intervalos de confianza del 95% se obtuvieron mediante el programa BootStreat (Cabaret y Berrag, 2004). Este método calcula la eficacia del tratamiento y provee intervalos de confianza basado en re-muestreos (Sprent, 1989).

El punto de corte para considerar falta de eficacia a una droga antihelmíntica fue de <95% de reducción del conteo de huevos (Coles et al. 1992).

Para la estimación de prevalencia de RA a cada droga, la unidad de estudio de este trabajo son los establecimientos ganaderos, que fueron clasificados como positivos o negativos a RA, según los resultados obtenidos del TRCH.

Para el cálculo de las EC₅₀ se utilizó una ecuación logística de cuatro parámetros con pendiente variable para obtener los datos de dosis-respuesta por regresión no lineal utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (versión 7.04).

Las comparaciones de clasificación morfológicas de las L3 y resultados de PCR se realizaron mediante el método estadístico de Cohen's kappa (Dohoo et al., 2009) para determinar el acuerdo entre ambas técnicas. A continuación, se muestra el esquema completo de trabajo realizado (Figura 2)

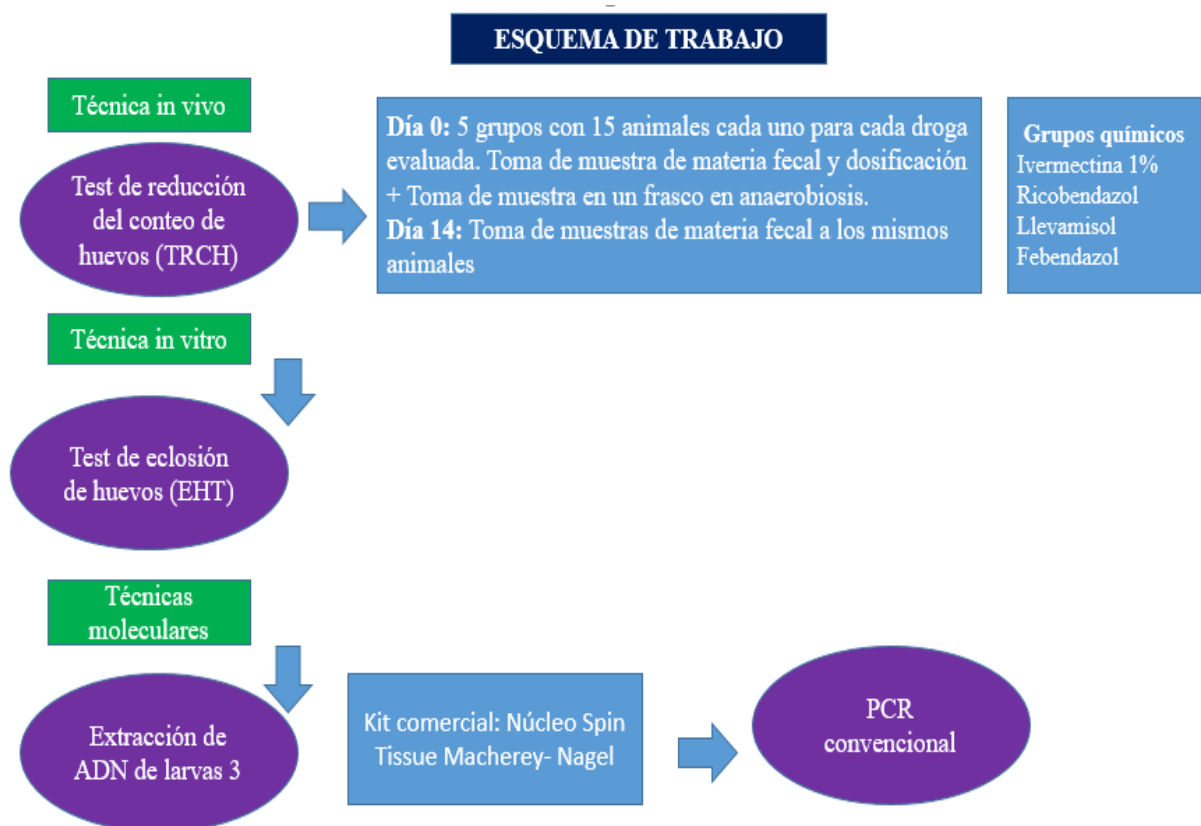


Figura 2. Esquema mostrando la dinámica general del trabajo de campo y laboratorio.

8. RESULTADOS

8.1. Estadística descriptiva

Inicialmente se realizaron exámenes preliminares para el TRCH en 59 predios ganaderos en categorías de terneros, de los cuáles 37 cumplieron con el conteo de huevos superior a 150 HPG. Finalmente, en 30 predios se evaluaron cuatro grupos químicos (IVM, LEV, RBZ y FBZ) mientras que, en siete, se evaluaron tres grupos químicos (IVM, LEV, RBZ). Los establecimientos muestreados están localizados en los siguientes departamentos del país: Tacuarembó (n=20), Paysandú (n=4), Cerro Largo (n=1), Durazno (n=2), Río Negro (n=2), Flores (n=1), Salto (n=3), Artigas (n=1), Rivera (n=2) y Colonia (n=1).

En la Tabla 2 se presentan los principales resultados de los datos demográficos y de manejo de los establecimientos relevados.

El biotipo mayoritario pertenece a razas británicas y la mayoría de los establecimientos muestreados realizan ciclo completo y cría.

El manejo antiparasitario de los establecimientos es mayoritariamente basado en drogas químicas y actualmente la mayoría de los establecimientos hacen uso de los tres grupos químicos de antihelmínticos disponibles en el mercado para vacunos.

Las lactonas macrocíclicas son utilizadas en gran cuantía en los establecimientos para el control de la garrapata y de la miasis (*Cochliomya hominivorax*) como se muestra en la Tabla 1.

El 54,5% de los establecimientos manifestaron que ingresan animales al predio y un 45,5% que no lo hace. Del total de establecimientos que respondió que ingresan bovinos de afuera, un 50% ingresa toros, un 16,7% vacas de cría, un 16,7% varias categorías y en menor porcentaje, terneros, novillos y vaquillonas.

