

Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala

Ivermectin and febendazole anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from naturally infected sheep in northern Tlaxcala, México

Xochil Montalvo-Aguilar^a, Ma. Eugenia López Arellano^b, Victor Vázquez Prats^b, Enrique Liébano Hernández^b, Pedro Mendoza de Gives^b

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la problemática de resistencia a febendazol (Fz) e ivermectina (IM) en ovinos infestados naturalmente con nematodos gastroentéricos (NGE) en tres municipios del estado de Tlaxcala, México. Se realizó un cuestionario para la selección de animales. Veinte rebaños fueron escogidos de los municipios de Calpulalpan (4), Nanacamilpa (10) y Hueyotlipan (6). Se formaron tres grupos de 10 a 14 ovinos por rebaño; I) control sin tratamiento; II) tratado con 5 mg de Fz por kilogramo de peso por vía oral; III) tratado con 0.2 mg de IM por kilogramo de peso por vía subcutánea. Se determinó la cantidad de huevos en heces los días 0 y 14 antes y después del tratamiento. El 55 % de ovinos experimentales fueron cruza Merino-Dorset provenientes de Australia, 75 % Suffolk, 10 % Hampshire, 10 % Criolla y 5 % Columbia; éstas últimas cuatro razas de origen nacional. Asimismo, las encuestas muestran que 75 % de los ovinos fueron tratados con derivados de lactonas macrocíclicas, 65 % de bencimidazoles y 45 % de salicilanidas. Los resultados de la prueba de campo, muestran resistencia a IM en un rebaño de Calpulalpan y se sospecha de resistencia en tres rebaños de Hueyotlipan. No se observó resistencia a Fz en ningún municipio, pero dos rebaños en Hueyotlipan resultaron sospechosos. *Haemonchus* y *Teladorsagia* fueron los géneros identificados resistentes a ivermectina y sospechosos de resistencia a febendazol.

PALABRAS CLAVE: Resistencia, Ivermectina, Febendazol, Ovinos, Nematodos gastroentéricos.

ABSTRACT

This experiment examined the problem of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes (GIN) to Ivermectin (IVM) and Febendazole (Fbz) in naturally infected sheep from Tlaxcala, Mexico. Twenty flocks were selected from three districts in Northern Tlaxcala: Calpulalpan (4), Nanacamilpa (10) and Hueyotlipan (6). Groups ranged from 10 to 14 sheep each and they were designed as follows: I), control; II) treated with Fbz at 5 mg per kg of body weight *per os*, and group (III) treated with IVM at 0.2 mg/kg of bodyweight by subcutaneous injection. Faecal samples were collected and nematode egg counting was estimated at days 0 and 14. Results were based on the faecal egg counts and from a flock management survey applied to farmers. The results showed that one flock was resistant to IVM, three flocks were classified as suspicious and sixteen flocks were susceptible. Moreover, infected sheep treated with Fbz did not show anthelmintic resistance; however, three flocks were suspicious and seventeen flocks were susceptible to this drug. On the other hand, the survey analysis showed that the frequency of anthelmintic treatments was 75 % to IVM, 65 % to Fbz and 45 % to Salicilanide. Besides, 55 % of experimental sheep were Merino-Dorset acquired from Australia, 75 % Suffolk, 10 % Hampshire, 10 % Cross-breed and 5 % Columbia; these last four breeds were acquired from local regions. Moreover, resistance to IVM appeared to be related to the frequent use of IVM and by infected sheep with GIN acquired from other regions.

KEY WORDS: Anthelmintic resistance, Ivermectin, Febendazole, Sheep, Gastro-intestinal nematodes.

Recibido para su publicación el 8 de junio de 2004 y aceptado para su publicación el 29 de julio de 2005.

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

^b Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria – INIFAP. Km 11.5 Carr. Cuernavaca-Cuautla, Apdo. Postal No. 206 CIVAC, 62550, Jiutepec, Mor. México. lopez.mariaeugenia@inifap.gob.mx. Correspondencia al 2° autor.

El diagnóstico de resistencia a los antihelmínticos es una herramienta de apoyo para la aplicación de tratamientos en regiones de alto riesgo a nematodos gastrointestinales (NGE) en rumiantes. Aunque el uso de productos químicos es hasta la fecha el único método de control, diversas medidas preventivas de resistencia a los antihelmínticos se están promoviendo por medio de la Food Agriculture Organization⁽¹⁾ y por el Consejo Nacional de Sanidad Animal de México⁽²⁾. Los NGE afectan principalmente a rumiantes que se localizan en regiones tropicales y templadas, debido a que favorecen la continuidad de la infestación; además, son un complejo de agentes cuya patogenia es muy severa en animales susceptibles e incluso pueden ser causa de muerte⁽³⁾. Los animales que sobreviven a la infestación, presentan signos de mala absorción de nutrientes, afectando la producción zootécnica. Por ejemplo, bovinos de trópico sin desparasitar durante tres meses pierden en promedio 28.8 kg de peso en infestaciones naturales⁽⁴⁾, y ovinos en las mismas condiciones pierden de 2 a 5 kg de peso al mes⁽⁵⁾. El daño causado por NGE también afecta la economía del ganadero, como se observó en Uruguay, donde se perdieron 41.8 millones de dólares (mdd)⁽⁶⁾. En Kenya se notificó que 26 mdd se pierden únicamente por causa del nematodo hematófago *Haemonchus contortus*⁽⁷⁾.

