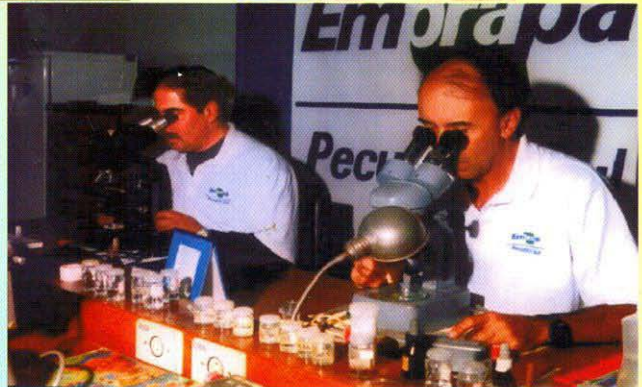


Detectando resistência anti-helmíntica





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 0103-376X

Dezembro, 2001

Documentos41

Detectando resistência anti-helmíntica

Flávio Echevarria

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul
BR 153, km 595 - Caixa Postal 242
96401-970 - Bagé, RS
Fone/Fax: (0XX53) 242-8499
<http://www.cppsul.embrapa.br>
sac@cppsul.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Roberto Silveira Collares*
Secretário-Executivo: *Nelson Manzoni de Oliveira*
Membros: *Klecius Ellera Gomes*
Sérgio Silveira Gonzaga
Carlos Miguel Jaume Eggleton
Ana Mirtes de Sousa Trindade
Vicente Celestino Pires Silveira

Supervisor editorial: *Sérgio Silveira Gonzaga*
Normalização bibliográfica: *Nelci M. B. Jeismann - CRB/10 670*
Tratamento de ilustrações: *Roberto Cimirro Alves*
Editoração eletrônica: *Roberto Cimirro Alves*

1ª edição

1ª impressão (2001): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Echevarría, Flávio.

Detectando resistência anti-helmíntica/Flávio Echevarría. - Bagé, RS: Embrapa CPPSul, 2001.

22p. (Embrapa Pecuária Sul, Documentos, 41)

ISSN 0103-376X

1. Ovinos. 2. Resistência. 3. Anti-helmíntico. 4. Avaliação. 5. Manual.
I. Título. II Série.

CDD: 636.3

Autores

Flávio Echevarria

Med. Vet., M.V.Sc., Ph.D.

Cx. Postal 242, Cep 96401-970 - Bagé - RS

(0xx53) 242.8499

echevarr@cppsul.embrapa.br

Sumário

1. Teste de Redução de OPG	7
1.1. Procedimentos Laboratorias	09
1.2. Análise estatística	10
1.3. Interpretação do teste de redução de OPG . .	10
2. Testes in vitro	11
3. Teste com necropsia	12
Conclusão	12
Suporte Bibliográfico	13
Anexo1	14
Anexo2	22

Detectando resistência anti-helmíntica

Levantamentos sobre a ocorrência de resistência anti-helmíntica tem sido conduzidos em diversas regiões do mundo e os resultados, de uma forma geral, indicam a presença desse problema em vários rebanhos, principalmente de ovinos. Esse tipo de pesquisa é importante para determinar a extensão do problema em uma determinada região e, conseqüentemente as políticas de controle a serem recomendadas. Por outro lado, rebanhos comerciais precisam ser monitorados para determinar quais os produtos que ainda podem ser utilizados e por quanto tempo uma determinada droga será útil no programa de controle.

Três técnicas podem ser utilizadas como ferramentas para diagnosticar a presença de resistência: redução de opg, o teste in vitro e o teste controlado com necropsia.

Estão sendo incluídos dois anexos (Anexo 1 e 2) onde são apresentadas rotinas de coleta e procedimentos para avaliação de rebanho(s).

1. Teste de Redução de OPG

Este é o método mais prático de determinar a resistência anti-helmíntica. A seguir são descritos procedimentos mínimos para manter a sensibilidade e a praticidade do método.

