

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**  
**Colegio de Ciencias de la Salud**

**Uso de Ivermectina y Fenbendazol en el control de *Strongyloides spp.*, en Anuros del Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios**

**Betsabé Abigail Trujillo Regalado**

**Medicina Veterinaria**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, 19 de mayo de 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Uso de Ivermectina y Fenbendazol en el control de *Strongyloides spp.*, en Anuros del Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios**

**Betsabé Abigail Trujillo Regalado**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Rommel Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc**

Quito, 19 de mayo de 2021

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Betsabé Abigail Trujillo Regalado

Código: 00138123

Cédula de identidad: 1727127415

Lugar y fecha: Quito, 19 de mayo de 2021

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

Los anfibios son susceptibles a parasitosis por nemátodos del género *Strongyloides* y *Rhabdias*, por lo tanto para evitar eventos de mortalidad por altas cargas parasitarias es necesario disponer de protocolos de desparasitación efectivos. El objetivo de este ensayo fue identificar el tratamiento antiparasitario de elección para el control de *Strongyloides spp.*, en el manejo *ex situ* de anuros mantenidos en el Centro Jambatu, Pichincha, Ecuador. Con el propósito de determinar la efectividad de cada protocolo antihelmíntico, se realizaron conteos de huevos fecales a través de la técnica McMaster modificada, antes y después de la desparasitación, con el fin de establecer la reducción de huevos, y el límite inferior de un intervalo de confianza del 95% (LCL). Con los datos obtenidos fue posible determinar la susceptibilidad o resistencia antihelmíntica de los parásitos de los anuros del estudio. En el tratamiento con ivermectina a dosis de 0.4 mg/kg (tratamiento C) se obtuvo una alta reducción de conteo de huevos (99,13%), y no se evidenció resistencia antihelmíntica (LCL 98,26%), mientras que los tratamientos basados en fenbendazol a dosis de 100 mg/kg (tratamiento A) e ivermectina a 0.2 mg/kg (tratamiento B) arrojaron resultados de resistencia antihelmíntica (LCL 37,96%; 79,51%). El protocolo combinado de ambos fármacos (tratamiento D) no mostró resultados significativamente diferentes al tratamiento C, en cuanto a reducir la carga parasitaria. Considerando los resultados obtenidos, se recomienda evaluar la resistencia antihelmíntica para el resto de la población del centro, así como emplear desparasitaciones selectivas y buscar métodos no farmacológicos para el control parasitario. Además, son necesarios más estudios para estandarizar la técnica McMaster en anfibios y determinar la carga parasitaria a la cual es necesario desparasitar a estos animales.

**Palabras clave:** anfibios, parasitosis, *Strongyloides*, Ecuador, desparasitación, ivermectina, fenbendazol, resistencia antihelmíntica.

## ABSTRACT

Amphibians are susceptible to parasitosis by nematodes of the genus *Strongyloides* and *Rhabdias*, therefore, to avoid mortality due to high parasite loads, it is necessary to have effective deworming protocols. The objective of this study was to identify the antiparasitic treatment of choice for the control of *Strongyloides spp.*, in the *ex situ* management of anurans kept at the Jambatu Center, Pichincha, Ecuador. In order to determine the effectiveness of each anthelmintic protocol, faecal egg counts were performed using the modified McMaster technique, before and after deworming, in order to establish the faecal egg count reduction test, and the lower limit of an interval of 95% confidence (LCL). With the data obtained, it was possible to determine the anthelmintic susceptibility or resistance of the parasites of the anurans in the study. In the treatment with ivermectin at a dose of 0.4 mg/kg (treatment C), a high reduction in egg count was obtained (99.13%), and no anthelmintic resistance was evidenced (LCL 98.26%), while the treatments based on fenbendazole at a dose of 100 mg/kg (treatment A) and ivermectin at 0.2 mg/kg (treatment B) gave anthelmintic resistance results (LCL 37.96%; 79.51%). The combined protocol of both drugs (treatment D) did not show significantly different results to treatment C, in terms of reducing the parasite load. Considering the results obtained, it is recommended to evaluate anthelmintic resistance for the rest of the population of the center, as well as to use selective deworming and to look for non-pharmacological methods for parasite control. In addition, more studies are necessary to standardize the McMaster technique in amphibians and determine the parasite load at which it is necessary to deworm these animals.

**Key words:** amphibians, parasitosis, *Strongyloides*, Ecuador, deworming, ivermectin, fenbendazole, anthelmintic resistance.

**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción .....	11
Metodología .....	14
Resultados .....	18
Discusión.....	21
Conclusiones .....	26
Agradecimiento.....	27
Referencias bibliográficas.....	28
Anexo A: Imágenes del procedimiento de la técnica de conteo de huevos McMaster modificada.....	31
Anexo B: Imágenes de los huevos y larvas de <i>Strongyloides spp.</i> .....	32
Anexo C: Conteo de huevos pre y post desparasitación .....	33
Anexo D: Promedio de los conteos de huevos pre y post desparasitación, y reducción de conteo de huevos.....	34

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

**Diagrama 1.** Distribución de los grupos de anuros en los tratamientos antiparasitarios .....18

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Huevos por gramo (HPG) en los conteos del grupo control (grupo 0).....	18
<b>Gráfico 2.</b> Promedio del test de reducción de conteo de huevos (TRCH %) de los grupos de cada tratamiento antiparasitario. ....	19

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Resultado <i>p value</i> de la prueba $X^2$ comparando los diferentes tratamientos .....	20
<b>Tabla 2.</b> Determinación de la resistencia o no resistencia al tratamiento antihelmíntico de los parásitos gastrointestinales de los grupos de anuros del ensayo. ....	20

## INTRODUCCIÓN

Los anfibios se dividen en 3 ordenes: Anura, Caudata y Gymnophiona (Arif, 2019). Se estima que en el mundo existen 8126 especies de este grupo de vertebrados, y de acuerdo al más reciente reporte de Ortega-Andrade et al. (2021) en el Ecuador existen 635 especies. No obstante, en las últimas décadas sus poblaciones han disminuido debido a varias causas como la introducción de especies invasoras, la pérdida de hábitats y enfermedades emergentes (Hallinger et al., 2020). Entre las estrategias que han surgido frente a esta pérdida de biodiversidad se encuentra la creación de proyectos de conservación y crianza *ex situ*, en los cuales se manifiesta la necesidad de contar con protocolos de desparasitación que eviten la mortalidad de anfibios y la transmisión de zoonosis (Hallinger et al., 2020)

Entre los parásitos más comunes se encuentran: protozoarios, acantocéfalos, pentastómidos, nemátodos, céstodos y tremátodos (Arif, 2019; Hallinger et al., 2020). Estos parásitos por lo general son inocuos en anfibios; sin embargo, los tremátodos enquistados y migrantes así como los céstodos y nemátodos filamentosos se consideran parásitos patógenos (Malago, 2019). En varios estudios se ha observado que los nemátodos del género *Rhabdias* y *Strongyloides* causan fuertes parasitosis en los anfibios, llegando incluso a provocar altas tasas de mortalidad (Eustace et al., 2018; Malago, 2019).