Tabla 1. Resumen de los principales datos demográficos y de manejo de los establecimientos relevados

Variable		Promedio/Porcentaje	Rango
Stock bovino	Bovinos Totales	1752	225 – 6000
	Terneros(as)	510	60 -2500
Raza	Británicas	77%	
	Cruzas Cebuinas	13%	
Sistema de Producción	Ciclo completo	50%	
	Cría	35%	
	Recría/Engorde	11%	
	Rotaciones	4%	
	Agrícolas		
Sistema de Pastoreo	Mixto	58%	
	Vacuno	27%	
	Alterno	3%	
	Rotaciones agrícolas	12%	
Uso de drogas	Ivermectinas	88%	
	Levamisoles	83%	
	Bencimidazoles	70%	
# Dosificaciones	Terneros	4,3	1 - 8
	Sobreaños	3,5	1 - 6
	Vacas cría	1,5	0 – 6
	Toros	1,3	0 - 6
Estrategia dosificación	Peso vivo individual	29%	
	Peso vivo promedio	67%	
Coproparasitarios	Si	79%	
	No	21%	
Lombritest	Si	33%	
	No	67%	
Dosifica-mueve de potrero	SI	50%	
	No	50%	
Usa lactona macrocíclica para garrapatas	Si	48%	
	No	52%	
Usa lactona macrocíclica para miasis	Si	65	
	No	35	

8.2. Resultados de la eficacia antihelmíntica

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la ivermectina no tiene eficacia para el control de los NGI de bovinos en ninguno de los establecimientos evaluados en este estudio (100% de establecimientos con resistencia). En 11 (29,7%), 10 (27,0%) y 3 (9,7%) de los establecimientos muestreados se detectó resistencia a LEV, RBZ y FBZ, respectivamente (Figura 3)

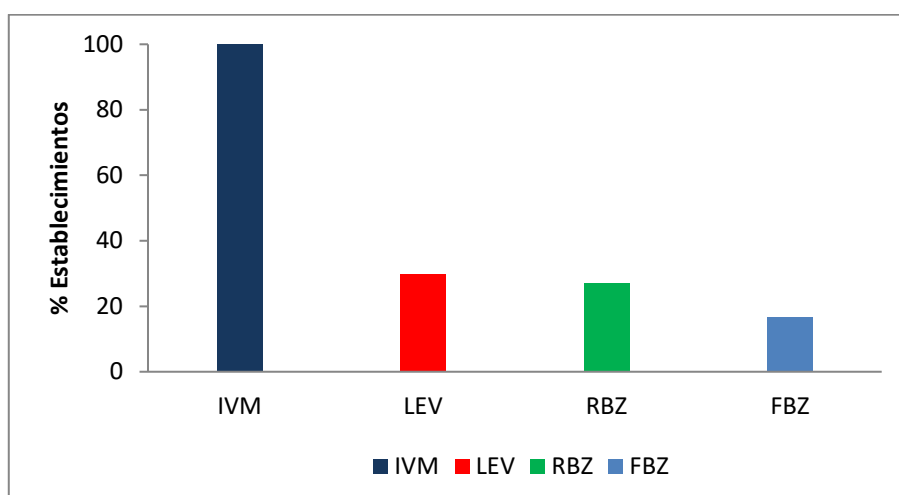


Figura 3. Porcentaje de establecimientos con resistencia a ivermectina (IVM), levamisol (LEV), Ricobendazol (RBZ) y Fenbendazol (FBZ)

En la Tabla 3, se presenta el porcentaje de la eficacia promedio y el rango con que cada una de las drogas actuó frente a la infestación parasitaria mixta.

Tabla 3. Porcentaje de eficacia promedio y rango que presentó cada una de las drogas evaluadas contra todas las especies de nematodos gastrointestinales presentes en la población bovina estudiada al momento de la prueba.

Droga	Eficacia	Rango
-------	----------	-------

	promedio (%)	(%)
Ivermectina	28,2	0-80
Levamisol	89,8	0-100
Ricobendazol	92,9	0 - 100
Fenbendazol	92,8	0 - 100

8.2.1. Resultado de resistencias múltiples

Del total de establecimientos muestreados, 21 (56,8%) presentaron resistencia a un solo principio activo; 9 (24,3%) a dos principios activos y 7 (18,2) a tres principios activos.

A continuación, se presenta un resumen del número de establecimientos que presentó resistencia a dos y más de los grupos evaluados:

- ❖ Ivermectina+levamisol: 13,51% (5/37)
- ❖ Ivermectina+ricobendazol: 5.40% (2/37)
- ❖ Ivermectina+ fenbendazol: 13.33% (4/30)
- ❖ Ivermectina+levamisol+ricobendazol: 13.51% (5/37)
- ❖ Ivermectina+levamisol+fenbendazol: 3.33% (1/30)
- ❖ Ivermectina+levamisol+ricobendazol+fenbendazol: 6,66% (2/30)

8.3 Resultado de la prueba de inhibición de eclosión de huevos (EHT)

De los establecimientos muestreados, se pudo realizar EHT en 22 de ellos, habiendo sido detectado 1 establecimiento positivo a RA a bencimidazol por esta prueba.

Los resultados promedios de la dosis efectiva para inhibir 50% de la eclosión de huevos fue de 0,039 (Rango: 0,029 – 0,130).

La comparación cruzada de los resultados de la prueba in vivo e in vitro para resistencia de los NGI a fenbendazol (bencimidazol oral), se realizó en 20 establecimientos y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación cruzada de los resultados de la prueba in vivo e in vitro para detección de resistencia a bencimidazoles, en 20 establecimientos de cría bovina.

TRCH	EHT		
	+	-	
+	0	3	3
-	1	16	17
TOTAL	1	19	20

TRCH=Test de resistencia del conteo de huevos, EHT= Test de inhibición de la eclosión de huevos

8.4. Resultados de la tipificación morfológica de los géneros parasitarios resistentes

La tipificación morfológica de las larvas infestantes obtenidas de los coprocultivos reveló que *Cooperia* spp fue el género más abundante, seguido por *Haemonchus* spp, *Trichostrongylus* spp y *Oesophagostomum* spp. *Ostertagia* spp fue identificada en forma minoritaria, tal como se muestra en la Figura 4.

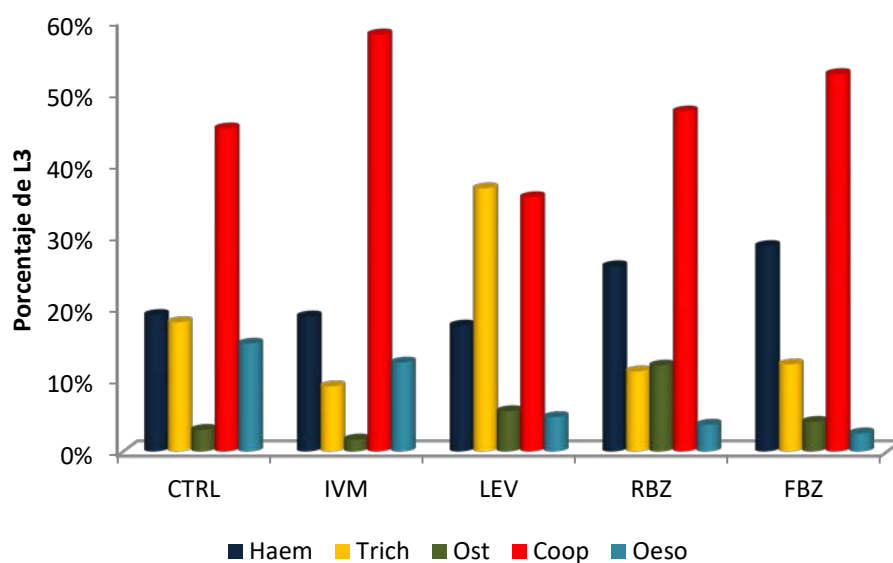


Figura 4. Porcentaje promedio de L3 recuperadas de los coprocultivos postratamiento, discriminadas por parásitos, grupos químicos analizados y el grupo control sin tratamiento.

En el Cuadro 1 se muestra el porcentaje de los géneros parasitarios que se desarrollaron cuando la eficacia a las diferentes drogas fue nula.

