

# Resistencia a los antihelmínticos en ganado ovino: Situación actual y propuestas de diagnóstico en campo.

Carlos Calvete

1º JORNADAS IVSA-ZARAGOZA  
COLEGIO DE VETERINARIOS DE ZARAGOZA  
25 de febrero de 2012

# RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS

*"Aumento significativo de los individuos de una población parasitaria, capaces de soportar niveles de fármaco que han probado ser letales para la mayoría de los individuos de la misma especie"*

*(Nari, 2001)*

# RESISTENCIA A LOS ANTIHELMÍNTICOS

Fenómeno de adaptación y supervivencia de las especies de parásitos ante la presión impuesta por el uso de antihelmínticos.

Carácter de resistencia es heredable y está asociado a uno o varios genes que normalmente se encuentran a baja frecuencia antes de la exposición a los fármacos.

El uso reiterado de antihelmínticos conlleva el incremento de la frecuencia de estos genes en la población parasitaria.

Proceso **IRREVERSIBLE**.

Su intensidad crece **EXPONENCIALMENTE** hasta que la eficacia de los antihelmínticos desaparece prácticamente.

# Factores asociados a la resistencia

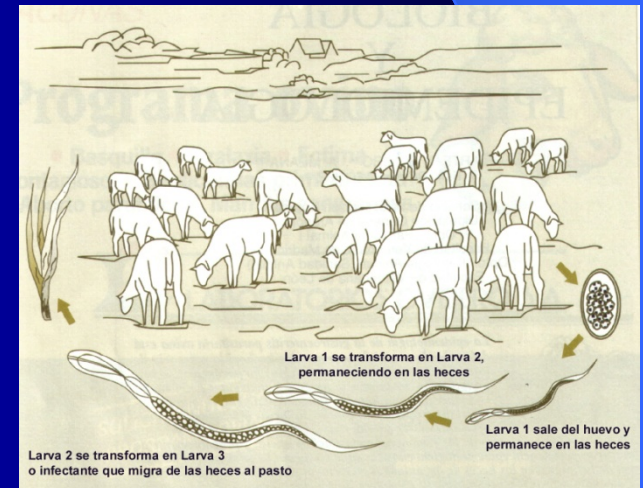
- Frecuencia de aplicación de los tratamientos antiparasitarios.
  - Mayor frecuencia > mayor presión de selección >>> resistencia.
  - 5-6 desparasitaciones/año generan resistencia en 2 años.
  - Frecuencias bajas pero repetidas en el tiempo, caso de España.
- Subdosificación:
  - Dosis subterapéuticas permiten sobrevivir a los individuos heterocigotos.
  - Cálculo de la dosis y conocimientos sobre biodisponibilidad y metabolismo según la especie animal o el manejo. *¡¡ imprescindible !!*

-Dosificar siempre con arreglo al animal más pesado.  
-Cabras precisan dosis de antihelmíntico 1,5-2 veces mayores que las ovejas para no quedar subdosificadas.



# Factores asociados a la resistencia

- Frecuencia de aplicación de los tratamientos antiparasitarios.
  - Mayor frecuencia > mayor presión de selección >>> resistencia.
  - 5-6 desparasitaciones/año generan resistencia en 2 años.
  - Frecuencias bajas pero repetidas en el tiempo, caso de España.
- Subdosificación:
  - Dosis subterapéuticas permiten sobrevivir a los individuos heterocigotos.
  - Cálculo de la dosis y conocimientos sobre biodisponibilidad y metabolismo según la especie animal o el manejo. *¡¡ imprescindibles !!*
- Proporción de parásitos susceptibles en refugio.
  - Población no expuesta al fármaco.
  - Núcleo de individuos susceptibles que posibilitan la dilución de los genes de resistencia en el total de la población.
  - Constituida por las fases preparasitarias presentes en el medio ambiente.



# DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA

- En el campo se sospecha cuando hay una baja respuesta clínica después de aplicar un tratamiento.
- Numerosas técnicas con fines diagnósticos y de investigación, que se agrupan en pruebas *in vivo* e *in vitro*.
- La mayoría serios inconvenientes en términos de coste, aplicabilidad y consistencia (precisión, interpretación y estandarización).