Deve-se usar animais jovens, na época do desmame, que não

tenham sido medicados pelo menos nas últimas 6-8 semanas e padronizados por idade e peso (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Ovinos padronizados, distribuídos em grupos e marcados distintivamente.

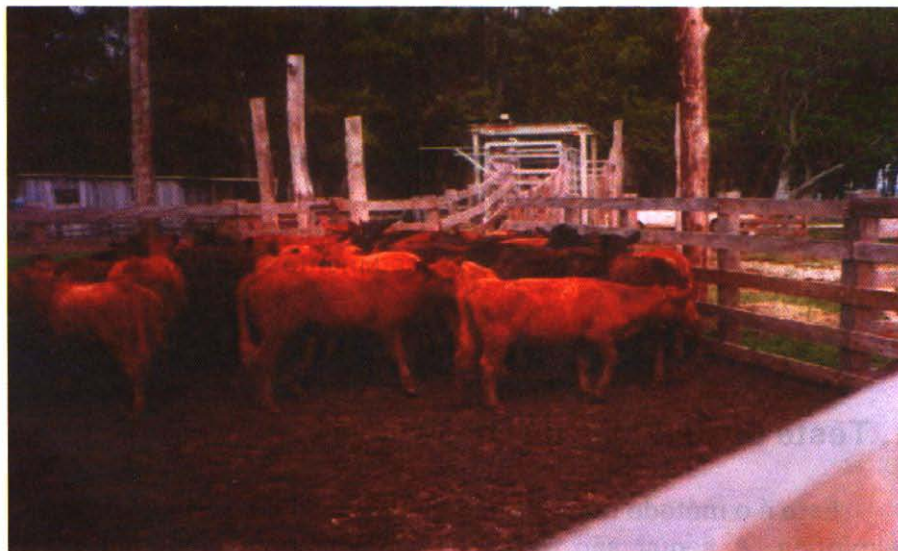


Figura 2. Bovinos padronizados por idade e peso.

Cada grupo deveria conter 15 animais para compensar aqueles que não produzirão amostras fecais na segunda visita. Os animais deverão ser alocados aos grupos ao acaso (depois de padronizados); o melhor método seria usar o opg anterior aos tratamentos contudo isso nem sempre é possível. Além disso, a estatística nos diz que para a análise dos resultados não precisamos dos dados de opg pré-tratamento; apenas comparamos os lotes medicados com o controle não tratado.

Resultados conclusivos não serão obtidos se a média de opg do rebanho avaliado estiver abaixo de 150 ovos/grama. As amostras fecais devem ser coletadas do reto e tão logo os animais estejam selecionados; caso contrário muitos não produzirão material suficiente para opg e cultura de larvas.

O cálculo da dose a ser utilizada deve ser baseada no peso no animal mais pesado depois de realizada a padronização dos grupos. Doses calculadas individualmente somente são usadas em trabalhos de pesquisa. Os antihelmínticos devem ser administrados com aparelhos previamente aferidos.

As amostras fecais devem ser acondicionadas de forma individual e transportadas ao laboratório o mais breve possível em uma caixa de isopor com gelo.

1.1. Procedimentos laboratoriais

Existe uma série de variações do método McMaster; o importante é que todas as amostras e futuras comparações sejam realizadas com o mesmo padrão.

Para a correta interpretação da avaliação anti-helmíntica é necessário realizar a cultura de larvas. Isto é feito retirando-se de cada amostra coletada 3-4g de fezes para uma cultura de cada grupo testado. As culturas devem ser incubadas a uma temperatura aproximada a 26°C durante sete dias. Ao final desse período, pelo menos 50 larvas de cada grupo devem classificadas.

1.2 Análise estatística

A percentagem de redução de opg é mais segura quando calculada usando as médias aritméticas das amostras coletadas entre 10 e 14 dias pós-tratamento. A utilização do intervalo de confiança a estas médias nos proporciona mais segurança na interpretação dos resultados.

Um exemplo de cálculo de médias, percentagem de redução e de intervalo de confiança pode ser visto no Anexo 2.