Los *Strongyloides spp.* son parásitos gastrointestinales generalmente especie-específicos que tienen un ciclo de vida directo (Viney & Lok, 2015), y que producen la muerte del hospedador por enteropatía por pérdida de proteínas (Densmore & Green, 2007). Los adultos hembras que se encuentran en la mucosa intestinal producen huevos que con el tiempo eclosionan en larvas que migran por el lumen, ambos estadíos infectantes son eliminados en las heces (Patterson-Kane et al., 2001). Las larvas liberadas ingresan a un nuevo huésped por vía oral o cutánea, mientras que los huevos pueden ser ingeridos directamente (Viney & Lok,

2015). Las parasitosis generadas por estos nemátodos usualmente son tratadas con antihelmínticos como los benzimidazoles y la ivermectina (Viney & Lok, 2015).

Los benzimidazoles son un grupo de antiparasitarios cuyo mecanismo de acción consiste en interferir con el metabolismo energético dentro del parásito (Fesseha et al., 2020). Un ejemplo de este grupo es el fenbendazol que también inhibe la producción de huevos en los parásitos (Panarella, 2002). Su vía de administración es oral y en anfibios se recomiendan las siguientes dosis: 10 mg/kg dosis única, 50 mg/kg por 3-5 días y 100 mg/kg cada 10-14-21 días (Smith, 2007). Sin embargo, la administración por esta vía es casi imposible en especies muy pequeñas o de movilidad ágil (Letcher & Glade, 1992). Hasta ahora en anfibios no se han reportado casos de toxicidad por fenbendazol (Bianchi et al., 2014).

Por otro lado, la ivermectina es una lactona macrocíclica que aumenta la permeabilidad iónica de las membranas celulares nerviosas y musculares, provocando parálisis y muerte helmíntica (Fesseha et al., 2020). En anfibios se puede aplicar por vía tópica considerando la alta permeabilidad de su piel (Llewelyn et al., 2016), y algunas de las dosis recomendadas son: 0.2-0.4 mg/kg y 2 mg/kg como dosis única (Smith, 2007). No obstante, en anuros se han reportado varios casos de intoxicación con ivermectina, cuya signología se presentó con: ataxia, reflejos reducidos o ausentes, insensibilidad e hidroceloma (Clayton et al., 2013).

A través del conteo de huevos con la técnica McMaster se determina la carga parasitaria de *Strongyloides spp.* (Fesseha et al., 2020). Adicionalmente realizando conteos pre y post desparasitación es posible calcular el porcentaje de reducción de conteo de huevos (Seyoum, Demessie, et al., 2017). Este último parámetro permite establecer la eficacia antiparasitaria de un fármaco para un grupo específico de animales (Young et al., 2000), es decir, se detectan los casos de resistencia antihelmíntica, la cual se genera por el frecuente uso del fármaco y/o por un inadecuado sistema de manejo (Seyoum et al., 2017).

Desde el 2011 el Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios se encarga de generar conocimiento sobre este grupo taxonómico y de reproducir poblaciones genéticamente viables (AFP Español, 2020). A partir del año 2016 se evidenció la presencia de *Strongyloides spp.* en los frotis fecales de los anfibios de este centro, y actualmente este es el mayor problema de nematodiasis. Debido a las condiciones de manejo *ex situ* las larvas de estos nemátodos se acumulan fácilmente causando reinfestaciones (Eustace et al., 2018), además de que, debido a factores extrínsecos e intrínsecos las cargas parasitarias individuales aumentan (Arif, 2019).

Si dentro del manejo de anfibios en cautiverio se desparasita habitualmente y se realizan limpiezas periódicas de sus recintos, las cargas parasitarias son controlables (Eustace et al., 2018). Actualmente, en el Centro Jambatu regularmente se limpian los terrarios y contenedores plásticos, y anualmente todos los ejemplares son desparasitados con ivermectina a 0.2 mg/kg con repetición a los 7 días, o fenbendazol a 100 mg/kg durante 3 días seguidos y si es necesario se repite una semana después. Este último protocolo se emplea en individuos débiles, en etapas juveniles y en especies donde se han observado efectos adversos al aplicar ivermectina.

El propósito de esta investigación fue identificar el tratamiento de elección para el control de *Strongyloides spp.*, en el manejo *ex situ* de anuros mantenidos en el Centro Jambatu. La pregunta de investigación se basó en si el efecto antiparasitario de diferentes protocolos es semejante o no. Bajo esta premisa se plantearon dos hipótesis. La primera hipótesis alternativa señala que existe diferencia significativa en la reducción de conteo de huevos de *Strongyloides spp.* en los grupos tratados con los diferentes protocolos antiparasitarios. Mientras que la segunda hipótesis alternativa sugiere que existe resistencia antihelmíntica para ivermectina y/o fenbendazol en los nemátodos gastrointestinales de los anuros del estudio.

## METODOLOGÍA

El experimento se llevó a cabo en el Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios, localizado en el Valle de los Chillos, Pichincha, Ecuador.

1. Se escogieron grupos de anuros con antecedentes de parasitosis, y que no se habían desparasitado en los últimos 3 meses. Además, se consideró que la especie tuviera un peso mínimo de 5 gramos y que fueran individuos de especies de movilidad lenta. De este modo, se seleccionaron las siguientes especies:

a) *Gastrotheca lojana*

b) *Cruziohyla craspedopus*

c) *Gastrotheca testudinea*

d) *Gastrotheca turnerorum*

2. Debido a que el estudio fue intencionado, no se realizó un cálculo muestral. Se escogió el número de grupos según los parámetros mencionados, y de acuerdo con el tiempo establecido para la realización del estudio.