Cuadro 1. Géneros de nematodos gastrointestinales (NGI) encontrados en los coprocultivos de los test de reducción de conteo de huevo con valores de cero.

Droga	Género de nematodos gastrointestinales			
	%			
	<i>Haemonchus</i> sp	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Cooperia</i> spp.	<i>Ostertagia</i> sp.
Ivermectina	36,4	7,2	38,0	1,7
Levamisol	7,0	2,0	90,0	0,0
Ricobendazole	13,0	0,0	86,0	0,0
Fenbendazol	61,0	0,0	38,0	0,0

8.5. Resultados de tipificación molecular de los géneros parasitarios resistentes

Del total de los predios muestreados, en 20 de ellos se pudo obtener ADN de calidad suficiente para realizar la técnica de PCR convencional.

De los 20 establecimientos, 94 muestras de ADN fueron extraídas de L3 provenientes de los coprocultivos desarrollados para el test de RCH y con ellas se realizaron 376 reacciones de PCR.

De las 94 muestras analizadas, en 83 de ellas (88,3%) se obtuvieron bandas de 106pb, correspondientes a lo descrito en el protocolo para *Trichostrongylus* spp. (Fig. 6)

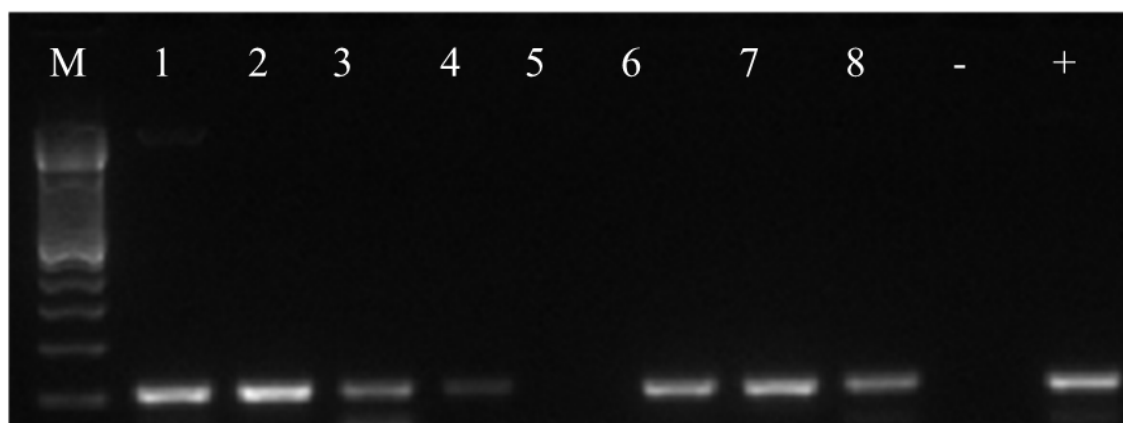


Figura 6. Identificación de *Trichostrongylus* spp. provenientes de ADN de L3. Se observan bandas de amplificación que coinciden con los 106 pb en las muestras números 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8.

-Control negativo: agua ultrapura, +control positivo, ADN de machos adultos de *Trichostrongylus* spp., M= Marcador molecular 100pb.

De 94 muestras sometidas al protocolo para identificación de *Haemonchus* sp, 78 (82,3%) mostraron una banda de 226 pb descriptas para dicho parásito (Fig.7)

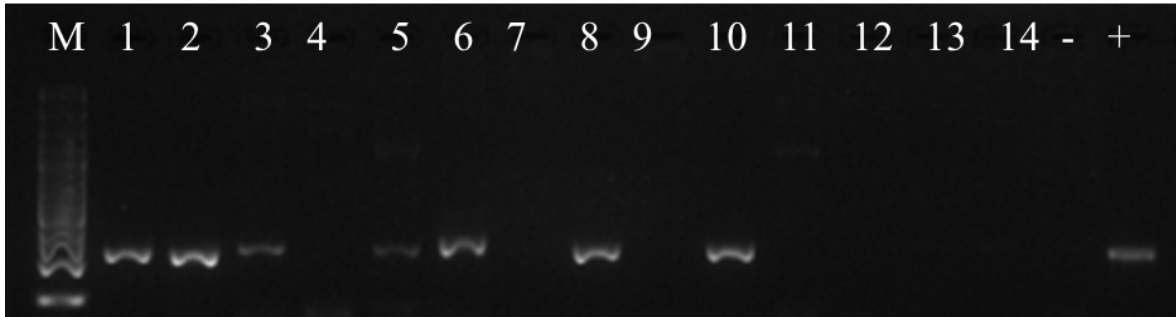


Figura 7. Identificación cualitativa de *Haemonchus spp.* provenientes de L3. Se presentan bandas de amplificación cercanas a 226 pb en las muestras números 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 10.

-Control negativo: agua ultrapura, +control positivo: ADN de machos adultos de *Haemonchus contortus*, M= Marcador molecular 100pb.

De 94 muestras sometidas al protocolo descrito para *Ostertagia ostertagi*, 13 (13,8%) desarrollaron una banda de 124 pb, descripta para dicho parásito (Fig. 8).

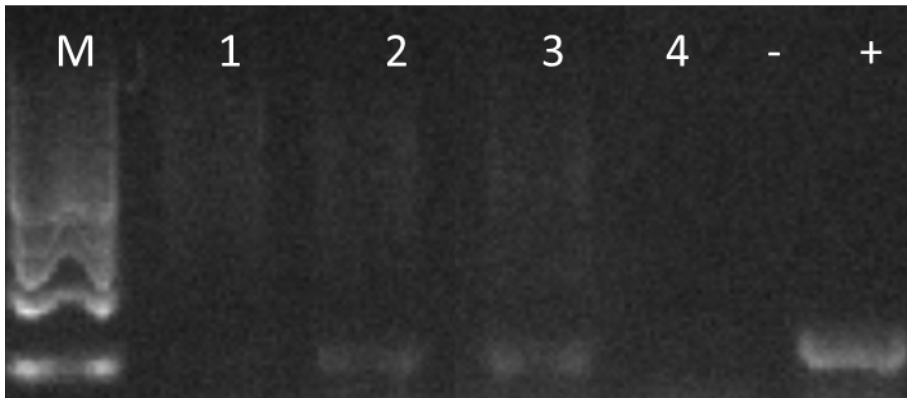


Figura8. Identificación de *Ostertagia ostertagi* provenientes de L3. Se presentan bandas de amplificación cercanas a 124 pb en las muestras números 2 y 3.

-Control negativo: agua ultrapura, +control positivo: ADN de machos adultos de *Ostertagia ostertagi*, M= Marcador molecular 100pb.

De 94 muestras sometidas al protocolo descrito para *Cooperia* spp, 44 muestras (46,8%) desarrollaron bandas que superaron los 200 pb. Esto no se correspondió con el tamaño

esperado de 192 pb descrito en el trabajo de Demeler et al. (2013) para *Cooperia oncophora* (Fig. 9).