Puesto que los productos antihelmínticos son el único método de control disponible en el mercado, se recomienda realizar el diagnóstico parasitológico para prevenir problemas de salud y resistencia antihelmíntica, en caso de que los animales requieran ser tratados continuamente⁽⁸⁾. En México, los productos derivados de benzimidazoles (Bz) y lactonas macrocíclicas (LM) son comúnmente usados en regiones productoras de borregos por su amplio espectro de acción. En México se determinó resistencia a Bz a NGE en ovinos desde 1990⁽⁹⁾, inicialmente se reportó únicamente en el estado de Puebla, pero posteriormente se notificó en otros estados como Morelos, Veracruz y Yucatán^(10,11,12). Sin embargo, en México aún no se han notificado estudios de resistencia a los derivados de las lactonas macrocíclicas.

El estado de Tlaxcala cuenta con una gran población de ovinos, los cuales están expuestos a problemas de NGE durante todo el año. Además, la demanda

Tropical and temperate regions represent the most favorable conditions for domestic ruminants to acquire gastro-intestinal nematode infections (GIN). Anthelmintic treatment is the unique method of control currently used against such infections; however, different factors have triggered resistance problems, which is nowadays a worldwide concerning. The Food Agriculture Organization⁽¹⁾ and the National Committee of Animal Health in Mexico⁽²⁾ have suggested the establishment of different methods of diagnosis of resistance as the first step to prevent this alarming problem. Gastro-intestinal Nematodes are one of the main causes of dead and chronic infection to domestic ruminants in the livestock industry which is seriously affected⁽³⁾. For instance, infected cattle and sheep lost 28.8 kg and 2.5-5 kg of bodyweight without anthelmintic treatment in 3 and 1 mo, respectively^(4,5). The economy of countries as Uruguay⁽⁶⁾ and Kenya⁽⁷⁾ lost 41.8 million dollars (mdd) and 26 mdd, respectively, because of the pathogenic action of GIN, especially by the haemathophagous nematode *Haemonchus contortus*.

Considering that anthelmintic treatment is currently the only method of control used against GIN, the importance of anthelmintic resistance has lead to an increased need for reliable and standardized detection methods in temperate and tropical regions⁽⁸⁾. In Mexico, benzimidazole (Bz) and macrocyclic lactones (ML) drugs are frequently used by their broad activity against different classes of parasites. However, anthelmintic resistance was reported for first time in 1990 in Puebla⁽⁹⁾. Since then, resistance to Bz compounds has been reported in Morelos, Veracruz and Yucatan^(10,11,12). In contrast, until now no anthelmintic resistance to ML and Bz has been notified in Tlaxcala, Mexico.

The economy of Tlaxcala is based on the meat-sheep production; the need of sheep is frequently demanded and sometimes meat has to be acquired from far away regions to satisfy such demand. Currently, there is a lack of information about anthelmintic resistance in the livestock industry in Tlaxcala and effective diagnosis method of resistance should be established. The present study was aimed to identify the presence of anthelmintic

de carne de ovinos en este Estado favorece el crecimiento del mercado, por lo cual hay constante movimiento de animales. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de resistencia en NGE a febendazol (Fz) y a ivermectina (IM) en tres regiones productoras de ovinos.

El estudio experimental se realizó en tres regiones productoras de ovinos, localizadas en la región noroeste del estado de Tlaxcala. Se seleccionaron al azar los municipios de Calpulalpan, Nanacamilpa de Mariano Arista y Hueyotlipan, clasificados con clima C(w2). Estos municipios cuentan con 44,356 cabezas de ovinos, lo cual representa el 28.9 % del total de la población ovina del estado⁽¹³⁾. Con objeto de contar con información relacionada a los animales seleccionados se aplicó un cuestionario general, el cual incluye: número de animales, raza, edad, sexo, método de tratamiento y diagnóstico parasitológico, así como información relacionada con el tipo de pastoreo, adquisición de animales y su procedencia.

El análisis de los datos colectados se realizó con base a la aplicación de estadística descriptiva⁽¹⁴⁾. Se seleccionaron 20 rebaños distribuidos de la siguiente forma: 4 de Calpulalpan, 10 de Nanacamilpa y 6 de Hueyotlipan. En total se trabajó con 600 ovinos de diferente raza, sexo (excluyendo hembras gestantes) y edad. Los animales seleccionados no habían sido tratados con ningún producto antihelmíntico en un periodo de tres meses, y presentaron más de 200 huevos por gramos de heces (hpgh), como lo recomienda la Asociación Mundial de Avances en Parasitología Veterinaria (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP, siglas en inglés)⁽¹⁵⁾. Las heces fueron analizadas por la técnica de Mc Master⁽¹⁶⁾ previo a la selección de animales y durante la fase experimental (antes y después del tratamiento), asimismo, se colectaron larvas infectantes por la técnica de cultivo en tarro para identificar los géneros presentes⁽¹⁷⁾.