# DIAGNOSTICO DE LA RESISTENCIA: *Pruebas in vivo*

- **TEST REDUCCIÓN ELIMINACION DE HUEVOS (FECRT)**
  - Prueba de campo por excelencia.
  - Único válido para todos los antihelmínticos.
  - Calcular entre 10 y 14 días después del tratamiento la reducción de la tasa de eliminación de huevos.
  - Estandarizado por la WAAVP: resistencia cuando reducción  $< 95\%$



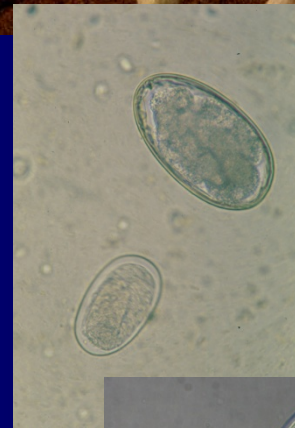
# DIAGNOSTICO DE LA RESISTENCIA: *FECRT*

- **Inconvenientes que limitan su utilización.**
  - Baja sensibilidad: genes presentes en el 25% de la población.
  - Muy difícil de aplicar cuando la eliminación es baja (<150 hpg).
  - Falta de precisión derivadas de McMaster y muestreo.
- **Recientemente se ha optimizado, buscando simplificarlo y aumentar la especificidad y sensibilidad.**
  - Aprovechar el manejo rutinario del ganado para los muestreos.
  - Trabajar con “pool” de heces como unidad de muestreo.
  - Utilizar bajas diluciones en las técnicas de recuento de huevos.



# DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA: Pruebas *in vitro*

- Disponibles diversas pruebas, utilidad sobre todo en investigación.
- Sólo es necesario recoger heces directamente del recto en unas 25-30 ovejas.
- Test de eclosión de huevos (EHA), Test de desarrollo larvario (LDA) y Test de PCR a tiempo real (RT-PCR).

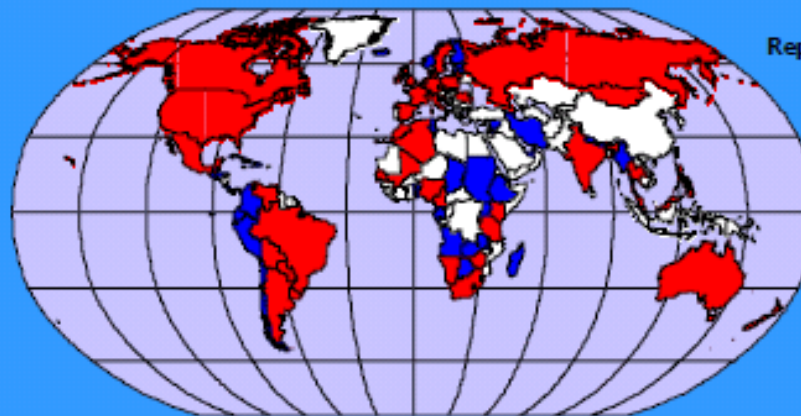


# Evolución histórica de la resistencia

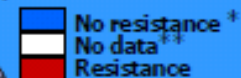
- Primera denuncia en 1957: *H. contortus* / fenotiacina
- TBZ en 1964, tres años después de su comercialización.

## ANTHELMINTIC RESISTANCE

Based on data from Survey of OIE member countries,  
FAO questionnaires (1998) and literature search (1999)



Reports on anthelmintic resistance



- \* The countries have reported "No resistance". However this is not necessarily based on the results of randomized countrywide surveys.
- \*\* The countries did not reply to the questionnaires.

6000 0 6000 12000 Miles



# SITUACIÓN ACTUAL DE LA RESISTENCIA

- En Europa y en general en los países del hemisferio norte, la emergencia de menor intensidad, aunque denunciado en la mayoría de ellos, siendo UK el más afectado.
- En España
  - Descrita en 1997 en cabras cachemira importadas. (Requejo-Fernández et al., 1997)
  - La información, está limitada a cuatro regiones y algunos datos son preocupantes.