3. Se prepararon los contenedores de plástico que sirvieron como recintos para los anuros del estudio. Una vez lavadas las tinas se colocó papel toalla húmedo como sustrato en varias capas y las tapas de las tinas se perforaron para permitir la entrada de aire.

4. Se instalaron los contenedores en la habitación de cuarentena, y a cada grupo se colocó en una tina separada.

5. Se aplicó la siguiente técnica modificada de conteo de huevos McMaster:

a. Como primer punto fue necesaria la preparación del fluido de flotación en base a nitrato de sodio con una densidad específica de 1.18, ya que esta solución es la adecuada para la

flotación de los huevos de *Strongyloides spp.* (Ballweber et al., 2014). En este caso se mezclaron 100 gramos de nitrato de sodio con 250 ml de agua destilada.

b. A continuación, las heces frescas (de menos de 24 horas post evacuación) fueron recolectadas con una espátula de las tinas del grupo a evaluar, y se pesaron en conjunto.

c. El fluido de flotación preparado se colocó de tal forma que la mezcla quedó en una proporción de 1 g heces:10 ml fluido; y se la agitó con la espátula hasta homogenizarla.

d. La mezcla fecal se filtró por un colador.

e. Con ayuda de una pipeta de Pasteur se tomaron muestras del filtrado para llenar las dos cámaras del dispositivo McMaster, y se dejó reposar 5 minutos para que floten los huevos (Ballweber et al., 2014). Puesto que en algunos muestreos la cantidad de heces recolectadas fue reducida solamente se pudo completar una cámara.

f. Por último, el dispositivo fue colocado bajo el microscopio, y se realizó el conteo de huevos usando el lente objetivo 10x y el lente ocular 10x (Vadlejch et al., 2011).

6. Se usó la fórmula propuesta por Ballweber et al. (2014) para calcular la cantidad de huevos por gramo (HPG):

$$HPG = \frac{n}{0.15} \times \frac{V}{m}$$

n: número total de huevos en una cámara/promedio de huevos de las dos cámaras

V: volumen de la muestra fecal homogenizada (g heces + ml fluido flotación)

m: peso de las heces en gramos

7. Como grupo control (grupo 0) se escogió a 8 ranas de la especie *G. lojana*. Con los conteos realizados en este grupo se evidenció la varianza entre ellos (gráfico 1), por lo cual a partir del grupo 4 se realizaron 3 conteos previos a la desparasitación (Anexo C).

8. El grupo control no recibió tratamiento antiparasitario hasta la mitad del ensayo, sin embargo, por la alta carga parasitaria observada en los conteos presentados en el gráfico 1, se decidió incluirlo en uno de los tratamientos antiparasitarios.
9. A cada grupo se administró uno de los siguientes tratamientos antiparasitarios, con repetición una semana después:

Tratamiento	Fármaco	Vía de administración	Dosis	Duración
A	Fenbendazol	Oral	100 mg/kg	3 días
B	Ivermectina	Tópica*	0.2 mg/kg	1 día
C	Ivermectina	Tópica*	0.4 mg/kg	1 día
D	Fenbendazol + Ivermectina	Oral + Tópica*	100 mg/kg + 0. 2 mg/kg	3 días + 1 día

\* en la parte proximal ventral de cualquiera de las extremidades posteriores.

Estas dosis y frecuencias son en base a Carpenter & Marion (2018) y Smith (2007).

10. Para evaluar la carga parasitaria post tratamiento se realizaron 2 conteos con la técnica McMaster modificada entre los días 10 y 14 post desparasitación (Coles et al., 1992).
11. Todos los datos y promedios obtenidos fueron tabulados en Microsoft Excel, y los cálculos necesarios fueron realizados en el mismo programa.
12. Se calculó el test de reducción de conteo de huevos (TRCH) de la siguiente manera:

$$\% TRCH = \frac{HPG \text{ pre tratamiento} - HPG \text{ post tratamiento}}{HPG \text{ pre tratamiento}} \times 100$$

(Fesseha et al., 2020)

13. Se promedió el porcentaje del TRCH de cada grupo según el tratamiento administrado y con estos datos se realizó la prueba de  $X^2$  comparando los tratamientos en pares (tabla 1).

La prueba de  $X^2$  acepta distribuciones no normales, generalmente obtenidas en un estudio experimental, y permite evaluar hipótesis de relación entre dos variables categóricas (Hernández et al., 2014). En este caso se manejó un margen de error de 0.05.

14. Para determinar la eficacia de los fármacos se realizó Bootstrapping con  $n=500$  en los tratamientos A, B y C. Y con estos datos se determinó el límite inferior de un intervalo de confianza del 95% (LCL 95%). Este cálculo no fue posible realizarlo con el tratamiento D ya que solo se contaba con un dato.

15. Se aplicaron los criterios establecidos por de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria para la detección de resistencia antihelmíntica:

$TRCH < 95\% * / 90\% \wedge$  y  $LCL 95\% < 90\% =$  Resistencia antihelmíntica

$TRCH < 95\% * / 90\% \wedge$  ó  $LCL 95\% < 90\% =$  Sospecha de resistencia antihelmíntica

$TRCH \geq 95\% * / 90\% \wedge$  y  $LCL 95\% \geq 90\% =$  Susceptibilidad antihelmíntica

\*Aplicado para ivermectina, ^Aplicado para fenbendazol

(Cernea et al., 2015; Coles et al., 1992)

16. Con los resultados estadísticos, se realizó una búsqueda bibliográfica con el navegador Google Chrome en las bases de datos de: Google Scholar, PubMed y en la base digital de la Universidad San Francisco de Quito. Para ingresar a la última base de datos se lo hizo usando el usuario y contraseña de estudiante de la USFQ. No se aplicó filtros de fecha, y se utilizó bibliografía en inglés, español y portugués.