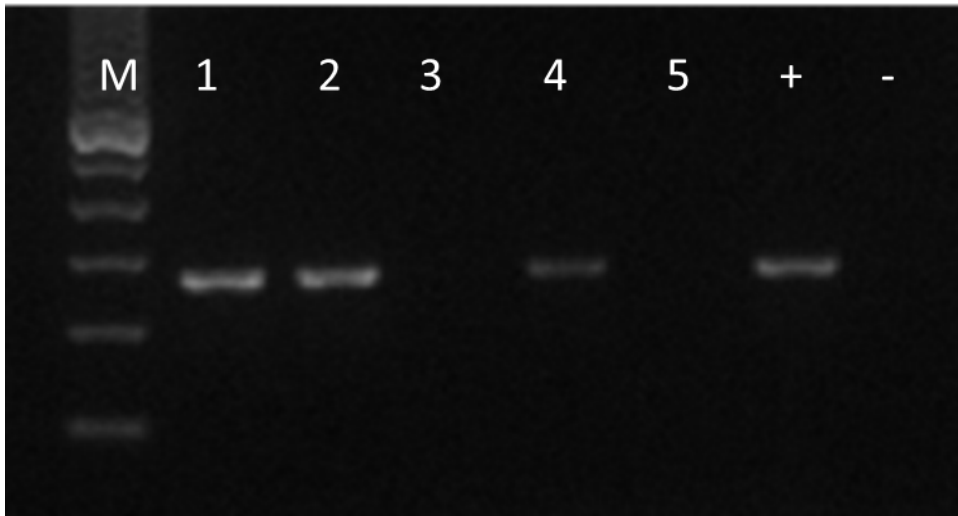


Figura 9. Se presentan bandas inespecíficas cercanas a los 200pb en las muestras número 1, 2 y 4.

-Control negativo: agua ultrapura, +control positivo ADN de machos adultos de *Cooperia oncophora*, M= Marcador molecular 100pb.

En resumen, en la Figura 10 se presenta en porcentaje promedio el resultado de los géneros parasitarios identificados por PCR y discriminados por grupos tratamiento.

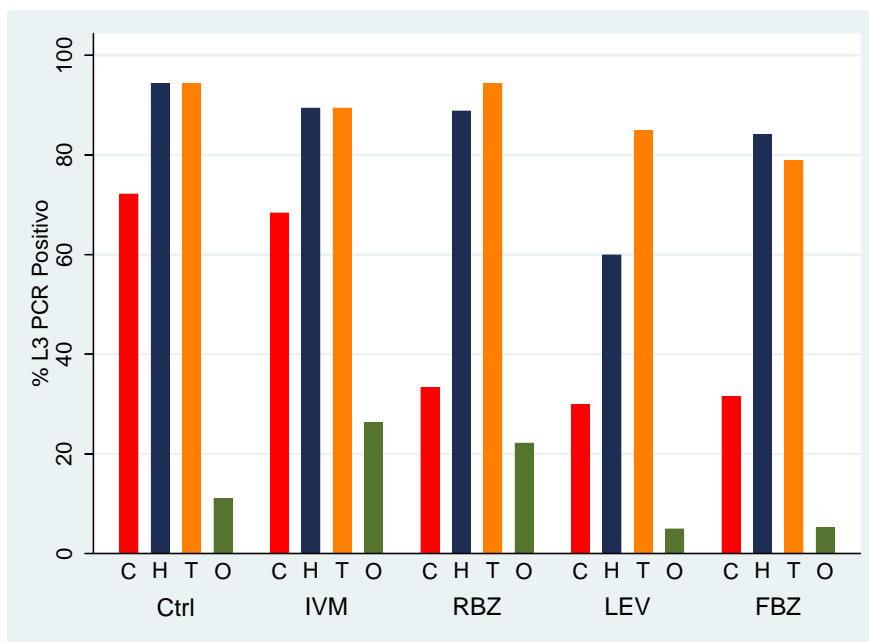


Figura 5. Porcentaje promedio de resultados positivos a PCR, discriminadas por parásitos y grupos químicos.

C=Cooperia; H=Haemonchus; T=Trichostrongylus; O=Ostertagia; Ctrl=Control; IVM=Ivermectina; RBZ=Ricobendazol; LEV=Levamisol; FBZ=Fenbendazol

En la tabla 5 se presenta los resultados de la secuenciación de los productos de PCR enviados a analizar a MacroGen; una vez recibidos, se realizó la búsqueda de secuencias en el GenBank que es la base de datos más utilizada en las Américas.

En la tabla 5 figuran muestras de diferentes predios, el porcentaje de cobertura es el porcentaje de la secuencia que fue alineado con las secuencias registradas en el GenBank, el porcentaje de identificación, es el porcentaje en que la secuencia se asemeja a la registrada en el GenBank y Accession, es el número de acceso de la secuencia registrada.

Tabla 5. Resultados del análisis de la secuenciación de fragmentos de los productos de PCR analizados

MUESTRA	COBERTURA	% IDENTIFICACIÓN	# ACCESSION	GENERO/ESPECIE
177 TESTIGO COOP FOR	63%	93.29%	AJ544419.1	Cooperia oncophora
177 TESTIGO TRICHO FOR	100% 100%	96.61% 96.6%	MN709038 MH598393	Trichostrongylus axei Trichostrongylus sp.
177 IVOMECH HC FOR	97%	96.43%	MF398444.1	Haemonchus contortus
177 TESTIGO TRICHO REV	85%	95.71%	MT294439.1	Trichostrongylus colubriformis
177 IVOMECH HC REV	88%	99.41%	LC368075.1	Haemonchus contortus x Haemonchus placei
177 IVOMECH COOP FOR	82% 84%	98.46% 97.47%	MT294431 KX358861.1	Cooperia punctata Cooperia oncophora
177 RIPERCOL TRICHO FOR	100% 100%	96.61% 96.6%	MN709038 MH598393	Trichostrongylus axei Trichostrongylus sp.
177 RIPERCOL TRICHO	83%	98.48%	MT184889.1	Trichostrongylus colubriformis

MUESTRA	COBERTURA	% IDENTIFICACIÓN	# ACCESSION	GENERO/ESPECIE
REV				
177 RIPERCOL COOP FOR	13%	100.00%	MK936889.1	Cooperia oncophora
177 PANACUR TRICHO FOR	62%	100.00%	MT294439.1	Trichostrongylus colubriformis
177 PANACUR TRICHO REV	71%	100.00%	MT184889.1	Trichostrongylus colubriformis
177 TESTIGO HC FOR	91%	100.0%	MF398445.1	Haemonchus contortus (barber pole worm)
177 TESTIGO HC REV	94%	97.91%	MH481593	Haemonchus contortus (barber pole worm)
434 TESTIGO COOP REV	79%	83.33%	MH267773.1	Cooperia oncophora
380 TESTIGO COOP REV	75%	94.89%	MH267790.1	Cooperia spatulata
434 TESTIGO COOP FOR	75%	79.43%	AJ544424.1	Cooperia oncophora
161 IVOMECCOOP REV	79%	77.25%	AJ544411.1	Cooperia oncophora
417 IVOMECCOOP FOR	52%	87.60%	AJ544465.1	Cooperia oncophora
153 TESTIGO HC FOR	90%	98.84%	LC368048.1	Haemonchus contortus (barber pole worm)
417 IVOMECCOOP REV	57%	78.03%	AJ544384.1	Cooperia oncophora
161 IVOMECCOOP FOR	74%	75.15%	AB238687.1	Cooperia oncophora
423 RICOVERM COOP FOR	54%	76.19%	AJ544465.1	Cooperia oncophora
392 RIPERCOL TRICHO F	77%	98.41%	MT294439.1	Trichostrongylus colubriformis
164 IVOMEX COOP FOR	83%	77.95%	AJ544383.1	Cooperia oncophora
392	83%	76.05%	AJ544456.1	Cooperia oncophora

