

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

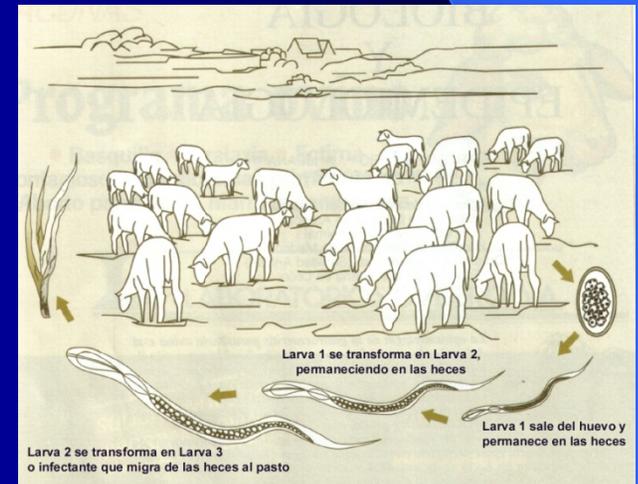
- Frecuencia de aplicación de los tratamientos antiparasitarios.
 - Mayor frecuencia > mayor presión de selección >>> resistencia.
 - 5-6 desparasitaciones/año generan resistencia en 2 años.
 - Frecuencias bajas pero repetidas en el tiempo, caso de España.
- Subdosificación:
 - Dosis subterapéuticas 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. *¡¡ imprescindible !!*
- 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).

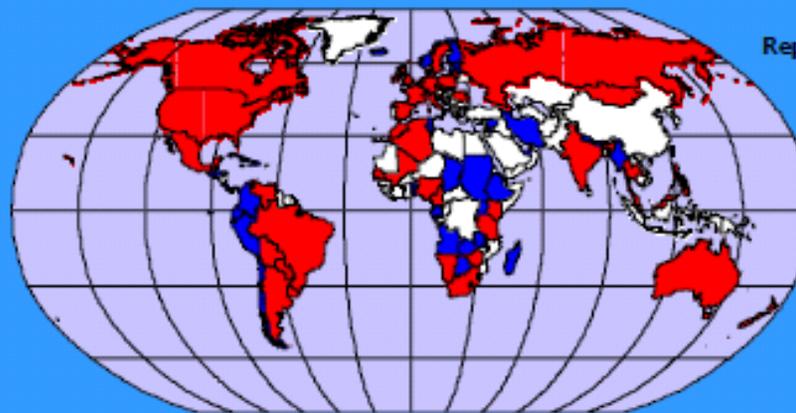


Evolución histórica de la resistencia

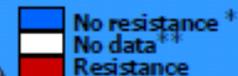
- Primera denuncia en 1957: *H. contortus* / fenotiacina
- TBZ en 1964, tres años después de su comercialización.

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
Castilla / León (Alvarez et al., 2006)	14,3	38,5	23,5
Galicia (Diez-Baños et al., 2008)	33,3	No testado	8,3
Aragón (Calvete et al., 2012)	11,2	No testado	No testado
Zona Centro (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-CO3-01
 - 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.