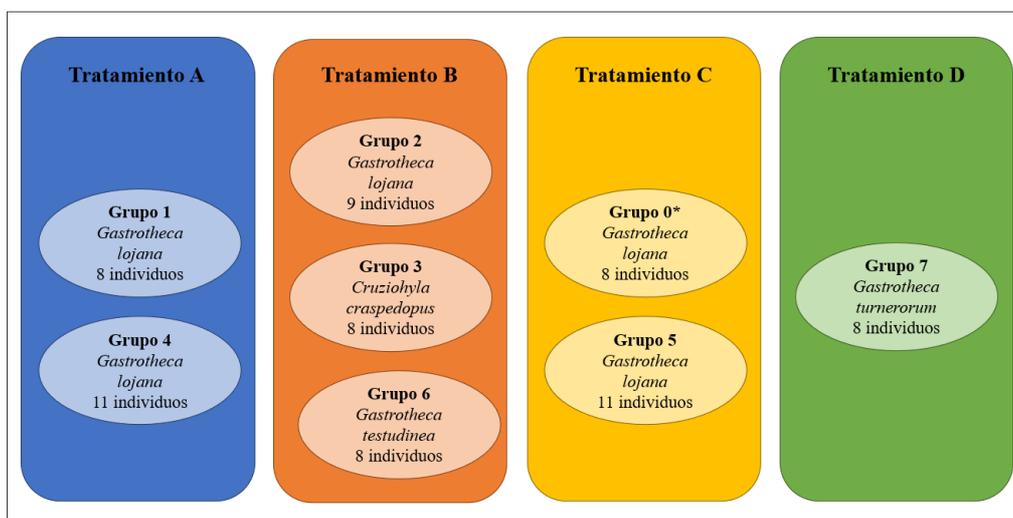
17. Al tener la información recolectada se procedió a discutir los resultados y hallazgos importantes.

18. Se utilizó el gestor de referencias bibliográficas Mendeley durante todo el proceso de escritura del informe final.

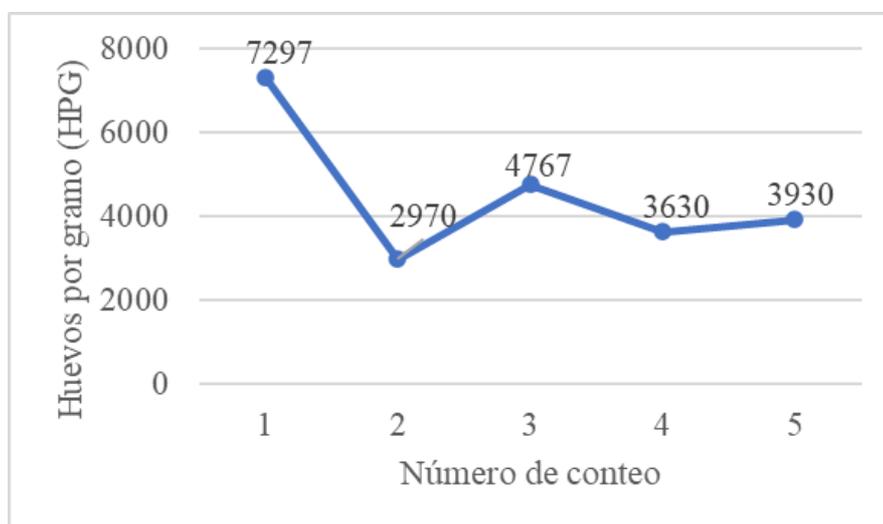
## RESULTADOS

En el diagrama 1 se especifican los grupos seleccionados para recibir cada tratamiento, así como la especie de anfibio y el número de individuos de cada grupo.

**Diagrama 1.** Distribución de los grupos de anuros en los tratamientos antiparasitarios



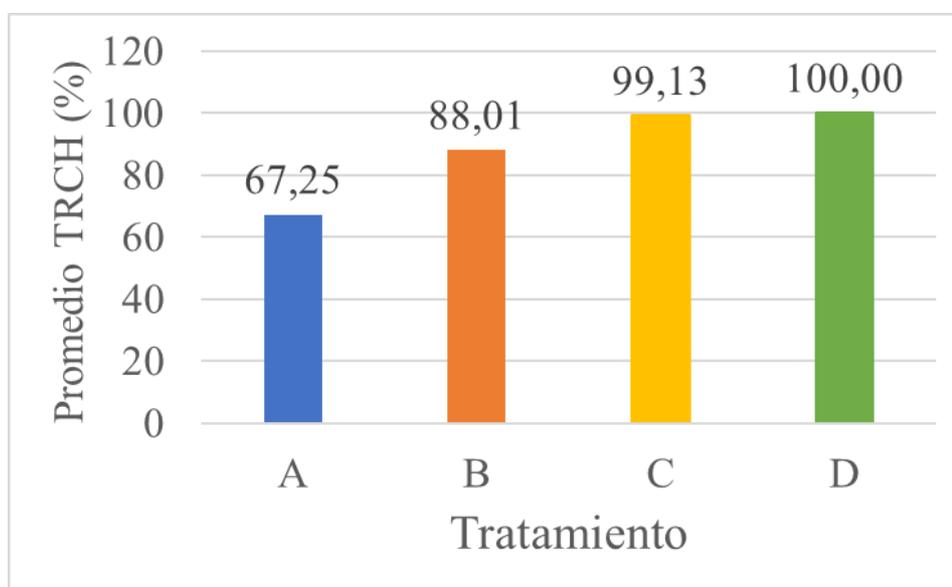
En el gráfico 1 se muestran los conteos realizados en el grupo control. Son notables las variaciones entre cada conteo, el primer conteo arrojó el resultado más alto de 7297 HPG, mientras que el segundo mostró el más bajo siendo de 2970 HPG. Los siguientes conteos mostraron resultados más semejantes entre ellos, pero todos sobre los 3000 HPG.



**Gráfico 1.** Huevos por gramo (HPG) en los conteos del grupo control (grupo 0)

En el anexo D se muestra los promedios obtenidos de los conteos previos a la desparasitación (HPG inicial) para cada grupo, así como de los conteos posteriores a la desparasitación (HPG final). Además, se expone el resultado del test de reducción de conteo de huevos en porcentaje (TRCH %), con estos datos grupales se obtuvo el promedio correspondiente a cada tratamiento.

En el gráfico 2, se evidencia que los grupos que estuvieron bajo el tratamiento A presentaron la menor reducción de conteo de huevos, siendo 67,25%. Mientras que usando el tratamiento D se observó la mayor reducción porcentual siendo del 100%. Por otro lado, los grupos en los que se puso a prueba el tratamiento B y C presentaron una moderada-elevada reducción de conteos de huevos.



**Gráfico 2.** Promedio del test de reducción de conteo de huevos (TRCH %) de los grupos de cada tratamiento antiparasitario.