Región	Benzimidazol	Imidazotiazol	Macrolactonas
<b>Castilla / León</b> (Alvarez et al., 2006)	14,3	38,5	23,5
<b>Galicia</b> (Diez-Baños et al., 2008)	33,3	No testado	8,3
<b>Aragón</b> (Calvete et al., 2012)	11,2	No testado	No testado
<b>Zona Centro</b> (Sacristán-Gómez et al., 2009)	0	0	No testado

# Necesidad de estudio de la resistencia

## MOTIVOS:

- 1) Información obtenida en trabajos anteriores.
- 2) Escasa información sobre las resistencias en nuestro país.
- 3) Posible extensificación de los sistemas de producción con el consiguiente incremento de la importancia de las parasitosis gastrointestinales.
- 4) La principal estrategia es la detección precoz de la resistencia y el establecimiento de manejos orientados a retardar su crecimiento.

## PROYECTOS:

- (2007-2010) INIA RTA 2006-0183-C03-01
- (2010-2013) INIA RTA 2010-00094-C03-01
  - CITA-Aragón (coordinación)
  - Universidad de Zaragoza
  - Universidad de León
  - Universidad Complutense Madrid

# Proyecto de investigación resistencias

## OBJETIVOS PRINCIPALES:

- 1) -Valorar la situación actual de las resistencias a los antihelmínticos en la ganadería ovina en el área de estudio.
- 2) -Identificar posibles factores asociados a la aparición y crecimiento de los fenómenos de resistencia.
- 3) -Optimizar los métodos de diagnóstico para su uso rutinario en condiciones de campo.

# Caracterización epidemiológica de explotaciones

## MUESTREO:

-107 explotaciones de ovino en Aragón.

## ENCUESTA:

- Localización (coordenadas geográficas)
  - Fecha del muestreo
  - Censo explotación
  - Riesgo de importación de parásitos (reposición, cuarentena...)
  - Manejo (semiextensivo)
  - Tipo de hábitat (clasificación preliminar: seco, regadío, mixto)
  - Tipo de pastos (comunales, privados, etc.)
  - Frecuencia de desparasitación
  - Principales épocas de desparasitación
- Otros datos adicionales para caracterizar el manejo.



# Prueba *in vitro*: Test de la eclosión de huevos

- Recolección de heces directamente del recto en unas 25-30 ovejas.
- Estimación de la tasa de eclosión a dosis discriminante de tiabendazol ( $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ ).



## INTERPRETACION:

-Dosis discriminante debe de inhibir la eclosión de, al menos, el 99% de los huevos.

-Si el porcentaje de eclosión es  $\geq 50\%$ , entonces se considera que existe un fenómeno declarado de resistencia.