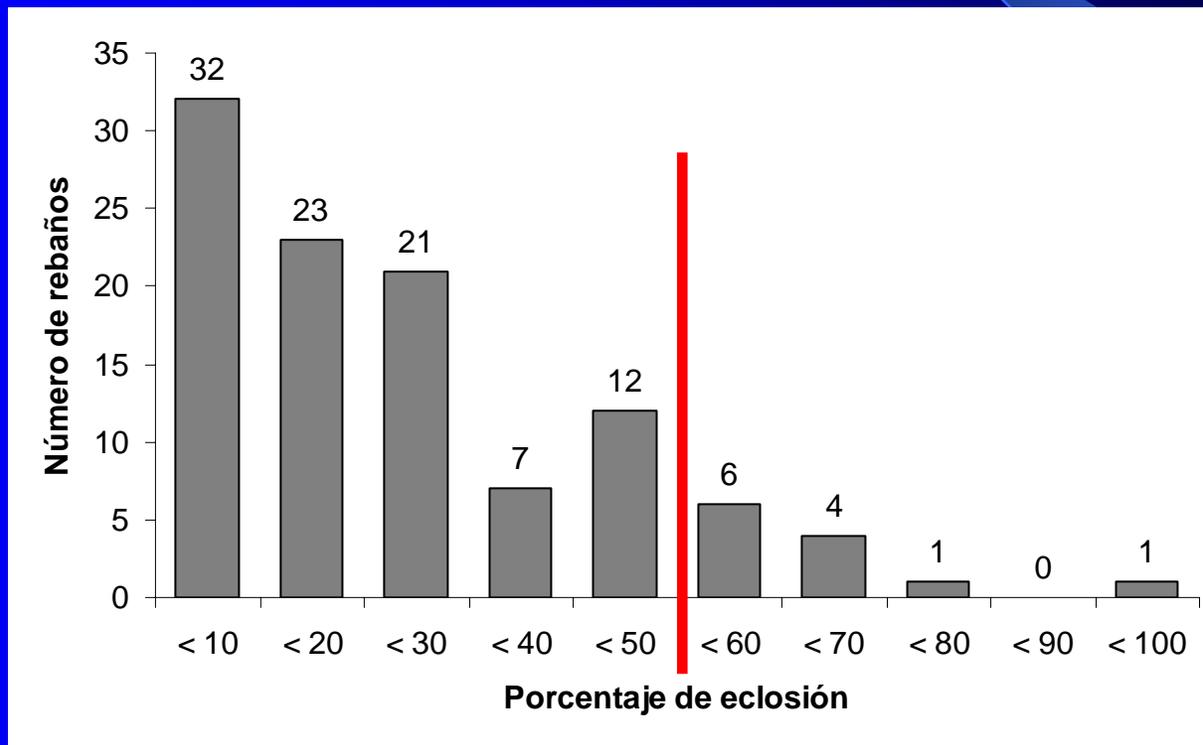
-Inconvenientes:

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

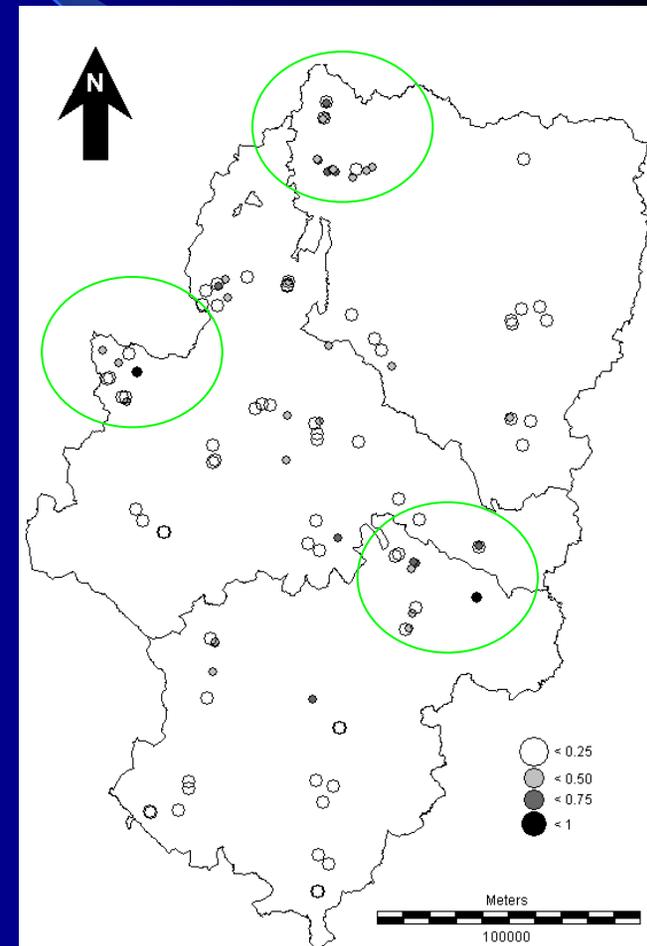
Frecuencia de aplicación de los tratamientos antiparasitarios.
Subdosificación.
Uso de pastos privados.