Los resultados de la prueba de chi cuadrado se observan en la tabla 1, solamente en las comparaciones entre el tratamiento A frente al C y D se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). El resto de comparaciones no fueron significativamente diferentes, es decir que la reducción de conteo de huevos fecales del 100% obtenida con el tratamiento D no difiere

significativamente que la obtenida al aplicar el tratamiento C o B. No obstante, el tratamiento A no es significativamente diferente al B.

**Tabla 1.** Resultado *p value* de la prueba  $X^2$  comparando los diferentes tratamientos

Tratamiento	A	B	C	D
A	-----			
B	0,095712	-----		
C	0,013457	0,416308	-----	
D	0,011328	0,381811	0,950716	-----

*p value* < 0.05 indica diferencia significativa

Finalmente, con la metodología de este ensayo y usando los criterios internacionales de resistencia antihelmíntica en veterinaria, se determinó que los parásitos gastrointestinales de las ranas del estudio solamente son susceptibles al tratamiento C basado en la administración de ivermectina a una dosis de 0.4 mg/kg (tabla 2). Por el contrario, para el tratamiento A y B muestran evidente resistencia antihelmíntica.

**Tabla 2.** Determinación de la resistencia o no resistencia al tratamiento antihelmíntico de los parásitos gastrointestinales de los grupos de anuros del ensayo.

Tratamiento	LCL 95%	Resultado
A	37,96	R
B	79,51	R
C	98,26	N

LCL: límite inferior del intervalo de confianza, R: resistente, N: no resistente

## DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue comprobar cuál es el tratamiento antiparasitario más adecuado en un grupo de anuros del centro Jambatu expuestos a diferentes fármacos y dosis, para esto se aplicó una técnica modificada de conteo de huevos McMaster. Al emplearla antes y después de la desparasitación fue posible realizar el test de reducción de conteo de huevos (TRCH) y determinar la resistencia antihelmíntica de los tratamientos antiparasitarios.

En la búsqueda realizada no se identificó literatura publicada sobre la técnica McMaster en anfibios, sin embargo, la técnica usada en este estudio se adaptó para analizar una cantidad de heces incluso menor a 1 gramo. El problema es que mientras menor cantidad de heces es examinada, la estimación de los huevos por gramos (HPG) es menos precisa (Vadlejch et al., 2011). Con el fin de disminuir esta variación se aumentó el número de réplicas y se utilizó un factor de dilución 1:10 (Vadlejch et al., 2011),

En anfibios es recomendable utilizar un contenedor limpio con papel húmedo como recinto durante el muestreo de las heces, ya que en el terrario se puede dar contaminación por otros organismos (Hoegeman, 1999), Esto no se implementó en el grupo 6 puesto que los individuos no se alimentaron en las tinas, y por consiguiente se los mantuvo en su terrario para obtener muestras fecales. No obstante, el conteo de huevos no arrojó un resultado alarmante (ver Anexo C). Pero se debe considerar que según los registros del centro, los individuos mantenidos en las tinas suelen tener mayor carga parasitaria y altas tasas de mortalidad en comparación a los que viven en terrarios, probablemente por la diferencia en la frecuencia de limpieza.

En estudios donde se calcule la reducción porcentual de conteo de huevos, se recomienda tener un grupo control para observar los cambios naturales de aparición de huevos en muestrales fecales (Coles et al., 1992). En este estudio se contaba con un grupo control, pero

este presentó más de 2900 HPG (gráfico 1) de *Strongyloides spp.*, con esta carga parasitaria se puede suponer un muerte probable de los individuos, por esto el grupo fue incluido en uno de los tratamientos.

Los resultados de reducción de conteo de huevos presentados en el gráfico 2 permiten observar que con el uso del tratamiento A, se produce la menor reducción de la carga parasitaria. En estudios realizados en otras especies se ha reportado una elevada presencia de huevos luego de la desparasitación con benzimidazoles, lo cual se asocia a resistencia antihelmíntica (Fesseha et al., 2020). Además, es necesario considerar que este tratamiento fue el único frente al cual hubo diferencias significativas en las comparaciones de TRCH (tabla 1). Todo esto se relaciona a la existencia de resistencia antihelmíntica evidenciada en la tabla 2. En definitiva, este no sería el tratamiento de elección en el caso de estos anuros.

En un caso reportado de estrongiloidiasis en ranas *Hyla andersonii* se administró fenbendazol oral a dosis de 27 mg/kg y estas murieron debido a nematodiasis (Troan et al., 2021); es decir que esta dosis fue sumamente baja como para disminuir la parasitosis. Se alude que los individuos que no responden a las dosis terapéuticas de fenbendazol si suelen responder ante dosis/frecuencias más altas (Carrington et al., 2011) debido a la rápida generación de resistencia antihelmíntica (Cox, 2004). En cambio, en otro ensayo se desparasitó sapos *Bufo houstonensis* con fenbendazol a 290-580 mg/kg en polvo sobre grillos de alimentación por 3 días, y se redujo significativamente la carga parasitaria (Bianchi et al., 2014).

Por otro lado, al utilizar protocolos con ivermectina se consideró el riesgo de toxicidad y por ello se escogió dosis bajas y una vía menos invasiva: 0.2 y 0.4 mg/kg por vía tópica. Cabe mencionar que, en el Acuario Nacional de Baltimore, se reportó una intoxicación masiva de dendrobátidos con 0.2 mg/kg PO por una presunta sobredosificación (Clayton et al., 2013; Hahn et al., 2014) y lo mismo ocurrió en sapos *Incilius alvarius* (Helmick et al., 2018). En este

estudio no se observaron efectos adversos a ivermectina en ninguno de los individuos, esto refuerza la decisión de desparasitar por vía tópica en lugar de vía oral.

En general las lactonas macrocíclicas tienen un alto nivel de eficacia antihelmíntica (Cernea et al., 2015). En una *Leiopelma archeyi* con nematodosis nasal se aplicó moxidectina a 0.4 mg/kg oral e intranasal, y se logró una recuperación exitosa (Shaw et al., 2011). Además, en *Rhinella marina* con infestación de *Rhabdias*, se usó ivermectina a dosis de 0.2 mg/kg de forma parenteral en el saco linfático dorsal y los conteos de larvas en heces disminuyeron rápidamente (Finnerty et al., 2018). Ahora bien, en este estudio a dosis de 0.2 mg/kg ya se evidenció resistencia antihelmíntica, no así a una dosis de 0.4 mg/kg a la que los parásitos de estos anuros aún son susceptibles (tabla 2), y por ello se obtuvo una TRCH de 99,13%.