## -Inconvenientes:

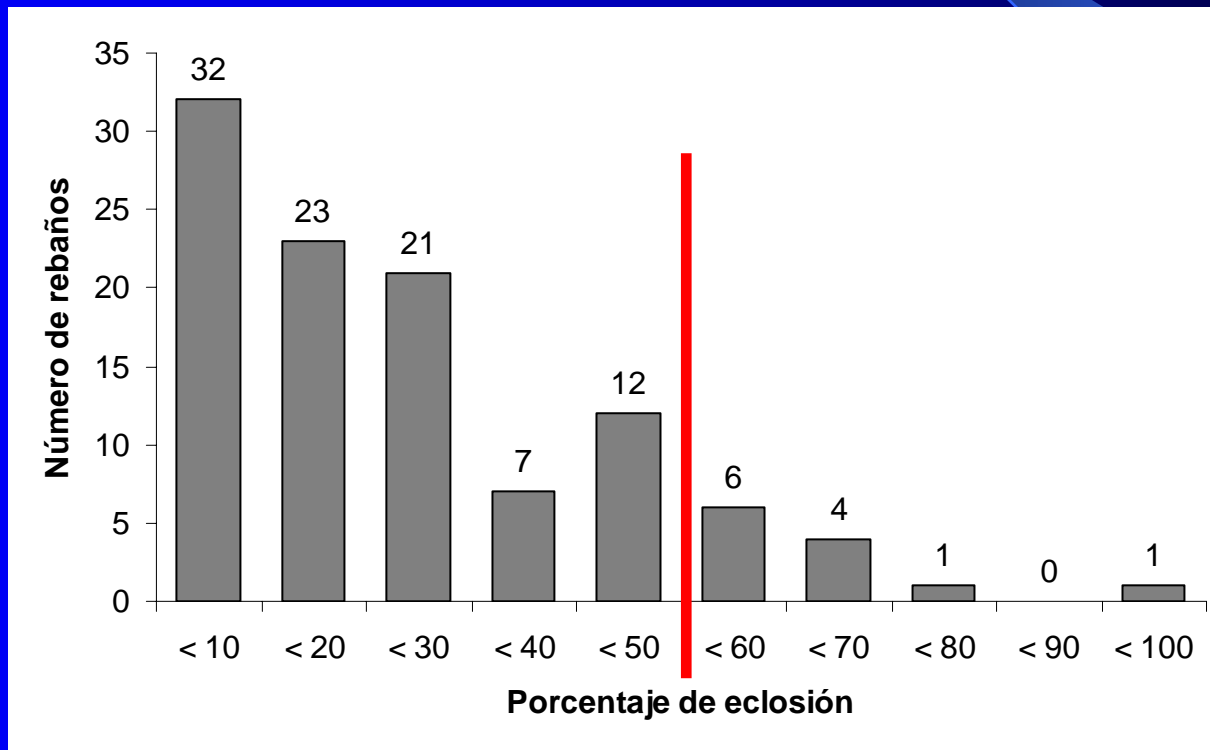
No se identifican las especies o géneros resistentes  
Conservación adecuada de los huevos



# Prevalencia y niveles de resistencia

-De 107 explotaciones, en 12 el porcentaje de eclosión fue  $\geq 50\%$ .  
**Prevalencia = 11%**. En algunas se confirmó mediante FECRT.

-**PROBLEMA:** Solo en 2 explotaciones hubo porcentajes de eclosión  $\leq 1\%$ . Esto indica que habría **cepas resistentes en el 98%** de las explotaciones.



**SITUACION ACTUAL:** Baja prevalencia pero con riesgo de aumentar rápidamente.



# Factores asociados a la resistencia

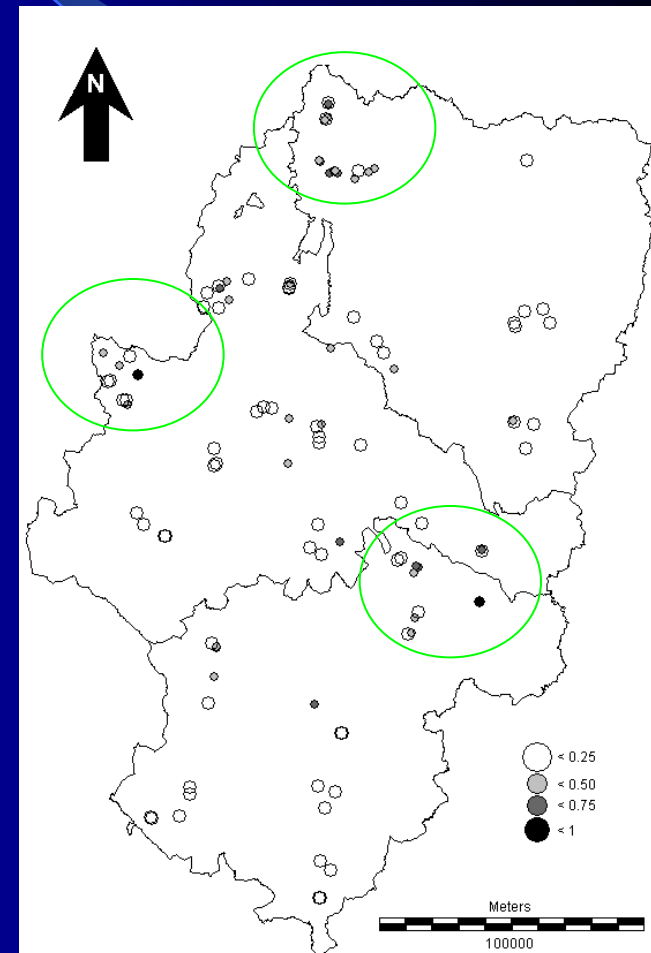
Frecuencia de aplicación de los tratamientos antiparasitarios.  
Subdosificación.  
Uso de pastos privados.

