

# Eficacitatea doramectinei împotriva larvelor muștelor *Hypoderma bovis*

HENDRICKX M.O., ANDERSON L., BOULARD C.\*, SMITH D.G., WEATHERLEY A.J.

Pfizer Central Research, Sandwich, Marea Britanie

\* I.N.R.A. Tours, Franța

**REZUMAT.** Eficacitatea doramectinei în tratamentul infestației naturale a bovinelor cu larve de *Hypoderma bovis* în stadiul I, II sau III, a fost determinată prin 2 studii realizate în Burgundia (Franța). În primul studiu, s-a efectuat tratamentul bovinelor din șase ferme, cu infecție cunoscută cu *Hypoderma bovis*, în decursul lunii octombrie. S-a utilizat fie doramectină în doză de 200 μg/kg masă vie (186 animale), fie un volum echivalent de ser fiziologic (157 animale), acesta fiind lotul martor. În timpul lunilor următoare, martie și aprilie, toate animalele au fost examinate pentru depistarea prezenței nodulilor. Într-un al doilea studiu, bovinele din 4 ferme, care aveau noduli pe spate, au fost tratate, în timpul lunii martie 1990, fie cu doramectină, fie cu ser fiziologic, ca în studiul precedent. Viabilitatea larvelor din fiecare nodul, la toate animalele, a fost evaluată tot la 2 zile, timp de 14 zile. În primul studiu, nici un nodul nu a fost depistat pe animalele tratate cu doramectină, iar pe cele tratate cu ser fiziologic s-au găsit 135 de noduli. În al doilea studiu, toate larvele din nodulii de pe spatele bovinelor tratate cu doramectină au murit până în ziua a 14-a după tratament și au fost găsite larve viabile în nodulii de pe spatele vacilor tratate cu ser fiziologic. Nu s-a observat nici o reacție adversă la doramectină în timpul experimentului. S-a tras concluzia că doramectina este deopotrivă sigură și eficace 100% în tratamentul tuturor stadiilor infestației cu *H. bovis* la bovine.

## INTRODUCERE

Muștele care produc noduli (*H. bovis* și *H. lineatum*) sunt paraziți importanți ai bovinelor în emisfera nordică, între 25° și 60° latitudine. Bovinele sunt singurele gazde normale ale acestor paraziți, deși, ocazional, s-au găsit larve și la cabaline, ovine și om (Soulsby, 1982). Pierderile economice pot fi în principal atribuite larvelor migratoare, care perforează pielea (Andrews, 1978). Această infestație necesită ajustarea carcasei și determină scăderea calității cărnii și imposibilitatea utilizării pielii animalului. În plus, aceste bovine infestate pot fi mai susceptibile la infecții bacteriene, virale și parazitare, datorită proprietăților imunosupresive ale enzimelor produse de larvele de stadiul I (Boulard și Bencharif, 1984; Boulard, 1989; Chabaudie și Boulard, 1992), iar vițeeii infestați cu larve pot prezenta scăderea ratei de creștere. Larvele de *Hypoderma* sunt sensibile la insecticide sistemice (ex. organofosforice și avermectină), care au fost utilizate cu succes în

eradicarea aproape completă a acestor muște în U.K., Scandinavia, Danemarca, Olanda, regiuni ale Franței și Germania (Macchioni, 1987; Lonneux *et al.*, 1991). Doramectina (Dectomax<sup>TM</sup>, Pfizer), o nouă avermectină, este un insecticid cu spectru larg, care s-a dovedit a fi foarte eficient asupra diferitelor specii de nematode, păduchi și căpușe la bovine (în doză de 200 μg/kilocorp) (Jones *et al.*, 1993; Logan *et al.*, 1993). Prezenta lucrare descrie 2 studii menite să determine eficacitatea acestei doze de doramectină în tratamentul infestației natural dobândite cu larve de *Hypoderma spp.* în diferite stadii de dezvoltare.

## MATERIALE ȘI METODE

### Locurile de studiu

Locurile în care aceste studii au fost efectuate erau ferme comerciale din regiunea Burgundiei (Franța) unde s-a înregistrat o incidență crescută a infecției cu *Hypoderma spp.*, dar nu exista un

program regional de eradicare. Fermele au fost selectate în urma confirmării infecției existente și netratate în primăvara și vara aceluși an (1989), când a început primul studiu.