MUESTRA	COBERTURA	% IDENTIFICACIÓN	# ACCESSION	GENERO/ESPECIE
TESTIGO COOP FOR 164 IVOMECC COOP REV	88%	77.14%	AJ544383.1	Cooperia oncophora

8.6. Resultados del acuerdo estadístico entre técnicas morfológicas y moleculares

Los resultados del análisis estadístico de Cohen's Kappa (Dohoo et al., 2009) para el acuerdo entre la clasificación de género o especies parasitaria por morfología de las L3 recuperadas de los coprocultivos versus PCR convencional, se muestran en la Tabla 5, sin discriminar por género parasitario. En el análisis reveló un índice kappa de 0.2184, lo cual corresponde a acuerdo aceptable entre las dos técnicas.

Tabla 5. Resultado de pruebas positivas y negativas que concuerdan y difieren en la clasificación morfológica y molecular, sin discriminar por tipo de droga o parásito.

Morfología	PCR		Total
	0	1	
0	70	52	122
1	88	166	254
Total	158	218	376

En la Tabla 6 se muestran los resultados descriptivos para ambas pruebas en este caso discriminados por tipo de parásito y en Tabla 7 los resultados del estadístico kappa.

Tabla 6. Resultado de número de pruebas negativas y positivas a la clasificación morfológica y molecular, discriminados por género de parásito.

Parásito	Morfología		PCR	
	+	-	+	-
<i>Cooperia spp</i>	76 (85,4%)	13 (14,6%)	41 (56%)	48 (54%)
<i>Haemonchus sp</i>	65 (72%)	24 (27%)	73 (82%)	16 (18%)
<i>Trichostrongylus spp</i>	61 (69%)	28 (31%)	79 (89%)	10 (10%)
<i>Ostertagia sp</i>	34 (38%)	55 (62%)	13 (15%)	76 (85%)

Tabla 7. Índice Kappa resultado de la comparación de pruebas para cada género.

Género parasitario	Índice Kappa (%)	Interpretación del acuerdo
Cooperia	0,085 (8,5)	Leve
Haemonchus	0,30 (30)	Aceptable
Trichostrongylus	-0,14 (-14)	Pobre
Ostertagia	0,17 (17)	Leve

9. DISCUSIÓN

Los resultados presentados arriba muestran que la resistencia a los antihelmínticos está ampliamente difundida en los establecimientos de bovinos para carne y en el 100% de los predios la ivermectina no presentó eficacia para el control de los NGI. Debido a este hecho, no fue posible realizar un análisis estadístico para establecer los potenciales factores que han generado dicha situación. Como dicho principio activo es usado también para el control de ectoparásitos como las garrapatas y miasis, posiblemente sea una de las potenciales causas de este fenómeno. Debido a que estos resultados coinciden con un trabajo reciente realizado en Uruguay por Correa (2019, comunicación personal), en donde se encontró 79.5% de establecimientos con presencia de resistencia a ivermectina.

La gran influencia de la ivermectina como droga más utilizada concuerda con el análisis llevado a cabo por Suarez. et al (2011) en La Pampa, Argentina y otro estudio más reciente realizado por Descarga. et al (2019), donde también predomina la ivermectina como los antihelmínticos más utilizados. En el caso de nuestro trabajo, además de estar la resistencia a ivermectina presente en todos los establecimientos muestreados, es destacable la baja eficacia de esta droga, ya que ella se comprobó en 13 de 37 establecimientos con niveles iguales o menores al 10 % como se puede apreciar en las gráficas presentadas en Anexo 2. Respecto al grupo de los bencimidazoles, se encontró también un porcentaje importante de establecimientos con baja eficacia a este grupo químico. Si bien en promedio las eficacias para este grupo químico están poco por debajo de los umbrales considerados aceptables (RBZ 92.9% y FBZ 92.8%) podríamos decir que la problemática estaría en estadios iniciales de desarrollo de resistencia. Aunque estas dos drogas pertenecen a un mismo grupo químico, son formulaciones diferentes y lo esperado sería obtener mayor eficacia del FBZ frente a RBZ concordando con lo descrito en el trabajo de Cristel. et al (2017).

Con relación al grupo de levamisol, resultó llamativo el número de establecimientos con falta de eficacia a esta droga (11/37), si bien la mayoría de los TRCH revelaron que la droga en promedio está actuando con más de 79% de eficacia. Estos resultados difieren

tanto con él informado en Argentina por Cristel et al. (2017) en el trabajo realizado en la provincia de La Pampa donde dichos autores no encontraron establecimientos con resistencia a levamisol. Sin embargo, en un trabajo de Caracostantogolo (2004) y Caracostantogolo et al. (2005) se reporta resistencia a levamisol (sin especificar concentración del producto utilizado), en 5 de 69 (7%) establecimientos muestreados. Posteriormente, en un trabajo publicado por Anziani y Fiel (2015), se indica que la resistencia a los levamisoles no está presente en Argentina. A pesar de que dichos autores atribuyen las bajas eficacias obtenidas en sus trabajos a que la droga no alcanza eficacias mayores al 90% para algunos géneros parasitarios, sobre todo *Ostertagia ostertagi*, esta teoría no se sustenta para nosotros, ya que, en nuestro trabajo, la mayoría de los TRCH fueron $\geq 95\%$. En un trabajo adicional a esta tesis, se detectó resistencia a levamisol en *Ostertagia ostertagi* mediante secuenciación masiva (Mederos et al., 2021).

La discrepancia en los resultados en las diferentes regiones mencionadas arriba puede deberse en parte a las condiciones epidemiológicas, al manejo de los animales y del uso de las drogas en las diferentes regiones donde se realizaron los muestreos, ya que, con el advenimiento de las lactonas macrocíclicas, levamisoles y bencimidazoles pasaron a ser menos utilizadas.

Por otro lado, en un meta-análisis de estudios publicados (Mederos et al., 2018), de 10 estudios que evaluaron levamisol, se informa de resistencia en 7 de ellos. Los mismos están distribuidos en Nueva Zelanda, Australia, Argentina, Brazil y Venezuela. Las concentraciones del producto utilizado, vario entre 7% y 22%, de acuerdo con las aprobaciones en cada país.

En Uruguay, Fiel y Nari (2013), informan de eficacias por debajo de 95% al levamisol (sin especificar concentraciones) en 4 establecimientos de 22 analizados (18%).

El complejo perfil de resistencias múltiples demuestra una situación de creciente severidad frente al uso de drogas para el control helmíntico, probablemente y de acuerdo con lo mencionado por Suárez y Cristel (2014), el uso incorrecto sea el factor fundamental generador de la RA.