A média aritmética é mais fácil de calcular e nos dá uma melhor visualização do nível de infecção do rebanho como um todo. Além disso, é o método mais severo em se tratando de redução produção de ovos e por isso mais conservador como uma medida de avaliação da ação de um anti-helmíntico.

A aplicação do intervalo de confiança à média aritmética irá demonstrar mais claramente a amplitude de eficácias de um anti-helmíntico com a variabilidade dos dados de opg.

Estudos recentes tem demonstrado que dados de opg pré-tratamento não alteram os percentuais de redução de opg onde foi feita uma boa padronização dos grupos a serem tratados bem como o lote controle não medicado. Isto reduz acentuadamente o trabalho no laboratório.

1.3 Interpretação do teste de redução de opg

Resultados de pesquisa indicam que resistência deve ser declarada quando:

- a - o percentual de redução de opg for menor que 95%
- b - o intervalo de confiança inferior (a 95%) estiver abaixo de 90%.

Se os dois critérios forem confirmados, diagnostica-se resistência. Quando apenas um dos itens é cumprido então teremos uma suspeita de resistência anti-helmíntica.

2. Testes *in vitro*

Estes testes podem ser usados para quantificar o nível de resistência de um determinado produto mas requerem um alguns equipamentos laboratoriais mais sofisticados e um considerável treinamento técnico. Estes testes exigem o uso de estirpes puras mas geralmente amostras de campo estão compostas de vários gêneros; ainda mais, há necessidade de usar como padrões, cepas monoespecíficas com seus respectivos níveis de resistência e susceptibilidade conhecidos para que possam ser usados como controle. Assim, estes testes são usados mais comumente para fins experimentais.

Testes	Resistência a:
Eclosão	Benzimidazóis
Paralisia larval	Levamisole
Fixação de tubulina	Benzimidazóis
Desenvolvimento larval	Todas

Informações recentes indicam que um teste de desenvolvimento larval (Figura 3) está sendo desenhado para análise de diversos produtos. Uma placa de 96 poços seria impregnada com diferentes princípios ativos e concentrações; nesse sistema uma suspensão de ovos, previamente separada das fezes, seria depositada em cada poço e depois de 6,5 dias de incubação procede-se a leitura para determinar a concentração limitante no desenvolvimento de ovos e larvas. Espera-se que este tipo de kit de diagnóstico venha a ter um preço acessível a países em desenvolvimento.

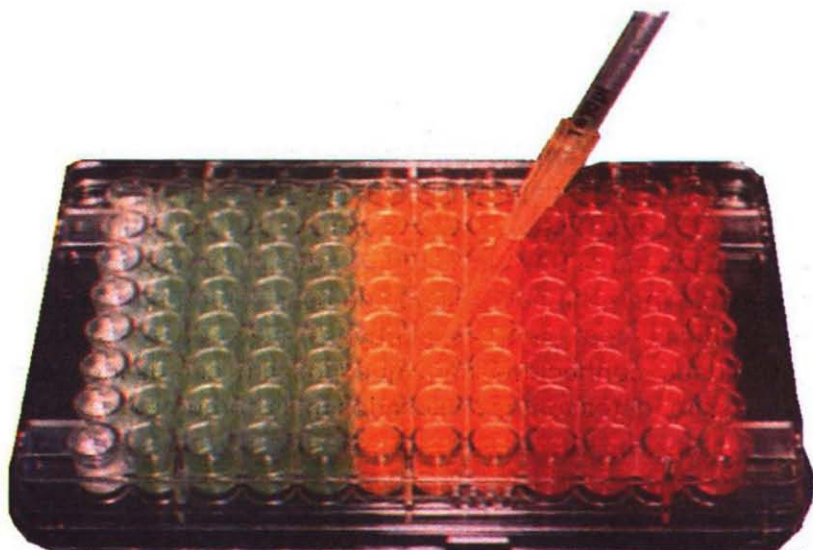


Figura 3. Placa de 96 poços, impregnada com diferentes produtos onde são depositados ovos de nematódeos.