## **Animale**

Bovinele din ambele studii erau predominant din speciile Charolais și metis Charolais, cu vârsta cuprinsă între 6 și 24 de luni. Animalele au fost scoase la pășunat permanent în timpul perioadei de activitate a *Hypodermei*, pentru realizarea riscului maxim de infestare naturală. Toamna, bovinele au fost aduse acasă.

## **Modelul experimental**

### ***Studiul I. Evaluarea eficacității împotriva primului stadiu al infestației***

În octombrie 1989, când larvele de *Hypoderma* erau în primul stadiu de dezvoltare, vacile din cele șase ferme au fost repartizate la una din cele două grupe de tratament (doramectin sau soluție salină), în funcție de greutate și sex. În ziua repartizării (ziua 0), de la fiecare animal s-a luat câte o probă de sânge, pentru determinarea anticorpilor anti-*Hypoderma*. Apoi au fost efectuate tratamentele: 186 de vaci au primit doramectină s.c. în doză de 200 μg/kilocorp, iar 157 de vaci au primit (tot s.c.) ser fiziologic în doză de 1 ml/50 kg. În continuare, vacile au fost observate la intervale regulate până ce nodulii au fost palpabili la majoritatea celor din grupul tratat cu ser. În zilele 161 și 190, a fost înregistrat numărul nodulilor de pe fiecare animal. La fiecare fermă, au fost colectate larvele de la 3-5 vaci, pentru identificarea speciilor.

### ***Studiul II. Evaluarea eficacității împotriva stadiilor II și III ale infecției***

Bovinele din 4 ferme au fost supravegheate, pentru observarea apariției nodulilor, din ianuarie 1990. Nodulii au fost găsiți în februarie, iar studiul a fost început în martie, când toate animalele aveau noduli, conținând larve în stadiile II și III. Aceeași procedură s-a aplicat în toate cele 4 ferme. La începutul fiecărui studiu (ziua 0), a fost notată poziția fiecărui nodul de pe spatele fiecărui animal. Un nodul a fost clasificat ca și conținând o larvă viabilă dacă era ferm la palpare și dacă era prezent un orificiu respirator

(prin piele), prin care la o examinare atentă puteau fi văzute spiralele larvare. Nodulul a fost clasificat ca fiind fără larvă, sau conținând o larvă moartă/în rezorbție, dacă era moale, iar orificiul respirator era astupat, sau dacă nu se puteau vedea spiralele larvare. Observații ulterioare au fost utilizate pentru confirmarea acestei clasificări deoarece unii noduli au dispărut în cursul studiului. Animalele au fost cântărite și repartizate aleator uneia din cele două grupe de tratament (doramectină sau ser fiziologic).

De asemenea, în fiecare fermă, au fost extrase larvele din nodulii a 3-5 vaci neincluse în studiu și a fost identificat stadiul evolutiv și specia căreia îi aparțineau. În ziua 0, 47 de vaci au primit doramectină, iar 30 ser fiziologic, folosind aceleași doze și căi de administrare ca și în primul studiu. Apoi, fiecare nodul cartografiat, de pe fiecare animal, a fost observat în zile alternative, până în ziua 14, pentru depistarea prezenței larvelor viabile. Pentru nodulii care conțineau larve viabile la începutul studiului, au fost folosite diverse criterii pentru a face posibilă determinarea soartei fiecărei larve. Larvele care au fost identificate ca viabile, dar care nu au mai fost găsite în nodulul lor la următoarea observație, a fost considerat că au eclozionat pentru stadiul de pupă. În aceste cazuri, ecloziunea a putut fi confirmată datorită transformării porului respirator într-o rană largă (până la 0,5 cm diametru). O larvă a fost considerată ca fiind moartă "in situ" dacă la o mică presiune pe nodul rezulta o larvă flască, zdrobită, sau dacă o larvă insuficient de matură pentru a deveni pupă (ex. stadiul II sau stadiul III timpuriu) era văzută ieșind prin porul respirator. De asemenea, vindecarea deasupra porului respirator, fără lărgirea datorată eclozionării, împreună cu aplatizarea nodulului era considerată ca indici pentru moartea și resorbția larvei. În ziua 14, a fost înregistrată apariția de noi noduli. Atât cât a fost posibil, toate larvele viabile au fost extrase din noduli și identificate.

