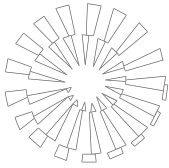


Notas de investigación

Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales



First report in Mexico on ivermectin resistance on naturally infected calves with gastrointestinal nematodes

Lisandro A. Encalada Mena* Ma. Eugenia López Arellano** Pedro Mendoza de Gives**
 Enrique Liébano Hernández** Víctor Vázquez Prats** Gerardo Vera Ycuspinera***

Abstract

The aim of this work was to determine the presence of ivermectin anthelmintic resistance in gastrointestinal parasitic nematodes in young cattle naturally infected in the state of Campeche, Mexico. This research was performed based on a survey of sanitary management to 35 cattlemen for the selection of suspicious herds with anthelmintic resistance problems. Calves from six to 12 months age were selected because no anthelmintic treatment had been given for at least 60 days and because they showed more than 200 eggs per gram of feces (epg) before treatment. Two groups of calves from seven to 13 each were randomly chosen; control group received no treatment, and treated group received ivermectin at a dose of 0.2 mg per kg of body weight, subcutaneously. Fourteen days after treatment, the epg number was determined and infective larvae genera were taxonomically identified. Data were analyzed using RESO program for anthelmintic resistance. The results indicated a concerning problem of ivermectin anthelmintic resistance in the evaluated cattle of five ranches with levels higher than 60%. The nematode genera identified before treatment were: *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp and *Oesophagostomum* sp, and after treatment *Cooperia* spp still remained in five ranches, followed by *Oesophagostomum* sp and *Haemonchus* spp for two of the evaluated ranches. This research shows, for the first time in the state of Campeche, anthelmintic resistance in young cattle, as well as presence of gastrointestinal nematodes resistant to ivermectin.

Key words: ANTHELMINTIC RESISTANCE, CALVES, GASTROINTESTINAL NEMATODES.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue detectar resistencia a ivermectina en nematodos gastrointestinales en bovinos jóvenes infectados naturalmente en Campeche, México. El trabajo se llevó a cabo con base en una encuesta de manejo sanitario realizada a 35 ganaderos para la selección de hatos sospechosos de problemas de resistencia antihelmíntica. Becerros de seis a 12 meses de edad fueron seleccionados debido a que no habían recibido tratamiento antihelmíntico en un periodo mínimo de 60 días y porque presentaron cuentas parasitarias mayores de 200 huevos por gramo de heces (hpg), antes del tratamiento. Se formaron dos grupos de bovinos al azar, de siete a 13 animales cada uno; el grupo testigo no recibió tratamiento, y grupo tratado recibió 0.2 mg por kg de peso de ivermectina, vía subcutánea. Catorce días después del tratamiento, se determinó el número de hpg y se identificaron los géneros de larvas infectantes. Los datos se analizaron en el programa RESO para resistencia antihelmíntica. Los resultados indicaron serios problemas de resistencia a ivermectina en el ganado vacuno evaluado en cinco ranchos con niveles mayores de 60%. Los nematodos identificados antes del tratamiento, *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp y *Oesophagostomum* sp, y después del tratamiento fueron *Cooperia* spp en los cinco ranchos, seguido por *Oesophagostomum* sp y *Haemonchus* spp para dos de los ranchos evaluados. Este trabajo muestra evidencia, por primera vez en Campeche, de resistencia a ivermectina en bovinos jóvenes, así como presencia de tres géneros de nematodos gastrointestinales resistentes a ivermectina.

Palabras clave: RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA, BECERROS, NEMATODOS GASTROINTESTINALES.

Recibido el 2 de agosto de 2007 y aceptado el 20 de junio de 2008.

*Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Campeche, Calle 53 s/n, Col. Unidad Esfuerzo y Trabajo, 24350, Escárcega, Campeche, México.

**Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Cuernavaca-Cuautla 8534, CP 62550, Jiutepec, Morelos, México.

***Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Agropecuarias, Km 25, Carretera Villahermosa-Teapa, R/a La Huasteca, 2ª Sección del Municipio del Centro, Tabasco, México.

Nota: Los datos del presente trabajo forman parte de la tesis de maestría del primer autor.

Correspondencia: Ma. Eugenia López-Arellano, correo electrónico: mlopez_arellano@hotmail.com

Introduction

The cattle livestock production is one of the main protein sources obtained from animals in Mexico, and most of these herds are localized in extensive tropical regions of the country. Livestock production in such regions is seriously affected by gastrointestinal nematodes (gin) that cause damage on the abomasal and intestinal mucosa, which finally affect the absorption of nutrients and cause decreasing of the body weight. Currently, the use of chemical drugs known as “anthelmintics” is the only method of control used against these parasites, and their use is mainly required in tropical regions where the high prevalence of parasites is threatening the animal health. On the other hand, the benzimidazole, imidazothiazole and macrocyclic lactones are families of anthelmintics that have been considered as the major chemical products with efficacy against gin in ruminants. Nevertheless, the toxic effect of anthelmintics and their use will depend on the susceptibility of the target parasite, as well as environmental factors and health programs to prevent such parasitosis. The efficacy of anthelmintics can change due to the development of anthelmintic resistance in the parasites against such compounds; this phenomenon has mainly developed in small ruminants.² In contrast, the anthelmintic resistance in cattle has been less studied, but in the last seven years some countries have notified the presence of resistance against ivermectin in gin in cattle.^{3,4}

The ivermectin is an anthelmintic compound that belongs to the macrocyclic lactone family, which for long time has shown to be an excellent product into the anthelmintic market due to its high nematicidal effect and its broad spectrum activity. In Mexico, about 50% of the livestock production is mainly localized in tropical areas, in which cattle is continuously exposed to *gin* and animals can easily acquire gin infection and other types of parasites.⁵ In some regions, the use of anthelmintics is part of the regular husbandry procedure against parasites; however, the screening of anthelmintics efficacy should also be established looking for suitable strategies which might prevent anthelmintic resistance problems.

The big concern about the continuous anthelmintic resistance spreading in livestock farms in Mexico has motivated the performance of the present research work. This study was aimed to identify the presence of anthelmintic resistance in gin against ivermectin in cattle in the State of Campeche, Mexico. This work was carried on in a subtropical region at the Escarcega municipality in Campeche, Mexico.⁶ A survey was applied to 35 cattle-herds to select young calves considered as the most susceptible animals to acquire

Introducción

El ganado vacuno es una de las principales fuentes de proteína de origen animal en México, gran parte de este ganado se localiza en regiones tropicales. La producción ganadera en estas regiones es afectada por nematodos gastrointestinales (ngi) que dañan la mucosa del abomaso e intestinos, además de que afectan la absorción de nutrimentos y repercuten en la ganancia de peso. En la actualidad, el uso de medicamentos químicos conocidos como “antihelmínticos”, es el único método de control de esas parasitosis y su utilización es indispensable sobre todo en regiones tropicales donde la alta prevalencia de parásitos pone en riesgo la salud del ganado. Asimismo, los antihelmínticos derivados de los bencimidazoles e imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas han sido considerados como los compuestos químicos de mayor efectividad en contra de ngi en rumiantes. Sin embargo, el efecto tóxico de los antihelmínticos y su uso dependerá de la susceptibilidad del parásito blanco del medicamento, así como de factores ambientales y programas de salud que tengan como propósito prevenir tales parasitosis.¹ No obstante, la eficacia de los antihelmínticos podría cambiar debido al desarrollo de resistencia en los parásitos hacia dichos compuestos; este fenómeno se ha presentado principalmente en pequeños rumiantes.² En cambio, el problema de resistencia en bovinos había sido menos estudiado, pero en los últimos siete años en algunos países se han notificado problemas de resistencia a ivermectina en ngi de bovinos.^{3,4}