Una alerta importante, es que se detectó un 18,91% de los establecimientos con resistencia simultánea a 3 grupos químicos. En particular es alarmante un predio que presentó 0% de eficacia para IVM, RBZ y FBZ y esto va a ser evaluado nuevamente para descartar errores de dosificación.

El NGI que resultó mayoritariamente resistente a todos los principios químicos, fue *Cooperia* spp, seguida por *Haemonchus* sp. Esto es coincidente con la mayoría de los trabajos publicados, excepto por aquellos lugares donde las condiciones epidemiológicas son diferentes y *Ostertagia ostertagi* es la especie más abundante que en nuestras condiciones climáticas.

A juzgar por los resultados presentados arriba, se logró poner a punto los protocolos de PCR para la identificación de los géneros parasitarios *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Haemonchus* y especie *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con los protocolos descritos por Demeler et al., (2013).

No se detectaron reacciones cruzadas entre los diferentes parásitos ya que se trabajó con ADN de infecciones mixtas, lo cual indica una muy buena especificidad de los primers.

La discordancia o falta de acuerdo que se encontraron entre la clasificación morfológica y la molecular fue en el género *Cooperia* spp, con algunas muestras evidenciando un tamaño de pares de base mayor a lo esperado y cercanos a 200pb en lugar de 192pb como indica el protocolo de Demeler 192pb.

Estas discordancias se pudieron explicar con los resultados tanto las secuenciaciones de fragmentos de ADN como las secuenciaciones masivas del fragmento ITS-2 (trabajo no incluido en esta tesis), que confirmaron que las muestras presentaban mayoritariamente *Cooperia puntacta*, seguida por *oncophora*.

Cabe destacar que los primers utilizados por nosotros en esta tesis son más específicos para *C. oncophora*, aunque pueden también detectar *C. puntacta/pectinata*.

Esto explicaría también el bajo resultado obtenido en el test de kappa usado para la comparación de la clasificación morfológica y el PCR con primers fundamentalmente de *C. oncophora*.

Con respecto a las muestras que resultaron positivas a *Haemonchus* sp, la secuenciación de los fragmentos enviados a Macrogen, Corea del Sur, revelaron alta homología con *H. contortus*. Sin embargo, en la secuenciación masiva el ITS-2 de larvas 3 realizadas en la Universidad de Calgary, Canadá, identificaron *Haemonchus placei* además de *Haemonchus contortus* en muchas de las muestras (Mederos et al., 2021).

Con respecto al género *Trichostrongylus*, en el trabajo de nemobioma analizado de uno de los predios por Mederos et al. (2021) no se identifica *T. columbriformis* y la mayoría corresponden a *T. axei* y sin clasificar.

10. CONCLUSIONES

A juzgar por los resultados presentados arriba, se confirma que la resistencia a las drogas antihelmínticas está ampliamente diseminada en los establecimientos de cría vacuna en Uruguay. Debido a ello, se deberían estudiar e implementar planes de control complementarios, enfocados a racionalizar y potenciar el uso de las drogas de síntesis química.

Por otro lado, quedó demostrado que las técnicas moleculares a partir de larva 3, son factibles de implementar y resultan una herramienta de mucha utilidad para el estudio de nemátodos gastrointestinales resistentes a las diferentes drogas. Se debería continuar los trabajos de evaluación de otros protocolos de PCR para mejorar la detección sobre todo de las especies de *Cooperia* spp. Los resultados tanto de las secuenciaciones de fragmentos como las secuenciaciones masivas adicionales a esta tesis mostraron que la especie predominante en nuestro sistema de cría vacuna es *Cooperia punctata*, parásito que, bajo condiciones favorables, puede causar parasitosis clínica y problemas productivos en las categorías jóvenes de bovinos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuario OPYPA, (2018) <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuario%202018/ANUARIO%20OPYPA%202018%20WEB%20con%20v%C3%ADnculo.pdf>

Anziani O.S, Guglielmone A.A, Zimmerman N G, Vazquez R. & Suarez V.R. (2001). Avermectin resistance to *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina. Vet. Rec. 149: 58-59.

Anziani, O.S.; Fiel, C.A. (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. Rev. Inv. Agrop. 41(1):34-46.

Bailey, J., (2008). The Integration of Grazing Management and Anthelmintic Treatment to Provide Clean Lambing Paddocks in the Northern Table-lands Region of NSW, Australia. University of New England, Armidale (Ph.D. Thesis).

Cabaret y Berrag, 2004. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. Veterinary Parasitology, 01, 121(1-2):105-113
DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.01.020 PMID: 15110408.

Castells D. (2004). Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. Seminario “Nematodos Gastrointestinales de los ovinos y Saguaypé en ovinos y bovinos”, INIA Tacuarembó, Uruguay, pp. 3-11

Castells D, Nari A, Gayo V, Mederos A, Pereira D. (2013), Epidemiología e impacto productivo de nematodos gastrointestinales en Uruguay. En: Fiel C & Nari A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap. 7, pp. 149-173.

Caracostantogolo, J., 2004. News on anthelmintic resistance. / Noticias sobre resistencia a los antihelmínticos. Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires). 85:4.

Caracostantogolo J., Castaño R., Cutullé Ch., Cetrá B., Lamberti R., Olaechea F., Ruiz M., Schapiro J., Martínez M., Balbiani G., Castro M. 2005. Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. Fao, Producción y Sanidad Animal.

Coles, G. C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. (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

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136:167-185. Doi: 10.1016/j.vetpar.

Corticelli, B. y Lai, M. (1963). Ricerche sulla tecnica di cultura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria*, año 9, fasc. V/VI.

Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli M, Utzinger J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc* 5:503–515.

Cristel, S. Fiel, C.A. Anziani, O. Descarga, C.O. Cetrá, B. Romero, J. Fernández, S. Entrocasso, C.M. Lloberas, M. Medus, D. Steffan, P.E. (2017). Anthelmintic resistance in grazing beef cattle in central and northeastern areas of Argentina—an update. *Vet. Parasitol.* 9:25-28

Demeler J, Kuttler U, von Samson-Himmelstjerna G. (2010). Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 170: 61-70.

Demeler J, Ramünke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu J, Cringoli G, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J. (2013). Discrimination of Gastrointestinal

Nematode Eggs from Crude Fecal Egg Preparations by Inhibitor-Resistant Conventional and Real-Time PCR. PLOS ONE 8(4): e61285.

Dash, K., Hall, K., Barger, I.A., 1988. The role of arithmetic and geometric worm egg counts in faecal egg count reduction test and in monitoring strategic drenching programs in sheep. Aust. Vet. J. 65, 66–68.

Descarga C, Di Niro M, Anomale V, Peñafort C. (2019). Prácticas de control helmíntico en sistemas de producción de carne bovina de la región central de Argentina. Revista Científica FAV-UNRC.

Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2009. Veterinary Epidemiologic Research. VERinc. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. p97-100.

Fiel C.A., Saumell C.A., Steffan P.E. & Rodriguez E.M.(2001), Resistance of Cooperia to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. Vet. Parasitol.97: 213-219.

