

Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes

TCP/ARG/2904

Informe Final – Marzo/2005

Echevarria F.*

* Embrapa, C.P. 242; Bagé, RS. Brasil 96401-970 - echevarr@cppsul.embrapa.br

Resumen

Durante la tercera semana de Marzo de 2005 realicé la segunda y última visita al Área de Parasitología del Instituto de Patobiología CICVy A de INTA Castelar en la República Argentina, para examinar los resultados obtenidos durante el Proyecto de Cooperación Técnica TCP ARG 2904.

Con la ayuda del Coordinador Nacional del Proyecto, Dr. Jorge Caracostantogolo, revisamos el total de la información obtenida y puede reportarse que el proyecto fue llevado a cabo de acuerdo con la propuesta original.

La resistencia a los antihelmínticos esta difundida en Argentina. Tanto en bovinos como en ovinos, la principal droga a la cual los nematodos son resistentes es ivermectina. En bovinos, 55% de los campos muestreados tiene parásitos resistentes a esta droga mientras que en ovinos, hay un 44% de rebaños donde esta droga no es más efectiva. La resistencia al grupo bencimidazol ocurre en 10% de los rodeos bovinos y 47% de los establecimientos ovinos. El levamisol puede ser usado todavía en la mayoría de los establecimientos bovinos dado que solamente el 7% de ellos tiene parásitos resistentes al mismo. En el caso de los ovinos, la resistencia a esta droga afecta al 25% de los hatos.

El laboratorio de la institución mencionada estandarizó una técnica de PCR que puede distinguir entre parásitos susceptibles y resistentes a ivermectina (en adultos y en larvas) la que ayudará al diagnóstico de poblaciones de nematodos que están desarrollando resistencia

El uso de medidas alternativas para el control de los parásitos fue testado en la Provincia de corrientes. La aplicación de la técnica de FAMACHA redujo la necesidad de tratamiento en 60% de los animales pero fue evaluada a la salida de una temporada muy seca y debería ser probada nuevamente dado que los animales estaban en condición desfavorable. También se evaluó el efecto de la administración de partículas de óxido de cobre, obteniendo una reducción del HPG por alrededor de 6 semanas. En cuanto a químicos diferentes a los usados en la actualidad, se evaluó el efecto de naltalophos pero su precio es comparativamente muy elevado.

La principal contribución de este TCP fue en entrenamiento. Aproximadamente 120 veterinarios y casi 900 productores concurren a cursos y charlas sobre cómo manejar el control de los parásitos internos de ovinos y bovinos. Los Veterinarios fueron actualizados en técnicas de laboratorio para detectar resistencia y en nuevas alternativas para controlar nematodos.

El mejoramiento de la capacidad y el entrenamiento fueron dos componentes esenciales de este Proyecto. Los profesionales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, del SENASA y de los grupos colaboradores asociados con el Proyecto, aumentaron significativamente su capacidad técnica para el manejo, diagnóstico, prevención y control de los helmintos gastrointestinales en el contexto de la resistencia a las drogas antiparasitarias.

A modo de conclusión, puede decirse que el TCP ARG 2904 ha contribuido al conocimiento general del problema de la resistencia a los antihelmínticos. El grupo de investigación que ha conducido este trabajo, debería ser estimulado para enfrentar el problema de la resistencia a los antihelmínticos con nuevas líneas de trabajo, tales como la selección de animales resistentes y el mejoramiento de la nutrición como forma de reducir la necesidad de tratamientos antihelmínticos en el ganado.

Introducción

Este Proyecto fue apoyado por FAO como respuesta a un pedido del Gobierno Argentino para llevar a cabo estudios sobre la extensión del problema de la resistencia a los antihelmínticos en bovinos y ovinos y también sobre la evaluación de medidas alternativas de control para frenar o demorar el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos.

Este reporte resume los resultados obtenidos durante los dos años del Proyecto y fue concluido

luego de la segunda y última visita al Área de Parasitología del Instituto de Patobiología CICVy A de INTA Castelar en la República Argentina, llevada a cabo del 14 al 18 de Marzo de 2005.

La primera misión como Consultor Externo del Proyecto de Cooperación Técnica TCP ARG 2904, la efectuó del 19 al 26 de Octubre de 2003.

El Coordinador Nacional del Proyecto, Dr. Jorge Caracostantogolo y yo analizamos la información total obtenida durante los dos años del Proyecto. El Dr. Carlos Eddi, Senior Animal Health Officer, de FAO Roma estuvo también presente durante esta semana.