La ivermectina constituye un compuesto antihelmíntico que forma parte de la familia de lactonas macrocíclicas, la cual a lo largo de muchos años ha gozado de excelente reputación en el mercado de los antihelmínticos por su alta efectividad nematicida y su amplio espectro de acción. En México, aproximadamente 50% de la producción ganadera se localiza en áreas tropicales, ello favorece la infección por ngi y otra clase de parásitos.⁵ El uso de antihelmínticos en algunas regiones forma parte de los programas de desparasitación; sin embargo, también se debería dar seguimiento a la eficacia de dichos compuestos con el fin de buscar estrategias que prevengan problemas de resistencia antihelmíntica.

Debido al interés por prevenir la diseminación de resistencia antihelmíntica y con base en la importancia de la ganadería en México, el objetivo del presente estudio fue identificar posibles problemas de resistencia a ivermectina en ngi en ganado bovino en Campeche, México. El trabajo se realizó en la región subtropical de Escárcega, Campeche,⁶ donde se aplicó un cuestionario a 35 explotaciones bovinas para la selección de animales jóvenes, porque son los más susceptibles a

a parasitic nematode infection. Questions such as use and frequency of anthelmintics and other parasitic products and commercial brand in use were included. Also, additional information was investigated such as if cattlemen followed the manufacturer recommendations dose according to the animal weight, as well as the number of calves, grazing time, type of the feeding supplement, age and breed.

The evaluation of the anthelmintic resistance was carried on in gin naturally infected sheep, using the fecal egg count reduction test, cited by Coles *et al.*,⁷ and also by the international guide of anthelmintic evaluation,⁸ which considers the use of six to 15 infected cattle with 200 eggs per gram in feces, which did not received treatment for the last 60 days. The faecal egg counts reduction test determined the percentage of gin in feces previous and post anthelmintic treatment throughout the McMaster technique.

Two hundred and four cattle samples were analyzed from six to 12 months-old-age calves, which did not receive treatment 60 days previous to the anthelmintic evaluation to avoid any residual drug effect. The results showed only 104 calves (50.98%) with parasitic infection similar or higher than 200 *epg*, remaining 52 animals in each of the control and treated groups, respectively. The evaluation of the anthelmintic resistance was carried on in five ranches, denominated as R1, R2, R3, R4 and R5.

In each ranch, two groups of animals were considered: 1) Control, which received only water and 2) Treated, with 0.2 mg of ivermectin per kg of body weight applied by subcutaneous via*. Seven to 13 calves were used per group, previous positive diagnosis to gin. The number of *epg* was determined by McMaster technique at day cero and 14 after the ivermectin treatment.^{1,8} Moreover, gin larvae genus was identified by glass culturing vessel technique.⁹ Data were analyzed using the RESO software program.¹

Results of the evaluation were considered using the following criteria: resistant, if the reduction of *epg* percentage was lower than 95% and if the low limit of the confidence interval was lower than 90%, and suspicious, if only of one of these criteria was observed.^{1,8} The results show the presence of anthelmintic resistance in calves from the five evaluated ranches (Table 1). The gin larvae genera identified previous treatments were: *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp and *Oesophagostomum* sp in the five ranches. In contrast, different results were observed among ranches after treatments, *Cooperia* was the dominant genus identified in the five ranches, followed by *Haemonchus* and *Oesophagostomum* in R4 and R1, respectively.

In this context, data obtained from the applied survey to 35 cattlemen showed that ivermectin was the most used product (65%.9), followed by levamisole

nematodiasis. Se incluyeron preguntas acerca del uso y frecuencia de los productos antihelmínticos y otros desparasitantes, nombre comercial del desparasitante que se emplea, y se preguntó al ganadero si aplicaba la dosis conforme al peso de los animales, además del número de animales jóvenes, tipo de pastoreo, tipo de complemento alimenticio, edad y raza.