## **Tehnicile parazitologice**

Nodulii din piele și țesutul subcutanat, determinați de larvele de *Hypoderma*, au fost identificați prin palpare și observarea porului respirator larvar. Larvele au fost extrase din noduli prin injectare de apă oxigenată, așa cum

au descris Scholl și Barrett (1986). Stadiul de dezvoltare și specia larvelor exprimate au fost identificate utilizând criteriile publicate (James, 1947; Zumpt, 1961). Doar la larvele intacte după colectare au fost identificate speciile cărora le aparțineau.

### **Răspunsul imun cu Ac anti-*Hypoderma***

La începutul studiului I, răspunsul cu IgG la larvele de *Hypoderma* a fost determinat în probe de ser de la fiecare animal, prin testul ELISA. A fost utilizat un extract solubil de *Hypoderma lineatum*, compus din hypodermin C (Boulard, 1985; Boulard și Villejoubert, 1991). În fiecare plăcuță pentru microtitrare au fost puse seruri standard pozitive (Poz) și negative (Neg).

Rezultatele au fost exprimate în procente, utilizând următoarea formulă:

$$\text{titrul Ac} = (\text{Proba OD} - \text{Ser Neg OD}) / (\text{Ser Poz OD} - \text{Ser Neg OD}) \times 100$$

unde OD reprezintă densitatea optică pentru fiecare probă. Animalele cu titrul Ac anti-*Hypoderma* de peste 17% au fost considerate ca având imunitate la larvele de *Hypoderma spp.* Această valoare prag a fost obținută din media ( $\pm 3\text{QD}$ ) probelor de ser standard Neg.

### **Analize statistice**

#### ***Numărătoarea nodulilor***

În studiul I, diferențele de tratament dintre animalele cu și fără noduli, din fiecare zi de evaluare au fost comparate utilizând examenul clinic.

În studiul II, larvele moarte și cele care au eclozionat înainte de tratament (ziua 0) au fost

excluse din analize. Analiza varianței a fost utilizată pentru determinarea diferenței numerelor medii de noduli larvari viabili per animal (la ziua 0), între cele două grupe de tratament. Analiza varianței cu ajutorul unui split-pot, a fost, de asemenea, utilizată la determinarea diferenței procentelor medii de larve moarte, dintre grupele de tratament, în fiecare zi de evaluare (zilele 2-14).

### ***Titrurile Ac***

O distribuție cumulativă a frecvențelor titrurilor a fost utilizată la determinarea proporției de animale care prezentau răspuns imun. Analiza varianței a fost utilizată la determinarea diferenței valorilor medii a titrului Ac (în ziua 0), între cele două grupe de tratament.

## **REZULTATE**

### **Larvele**

Toate larvele înregistrate au fost identificate ca aparținând speciei *Hypoderma bovis*.

### **Răspunsul imun cu Ac anti-*Hypoderma***

În studiul I, 113 vaci din grupul tratat cu ser fiziologic și 141 din cel tratat cu doramectină aveau răspuns imun la *Hypoderma* (Tabel 1). Titrul mediu al Ac anti-*Hypoderma* a fost 35,7 la grupul martor și 37,8 la grupul tratat cu doramectină. Aceste valori medii nu erau semnificativ diferite, ceea ce susține prezumția făcută privind eficacitatea tratamentului, arătând că extensia infestației cu *Hypoderma* la începutul studiului a fost similară la cele două grupuri.

**Tabel 1**

Titrurile Ac anti-*Hypoderma* la bovine (studiul I)

<b>Tratament</b>	<b>Mărimea grupului</b>	<b>Nr. animale cu titru pozitiv</b>	<b>Titru Ac - media</b>	<b>Titru Ac - limite</b>	<b>Valoare P</b>
Netratat	154	113	35,7	0-150	-
Doramectină	185	141	37,8	0-124	0,4674

## Numărătoarea nodurilor

În studiul I, între ziua 0 și ziua 161, un animal din grupul tratat cu doramectină și 3 din cel martor au murit, din cauze independente de tratament și au fost excluse din studiu. În zilele 161 și 190, nici un nodul nu a fost prezent pe nici un animal tratat cu doramectină, pe când, din 154 de vaci martor, pe 124 s-au găsit noduli în ziua 161 și pe 134 în ziua 190. Eficacitatea doramectinei (procentul animalelor fără noduli după tratament) a fost de 100% (Tabel 2). În grupul animalelor tratate cu ser, numărul mediu de noduli per animal infestat a crescut de la 11 (ziua 161) la 17 (ziua 190), cu limitele de 1-66. Numărul larvelor aflate în stadiul III de dezvoltare a crescut de la 59% (ziua 161) la 72% (ziua 190), indicând faptul că larvele de pe animalele din grupul martor au continuat să migreze și că exista un nivel ridicat al infestației la aceste vaci. Dintre larvele exprimate, 99% erau intacte și au fost identificate ca aparținând sp. *Hypoderma bovis*, în stadiile II și III.