Resultados y conclusiones

Muestreo de resistencia a los antihelmínticos en ovinos y bovinos

Se estudiaron resultados obtenidos durante el muestreo de establecimientos ovinos y bovinos distribuidos en las Provincias de mayor actividad ganadera. La técnica de reducción en el conteo de huevos fue el medio empleado para la detección de resistencia en los establecimientos mencionados.

El muestreo ha sido realizado por 16 grupos de trabajo que respetaron una guía de procedimientos elaborada por la Coordinación Nacional del Proyecto.

Luego de un trabajo previo de difusión del proyecto entre veterinarios y productores llevado a cabo en el mes de febrero de 2003, en el mes de abril, se inició el trabajo de muestreo escogiendo a los establecimientos al azar.

En cada sitio de muestreo fue llenada una planilla de características del establecimiento en cuanto a ubicación, tipo de explotación ganadera, origen de los animales, modo de aplicación de los tratamientos y frecuencia de los mismos.

Dos instituciones del Gobierno Argentino (SECyT e INTA) proveyeron subsidios accesorios al Área de Parasitología de INTA para trabajar en el tema de resistencia a los antiparasitarios internos en rumiantes, lo que facilitó el aflujo de fondos para llevar a cabo los movimientos del personal encargado del muestreo.

En cada establecimiento se muestrearon en una primera visita 100 ovinos o bovinos jóvenes. Sobre la base de la cantidad de huevos por gramo de materia fecal (HPG) se formaron 4 grupos homogéneos de 15 animales cada uno. En la segunda visita, se llevó a cabo el tratamiento de 3 grupos, quedando el cuarto como control no tratado. Los antiparasitarios empleados fueron siempre de las mismas marcas comerciales y estaban formulados sobre la base de fenbendazol al 10%, fosfato de levamisol al 22,5% y a ivermectina al 1%.

En los establecimientos ovinos de la zona más cálida, con alta prevalencia de *H. contortus*, se trabajó con un grupo adicional que se trató con closantel.

Fueron muestreados 35 establecimientos ovinos y 85 bovinos. Los resultados de prevalencia de resistencia a los antihelmínticos en Argentina pueden verse en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1: Resultados del muestreo de resistencia a los antihelmínticos en bovinos

CAMPOS MUESTREADOS	SUSCEPTIBLES	RLEV*	RBZD*	RIVM*	HPG INSUF
Buenos Aires (38)	9	2	2	19	9
Córdoba (8)	4	1	0	3	1
Corrientes (8)	4	1	3	3	0
Chaco (2)	0	0	0	2	0
Entre Ríos (5)	0	0	2	4	1
La Pampa (12)	8	0	0	4	0
Neuquén (1)	1	0	0	0	0
Río Negro (1)	0	0	0	1	0
San Luis (1)	0	1	0	0	0
Santa Fe (9)	2	0	0	2	5
TOTAL (85)	28/69 (41%)	5/69 (7%)	7/69 (10%)	38/69 (55%)	16/85 (19%)

Las cifras muestran que sólo el 38% de los rodeos ovinos están parasitados por nematodos gastrointestinales susceptibles; en tanto que el 62% restante de los establecimientos, tiene resistencia a algunos de los grupos químicos en uso. La mayoría de los casos, reúnen resistencia a ivermectina y a benzimidazoles.

En bovinos, la resistencia ya está presente en el 60% de los rodeos estudiados y la mayoría de ellos (55%) es resistente al grupo ivermectina. La mayor parte de los géneros gastrointestinales de ovinos y bovinos presentaron resistencia a las drogas usadas.

Tabla 2: Resultados del muestreo de resistencia a los antihelmínticos en ovinos

CAMPOS MUESTREADOS	SUSCEPTIB.	RLEV*	RBZD*	RIVM*	RCLO*	HPG INSUF
Buenos Aires (19)	6	2	7	7	0	3
Corrientes (9)	0	5	9	9	5	0
Chubut (3)	2	1	1	0	0	0
La Pampa (2)	2	0	0	0	0	0
Santa Cruz (1)	1	0	0	0	0	0
Tierra del Fuego (1)	1	0	0	0	0	0
TOTAL (35)	12/32 (38%)	8/32 (25%)	15/32 (47%)	14/32 (44%)	3/32 (9%**)	3/35 (9%)

* La **R** frente a la sigla **LEV**= levamisol; **FBZ**= fenbendazol; **IVM**= ivermectina;

CLOS= closantel es para indicar resistencia a esa droga en particular.

** En los 9 (nueve) campos muestreados en Corrientes se evaluó el grupo closantel.

Cinco de los nueve establecimientos (55,55%) presentaban resistencia a este grupo.