La evaluación de la resistencia antihelmíntica se realizó en campo, utilizando la prueba de reducción de huevos en heces, citada por Coles *et al.*,⁷ así como por la guía internacional para la evaluación de antihelmínticos,⁸ que consiste en usar de seis a 15 bovinos infectados con 200 huevos por gramo de heces y sin haber recibido tratamiento antihelmíntico en 60 días. La prueba de reducción de huevos en heces consiste en determinar el porcentaje de huevos de *ngi* en heces antes y después del tratamiento antihelmíntico, a través de la técnica de McMaster.

Se analizaron 204 muestras de bovinos de seis a 12 meses de edad que no habían sido tratados con antihelmínticos durante 60 días anteriores al ensayo, para evitar algún posible efecto residual; de éstos, sólo 104 (50.98%) cumplieron con las cargas parasitarias iguales o mayores de 200 *hpg*, quedando un total de 52 animales para los grupos testigos y tratados, respectivamente. La evaluación de resistencia antihelmíntica se realizó en cinco ranchos, a los que se denominó R1, R2, R3, R4 y R5.

En cada rancho se incluyeron dos grupos de animales: 1) Testigo, que recibió agua como placebo y 2) Tratado, al que se le aplicaron 0.2 mg de ivermectina por kg de peso vía subcutánea.* Se utilizaron de siete a 13 becerros por grupo, que habían sido previamente diagnosticados como positivos a *ngi*. El número de *hpg* fue determinado durante los días cero y 14 posteriores al tratamiento con ivermectina, por la técnica de McMaster.^{1,8} Asimismo, se identificaron los géneros de *ngi* por el método de cultivo de larvas en tarro.⁹ Los datos obtenidos se analizaron con el programa RESO.¹

Los criterios de evaluación fueron: resistente, si el porcentaje de reducción de *hpg* es menor de 95% y si el límite inferior del intervalo de confianza es menor a 90%; y sospechoso, si se observa sólo uno de los dos criterios.^{1,8} Los resultados señalan problemas de resistencia antihelmíntica en becerros de cinco ranchos (Cuadro 1). Los géneros de *ngi* identificados antes del tratamiento fueron: *Cooperia* spp, *Haemonchus* spp y *Oesophagostomum* sp para los cinco ranchos. En contraparte, se observaron diferencias entre ranchos, posteriores al tratamiento; el género predominante para los cinco ranchos fue *Cooperia*, seguido de *Haemonchus* y *Oesophagostomum* para R4 y R1, respectivamente.

*Ivomec, Laboratorios Merial, lote NDO 2300, México.

Cuadro 1

PROMEDIO DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES ELIMINADOS POR g DE HECES OBTENIDOS EN BOVINOS DE CINCO RANCHOS EN ESCÁRCEGA, CAMPECHE, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON IVERMECTINA, INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA
 MEAN OF GASTROINTESTINAL NEMATODE EGGS PER g OF CATTLE FECES OBTAINED FROM FIVE RANCHES IN ESCARCEGA, CAMPECHE, BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH IVERMECTIN, 95% CONFIDENCE INTERVAL, GASTROINTESTINAL NEMATODE EGG REDUCTION PERCENTAGE AND ANTELMINTHIC RESISTANCE DIAGNOSIS

Ranch number	Number of calves per group	Pre-treatment epg*		Post-treatment epg*		95% of I.C. of confidence		% of reduction	Diagnosis
		Cx	Tr	Te	Tr	Low	Upper		
1	10	370	575	920	185	43	93	80	R
2	7	350	329	464	29	86	97	94	R
3	10	705	456	505	35	83	97	93	R
4	12	100	1 000	1421	233	37	96	84	R
5	13	1 484	996	881	350	1	84	60	R

I. C. = Confidence Interval; epg = eggs per gram of feces; * = arithmetic mean; Cx = control group; Tr = treated group
 R = anthelmintic resistance

(27.3%) and febendazole (6.8%), between anthelmintic treatment periods from four to six months. Moreover, animals were grazing all year; 43% of the cattlemen moved animals from one to another grassland. This study was performed from May to August 2006, and it had favorable meteorological conditions for nematode parasites such as heavy rains at evening and night with a mean of 568.46 mm per month and temperature around 27.27°C to develop *gin* stages to infect grazing cattle, mainly young cattle.