Se aplicó la prueba de reducción del conteo de huevos en heces (Faecal egg count reduction test, FECRT, siglas en inglés)⁽¹⁵⁾ de la siguiente forma: los animales de cada rebaño se dividieron en tres grupos con 10 a 14 animales cada uno; I) sin

resistance in GIN to Ivermectin (IVM) and Febendazole (Fbz) from three districts, recognized by their important sheep production on Tlaxcala. This study was carried out in northern Tlaxcala in Calpulalpan, Nanacamilpa and Hueyotlipan regions, classified as temperate areas with C(w2) climate. Sheep population in such districts is 44,356 heads which represent 28.9 % of the total ovine production in Tlaxcala⁽¹³⁾. A survey related to the flocks management (grazing time, animal population size, age and breed) and treatment (frequency, dose, anthelmintic and diagnosis) of every flock was obtained from each farm. Survey data were analyzed by a descriptive statistical method⁽¹⁴⁾. Twenty farms were examined, 4 from Calpulalpan, 10 from Nanacamilpa and 6 from Hueyotlipan. Six hundred male and female sheep (except pregnant ewes) of different range of age were used. Experimental animals with more than 200 eggs per gram (EPG) and with no treatment at least three months before experimental assay were selected, as suggested by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP⁽¹⁵⁾. Egg counts were determined following the McMaster technique previous and after the experimental assays⁽¹⁶⁾. Infective nematode larvae were obtained from GIN positive faecal samples and taxonomic genera identification was carried out⁽¹⁷⁾.

The Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) recommended by the WAAVP was followed⁽¹⁵⁾. The FECRT was examined: sheep in each farm were distributed into three groups, ranged from 10 to 14 animals each; I) control, without anthelmintic treatment; II) treated with Febendazole (Fbz) at 5 mg/kg per os (Panacur Compositum, Lab. Intervet); III) treated with Ivermectin (IVM) at 0.2 mg/kg of bodyweight by subcutaneous injection (Dectiver, Lab. LAPISA). Experimental sheep were treated at day cero (D0) and faecal samples were taken at days cero and 14 (D14), before and after treatment. Egg counts were estimated following the McMaster method and the infective larvae from faecal cultures were identified as cited above.

The total egg nematodes counting after FECRT was estimated using the arithmetic mean (\bar{A}). Moreover, the percentage of reduction was

tratamiento antihelmíntico; II) tratado con febendazol (5 mg/kg, vía oral, Panacur Compositum, Lab. Intervet); III) tratado con ivermectina (0.2 mg/kg, vía subcutánea, Dectiver, Lab. LAPISA). El tratamiento se aplicó únicamente el día 0 (D0) y se colectaron muestras de heces los días cero y 14 (D14), éste último correspondiente al día postratamiento. Se realizó el conteo de hpgh y la identificación de larvas usando las técnicas de Mc Master y la técnica de tarro para identificar estadios infectivos de NGE, respectivamente.

El porcentaje de efectividad fue el único parámetro que se tomó en cuenta para medir la resistencia antihelmíntica, con base al porcentaje de reducción de huevos en heces y a el 95% de confiabilidad del intervalo de confianza. La interpretación de los datos se realizó tomando la metodología citada por la WAAVP⁽¹⁵⁾:

$$\text{Porcentaje de efectividad} = 100 (1 - x \div t / x \div c)$$

Donde: $x \div t$ = media del grupo tratado y $x \div c$ = media del grupo control.

El cálculo para la obtención del intervalo de confianza (95%) se realizó siguiendo la media aritmética.

Límite de confianza

$$\begin{matrix} \text{superior} & & \text{inferior} \\ 100 [1 - x \div t / x \div c \exp (-2.048 \sqrt{Y})] & & 100 [1 - x \div t / x \div c \exp (+2.048 \sqrt{Y})] \end{matrix}$$

En donde:

$x \div t$ = media aritmética del grupo tratado; $x \div c$ = media aritmética del grupo control; Y = varianza de reducción.

Asimismo, se usaron los siguientes criterios de clasificación: *Resistente*, si el porcentaje de reducción en el conteo de huevos es menor del 95% y si el límite inferior (95%) del intervalo de confianza es menor del 90%. *Sospechoso*, si solamente uno de los dos criterios anteriores aparece⁽¹⁵⁾.

Los resultados obtenidos del cuestionario indican que 11 de 20 rebaños adquirieron ovinos de origen australiano en el último año, y 9 productores no mencionan la procedencia. El porcentaje de razas

estimadas por comparando los medios de huevos eliminados para ambos grupos, y un intervalo de confianza del 95% fue considerado. El porcentaje de reducción de huevos fue estimado siguiendo la fórmula recomendada por la WAAVP⁽¹⁵⁾:

$$\text{Porcentaje de efectividad} = 100 (1 - x \div t / x \div c)$$

Where: $x \div t$ = mean of treated group and $x \div c$ = mean of control group.

The confidence interval (95%) was calculated following the arithmetic mean.

Limit of confidence

$$\begin{matrix} \text{Upper} & & \text{Lower} \\ 100 [1 - x \div t / x \div c \exp (-2.048 \sqrt{Y})] & & 100 [1 - x \div t / x \div c \exp (+2.048 \sqrt{Y})] \end{matrix}$$

Where:

$x \div t$ = arithmetic mean of treated group; $x \div c$ = arithmetic mean of control group; Y = variance reduction

Criteria for determining the anthelmintic resistance to Ivermectin were as follows: (1) If the reduction percentage in the egg count was lower than 95%, (2) If the 95% confidence level was lower than 90%. It was considered as a resistant group when both criteria were present, but if only one of the two criteria was present, it was considered as suspicious. When neither of the two criteria was present it was considered as a susceptible group⁽¹⁵⁾.