Factores bioclimáticos, estacionales y de uso del suelo.

- Niveles mayores en zonas frías y húmedas (somontanos)
- Mayor en rebaños muestreados en otoño y menor en invierno.

Niveles de resistencia presentan una fuerte correlación espacial.

- Trasmisión de cepas.
- Manejo sanitario común.



# ¿Qué podemos hacer para minimizar la expansión de la resistencia?

1) Eliminar o reducir la aplicación de aquellas medidas de manejo implicadas en su desarrollo.

2) Establecer prácticas rutinarias de vigilancia para la detección y diagnóstico de la resistencia en campo.

-En casos clínicos, observar la respuesta después del tratamiento (no siempre posible ni aplicable).

-Aplicación rutinaria de protocolos para valorar la eficacia del tratamiento. **PROGRAMA DE VIGILANCIA**

# VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA

- TEST REDUCCIÓN ELIMINACION DE HUEVOS (FECRT)
  - Prueba de campo por excelencia.
  - Único válido para todos los antihelmínticos.
  - Fundamento muy sencillo
  - Calcular entre 10 y 14 días después del tratamiento la reducción de la tasa de eliminación de huevos.



# VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA. FECRT

Intento de estandarización por la WAAVP (1992):

- Dos lotes: Lote control y lote tratado
- Tamaño de lote= 15 animales
- Límite de detección de técnica McMaster: 50 hpg (o 15 hpg)
  
- Cálculo de la tasa de reducción comparando las medias de lote
- Resistencia cuando reducción  $< 95\%$  y límite del CI95%  $< 90\%$ .
- No adecuado para tasas de eliminación bajas ( $< 150$  hpg)

\*Protocolo establecido de forma empírica. No validado adecuadamente.

# VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA: FECRT

## Multitud de variaciones:

- Comparación: lote control v.s. mismo lote
- Cálculo tasa reducción: tasas medias de grupo v.s. individuales
- Cálculo de las tasas medias de grupo:  
media estimaciones individuales v.s. homogeneizados
- Diferente tamaño muestral: Desde 1 hasta 15
- Diferente límite detección McMáster: desde 100 hasta 1 hpg
- Diferente criterio para definir resistencia: Desde 95% hasta 80%
- Diferentes escenarios:  
Desde muy baja hasta muy alta tasa de eliminación de huevos.

**\*\*\*Resultados e interpretaciones relativamente arbitrarios**

# MODELIZACION FECRT

## Simulación muestreo en campo:

- Una sola especie de parásito.
- Rebaño de 1000 individuos que son seleccionados al azar.
- 42 escenarios de distribución y abundancia parasitaria:
  - 6 niveles de distribución parasitaria: valores de  $k$  (0,1-5)
  - ×
  - 7 niveles de abundancia parasitaria: Media HPG = 50-10.000 hpg
- 9 niveles de resistencia antihelmíntica: FECR real 30-99,9%
- 7 niveles de esfuerzo muestral: tamaño de muestra 10-70 individuos.