3. Teste com necropsia

O uso de necropsia de grupos de animais medicados com diferentes drogas e a inclusão de um lote não medicado serve para confirmar os resultados dos testes de redução de opg e in vitro. Devido ao alto custo deste tipo de avaliação isto normalmente não é realizado com exceção de casos especiais quando a confirmação da resistência é requerida.

Conclusão

Para fins de diagnóstico, o método da redução de opg é o mais apropriado para exame de rebanhos suspeitos de terem resistência anti-helmíntica bem como ferramenta de monitoramento de programas de controle de verminose.

Suporte bibliográfico

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R. Taylor, M. A. & Waller, P.J. 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.

Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin no. 18, London, UK. 1979

Powers, K.G., Wood, I.B., Eckert, J., Gibson, T. and Smith, H.J. 1982. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) - Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Veterinary Parasitology* 10: 265-284.

Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A, Reinecke, R.K., Slocombe, O, Taylor, S.M. and Vercruyse, J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 58:181-213.

Ueno, H. & Gonçalves, P.C. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4ª Edição. JICA; Salvador, 143p.

Anexo 1

GUIA DE CAMPO

Contactando o produtor

Uma vez localizado o produtor deve-se tentar marcar a 1ª visita o mais rápido possível. Entretanto, deve-se perguntar ao produtor quanto tempo faz que medicou os animais. É importante que os animais não tenham sido medicados nas últimas 6 semanas. Se os animais foram medicados a menos de 6 semanas, é bom já deixar marcada a visita para tão logo esse tempo tenha sido ultrapassado.

Atenção - peça ao produtor para trazer os animais para a mangueira só depois da chegada do técnico à propriedade, caso contrário muitos animais já terão defecado e não será possível coletar o material de muitos cordeiros (o criador poderá deixar os animais num piquete para esperar pelo técnico, mas nunca na mangueira!).

Padronização e pesagem dos animais

Deve-se, em primeiro lugar, eliminar alguns animais que destoem do lote por serem muito grandes/pesados ou pelo inverso pequenos e leves. Animais doentes também devem ser eliminados.

A seguir deve-se escolher o animal mais pesado (depois de ter eliminado os extremos) para ser calculada a dose de produto a ser aplicado. Para ovinos e caprinos pode-se usar uma balança de uso doméstico (Figura 4). Após a colocação da balança num local plano, deve-se tomar o peso da pessoa que estiver nos ajudando e a seguir o peso do auxiliar com o cordeiro em seus braços. A diferença será o peso do animal.



Figura 4. Emprego de balança doméstica para pesar pequenos ruminantes.

Marcando os grupos de animais

Uma vez padronizado o lote de animais deve-se embretá-los e iniciar a formação dos lotes.

Os primeiros 10 animais serão marcados com tinta, por exemplo, vermelha na cabeça - lote controle. O segundo lote de 10 animais - marcados com Tinta azul nas cruzes - lote Valbazen e assim por diante. Para melhor visualização veja a tabela abaixo (exemplo para ovinos e caprinos).

LOTE	NO. ANIM.	TINTA	TRATAMENTO*	Dose 1ml: ?kg
1	10	Vermelho/cabeça	Controle	-
2	10	Azul/cruzes	Valbazen	1ml:5kg
3	10	Azul/anca	Ripercol	1ml:10kg
4	10	Verde/cabeça	Ivomec	1ml:4kg
5	10	Amarelo/cabeça	Closantel	1ml:10kg

*Estes produtos representam quatro grupos químicos: benzimidazole, levamisole, ivermectin e closantel, respectivamente. Outros produtos, dentro de cada grupo, poderá ser usado em substituição aos deste exemplo.



Figura 5. Exemplo de anti-helmínticos, representando quatro diferentes grupos químicos, em um kit de avaliação

Dosificação

O produto Valbazen (albendazole suspensão) deverá ser agitado fortemente antes do uso (os demais produtos não precisam ser agitados).