According to the questionnaire, the predominant breeds involved into this experimental study were as follows: Merino-Dorset 55 (11 from a total of 20), Suffolk 75 (15 from 20), Hampshire 10 (2 from 20), Cross-breed, 10 (2 from 20) and Columbia 5 (1 from 20). In addition, the enquiry information showed that 11 of 20 farmers acquired sheep from Australia (55) and the remaining 9 were bought from an unknown Mexican origin.

Most of the experimental animals were grazing over 6 to 7 h considering as a semi-intensive system management (95%) and only one flock (from Nanacamilpa) used the intensive system production (5%). Animals under the semi-intensive system were fed with grains and pasture such as tiazol

Cuadro 1. Porcentaje de reducción de huevos de nematodos después del tratamiento con febendazol e ivermectina en el municipio de Calpulalpan

Table 1. Nematode egg count percent reduction after treatment with febendazole and ivermectin in flocks from Calpulalpan municipality

Flock No.	No. Anim.		epgf (x±std)			Reduction epgf %		Conf. Int. 95%		Dx	
	C	T	I	II	III	II	III	II	III	II	III
1	12	10	737±656	0±0	5±9	100.0	99.2	100.0 - 100.0	92.7 - 99.9	S	S
2	14	10	978±445	5±9	0±0	99.5	100.0	95.8 - 99.9	100.0 - 100.0	S	S
3	12	10	233±115	0±0	0±0	100.0	100.0	100.0 - 100.0	100.0 - 100.0	S	S
4	10	10	320±310	10±2	20±2	96.2	89.9	90.8 - 98.4	75.9 - 95.8	S	R

C= Control group; T= Treated group; epgf= eggs per gram of feces; Dx= Result of egg count reduction tests; S= Susceptible; R= Resistant. I= Without treatment; II= Treated with febendazole; III= Treated with Ivermectine.

de los 20 rebaños (equivalente al 100 %) para los tres municipios se distribuyó de la siguiente forma: 55 % cruza de Merino-Dorset de procedencia australiana (11 rebaños de 20), 75 % Suffolk (15 rebaños de 20), 10 % Hampshire (2 rebaños de 20), 10 % Criolla (2 rebaños de 20) y 5 % Columbia (1 rebaño de 20), éstas últimas cuatro razas de origen nativo.

Respecto al sistema de producción, 19 (95 %) de los productores llevan a cabo el sistema semi-intensivo y sólo un productor (Nanacamilpa) lleva a cabo el tipo intensivo (5 %). Los productores que practican el sistema semi-intensivo, pastorean a los animales en praderas y terrenos comunales por 6.7 h en promedio. La suplementación de estos rebaños se realiza con cualquiera de los siguientes productos de la región: tiazol molido, maíz (molido

(corn smooth mixture), oat, and wheat. In contrast, sheep under the intensive system were fed with pellets, pasture and water for 24 h. Also, the frequency of the anthelmintics used was 75 % of Ivermectin (ML), 55 % of Albendazole (Bz), 45 % of Closantel (Saliscilanide), 10 % of Febendazole (Bz) and 5 % of Moxidectin (ML) with a frequency of 4 to 6 times per year. Ivermectin (ML) product was frequently used (40 %) against external parasites infections such as oestrosis.

The results obtained from the FECRT assays indicated that four flocks from Calpulalpan district were susceptible to the action of Febendazole and similar results were observed in three flocks treated with Ivermectin; however, one flock was resistance to Ivermectin (flock 4) (Table 1, Figures 1,2,3,4). The

Figura 1. Porcentaje de reducción contra febendazol en 20 rebaños de tres municipios de Tlaxcala, México

Figure 1. Percent reduction against Febendazole in 20 flocks from three municipalities in Tlaxcala, Mexico

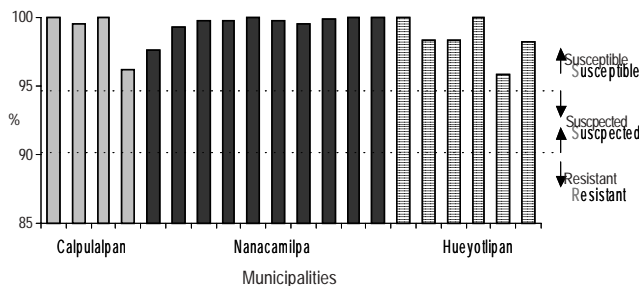
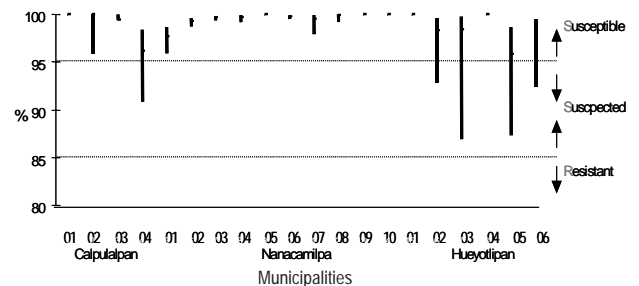


Figura 2. Límites de confianza contra febendazol en 20 rebaños de tres municipios de Tlaxcala, Mexico

Figure 2. Confidence limits against febendazole in 20 flocks from three municipalities in Tlaxcala, Mexico



o grano), cebada, avena, trigo y haba. El productor que practica el sistema intensivo, mantiene a su rebaño en corrales 24 h y suministra concentrado, alfalfa y agua. La información obtenida respecto a los antihelmínticos más utilizados en la región, son: ivermectina 75 %, albendazol 55 %, closantel (salicilanidas) 45 %, febendazol 10 % y moxidectinas 5 %. La frecuencia de tratamientos en los tres municipios fue de seis meses en promedio, el periodo mínimo fue de cuatro meses y el de mayor tiempo fue de ocho meses. Asimismo,

survey applied to this district indicated that some flocks were acquired from Australia during one year.