Anthelmintic treatments are nowadays the unique method of control against *gin*, in Mexican cattle herds and macrocyclic lactones such as ivermectin have shown broad-spectrum of activity against different parasites. Unfortunately, the results of the present research show evidence of the presence of anthelmintic resistance in nematodes against ivermectin in cattle in Mexico, which is a concerning problem mainly because of the importance of cattle in the livestock production. Similar results were notified in 2001 in Argentina, showing 13% of *gin* ivermectin resistance in cattle,³ which increased at 92% in 2004.¹⁰ Although, the origin of the anthelmintic resistance against ivermectin in cattle nematodes in that country was unknown, Fiel *et al.*³ suggests that the frequency of treatments and the long persistence of

En este contexto, los datos de la encuesta aplicada a 35 ganaderos señalan que ivermectina es el producto de mayor uso (65.9%), seguido de levamisol (27.3%) y de febendazol (6.8%), aplicados en periodos de cuatro a seis meses entre tratamientos. Además, los animales se encontraron en pastoreo todo el año; 43% de los productores realizaba rotación de potreros. El presente trabajo se realizó de mayo a agosto de 2006, cuando las condiciones climáticas fueron lluvias abundantes en tarde y noche con promedio mensual de 568.46 mm y temperatura promedio de 27.27°C, lo cual indicaba condiciones favorables para el desarrollo de estadios evolutivos de *ngi* para la infestación de bovinos en pastoreo, afectando principalmente al ganado joven.

El tratamiento antihelmíntico es, a la fecha, el principal método de control, y las lactonas macrocíclicas han mostrado amplio espectro de acción contra diferentes tipos de parásitos, dentro de las cuales se encuentran las ivermectinas. Infortunadamente, el problema de resistencia a ivermectina se observó en ganado vacuno de México, lo cual es preocupante debido a la importancia de esta especie en la producción ganadera. Similares resultados fueron notificados en 2001 en Argentina, con 13% de resistencia a *ngi* en bovinos,³ lo cual incrementó a 92% en 2004.¹⁰ Aunque

the therapeutic activity are the main causes. In addition, Gasbarre *et al.*¹¹ identified ivermectin resistance problems on infected cattle with gin in North America, suggesting the incorrect anthelmintic dose as the cause of anthelmintic resistance.

In Escarcega, the lack of record books with information related to the preventive and control management programs and also the excessive use of ivermectin were identified as the main problems of ivermectin resistance in the five evaluated herds, causing parasite resistance to this compound. Moreover, the reduction in the anthelmintic efficacy of ivermectin could motivate farmers to increase the frequency of treatments to compensate such low efficacy. In similar way, the use of common pastures was a non recommended husbandry procedure, since contaminated pastures are the feeding source with gin resistance to ivermectin.

In this sense, this study showed similar data to the Argentina and North America reports identifying *Cooperia* spp as the main resistant genus, which was markedly different in small ruminants, where *H. contortus* is the main genus with multiple anthelmintic resistance.^{1,12} The results obtained in the present study show, for the first time, the presence of anthelmintic resistance to ivermectin in gin in cattle in Mexico.

A screening of herds from regions under risk of anthelmintic resistance in Mexico and also the establishment of adequate deworming programs is highly recommended. Special attention in the use of the right doses of chemical drugs in relation to the body weight of the animals and the recommendations of the anthelmintic manufacturer are very important and should also been considered. The search of new alternatives of parasitic control, different to chemical compounds must be promoted in order to at least, partially replace the use of drugs for parasite control.