Fiel, C, Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica en rumiantes. Editorial Hemisferio Sur. Pp 257 – 299.

Garcia A, Gil M. (2009). Determinación de resistencia antihelmíntica en rodeos vacunos en Uruguay. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

Giudici C, Entrocasso C, Steffan P. (2013) Biología, fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel C &Nari A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Cap. 1, pp. 1-21.

Hoglund J, Engstrom A, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Tyden E., 2013. Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. Vet Parasitol 197: 251-257.

MAFF, 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationary Office, London, UK, pp. 20–27.

Martin PJ, Anderson N, Jarrett RG. (1989). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust Vet J* 66 (8): 236-240.

Mederos AE, Carracelas B, Minho AP, Fernández S and Sánchez J. J., 2018. Prevalence and Factors Associated with Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Cattle: A Systematic Review and Meta-analysis. *Vet. Med. Health*, 2 (2), 8.

Mederos, A., Redman, E., Serrano, C, Gilleard, J., 2021. ITS-2 rDNA metabarcoding and amplicon sequencing enabled investigation of anthelmintic resistance in cattle gastrointestinal nematodes in Uruguay. Proceedings of the 28th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 19th-22st July 2021, Dublin, Ireland.

Nari, A., Risso, E. (1994). Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. pp 55 – 201. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay.

Niec R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. INTA. 37p.

Salles J. (2002). Métodos de control integrado de las parasitosis gastrointestinales: manejo del pastoreo con criterio parasitario. Seminario “Parasitosis Gastrointestinales de los ovinos: situación actual y avances de la investigación”, Tacuarembó, Uruguay, pp 23-26

Salles J, Rodríguez M, Cardozo N, Risso E, Cardozo H. (2004). Resistencia antihelmíntica en vacunos en el Uruguay: primera comunicación. Seminario de actualización en parásitos gastrointestinales de bovinos y ovinos. INIA Tacuarembó.65-68.

Sprent P. (1989). Applied non-parametric statistical methods. Ed. Chapman & Hall, London, 259 pp.

Steffan P, Fiel C, Ferreyra D. (2012). Endoparasitosis más frecuentes de los rumiantes en sistemas pastoriles de producción. IPCVA. 112 pp.

Suarez, V.H.; Cristel, S.L. (2014). Risk factors for anthelmintic resistance development in cattle gastrointestinal nematodes in Argentina. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23(2):129-135.

Suárez, VH; Miranda, AO; Arenas, SM; Schmidt, EE; Lamberti, J; Schieda, A; Felice, G; Mas, D; Sola, E; Pepa, H; Bugnone, V; Calandri, H; Lordi, L. 2011. Incidencia y control de los nematodes gastrointestinales bovinos en el este de la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Invest. Agrop.* 37(1):26-36.

Paiva, F; Sato, M O; Acuña, A H; Jensen, J R; Bressan, M C (2001). Resistencia a ivermectina constatadas en *Haemonchus placei* y *Cooperia punctata* en bovinos. *A Hora Veterinaria, Brasil* 20: 29-32.

Pinheiro A.C. &Echevarria F.A.M. (1990). Susceptibilidade de *Haemonchus* spp en bovinos ao tratamento anti-helmíntico con albendazole e oxfendazole. *Pesq. Vet. Bras.*10: 19-21.

Prichard, R.K, Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C.A., Donald, A.D., (1980).The problem of anthelmintic resistance. *Aust. Vet. J.* 56, 239-250.

Roberts FH, O'Sullivan PJ. (1950). Methods for egg counts and larvae cultures from strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agric Res* 1: 99-102.

Roeber, F., Jex, A. R., Gasser, R.B., 2013. Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point? In D. Rollinson, editors: *Advances in Parasitology*, Vol. 83, Amsterdam, The Netherlands: Academic Press, pp. 267-333. ISBN: 978-0-12-407705-

Van Wyk JA, Mayhew E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res* 80(1): 539 doi:10.4102/ojvr.v80i1.539.

12. ANEXOS

a) Anexo 1

Cuestionarios, establecimientos muestreados, resultados demográficos y de manejo parasitario

CUESTIONARIO DE FACTORES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE RESISTENCIA ANTIHELMINTICA EN BOVINOS

1. Raza: _____
2. N° bovinos totales: _____
3. N° terneros: _____
4. Sistema de producción:
 - a) Ciclo completo _____
 - b) Cría _____
 - c) Recría, engorde _____
 - d) Otro _____
5. ¿Hay ingreso de animales al predio? Sí _____ Categorías: _____
No _____
6. Tipo de pastoreo:
 - a) Mixto lanar vacuno _____
 - b) Solo vacunos _____
 - c) Alterno bovinos/lanares _____
 - d) Rotaciones agrícolas _____
 - e) Otro _____

Manejo Parasitario

- 7) Antihelmínticos utilizados en los últimos 2 años
 - a) Levamisoles
 - b) Bencimidazoles
 - c) Ivermectinas
 - d) Otro
- 8) Número de tratamientos anuales:
 - a) Terneros
 - b) Sobreños
 - c) Vacas de cría
 - d) Otros (ej. toros)
- 9) Criterio para dosificar a los animales:
 - a) Peso individual _____

- b) Por el más pesado _____
- c) Otro _____

10) ¿Realiza análisis coproparasitarios (McMaster o HPG)? Si _____
 No _____

11) ¿Realizó lombritest alguna vez? Sí _____
 No _____

12) ¿Dosificación y cambio a pastura segura? Sí _____
 No _____

13. Realiza tratamientos con ivermectina/abamectinas/doramectina contra los siguientes parásitos externos:

- a) Garrapatas SI..... NO.....
- b) Miasis (mosca de la bichera) SI..... NO.....

14. Si la respuesta en (13) es SI, cuantas veces al año realiza los tratamientos:

- a) Garrapatas
- b) Miasis (mosca de la bichera)

b) Anexo 2

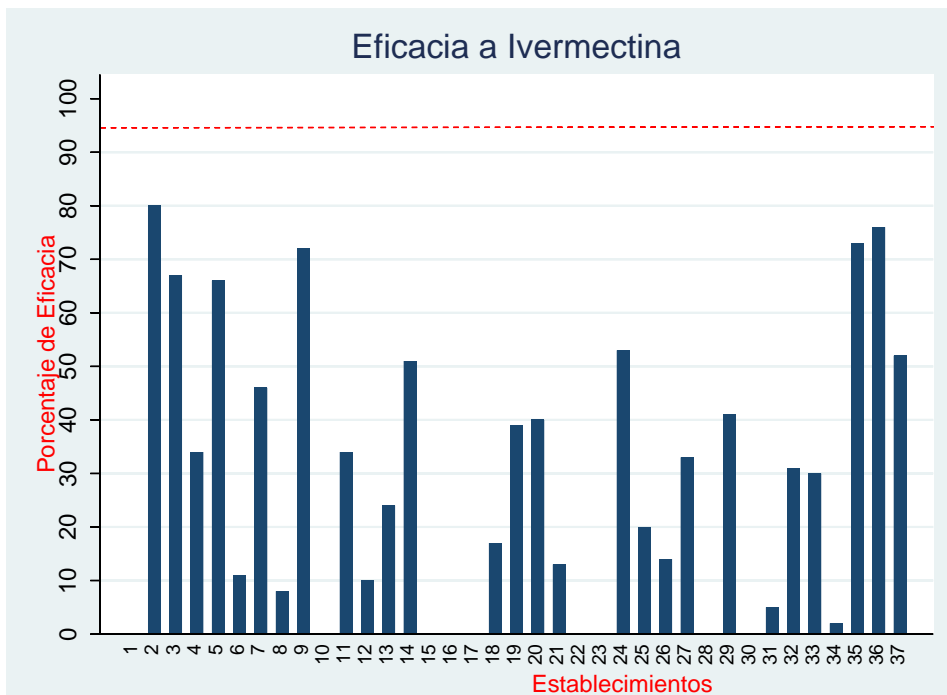


Fig. 1. Resultados de porcentaje de eficacia de la ivermectina contra nematodos gastrointestinales de bovinos encontrada en 37 establecimientos estudiados.