Procedimientos a seguir en los campos en que se ha detectado resistencia

Los resultados indican, un creciente y serio problema de desarrollo de resistencia a los antihelmínticos tanto en ovinos como en bovinos. La única forma de manejar el actual estado de resistencia en estos establecimientos, donde se ha detectado el problema, es mediante monitoreo de laboratorio.

En los casos que han presentado resistencia múltiple, es necesario hacer un diagnóstico más preciso para definir adecuadamente el tratamiento.

Además, para reducir el número de tratamientos antihelmínticos a través de prácticas de manejo asociadas con tratamientos químicos, es fundamental conocer qué drogas son todavía efectivas en un establecimiento dado.

Se deberá aconsejar a los productores y a los veterinarios de los establecimientos con resistencia, que

a) Lleven un registro de los tratamientos antiparasitarios que se hagan a partir del diagnóstico de resistencia, en el que hagan constar el nombre del producto utilizado y la fecha del tratamiento;

b) Siempre que sea posible, envíen muestras de materia fecal de animales tratados al laboratorio, para monitorear el HPG, 12 a 14 días después del tratamiento.

c) Tiendan a reducir el número de tratamientos y a suspender temporalmente el uso del antiparasitario (grupo químico) al que se haya detectado resistencia

d) Una vez por año, efectuar un FECRT con los grupos químicos de antiparasitarios disponibles en el mercado

Dado que el sistema de producción más usado en Argentina es la transferencia de terneros hacia zonas con mejores suelos donde se realiza el engorde, habría que evaluar la aplicabilidad de un sistema de tratamiento en el campo de origen con un producto que sea eficiente o en el campo de destino con cuarentena y con apoyo de laboratorio para reducir la transferencia de genes resistentes a ivermectina a la zona de engorde de bovinos.

Manejo de los datos y utilización del software para análisis de los mismos

Todos los datos se registraron en planillas de cálculo confeccionadas al efecto por la Coordinación Nacional del Proyecto. La totalidad de los grupos de trabajo emplearon el mismo modelo de planilla

que acompañó a las muestras en cada movimiento y que además era remitido al Coordinador del proyecto. El software empleado para el análisis de los datos fue el programa RESO y es empleado adecuadamente por el Área de Parasitología de INTA

Estado de avance en las técnicas *in vitro* para ser correlacionadas con el test de reducción en el conteo de huevos (FECRT)

Los resultados obtenidos indicaron la posibilidad de usar la técnica de eclosión *in vitro* para el diagnóstico de resistencia al grupo de los benzimidazoles que, en lo caso de Argentina está presente en un 47% de los establecimientos ovinos y en un 10% de los de bovinos del país. Al mismo tiempo, esta técnica está limitada a un solo grupo químico (benzimidazoles) y además está también condicionada con los requerimientos de rapidez y buena conservación de las muestras desde el campo hasta el laboratorio.

Actividad de difusión

Durante mi primera estadía en INTA Castelar, se llevó a cabo un seminario para veterinarios privados, industria farmacéutica veterinaria y representantes de productores con la participación de 50 asistentes en donde, además se presentaron los resultados preliminares del proyecto. Durante esta última visita se efectuó un seminario similar donde se hicieron presentes 35 veterinarios privados, de la universidad y también de la industria farmacéutica.

A lo largo de los dos años del Proyecto se llevaron a cabo 30 reuniones con productores y veterinarios con aproximadamente 900 asistentes en las que se presentaron los resultados y se dieron los lineamientos para demorar el avance de la resistencia a los antihelmínticos.

También se dictaron cuatro cursos de dos días de duración para Médicos Veterinarios a los que concurrieron 120 Profesionales. Los cursos tuvieron lugar en las ciudades de Balcarce, Mercedes Corrientes, Villa Mercedes San Luis y Buenos Aires.

Tests Moleculares para detección de parásitos resistentes

Con el objetivo de obtener marcadores moleculares para la detección de resistencia antihelmíntica que permitan contar con una herramienta que determine en forma precoz diferencias a nivel ADN entre cepas de parásitos susceptibles y resistentes a la ivermectina fueran empleadas las siguientes técnicas:

- 1- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)
- 2- RAPD-PCR (Amplificación al azar de sectores polimórficos del ADN)

Se logró:

I) Se estableció la metodología de extracción de ADN en huevos, larvas y nematodos adultos que permite un mejor rendimiento del material genético.