# MODELIZACION FECRT

Simulación procesado muestras en laboratorio:

-6 niveles de detección del McMáster:  $Mc\_L$  100-5 hpg

-6 fórmulas diferentes para el cálculo del FECRT:

$$TC = 100*(1-[T2/C2]) \text{ (distribución aleatoria)}$$

$$T_0 = 100*(1-[T2/T1]) \text{ (se incluyen todos los animales)}$$

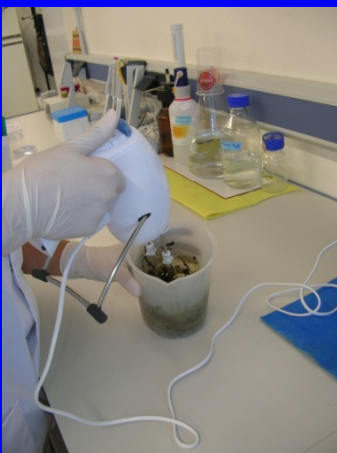
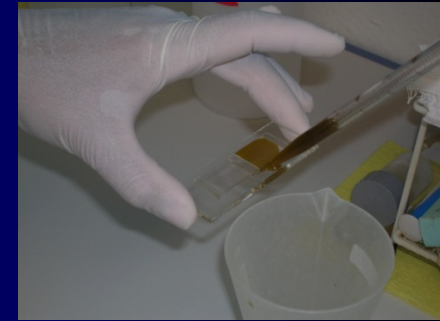
$$T = 100*(1-[T2/T1]) \text{ (sólo animales con HPG positivo)}$$

$$T_i = (1/n) \sum(100*(1-[T2/T1])) \text{ (sólo animales con HPG positivo)}$$

$$H_{TC} = 100*(1-[H_T2/H_C2]) \left. \vphantom{H_{TC}} \right\} \text{-Hasta 20 determinaciones}$$

$$H_T = 100*(1-[H_T2/H_T1]) \left. \vphantom{H_T} \right\} \text{-Variación intermuestral: Coef. 1,2,5,10}$$

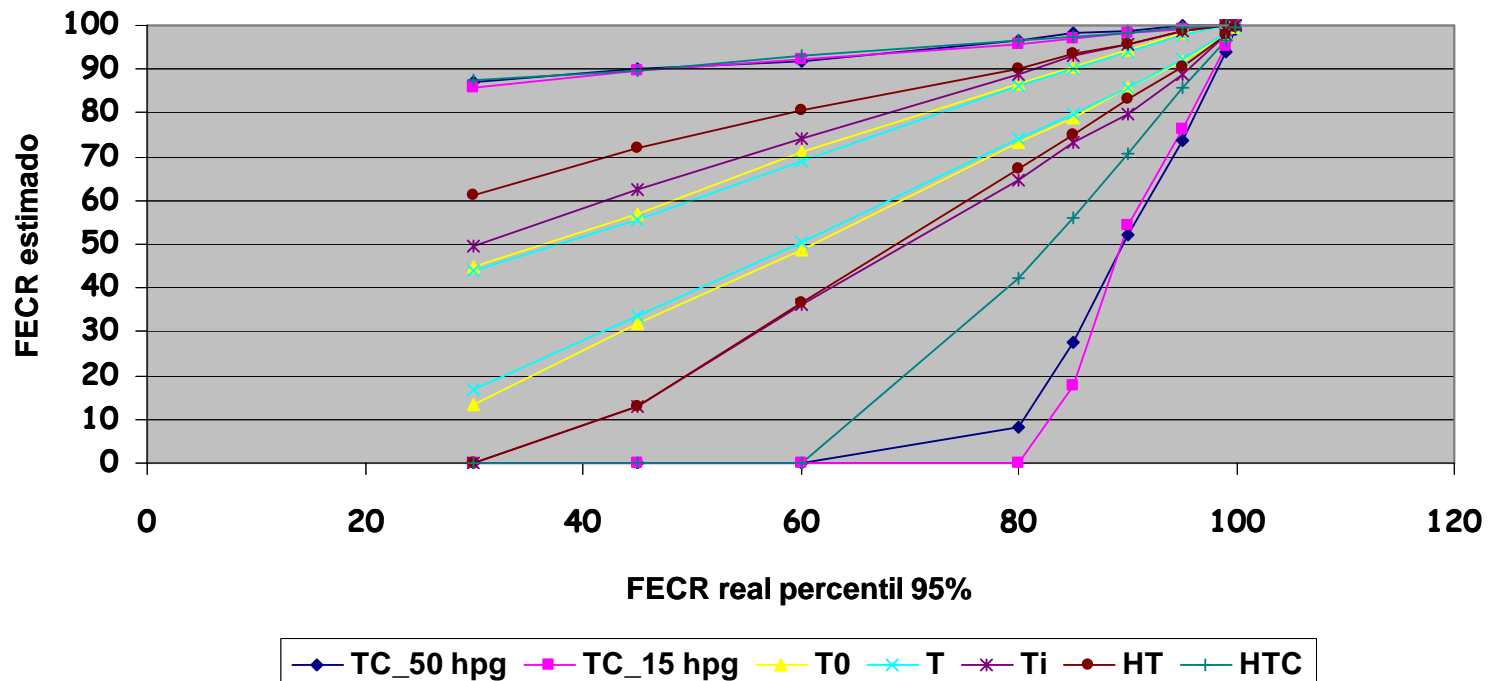
2,602,680 combinaciones replicadas 1000 veces