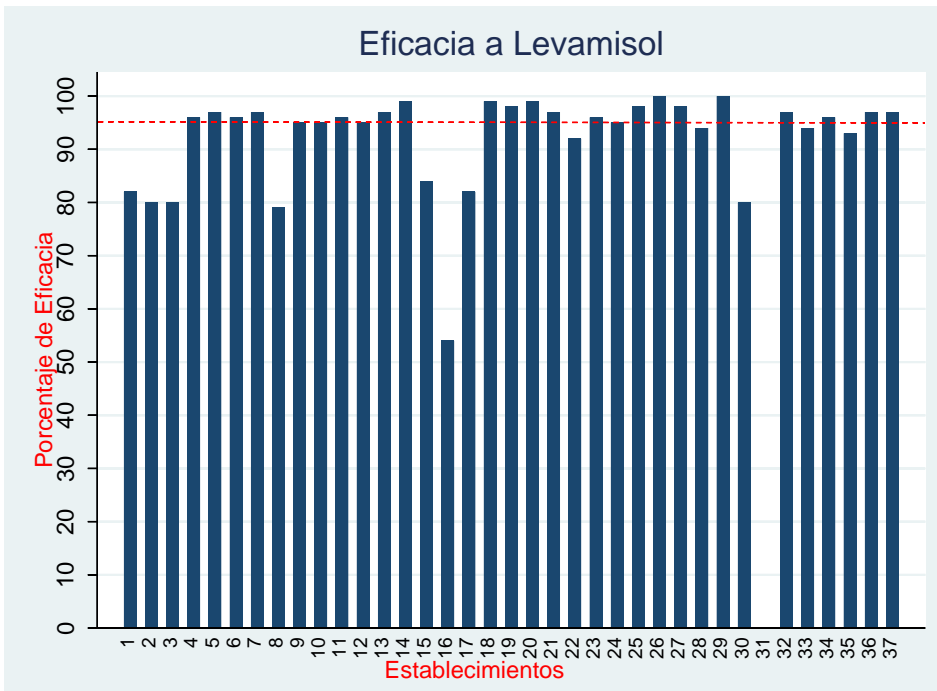


Fig. 2. Resultados de porcentaje de eficacia a levamisol contra nematodos gastrointestinales de bovinos encontrada en 37 establecimientos estudiados.

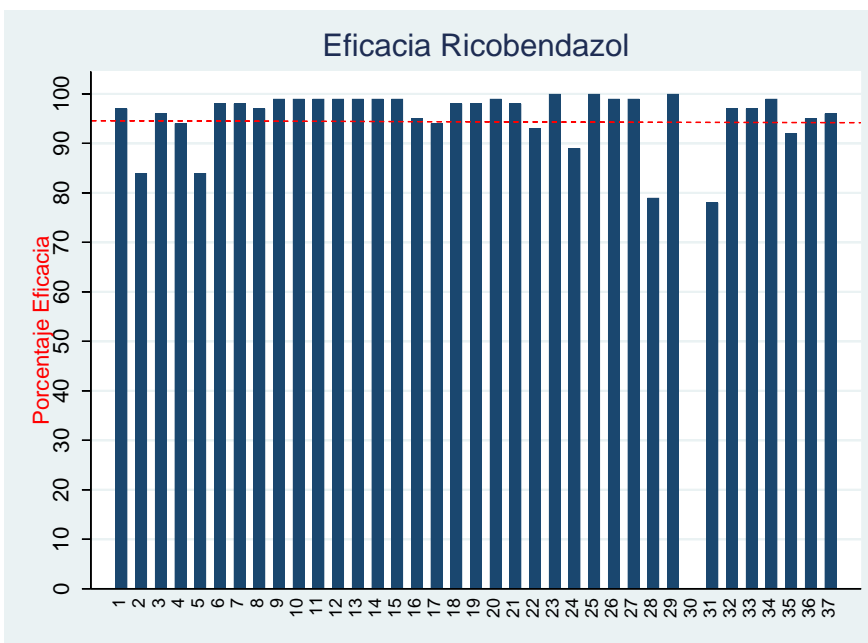


Fig. 3. Resultados de porcentaje de eficacia de ricoendazol contra nematodos gastrointestinales de bovinos encontrada en 37 establecimientos estudiados.

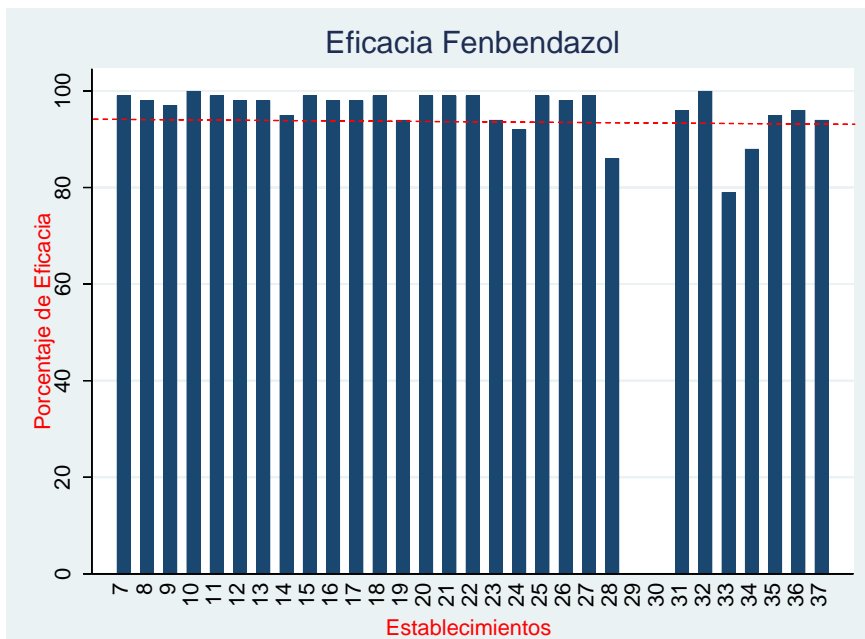


Fig.4. Resultados de porcentaje de eficacia fenbendazol oral contra nematodos gastrointestinales de bovinos encontrada en 30 establecimientos estudiados.