Depois de marcar o primeiro lote de 10 animais (lote controle, não medicado) passa-se a marcar o segundo lote e os 10 animais desse lote serão medicados com Valbazen. Este procedimento repete-se para cada lote, apenas mudando a cor e o medicamento, conforme a tabela acima. No caso da combinação Ripercol + Valbazen (levamisole + benzimidazole), primeiro administra-se uma droga e depois a outra; sempre usando seringas diferentes.

O kit de trabalho deve conter uma embalagem de cada produto (cada embalagem tem uma tabela com as dosagens conforme o peso). Coloque apenas um pouco do produto em um pequeno frasco (por ex. copinhos de cafézinho) e com as seringas descartáveis vá enchendo-as e medicando os animais. Não devolva o produto que sobrou para a embalagem de origem. Tenha cuidado para que os animais não mordam o aparelho, caso isto aconteça

pegue uma nova seringa. As seringas utilizadas são descartadas após o uso em cada propriedade.

A tabela acima é apenas sugestiva podendo ser incluídos/excluídos produtos conforme a necessidade técnica.

Questionário

Durante a primeira visita deve-se preencher o questionário anexo. Se o proprietário não estiver presente procure obter as informações do funcionário encarregado. Todas as informações devem ser tratadas em sigilo e em hipótese alguma serão mencionados os nomes dos produtores que colaborarem neste projeto em estudos de levantamento.

Segunda visita

Ao final da primeira visita deve-se combinar com o proprietário e/o funcionário a segunda visita 10 dias após. Nesta segunda visita iremos coletar fezes de todos os animais marcados usando os saquinhos plásticos. Cada lote de amostras (cada tratamento) deve ser colocado num saco plástico maior e identificado conforme a cor ou o tratamento. Não esqueça de pedir que os animais só sejam colocados na mangueira depois da sua chegada!

Nesta segunda visita aproveitamos para dosificar os animais do lote controle, não medicados na 1ª visita (tinta vermelha na cabeça).

Avise o proprietário que tão logo fiquem prontos os resultados das culturas de larvas ele receberá um relatório da atividade das diferentes drogas em seu rebanho.

Conservação e remessa do material

Uma vez concluída a coleta, acondicione os diversos sacos devidamente identificados que contém as amostras dos vários grupos, numa caixa de isopor com a respectiva identificação e com o questionário preenchido. Antes de atar a boca do saco, procure retirar o excesso de ar de cada embalagem.

Procure remeter o material para o laboratório o mais rápido possível. Não esqueça de colocar gelo ou "termo gel" GELADAS em cada caixa de isopor. Não deixe o seu carro com o material no sol!

Resultado do exame

O material será processado para opg e cultura de larvas tão logo chegue ao laboratório. A leitura das culturas deverá estar pronta após 10 dias e uma carta contendo os resultados será enviada ao produtor, via o técnico que fez a coleta. Nessa carta serão listados os produtos comerciais ainda eficazes bem como aqueles que apresentem problemas.

KIT DE CAMPO

- 1 Caixas de isopor
- 4 Embalagens de gelo reciclável "termo gel"
- 1 Fita adesiva (para lacrar cx. isopor)
- 6 Pacotes c/ saco plástico pequeno p/ coleta de fezes
- 6 Sacos plásticos grandes, já marcados para cada lote
- 1 Tabela de tratamentos
- 1 Tinta vermelha
- 1 Tinta azul
- 1 Tinta amarela
- 1 Tinta verde
- 10 Seringas 10ml
- 10 Seringas 5 ml
- 1 Balança de banheiro
- 9 Valbazen*
- 1l Ripercol oral *
- 1l Closantel*
- 1l Ivomec*
- 1 Questionário
- 6 Copos para cafézinho

* Representam quatro grupos químicos diferentes (i.é. benzimidazole, levamisole, closantel e ivermectin podem ser substituídos por outros, dentro do mesmo grupo.

Volume de produto a ser aplicado a cada animal, conforme peso e medicamento.