In contrast, ten experimental flocks in Nanacamilpa district showed 100 % of parasitic eggs reduction after Febendazole and Ivermectin treatment; so, such district was classified as susceptible (Table 2, Figures 1,2,3,4). On the other hand experimental flocks from Hueyotlipan district were suspicious to Febendazole and Ivermectin. Sheep showed a high parasitic egg burden before treatment (D0), and

Cuadro 2. Porcentaje de reducción de huevos de nematodos después del tratamiento con febendazol e ivermectina en el municipio de Nanacamilpa

Table 2. Nematode egg count percent reduction after treatment with febendazole and ivermectin in flocks from Nanacamilpa municipality

Flock No.	No. Anim.		Epgf (x±std)			Reduction epgf %		Conf. Int. 95%		Dx	
	C	T	I	II	III	II	III	II	III	II	III
5	11	11	3704±2845	86±75	35±42	97.7	99.1	95.9 - 98.6	98.3 - 99.6	S	S
6	11	12	1212±894	9±6	9±9	99.5	99.2	98.7 - 99.6	98.7 - 99.6	S	S
7	11	11	1540±1308	4±9	4±9	99.7	99.7	99.3 - 99.7	99.3 - 99.8	S	S
8	12	12	2990±2496	9±6	0±0	99.7	100.0	99.2 - 99.9	100.0 - 100.0	S	S
9	11	11	2840±2386	0±0	0±0	100.0	100.0	100.0 - 100.0	100.0 - 100.0	S	S
10	10	10	2065±1901	5±9	5±9	99.7	99.7	99.5 - 99.8	99.5 - 99.8	S	S
11	10	10	2155±1526	10±16	0±0	99.5	100.0	97.9 - 99.9	100.0 - 100.0	S	S
12	10	10	5185±3556	5±9	0±0	99.9	100.0	99.2 - 99.9	100.0 - 100.0	S	S
13	10	10	820±644	0±0	0±0	100.0	100.0	100.0 - 100.0	100.0 - 100.0	S	S
14	10	10	1625±1625	0±0	0±0	100.0	100.0	100.0 - 100.0	100.0 - 100.0	S	S

C= Control group; T= Treated group; epgf= eggs per gram of feces; Dx= Result of egg count reduction tests; S= Susceptible.
I= Without treatment; II= Treated with febendazole; III= Treated with Ivermectine.

Figura 3. Porcentaje de reducción contra ivermectina en 20 rebaños de tres municipios de Tlaxcala, Mexico

Figure 3. Percent reduction against Ivermectin in 20 flocks from three municipalities in Tlaxcala, Mexico

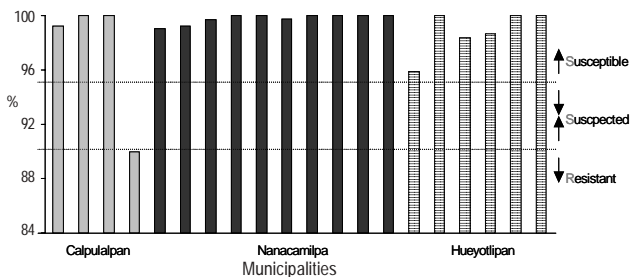
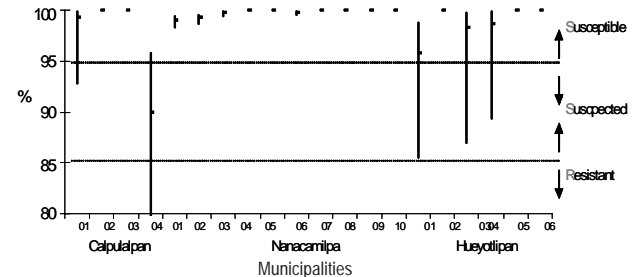


Figura 4. Límites de confianza contra ivermectina en 20 rebaños de tres municipios de Tlaxcala, Mexico

Figure 4. Confidence limits against Ivermectin in 20 flocks from three municipalities in Tlaxcala, Mexico



la oestrosis es una enfermedad ectoparasitaria que se presentó con frecuencia en los rebaños (40 %) y los productores trataron con ivermectina.

Los resultados de las pruebas de FECRT fueron: cuatro rebaños tratados con febendazol en el municipio de Calpulalpan, mostraron reducción en el conteo de huevos después del tratamiento al aplicar los criterios de evaluación citados, por lo cual se les identificó como susceptibles. Similares resultados fueron observados en tres rebaños de este municipio tratados con ivermectina; sin embargo el último rebaño (rebaño 4) mostró resistencia a este producto (Cuadro 1, Figuras 1,2,3,4). El dueño de este rebaño fue el único productor de este municipio que adquirió ovinos australianos en el período de un año.