II) A partir de ADN genómico de L3 de *H. contortus* se estableció un patrón diferencial de bandas de amplificación con RAPDs entre una cepa susceptible y otra resistente a la IVM.

III) Se diseñaron y construyeron primers para la amplificación de sectores génicos involucrados en la resistencia a la IVM (HcGluCl) y (HcPgp).

IV) Amplificación de sectores génicos que codifican para (HcGluCl) y (HcPgp) en huevos, larvas y adultos.

V) Se estableció un patrón de bandas de amplificación con RAPDs en una cepa susceptible a la IVM de *Haemonchus contortus* a partir de productos de amplificación de (HcGluCl91) .

La importancia de la determinación de métodos para purificar ADN que permitan obtener un mayor rendimiento del material genético radica en el mejor aprovechamiento del material cuando la muestra es escasa. Se comprobó que la metodología más adecuada fue la extracción de ADN utilizando fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico seguida de precipitación con etanol.

Se estableció un patrón de bandas a partir de ADN genómico de larvas de *H. contortus* que permite diferenciar cepas susceptibles y resistentes a la ivermectina. Para establecer el mismo se probaron 5 oligonucleótidos de secuencia aleatoria (RAPDs) de los cuales 1 de ellos mostró buena repetibilidad.

Este patrón puede considerarse una herramienta útil para la diferenciación entre cepas resistentes y susceptibles. No obstante pueden presentarse bandas producto de variabilidad genética no debi-

da a la resistencia sino a otros factores. Para disminuir la posibilidad de encontrar este tipo de bandas en los patrones, se decidió amplificar sectores génicos implicados en la resistencia a la ivermectina, como ser aquellos que codifican para la subunidad α de los canales de cloro para el glutamato (GluCl α) y para la glicoproteína P (Gp P). Posteriormente los productos de estas amplificaciones se sometieron a la amplificación por medio de RAPDs. De esta manera se pudo establecer con buena repetibilidad un patrón de bandas para una cepa pura de *H. contortus* susceptible a partir del sector génico que codifica para GluCl α . A futuro se espera establecer un patrón de bandas para cepas resistentes utilizando los mismo oligonucleótidos y de esta manera poder diferenciar unas de otras.

No fue posible realizar un patrón a partir de la amplificación del sector génico codificante para la Gp P, debido a que este producto presenta una banda de amplificación inespecífica. Para aumentar la especificidad de los primers se procederá a aumentar el número de bases de los mismos.

Medidas Alternativas de Control (FAMACHA, cobre, naftalophos)

El uso de medidas alternativas para el control de los parásitos fue testado en la Provincia de corrientes. La aplicación de la técnica de FAMACHA redujo la necesidad de tratamiento en 60% de los animales pero fue evaluada a la salida de una temporada muy seca y debería ser probada nuevamente dado que los animales estaban en condición desfavorable. También se evaluó el efecto de la administración de partículas de óxido de cobre, obteniendo una reducción del HPG por alrededor de 6 semanas. En cuanto a químicos diferentes a los usados en la actualidad, se evaluó el efecto de naftalophos pero su precio es comparativamente muy elevado y todavía no se comercializa en Argentina.

Conclusiones

Dado que la resistencia a los antihelmínticos está mostrando ser un problema para la producción ganadera de Argentina, será muy importante que las instituciones argentinas:

Difundan los resultados de este proyecto entre las asociaciones de productores mediante charlas en las que se ponga de manifiesto la importancia de un manejo adecuado de los tratamientos antiparasitarios.

Comuniquen los resultados a la industria farmacéutica para que provea al mercado suficientes productos alternativos elaborados en base a los grupos químicos menos afectados por la resistencia de los nematodos.

Continúen ofreciendo cursos para veterinarios en los que se trasmitan los conocimientos básicos para la realización del diagnóstico de resistencia y para el manejo adecuado de los tratamientos.

En las zonas más cálidas, p.ej. Corrientes, difundan el uso del método FAMACHA en pequeñas majadas de ovinos.

Promuevan el acercamiento del productor al veterinario para hacer un empleo racional de los tratamientos antiparasitarios que incluya el monitoreo de la resistencia por diagnóstico de laboratorio y al mismo tiempo reduzca el número de tratamientos en ovinos y bovinos.

Promuevan el empleo de medidas auxiliares de manejo de pasturas y de pastoreo alternado, la mejora de los niveles nutricionales, el establecimiento de programas de selección de animales resistentes a endoparásitos y la inclusión de tratamientos alternativos como el uso de hongos tendientes a lograr un control integrado de las parasitosis en el que se disminuya la frecuencia de tratamientos antiparasitarios químicos.