# PRECISION DE LAS ESTIMAS

Sin embargo, el problema es la relación directa pero no lineal entre la precisión y los niveles de resistencia reales.

- Incremento de la imprecisión con el aumento de la resistencia
- Escasa reproducibilidad de los resultados
- Inconsistencias en casos de monitorización
- Necesidad de protocolos costosos



Ej. Rebaños parasitación media. N = 20. En homogeneizados, N=50.



# DISCRIMINACION RESISTENCIA/NO RESISTENCIA

-Estimación de los percentiles 95% del rango de variación para una serie de valores de FECR real establecidos como puntos de corte para discriminar la resistencia de la no resistencia. **FECR = 99%** y **FECR = 95%**.

-En este caso se simularon 10,000 réplicas para cada escenario posible.



Interpretación de los coeficientes A y B:

-Coeficientes para la discriminación de resistencia / no resistencia con un 100% de sensibilidad y especificidad en, al menos, un 95% de las estimas.

**Clasificación: Sensible / Indeterminado / Resistente**

-Elaboración de tablas para diferentes escenarios parasitológicos:  
-Baja, Media o Elevada parasitación.

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

## TOMA DE MUESTRAS PRE-TRATAMIENTO

-Tratamiento a dosis terapéutica, sin posibilidad de subdosificación.

-Tomar heces de entre 40 y 50 animales.

-No hace falta guardarlas individualmente.

-Mejor si la cantidad de heces es similar entre animales.  
Variación máxima 1/10 entre la más pequeña y la más grande.

Se pueden tomar heces del recto de los animales, cogerlas del suelo si son frescas o ambas cosas hasta alcanzar el número de muestras.

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

## PROCESADO EN LABORATORIO

-Mezcla y homogenización de todas las muestras.

-Mejor si se usa algún tipo de máquina amasadora. NO utilizar batidoras o máquinas que lleven algún tipo de cuchilla.

-Determinación de la tasa media de eliminación de huevos por gramo de heces (hpg).

-Nivel de detección de la técnica McMáster = 15 hpg o menor.



Este nivel se logra contando los huevos que caen fuera de la cuadrícula de conteo y sumando los contados en ambas cámaras.

Necesario leer 10 placas de McMáster. (2 gramos de heces en 14ml de suspensión salina). Calcular el hpg medio.

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

## -TOMA DE MUESTRAS POST-TRATAMIENTO

-La toma de muestras se debe realizar entre 10 y 14 días después del tratamiento con antihelmíntico.

-La toma de muestras se realiza exactamente igual que en el pre-tratamiento, pero existen las siguientes dos opciones:

1)-Muestreo al azar en que los animales muestreados no tienen porqué ser los mismos que se muestrearon en el pre-tratamiento. Pueden ser cualquiera del rebaño, incluyendo o no (por azar) alguno de los muestreados en el pre-tratamiento.