În studiul II, numărul mediu de noduli cu larve vii, per animal, în ziua 0 (ziua aplicării

tratamentului), era 19,1 la grupul tratat și 18,3 la grupul martor, în limite de 1-67, la ambele grupe (Tabel 3). În grupul tratat cu doramectină, numărul larvelor vii a scăzut, odată cu creșterea corespunzătoare a numărului larvelor moarte. În acest grup, toate cele 896 de larve observate în ziua 0 au fost moarte până în ziua 14 și nici o larvă nu a eclozionat. În grupul tratat cu ser fiziologic, din ziua 14, majoritatea larvelor erau fie viabile (13,2 larve/animal), fie eclozionaseră (3,8 larve/animal), iar un număr scăzut muriseră "in situ". Procentul larvelor moarte per animal a fost semnificativ mai mare în grupul tratat cu doramectină, decât în cel martor, începând cu ziua 6 ( $p < 0,0001$ ). În grupul martor, numărul total de larve viabile "in situ" în ziua 0 era 548, iar în ziua 14 era 397. În ziua 14, numărul total de larve eclozionate era 114, iar numărul total de larve moarte era 37. Între zilele 0 și 14 au mai apărut 34 de noduli noi în grupul martor. Toate larvele exprimate în zilele 0 și 14 au fost identificate ca fiind stadiile II și III ale speciei *Hypoderma bovis*. Nici un nodul nou nu a fost observat pe nici un animal tratat cu doramectină. Nici o reacție adversă nu s-a înregistrat la nici un animal din nici un studiu.

**Tabel 2**

Eficacitatea doramectinei împotriva primului stadiu larvar al *H. bovis* - numărătoarea nodurilor la bovine

Tratament	Nr. animale	Nr. animale cu noduli în orice zi	Nr. mediu de noduli ziua 161	Nr. mediu de noduli ziua 190	Limitele	Valoare P	Eficacitate (%)
Netratat	154	134	11	17	1-66		
Doramectină	185	0	0	0	0-0	<0,001	100,0

**Tabel 3**

Eficacitatea doramectinei împotriva celui de-al doilea stadiu larvar al *H. bovis* - soarta larvelor în nodulii cartografiți începând cu ziua 0

Tratament	Nr. animale	Noduli cu larve variabile în ziua 0			Noduli cu larve moarte în ziua 14	
		total	media	limite	total	media
netratat	30	548	18,3	2-67	37	1,2
doramectină	47	896	19,1	1-63	896	19,1

Tratament	Nr. animale	Noduli cu larve vii în ziua 14		Noduli fără larve în ziua 14		Procentul mediu al larvelor moarte
		total	media	total	media	
netratat	30	397	13,2	114	3,8	21,4
doramectină	47	0	0,0	0	0,0	100

## DISCUȚII

Aceste studii au fost realizate în zona Burgundiei (Franța), unde nu se derula nici o campanie de eradicare în acea perioadă (1989-1990). Cirezile erau masiv infestate, de obicei cu peste 80% dintre vaci afectate (E. Hammard - comunicat personal, 1989). În cadrul oricărei arii geografice bine definite, perioada în care majoritatea nodulilor larvari sunt prezenți pe spatele vacilor infestate variază de la an la an, în funcție de climat (Tarry, 1980; Boulard, 1988a). În Burgundia, această perioadă durează, de obicei, 2 luni. Pentru a asigura o apreciere corectă a infestației și pentru a permite estimarea semnificativă a eficacității terapeutice a doramectinei, numărătoarea nodulilor a fost programată să coincidă cu perioada maximă de dezvoltare a acestora. Astfel, în ambele studii a fost lăsat un interval de 6 săptămâni de la prima apariție a nodulilor (la începutul lui februarie). În primul studiu, răspunsul imun al animalelor martor a sugerat că un număr minim de 113 vaci a fost infestat cu larve. De fapt, 134 de vaci din grup au arătat semne ale infestației. Subestimarea numărului actual al animalelor infestate se datorează faptului că nu în toate cazurile titrul Ac a avut un vârf. Oricum, valoarea prezisă a testului a fost confirmată, validând prezumția că 141 de vaci din grupul tratat cu doramectină ar fi avut semne ale infestației cu larve, dacă nu ar fi fost tratate.