El tratamiento D mostró una TRCH del 100%, aunque se debe considerar que solamente se analizó un grupo. En un estudio de dendrobátidos con estrongilos intestinales se administró fenbendazol a 100 mg/kg y 4 días después se añadió ivermectina a 266-373 ug/kg, pero no se evaluó la reducción de la carga parasitaria (Nichols et al., 2001). Aunque se pudiera asegurar la eliminación total de parásitos utilizando este tratamiento, se debe considerar que su TRCH no es diferente significativamente al tratamiento C (tabla 1), y que usar este protocolo representa mayor tiempo y manipulación de los anfibios, así como mayor riesgo de generar resistencia antihelmíntica (Cernea et al., 2015).

Es importante acotar que la desparasitación en conjunto con el manejo del ambiente donde viven los anfibios son la clave para el control de parasitosis (Patterson-Kane et al., 2001). Sobre todo, los cuidados en la higiene de los recintos son básicos con *Strongyloides spp.*, ya que son parásitos de difícil eliminación cuando se usa únicamente el tratamiento farmacológico (Bianchi et al., 2014).

En anfibios es aceptable combinar heces de varios individuos para realizar la técnica de flotación coprológica (Pessier & Mendelson, 2017) pero para conocer la resistencia antihelmíntica se lo debería hacer de forma individual (Cernea et al., 2015). Por esta razón y por el reducido número de muestras los datos no son extrapolables. Se recomienda ocupar técnicas que se puedan realizar de forma individual y a mayor escala, estas pueden ser: McMaster modificado estandarizado en anfibios (en el de este estudio la sensibilidad con dos cámaras es de 37 HPG, y con una cámara es de 73 HPG), centrifugación y observación directa usando una escala de 0 al 4 (Bianchi et al., 2014), o mini-FLOTAC que tiene sensibilidad de 5 HPG pero que requiere mínimo 2 gramos de heces (Ianniello et al., 2020).

La principal limitante de este estudio fue el tiempo, ya que no se logró ingresar más grupos al ensayo para tener más muestras en cada tratamiento, ni tampoco fue posible realizar muestreos individuales. Otra limitante es la escasez de información sobre parasitología en anfibios, ya que no hay puntos de corte establecidos para decidir desde que HPG es recomendable desparasitar, este sería un dato importante de determinar; así como también es necesario estipular el tiempo normal de reaparición de huevos post desparasitación en anfibios según cada fármaco.

A pesar de que en este ensayo se tomaron las consideraciones explicadas en la literatura para obtener resultados precisos, se recomienda estandarizar la técnica de conteo de huevos McMaster en anfibios ya que se ha demostrado que cualquier modificación influye de sobremanera en los resultados (Ballweber et al., 2014). Dentro de esta estandarización se debería incluir el número de conteos adecuados. Además, para próximos estudios se recomienda realizar una elección adecuada del grupo control considerando la posible mortalidad.

Por otro lado, considerando que en los individuos del estudio se evidenció resistencia antihelmíntica para el tratamiento A y B, se sugiere comprobar estos datos para el resto de ejemplares del centro. Además, se recomienda realizar desparasitaciones selectivas, es decir basadas en exámenes coprológicos que demuestren cuales individuos requieren ser desparasitados. Sería ideal usar otros fármacos que también han presentado buenos resultados en nematodiasis de anfibios para evitar un uso excesivo de ivermectina, pues esto aumentaría su probabilidad de generar resistencia. Por último, se recomienda buscar alternativas al control farmacológico de parasitosis.

## CONCLUSIONES

El tratamiento C arrojó la mayor reducción de conteo de huevos (99,13%) que es diferente significativamente frente al tratamiento A (67,25%), pero no frente al tratamiento D (100%). Además, se demostró que los parásitos de estos anuros no presentan resistencia antihelmíntica frente a ivermectina 0.4 mg/kg ya que el límite menor del intervalo de confianza de 95% fue de 98,26%. Por lo cual este sería el tratamiento de elección en estos anuros.

En la hipótesis 1 sobre la diferencia significativa en la reducción de conteo de huevos entre los tratamientos, la hipótesis alternativa fue aceptada en las comparaciones entre A x C y A x D, mientras que para el resto de las comparaciones se aceptó la hipótesis nula. Por otro lado, en la hipótesis 2 relacionada a la presencia de resistencia antihelmíntica, se aceptó la hipótesis alternativa en el caso del tratamiento A y B que son los protocolos antiparasitarios que se han venido usando en el centro Jambatu, y solamente con el tratamiento C se aceptó la hipótesis nula.

Con este ensayo se determinó que el fenbendazol en los anuros del estudio presenta una menor eficacia antihelmíntica en comparación a la ivermectina a dosis de 0.4 mg/kg. Incluso el límite inferior del intervalo de confianza de 95% de 37,96% y el porcentaje de reducción de conteo de huevos de 67,25% obtenidos con el tratamiento A, indican que hay resistencia antihelmíntica. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar en qué individuos hay resistencia o si esta resistencia es generalizada en los anuros del centro Jambatu.