En el municipio de Nanacamilpa, los 10 rebaños en experimentación fueron susceptibles a ambos productos, observándose reducción del 100 % en el conteo de huevos postratamiento (Cuadro 2, Figuras 1,2,3,4). En cambio, animales del municipio de Hueyotliplan fueron clasificados sospechosos de resistencia a los dos antihelmínticos. Los datos de hpgf muestran que todos los animales estaban positivos a NGE el D0 previo al tratamiento tanto con febendazol como con ivermectina. Catorce días después del tratamiento, se detectaron cuatro rebaños susceptibles a febendazol y dos rebaños sospechosos de resistencia; igualmente, tres rebaños fueron

fourteen days after treatment, two flocks were suspicious of anthelmintic resistance and four flocks were susceptible to Febendazole. Similar results were observed with Ivermectin; three flocks were suspicious to Ivermectin and the other three were suspicious (Table 3, Figures 1, 2,3,4).

Haemonchus sp, *Teladorsagia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Cooperia* spp and *Nematodirus* spp were the parasitic genera identified previously to treatment. Fourteen days after treatments, *Haemonchus* sp and *Teladorsagia* spp were the only genera resistant to Ivermectin in Calpulalpan district ($P < 0.05$). Same nematodes were also classified as suspicious of anthelmintic resistance to Ivermectin and Febendazole in Calpulalpan and Hueyotliplan districts.

The identification of resistant and suspicious flocks to Ivermectin in Tlaxcala is a concerning problem for the local livestock industry against gastro-intestinal parasitic nematodiasis. The continuous movement of infected sheep might be a risk to expand this problem to other states. For instance, in other countries included in South America, South Africa, Australia and New Zealand the control against GIN is nowadays a difficult problem, since the major drugs have already showed anthelmintic resistance^(18,19).

One of the remarkable results in the present investigation is the identification of anthelmintic

Cuadro 3. Porcentaje de reducción de huevos de nematodos después del tratamiento con febendazol e ivermectina en el municipio de Hueyotliplan

Table 3. Nematode egg count percent reduction after treatment with febendazole and ivermectin in flocks from Hueyotliplan municipality

Flock No.	No. Anim.		epgf ($\bar{x} \pm \text{std}$)			Reduction epgf (%)		Conf. Int. 95%		Dx	
	C	T	I	II	III	II	III	II	III	II	III
15	10	10	725±430	0±0	30±42	100.0	95.9	100.0 - 100.0	85.5 - 98.8	S	Su
16	10	10	590±288	10±16	0±0	98.3	100.0	92.8 - 99.6	100.0 - 100.0	S	S
17	10	10	305±125	5±9	5±9	98.4	98.3	86.9 - 99.8	86.9 - 99.8	Su	Su
18	10	10	370±140	0±0	5±9	100.0	98.6	100.0 - 100.0	89.3 - 99.8	S	Su
19	10	10	360±174	15±21	0±0	95.8	100.0	87.3 - 98.6	100.0 - 100.0	Su	S
20	10	10	510±314	10±16	0±0	98.2	100.0	92.4 - 99.5	100.0 - 100.0	S	S

C= Control group; T= Treated group; epgf= eggs per gram of feces; Dx= Result of egg count reduction tests; S= Susceptible; Su= Suspected. I= Without treatment; II= Treated with febendazole; III= Treated with Ivermectine.

identificados susceptibles a ivermectina y tres sospechosos de resistencia (Cuadro 3, Figuras 1,2,3,4).

Los géneros identificados antes de los tratamientos en los tres municipios fueron *Haemonchus* sp, *Teladorsagia* spp, *Trichostrongylus* spp, *Cooperia* spp y *Nematodirus* spp. A los 14 días postratamiento los géneros *Haemonchus* sp y *Teladorsagia* spp fueron los únicos nematodos identificados estadísticamente ($P < 0.05$) como resistentes a ivermectina en el municipio de Calpulalpan. Los mismos géneros fueron identificados en rebaños clasificados como sospechosos ($P < 0.05$) de resistencia a IM y Fz en los municipios de Calpulalpan y Hueyotlipan.

La detección de resistencia a ivermectina en el estado de Tlaxcala es un riesgo para el control de NGE en la ovinocultura mexicana, debido a que se puede extender e incrementar el problema. En países de Sudamérica, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda el problema de resistencia antihelmíntica se ha agravado tanto, que en la actualidad es difícil seleccionar antihelmínticos que no presenten dicho problema^(18,19).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, notifican por primera vez el problema de NGE resistentes a IM y aunque la resistencia se detectó en un rebaño de Calpulalpan, es importante hacer notar que otros rebaños resultaron sospechosos a ambos productos, siguiendo el criterio de evaluación propuesto por WAAVP.

Tlaxcala, se caracteriza por ser un estado productor de borregos, el cual exporta e importa ganado a diversos lugares del país e incluso del extranjero. Por tal razón, el problema de resistencia antihelmíntica es complejo, y se asocia a diversos factores. Por ejemplo, el pastoreo comunal que se realiza en estos municipios fue de 6.7 h, tiempo suficiente para contaminar praderas e infestar otros animales en pastoreo. Van Wyk⁽⁸⁾, señala que uno de los principales mecanismos que favorece el desarrollo de resistencia es el denominado “refugio”, debido a que poblaciones susceptibles y resistentes que escapan a la acción del tratamiento, y por lo tanto se asegura la infestación. En el caso de los municipios de Calpulalpan, Nanacamilpa y Hueyotlipan las condiciones ambientales favorecen el desarrollo y refugio de larvas infectantes. Además, el 55 % de los

resistencia to Ivermectin in Mexican sheep flocks, which is an important point to be considered in Epidemiology, prevention and control of GIN taking in account the economic importance of such diseases emphasized by the WAAVP⁽¹⁵⁾. Although, only one flock from Calpulalpan was detected, we considered that those flocks which were suspicious to Ivermectin and Febendazole might become in a serious problem if preventive measures are not taking in Tlaxcala in a near future.