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:

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

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

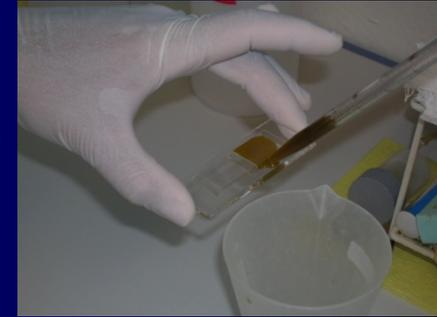
$$T = 100*(1-[T2/T1]) \text{ (sólo animales con HPG positivo)}$$

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

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

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

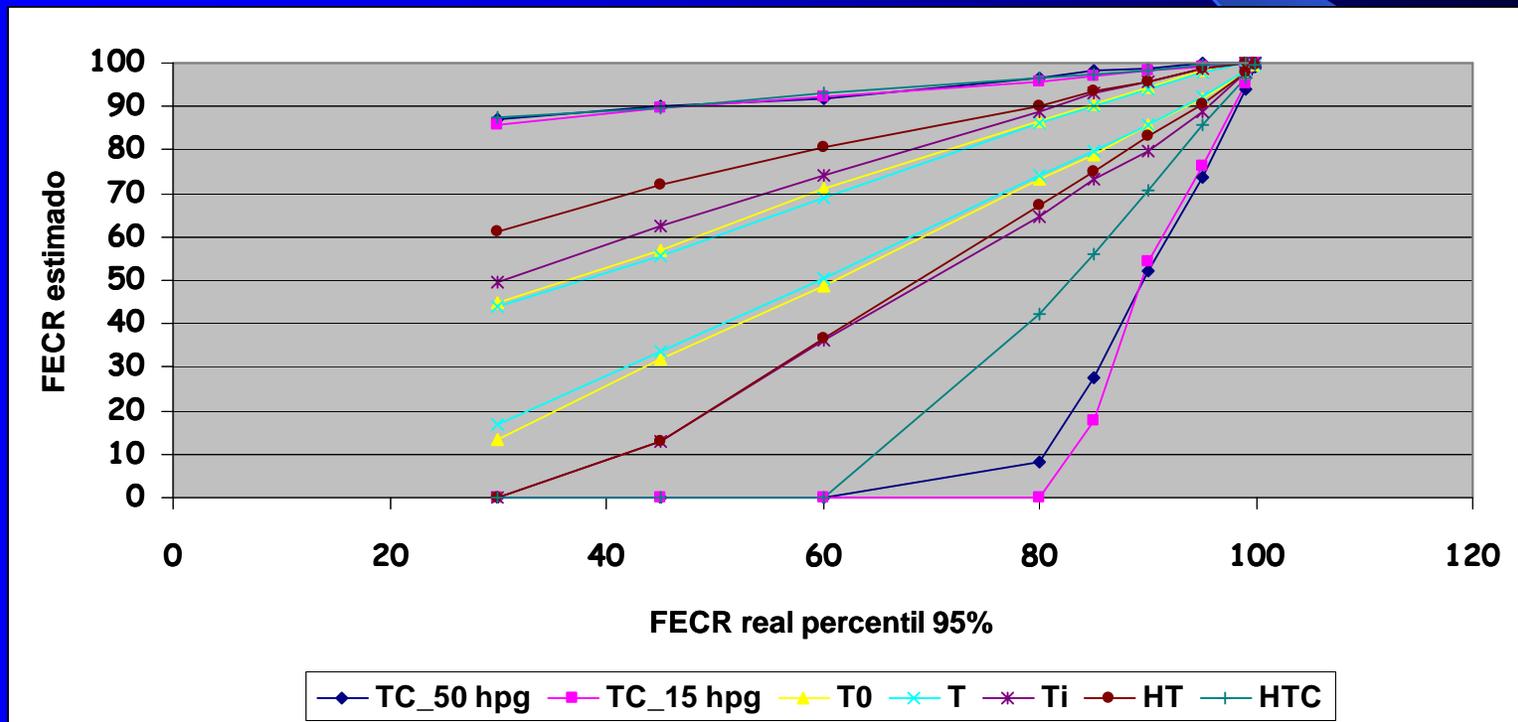
2,602,680 combinaciones replicadas 1000 veces



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.

Eliminación baja.		Eliminación media.	
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