2)- Muestreo dirigido, en el que se muestrean exactamente los mismos animales que en el pre-tratamiento (ej. caso de que el lote se haya mantenido apartado del rebaño durante los 10-14 días anteriores).

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

## CALCULO DE LA TASA DE REDUCCION (T(hpg)).

Estimación de la tasa de reducción mediante la siguiente fórmula.

$$T(hpg) = 100 \times (PRE(hpg) - POST(hpg)) / PRE(hpg).$$

PRE(hpg) y POST(hpg) son la tasa media de eliminación de huevos por gramo de heces antes y después del tratamiento respectivamente.

La tasa media es el valor de hpg medio estimado para las 10 cámaras de McMáster.

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

## INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Dos tipos de rebaños:

-Baja (< 200 hpg) y media eliminación (200-1000 hpg).

Una vez estimada la T(hpg) su interpretación se hace con la siguiente tabla que contiene los valores límite o discriminantes para una reducción de la hpg teórica del 99 o del 95% en función del nivel de parasitación del rebaño y de si se ha muestreado, o no, el mismo lote de animales antes y después del tratamiento.

<b>Eliminación baja.</b>		<b>Eliminación media.</b>	
hpg pre-tratamiento < 200 hpg		hpg pre-tratamiento= 200-1000 hpg	
Diferentes animales	Mismos animales	Diferentes animales	Mismos animales
92 << 73	94 << 82	96 << 84	97 << 90

99% ← 95%

99% ← 95%

99% ← 95%

99% ← 95%

**Niveles críticos de eficacia**

# PROTOCOLO MUESTREO FECRT

Eliminación baja. hpg pre-tratamiento < 200 hpg		Eliminación media. hpg pre-tratamiento= 200-1000 hpg	
Diferentes animales	Mismos animales	Diferentes animales	Mismos animales
92 << 73	94 << 82	96 << 84	97 << 90

**Ejemplo 1:** Se hace un test de reducción de huevos en un rebaño con un hpg medio de 350 hpg. Se muestrean los mismos animales antes y después del tratamiento y la T(hpg) calculada es igual a 91%.

- Eficacia real sí que es inferior al 99%.
- No podemos asegurar que sea igual o inferior al 95%.

**Ejemplo 2:** Se hace un test en un rebaño con un hpg medio pre-tratamiento de 150 hpg. Los animales se muestrean al azar antes y después del tratamiento, y la T(hpg) calculada es de 75%.

- Eficacia inferior al 99%, pero está dentro de los límites de una eficacia igual o superior al 95% .
- No podemos asegurar que haya un fenómeno de resistencia.
- Valores inferiores a 73 sí que serían indicadores de que la eficacia real ha sido igual o inferior al 95%.

# VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA

## ¿CUANDO Y CON QUÉ FRECUENCIA?

- No hace falta muestrear todos los rebaños todos los años.
- Sólo un reducido número cada año.
- Mejor si se hace un FECRT al mismo rebaño todas las veces que se desparasite a lo largo de un mismo año.
- Variación de los rebaños muestreados cada año.
- Muestrear un mismo rebaño pasados 4-5 años como mínimo.

## IDEALMENTE...

- Los datos obtenidos en los muestreos se deberían centralizar.
  - Análisis estratificado, teniendo en cuenta variaciones geográficas.
  - Obtención de información general útil para todos.



# CONTROL DE LA RESISTENCIA

## ¿QUE HACER CUANDO HAY RESISTENCIA?

-No existen recetas y las decisiones dependerán del nivel de resistencia y de la especie involucrada. **¡¡DIAGNÓSTICO!!**

-Niveles elevados (<75% eficacia)

-Patogenicidad de la especie

-Administración combinada de fármacos diferente acción.



**Cambio de fármaco**

-Introducir animales de otras procedencias en el rebaño.

-Reducir al máximo posible el uso de quimioterápicos:

-Tratamientos selectivos **¡¡animales de riesgo!!**.

- Prácticas de control integrado.

**MUCHAS GRACIAS**