The sheep industry in Tlaxcala includes the acquisition of animals from both national and international market. In this way, the analyses of factors involved in the anthelmintic resistance to Ivermectin are complex. For instance, 6 to 7 h animal grazing time was enough to contaminate common paddocks and to acquire the nematode infection by other hosts. Van Wyk⁽⁸⁾ mentioned that “refugia” is an important factor in the selection of resistant populations, because of the free-living parasitic nematodes, which will be able to escape a particular anthelmintic treatment and new progeny is saved for infestations and persistence, does not matter if they are susceptible or resistance. Temperate regions such as Calpulalpan, Nanacamilpa and Hueyotlipan are the ideal climate to “refugia” and developing of new infective larvae is continuous. Moreover, farmers acquired 55 of Australian sheep without any previous parasitic diagnosis. Australia is nowadays exploring other methods of parasitic control because of its serious resistance problem for decades⁽²⁰⁾. Considering this example, Mexico might take some preventive measure against parasitic nematodes resistance and new alternatives of control might be examined as well.

Moreover, the abusive use of different macrocyclic lactones (75 %) and bezimidazoles (65 %) products against GIN was involved in the presence of either resistant or suspicious parasites to Ivermectin and Febendazole which were observed in Calpulalpan and Hueyotlipan. Although, three treatments or less is considered a cause of anthelmintic resistance^(21,22); the frequency observed against GIN in the examined districts was not involved with resistance to Ivermectin; but Ivermectin was used by farmers against *Oestrus* based on the presence

productores adquirieron animales procedentes de Australia, los cuales estuvieron pastoreando junto con los de la región. Australia ha tenido serios problemas de resistencia múltiple por más de cuatro décadas⁽²⁰⁾. Por ello medidas preventivas se deberían de tomar pensando que el problema de resistencia antihelmíntica se vaya a dispersar.

Asimismo, el amplio uso de los derivados de las lactonas macrocíclicas (75 %) y bencimidazoles (65 %) también son factores involucrados en la resistencia o sospecha a ivermectina y fenbendazol observada en Calpulalpan y Hueyotlipan. Cabe señalar que la frecuencia de tratamientos mayores a tres, es otro factor que induce a la resistencia antihelmíntica^(21,22); en los municipios en estudio se observó que la media de tratamientos contra NGE fue de seis meses, por lo cual inicialmente se descartó dicha causa; sin embargo, se desconoce la frecuencia con que tratan oestrosis; el productor aplica tratamiento debido a la patente signología que los animales enfermos presentan, y lo hace con productos derivados de LM.

Estudios previos han mostrado que *Haemonchus* y *Teladorsagia* son tolerantes a la dosis letal de IM⁽²¹⁾, y similares resultados fueron observados en el presente estudio. Es importante tomar en cuenta que ambos géneros son dominantes en las infestaciones de ovinos, además son capaces de sobrevivir temperaturas extremas (-9 °C y 35 °C) como larvas infectantes en espera del hospedero⁽⁸⁾.

La contribución del presente estudio, fue determinar la presencia de resistencia antihelmíntica a ivermectina y fenbendazol en el estado de Tlaxcala, para analizar el riesgo del uso de antihelmínticos, y de la importancia de contar con registros de salud en un lugar donde hay flujo continuo de animales ajenos al estado. Es muy importante considerar que algunos nematicidas químicos dejan de ser efectivos, pero no por el producto en sí, sino por los organismos parásitos que desarrollan mecanismos de adaptación permanente y heredable.

Se concluye que se detectaron diversos factores de riesgo para la presencia de resistencia antihelmíntica, como son el uso inadecuado de ivermectina, debido a la ausencia de un programa de desparasitación, y

of nasal mucus in animals without any anti-parasitic schedule.

On the other hand, *Haemonchus* and *Teladorsagia* have been notified as the more frequently genera resistant to Ivermectin⁽²¹⁾, and same results were observed in the present study. In the tropical and temperate areas of Mexico, these parasitic nematodes are usually identified on infected sheep and have been frequently found in temperatures ranging between -9 and 35 °C⁽⁸⁾.

In summary, resistance to Ivermectin was found for first time in Tlaxcala, Mexico in Calpulalpan district and Ivermectin and Febendazole effectiveness was present in Calpulalpan and Hueyotlipan. *Haemonchus* and *Teladorsargia* were found the resistant genera. We should consider that gastro-intestinal nematodes are developing different mechanisms of detoxification, which are heritable to the next nematode progeny and some anthelmintic products were not working properly as some years before. The lack of an anthelmintic management schedule per flock in Tlaxcala was the cause of resistance to Ivermectin and suspicious cases of Febendazole and Ivermectin. This study examined the presence of GIN resistance to Ivermectin and Febendazol in Tlaxcala to analyze how anthelmintics were used and the importance of an appropriate animal health schedule, considering the introduction of new flocks. Our results have shown the problem of the two main anthelmintic products used by farmers, Ivermectin and Febendazole, and preventive measurements might be taken as it has being suggested by FAO^(1,8).