Referencias

1. Coles GC. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Vet Res* 2002;33:253-259.
2. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance a status report. *Trend Parasitol* 2004;20:477-481.
3. Fiel CA, Saumell CA, Steffan PE, Rodriguez EM. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatment in grazing cattle of the humid Pampa, Argentina. *Vet Parasitol* 2001; 97:231-219.
4. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Von Samson-Himmelskjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trend Parasitol* 2004;20: 469-476.
5. Mejía EF. Estudio recapitulativo de la distribución geográfica de helmintos y *Eimeria* spp de rumiantes domésticos en la República Mexicana (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1986.

se desconoce el origen de la resistencia a ivermectina en ese país, Fiel *et al.*³ consideran la frecuencia de los tratamientos y la larga persistencia de la actividad terapéutica como principales causas de origen. Asimismo, Gasbarre *et al.*¹¹ identificaron problemas de resistencia a ivermectina en vacunos infectados con ngi en Norteamérica, lo que sugiere el uso incorrecto de la dosis como causa de resistencia.

El principal problema que se observó en los cinco hatos seleccionados en Escárcega fue la ausencia de registros relacionados con programas sanitarios, y quizá al no existir un control del uso de ivermectina ésta se haya utilizado de manera excesiva, ocasionando que se presentara el problema de resistencia en los parásitos hacia este compuesto. Asimismo, esto último pudo provocar la necesidad de acortar el tiempo entre tratamientos para tratar de compensar la baja eficacia del compuesto. De igual manera, el uso de potreros comunes es mala práctica de manejo y resulta ser un factor importante en la diseminación de la resistencia, ya que el pasto es posible fuente de alimento contaminado con nematodos resistentes.

En este sentido, los datos de este estudio son similares a los notificados en Argentina y Norteamérica al identificar *Cooperia* spp como el principal género resistente, lo cual es muy diferente a lo que se ha observado en pequeños rumiantes, donde *H. contortus* es el principal género con problemas de resistencia múltiple.^{1,12} Los datos obtenidos aquí muestran evidencia, por primera vez en México, sobre la resistencia antihelmíntica a ivermectinas en bovinos.

Se sugiere dar seguimiento a hatos en regiones bajo riesgo de posibles problemas de resistencia en bovinos en México, así como establecer el uso adecuado de los antihelmínticos, con las dosis adecuadas de acuerdo con los pesos de los animales, y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Asimismo, es necesario promover la búsqueda de alternativas de control parasitario, diferentes al uso de compuestos químicos, que ayuden a reemplazar, al menos parcialmente, tales fármacos.

6. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Sistema Municipal de Base de Datos [Serie en línea] 2006 Sep. [citado 2006 sep 22]. Disponible en: <http://www.inegi.gob.mx>
7. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Samson-Himmelskjerna von G, Silvestre A *et al.* The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006; 136:167-185.
8. Veterinary International Cooperation Harmonization. Effectiveness of anthelmintics: Specific Recommendations for Bovine [online] 1999 Nov. [cited: 2006 Nov 16] Available from: www.vichsec.org/pdf/2000/GL12_ST7.pdf
9. Liébano HE. Identificación morfológica de larvas

- infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en rumiantes domésticos de México. En: Vazquez PVM, editor. Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. Morelos, México: INIFAP, 2004:26-77.
10. Anziani OS, Suarez V, Gulielmone AA, Warnke O, Grande H, Coles GC. Resistance to bencimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol* 2004;122:303-306.
 11. Gasbarre LC, Smith LL, Lichtenfels JR, Pilitt PA. Identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the United States. 49th Meeting American Association of Veterinary Parasitologists; 2004 July 24-28; Philadelphia USA. Philadelphia USA: American Association of Veterinary Parasitologists, 2004:57.
 12. Montalvo AX, López AME, Vázquez PVM, Liébano HE, Mendoza de GP. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos a bencimidazoles y lactonas macrocíclicas en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Téc Pecu Méx* 2006;44:81-90.