Peso dos animais (KG)	Valbazen	Ripercol	Ivomec	Closantel
	Pó	Oral	Oral	Oral
Dose aplicada (ml)				
15	3	1,5	4	1,5
16	3	1,7	4	1,5
17	4	1,7	4	1,7
18	4	2	5	1,8
19	4	2	5	2
20	4	2	5	2
21	4	2	5	2
22	5	2	6	2,2
23	5	2,3	6	2,3
24	5	2,5	6	2,5
25	5	2,5	6	2,5
26	5	2,5	7	2,5
27	6	2,7	7	2,7
28	6	2,7	7	2,8
29	6	3	7	3
30	6	3	8	3
31	6	3	8	3,0
32	7	3,3	8	3,2
33	7	3,3	8	3,3
34	7	3,5	9	3,4
35	7	3,5	9	3,5
36	7	3,5	9	3,6
37	8	3,7	9	3,7
38	8	3,7	10	3,8
39	8	4	10	4
40	8	4	10	4
41	8	4	10	4
42	9	4,3	11	4,2
43	9	4,3	11	4,3
44	9	4,5	11	4,4
45	10	4,5	11	4,5

Este é um exemplo para ovinos e deve ser modificado conforme os produtos usados e a espécie animal

Nº:

**RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM PARASITOS
GASTROINTESTINAIS DE OVINOS, CAPRINOS OU BOVINOS
PREENCHER NA 1ª VISITA**

Nome do produtor:

Estabelecimento: Nome:

Área:

Localidade (distrito e cidade):

População animal:

Total de ovinos: Raça:

Borregos dente de leite:

Ovelhas de cria:

Capões:

Carneiros:

Total de caprinos: Raça:

Borregos dente de leite:

Fêmeas de cria:

Reprodutores:

Total de bovinos:

Total de equinos:

Hoje, no potreiro dos borregos dente de leite que outras categorias animais também estão lá?

Vermífugos:

Quando foi a última dose? Qual o produto usado?

Quais os produtos mais utilizados nos últimos 5 anos?

.....

Na sua opinião, nos últimos anos a eficácia do vermífugos tem:

Melhorado:..... Piorado: Permanecido a mesma

Tratamentos anti-helmínticos:

Cordeiros: N° de tratamentos/ano:

Épocas:

J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D

Ovelhas: N° de tratamentos/ano:

Épocas:

J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D

=====

Data:/...../..... Técnico:.....

Obs: 1- cordeiro pesado:kg

Anexo 2

Exemplo de análise

Controle	OPG 10 dias após o tratamento			
	T1	T2	T3	T4
945	28	30	0	210
465	26	0	45	15
255	25	0	0	150
170	30	0	0	200
330	27	0	10	60
650	28	0	0	170
750	29	10	0	400
520	31	0	40	180

Animais p/ grupo = n_i ($N = \sum n_i$)	15	15	15	15	15
Média aritmética \bar{X}_i $\bar{X}_i = \sum X_{ij} / n_i$	456	28	16	9	207
Variança das contagens $S^2_i = (\sum_j X_{ij}^2 - (\sum X_{ij})^2 / n_i) / (n_i - 1)$	63873	5	2654	253	17413
Porcentagem de redução % $R = 100(1 - \bar{X}_t / \bar{X}_c)$	0	94	96	98	55
Variança da redução (escala log) $Y^2 = S^2_t / n_t \bar{X}_t + S^2_c / n_c \bar{X}_c$		0.02	0.71	0.21	0.05
Intervalo de confiança 95%					
Limite superior $100[1 - X_t / X_c \exp(-2.048 \sqrt{Y^2})]$		95	99	99	71
Limite inferior $100[1 - \bar{X}_t / \bar{X}_c \exp(+2.048 \sqrt{Y^2})]$		92	80	95	29

Onde i significa os grupos tratado (t) ou controle não medicado (c), j significa cada ovino no grupo e S^2_i representa a variância na escala aritmética.

Com os exemplos acima, T1 e T2 seriam suspeitos de resistência enquanto o T3 seria sensível e o T4 resistente.

O cálculo da média e variância pode ser feito na maioria das calculadoras. A análise pode ser feita em qualquer planilha eletrônica (um exemplo pronto pode ser obtido de echevarr@cppsul.embrapa.br)