ACKNOWLEDGMENTS

CENID-PAVET received financial support by Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología México (CONACyT) Num. R35438-B. X. Montalvo received a grant from Fundación Produce de Tlaxcala, Mexico and from The University of Tlaxcala, Mexico.

End of english version

por la posible introducción de animales provenientes de áreas de riesgo a resistencia. Se identificaron dos rebaños sospechosos a febendazol y tres rebaños sospechosos de resistencia a ivermectina; y se confirmó el desarrollo de resistencia a ivermectina en un rebaño. Los géneros identificados que toleraron la dosis terapéutica de IVM fueron *Haemonchus* sp y *Teladorsagia* sp. El resultado observado implica riesgo a la difusión de la resistencia a ivermectina, por lo cual se deberían de tomar las medidas preventivas indicadas por la FAO^(1,8).

AGRADECIMIENTOS

El Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Num. R35438-B. La M en C Xochil Montalvo recibió beca de la Fundación Produce de Tlaxcala, México y de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México.

LITERATURA CITADA

1. FAO. Food Agriculture Organization Network for helminthology in Africa. Global escalation of anthelmintic resistance (AR) calls for a re-evaluation of the problem. E-mail conference-summary Mar 2002. www.fao.org [on line] Accessed Mar 01, 2002.
2. CONASA. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Enfermedades infecciosas de ovinos y caprinos. Memorias, 16-19 Noviembre, 1999;411.
3. Manton VJA, Peacock R, Poynter D, SilvermanPH, Terry RJ. The influence of age on naturally acquired resistance to *Haemonchus contortus* in lambs. *Res Vet Sci* 1962;3:308-314.
4. Campos RR, Herrera RD, Vázquez PV, Villa GA. Frecuencia de tratamientos contra nematodos gastroentéricos y su relación con la ganancia de peso en becerros Cebú de trópico sub-húmedo. *Tec Pecu Méx* 1988;26:46-53.
5. FAO. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO 2003. Disponible: Red de Helminología para América Latina y el Caribe [en línea]. <http://cnia.inta.gov.ar>. Consultado Oct 8, 2004.
6. Nari A, Salles J, Castell D, Hansen JW. Control of gastrointestinal nematodes in farming systems of Uruguay. In: Hansen JW editor. Proc of Biological Control Workshop. FAO technical Series 1996;(141):89-94.
7. Anonnyomous. Integrated sustainable parasite control of ruminants in mixed farming systems in Kenya. FAO TCP Report (TCP7KEN7822). 1999.
8. Van Wyk JA. Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 2001;68:55-67.
9. Campos RR, Herrera RD, Quiroz RH, Olazarán JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Téc Pecu Méx* 1990;28:30-34.
10. García-Flores A, Vázquez-Prats V, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. *In vitro* and *in vivo* diagnosis of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in México. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México. 2003:194-199.
11. Figueroa CJA, Méndez MDR, Berruecos VJM, Álvarez LJA. Detección de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovinos. *Vet Méx* 2000;31:309-312.
12. Torres-Acosta JF, Roberts B, Canto-Dorantes J, Martínez-Ortiz C, Rodríguez J, Canul-Ku L, Cob-Galera L, Tirado-Muñoz F, Aguilar-Caballero A. Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in Yucatán. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México 2003:48-52.
13. INEGI. Anuario estadístico del Estado de Tlaxcala. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática (INEGI) y Gobierno del Estado de Tlaxcala, México. 2002.
14. Mendenhall W. Introducción a la probabilidad y la estadística. First edition. Universidad de Florida, USA: Wadsworth Internacional/Iberoamérica; 1982.
15. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. 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. *Vet Parasit* 1992;44:35-44.
16. Thiepont D, Rochete F, Vanparijs OFJ. Diagnosing Helminthiasis through coprological examination. First ed. Beerse, Belgium. Jansen Research Foundation; 1979.
17. Liébano HE, Flores CJ. Identificación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos en bovinos y ovinos de México. En: Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria editor. Diagnóstico de las nematodosis gastrointestinales de los ruminantes en México. Memoria Técnica. Mor., México 1999;23-40.
18. Nari A, Eddi C. Resistance to ecto and endo-parasites.a challenge for the XXI Century. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, 2003, Mérida Yucatán, México. 2003;53-60.
19. Van Wyk JA. Think refugia or lose the battle against drug resistance. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México. 2003;39-47.
20. Waller PJ. Nematode parasites of small ruminant livestock global perspectives, impact and coping with the problem of anthelmintic resistance. V International seminar in animal parasitology. October 1-3, Mérida Yucatán, México. 2003;76-85.
21. Hembry FG, Miller JE, Sime D, Rodriguez S, Stagg LC. Efficacy of repeated doses of Levamisol, Morantel Febendazole and Ivermectins against gastrointestinal nematodos in ewes. *Am J Vet Res* 1986;47(8):1677-1679.
22. Edwards JR, Wroth R, Chanect GC, Besier RB, Karlsson J, Morcombes PW, *et al.* Survey of anthelmintic resistance in wester Australian sheep flocks. *Aust Vet J* 1986;63:135-138.