Aunque muchas veces se evita el uso de ivermectina por los eventos reportados y anecdóticos de toxicidad, es necesario realizar una investigación previa sobre las dosis y vía de administración a utilizar para estar seguros de aplicarla en los anuros seleccionados. En este caso, esto se confirmó a través de bibliografía y al no observar signos de toxicidad durante el estudio en los individuos tratados con ivermectina.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Elena Naydenova, médico veterinario del Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios, por su guianza técnica en la realización del presente proyecto, así como por su aporte con conocimientos teóricos y prácticos en relación a la medicina de anfibios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFP Español. (2020, November 30). *El arca que salvó a una variedad de sapos de la desaparición en Ecuador | AFP - YouTube*.  
<https://www.youtube.com/watch?v=4Bz2JfKBE0>
- Arif, S. M. (2019). Endoparasitic nematohelminthes collected from inside frog *Rana ridibunda* ( Pallas , 1771 ) in two rivers near Baghdad / Iraq. *J. Pharm. Sci. & Res.*, *11*(5), 2083.
- Ballweber, L. R., Beugnet, F., Marchiondo, A. A., & Payne, P. A. (2014). American association of veterinary parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use - Is there really one best technique? *Veterinary Parasitology*, *204*(1–2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.009>
- Bianchi, C. M., Johnson, C. B., Howard, L. L., & Crump, P. (2014). Efficacy of fenbendazole and levamisole treatments in captive houston toads (*Bufo* [*Anaxyrus*] *houstonensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *45*(3), 564–568. <https://doi.org/10.1638/2013-0250R.1>
- Carpenter, J., & Marion, C. (2018). *Exotic Animal Formulary* (Fifth edi). Elsevier.
- Carrington, A. C., Carrington, J. L., Gould, J. C., Brooks, R. M., Porr, C. A., & Splan, R. K. (2011). Effect of ivermectin and fenbendazole on fecal egg count reduction among foals in Virginia. *Journal of Equine Veterinary Science*, *31*(5–6), 320–321.  
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.03.156>
- Cerneza, M., Cristina, R. T., Ștefănuț, L. C., Madeira de Carvalho, L. M., Taulescu, M. A., & Cozma, V. (2015). Screening for anthelmintic resistance in equid strongyles (Nematoda) in Romania. *Folia Parasitologica*, *62*(1), 1–7. <https://doi.org/10.14411/fp.2015.023>
- Clayton, L. A., Nelson, J., Payton, M. E., McDonnell, J. J., Rossi, B. H., King-Rahn, K., & Woodburn, D. (2013). Clinical Signs, Management, and Outcome of Presumptive Ivermectin Overdose in a Group of Dendrobatid Frogs. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, *22*(1), 5. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-22.1-2.5>
- Coles, G., Bauer, C., Borfsteede, F., Geerts, S., Klei, T., Taylor, M., & Waller, P. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, *44*, 35–44. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(89\)87190-7](https://doi.org/10.1016/0013-4686(89)87190-7)
- Cox, F. (2004). *Modern Parasitology* (Second edi). Marston Book Services Limited.
- Eustace, R., Wack, A., Mangus, L., & Bronson, E. (2018). Causes of mortality in captive Panamanian golden frogs (*Atelopus zeteki*) at the Maryland Zoo in Baltimore, 2001–2013. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *49*(2), 324–334.  
<https://doi.org/10.1638/2016-0250.1>
- Fesseha, H., Mathewos, M., & Kidanemariam, F. (2020). Anthelmintic Efficacy of Strongyle

- Nematodes to Ivermectin and Fenbendazole on Working Donkeys (*Equus asinus*) in and around Hosaena Town, Southern Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4868797>
- Finnerty, P. B., Shine, R., & Brown, G. P. (2018). The costs of parasite infection: Effects of removing lungworms on performance, growth and survival of free-ranging cane toads. *Functional Ecology*, 32(2), 402–415. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12992>
- Hahn, A., D'Agostino, J., & Cole, G. A. (2014). Secondary ivermectin poisoning in South American green snakes ( *Philodryas baroni* ) . *Veterinary Record Case Reports*, 2(1), 1–2. <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2014-000053>
- Hallinger, M. J., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2020). Endoparasites infecting exotic captive amphibian pet and zoo animals (Anura, Caudata) in Germany. *Parasitology Research*, 119(11), 3659–3673. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06876-0>
- Helmick, K. E., Garner, M. M., Rhyan, J., & Bradway, D. (2018). Clinicopathologic features of infection with novel brucella organisms in captive waxy tree frogs (*Phyllomedusa sauvagii*) and colorado river toads (*Incilius alvarius*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(1), 153–161. <https://doi.org/10.1638/2017-0026R1.1>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación* (Sexta edic). Editorial McGraw Hill.
- Hoegeman, S. (1999). Diagnostic sampling of amphibians. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 2(3), 731–739. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30119-6](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30119-6)
- Ianniello, D., Pepe, P., Alves, L. C., Ciuca, L., Maurelli, M. P., Amadesi, A., Bosco, A., Musella, V., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2020). Why Use the Mini-FLOTAC to Detect Metastrongyloid Larvae in Dogs and Cats? *Acta Parasitologica*, 65(2), 546–549. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00171-9>
- Letcher, J., & Glade, M. (1992). Efficacy of ivermectin as an anthelmintic in leopard frog. *Reports of Wildlife and Laboraty Animals*, 200(4), 537–538.
- Llewelyn, V. K., Berger, L., & Glass, B. D. (2016). Percutaneous absorption of chemicals: Developing an understanding for the treatment of disease in frogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(2), 109–121. <https://doi.org/10.1111/jvp.12264>
- Malago, J. J. (2019). Histopathological Diagnosis of Diseases Affecting Amphibians Inhabiting Kihansi Gorge , Tanzania. *Tanzania Journal of Science*, 45(4), 608–617.
- Nichols, D. K., Lamirande, E. W., Pessier, A. P., & Longcore, J. E. (2001). Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 1–11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.1>
- Ortega-Andrade, H. M., Rodes-Blanco, M., Cisneros-Heredia, D. F., Guerra-Arévalo, N., Lopez de Vargas-Machuca, K. G., Sánchez-Nivicela, J. C., Armijos-Ojeda, D., Andrade-Cáceres, J., Reyes-Puig, C., Quezada-Riera, A., Székely, P., Rojas-Soto, O., Székely, D., Guayasamin, J. M., Siavichay-Pesántez, F. R., Amador, L., Betancourt, R., Ramírez-

- Jaramillo, S., Timbe-Borja, B., ... Yáñez-Muñoz, M. H. (2021). Red List assessment for amphibian species of Ecuador: a multidimensional approach for their conservation. *PLoS ONE*, *16*(5), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251027>
- Panarella, M. (2002). Used as a benzimidazole anthelmintic and antiprotozoal agent. *Pharm profile*, *24*(4), 40–43.
- Patterson-Kane, J. C., Eckerlin, R. P., Lyons, E. T., & Jewell, M. A. (2001). Strongyloidiasis in a cope's grey tree frog (*Hyla chrysoscelis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *32*(1), 106–110. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2001\)032\[0106:SIACSG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2001)032[0106:SIACSG]2.0.CO;2)
- Pessier, A. P., & Mendelson, J. R. (2017). A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. *Iucn/Ssc Cbsg*, *January 2011*, 1–284.
- Seyoum, Z., Demessie, Y., Bogale, B., & Melaku, A. (2017). Field evaluation of the efficacy of common anthelmintics used in the control of gastrointestinal nematodes of sheep in Dabat district, Northwest Ethiopia. *Irish Veterinary Journal*, *70*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13620-017-0097-6>
- Seyoum, Z., Zewdu, A., Dagnachew, S., & Bogale, B. (2017). Anthelmintic Resistance of Strongyle Nematodes to Ivermectin and Fenbendazole on Cart Horses in Gondar, Northwest Ethiopia. *BioMed Research International*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/5163968>
- Shaw, S., Speare, R., Lynn, D. H., Yeates, G., Zhao, Z., Berger, L., & Jakob-Hoff, R. (2011). Nematode and ciliate nasal infection in captive archey's frogs (*leiopelma archeyi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *42*(3), 473–479. <https://doi.org/10.1638/2010-0180.1>
- Smith, S. A. (2007). The Art of Amphibian Science: Compendium of Drugs and Compounds Used in Amphibians. *ILAR Journal*, *48*(3), 297–300.
- Troan, B. V., Swartley, O. M., Delk, K. W., & Flowers, J. R. (2021). Strongyloidiasis in pine barrens treefrogs (*Hyla andersonii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *51*(4), 1052–1055. <https://doi.org/10.1638/2019-0237>
- Vadlejch, J., Petrtyl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., & Moravec, M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology Research*, *109*(5), 1387–1394. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2385-5>
- Viney, M. E., & Lok, J. B. (2015). The biology of Strongyloides spp. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–17. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.2>
- Young, K. E., Jensen, J. M., & Craig, T. M. (2000). Evaluation of anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *31*(3), 348–352. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0348:EOAAIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0348:EOAAIC]2.0.CO;2)

## ANEXO A: IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE CONTEO DE HUEVOS MCMASTER MODIFICADA

a. Fluido de flotación preparado

(Nitrato de sodio SG 1.18)



d. Filtración de la mezcla fecal

homogenizada



b. Recolección y pesaje de heces



e. Llenado de las cámaras McMaster y

reposo de 5 minutos



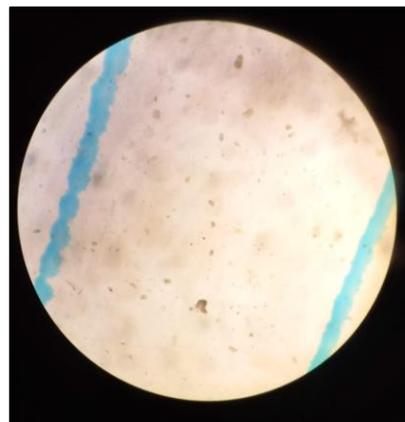
c. Mezcla fecal en proporción 1 g de

heces: 10 ml fluido



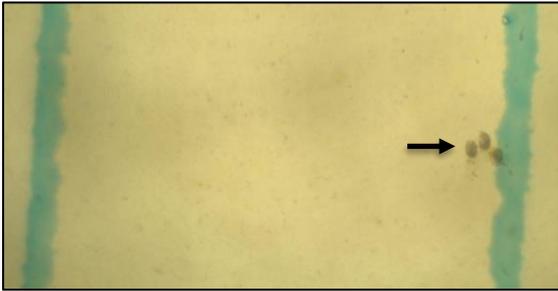
f. Observación al microscopio con

aumento total 100x

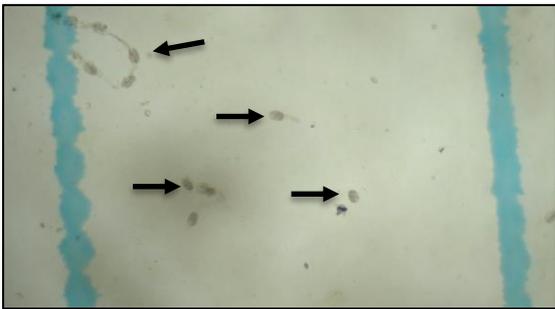


**ANEXO B: IMÁGENES DE LOS HUEVOS Y LARVAS DE *STRONGYLOIDES SPP.***

Huevos de *Strongyloides spp.* en mezcla fecal del grupo control 100x



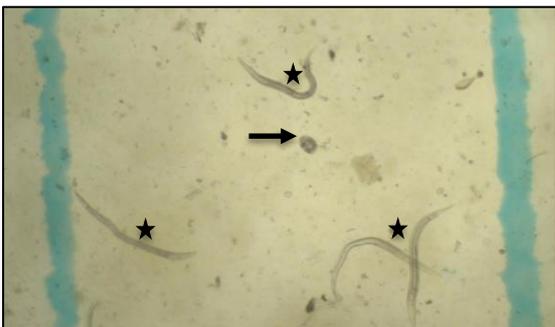
Huevos de *Strongyloides spp.* en mezcla fecal del grupo 5 pre- desparasitación 100x



Huevo de *Strongyloides spp.* en mezcla fecal del grupo 5 post- desparasitación 100x



Huevo y larvas de *Strongyloides spp.* en mezcla fecal del grupo 6 pre-desparasitación 100x



### ANEXO C: CONTEO DE HUEVOS PRE Y POST DESPARASITACIÓN

Huevos por gramos (HPG) observados en los conteos con la técnica McMaster realizados antes y después de la desparasitación en cada grupo de anuros.

#Grupo	HPG conteo/s pre-desparasitación	HPG 1er conteo post-desparasitación	HPG 2do conteo post-desparasitación
0	7297/2970/4767/3630/3960	0	0
1	3043	953	2823
2	3043	1210	37
3	623	73	110
4	6307/1063/2090	0	218
5	6307/1063/2090	73	37
6	1100/330/1577	16	0
7	440/5353/1137	0	0

Nota: los colores de la tabla se corresponden con los tratamientos antiparasitarios administrados a cada grupo (ver Diagrama 1)

**ANEXO D: PROMEDIO DE LOS CONTEOS DE HUEVOS PRE Y POST  
DESPARASITACIÓN, Y REDUCCIÓN DE CONTEO DE HUEVOS**

Promedio de conteo de huevos por gramo (HPG) en cada grupo de anuros seleccionado previo a la administración del tratamiento antiparasitario (HPG Inicial) y 1 semana después de finalizado el tratamiento (HPG final), y porcentaje de reducción de conteo de huevos (R-HPG).

#Grupo	HPG Inicial	HPG Final	TRCH (%)
0	4525	0	100,00
1	3043	1888	37,96
2	3043	624	79,51
3	623	92	85,31
4	3153	109	96,54
5	3153	55	98,26
6	1002	8	99,20
7	2310	0	100,00

Nota: los colores de la tabla se corresponden con los tratamientos antiparasitarios administrados a cada grupo (ver Diagrama 1)