Din punct de vedere istoric, tratamentul nodulilor larvari (în particular cu insecticide organofosforice) a fost asociat cu diferite reacții adverse post-terapeutice. Aceste reacții erau cauzate de 2 factori: toxicitatea în sine a compușilor (datorită activității anticolinesterazice a acestor insecticide) și moartea subită a larvelor (care determina eliberarea de Ag și toxine în țesuturile animalelor infestate). Aceste Ag și toxine au proprietăți inflamatorii foarte puternice, putând produce reacții toxice și anafilactice generale și posibil letale (Boulard, 1979; Eyre, 1981). Dacă larvele în stadiul I sunt ucise în localizările lor specifice de hibernare (pereții esofagieni la *H. lineatum* și canalul spinal la *H. bovis*), inflamația locală rezultată poate produce simptome de disfagie și edem esofagian, respectiv ataxie sau paralizia trenului posterior (Andrews, 1978; Boulard, 1988b). Perioada de risc maxim pentru aceste reacții adverse locale sau sistemice corespunde

perioadei în care majoritatea larvelor de stadiul I se găsesc în locurile lor de hibernare. Această perioadă variază în diferiți ani, în funcție de climă și de localizare geografică.

În Franța, pentru a cuprinde toate aceste variații, este recomandat a se trata animalele înainte de jumătatea lunii noiembrie, sau după jumătatea lunii februarie. Reacții adverse ocazionale pot apărea și în afara perioadei de risc maxim, mai ales la vacile intens infestate. În studiile prezentate aici, toate animalele au fost tratate în afara perioadei de risc maxim. În ciuda infestării masive în ambele studii, la nici un animal nu a fost observat vreun semn clinic care să poată fi atribuit larvelor moarte sau tratamentului cu doramectină. Aceasta se poate explica prin mecanismul de acțiune a doramectinei, comparabil cu cel al avermectinei și moxidectinei (Scholl *et al.*, 1992). Avermectina paralizază artropodele, prin creșterea conductanței Cl<sup>-</sup>, rezultând paralizie progresivă și apoi moartea (Fisher și Mrozik, 1992). Datorită acestui mod de acțiune, larvele sunt ucise încet, în câteva zile, evitând astfel eliberarea bruscă a toxinelor larvare, care apare după tratamentul cu insecticide organofosforice (Boulard, 1979). Compușii organofosforici triclorphon și fenthoin au dovedit o eficacitate împotriva primului stadiu larvar de 90-100% și respectiv 80-99%, în cadrul tratamentelor de toamnă. Eficacitățile au fost mai scăzute în cadrul tratamentelor de primăvară, când larvele se aflau în stadiile II și III (Hamel, 1984). Eficacitatea avermectinei s-a dovedit a fi de 100% împotriva primului stadiu larvar și de cca. 99% împotriva stadiilor II și III (Alva Valdez *et al.*, 1986). Rezultatele prezentate aici au demonstrat clar că doramectina este 100% eficace în tratamentul infecției naturale cu larve de *Hypoderma bovis* în toate stadiile de dezvoltare. În plus, absența oricărei reacții adverse în ambele studii, în ciuda nivelului ridicat al infestației, confirmă siguranța doramectinei în tratamentul corect programat și aplicat al infecției cu *Hypoderma*.

Eradicarea muștelor din genul *Hypoderma* a fost reușită într-o mare proporție în Danemarca, Irlanda, Scandinavia, Olanda, unele zone din Germania și Franța și în U.K. (Lonneux *et al.*, 1991). Succesul eradicării depinde de tratamentul larvicid efectiv și de prevenirea reinfestației din zonele vecine, ceea ce depinde de

implementarea totală a unor campanii obligatorii de eradicare atât pe plan regional, cât și pe plan național. Eficacitatea foarte ridicată a doramectinei o face potrivită utilizării ca tratament larvicid. Pe deasupra, administrarea doramectinei toamna, după ce muștele au devenit inactive, asigură uciderea larvelor de *Hypoderma*, înainte de a produce pagube în cireadă. De asemenea, în acest fel se vor putea folosi și proprietățile anihelmintice ale doramectinei (împotriva speciilor majore de nematode), precum și capacitatea de a inhiba stadiul IV larvar al *Ostertagia ostertagi* (Jones *et al.*, 1993).

## **SUMMARY**

### **Efficacy of doramectin against warble fly larvae (*Hypoderma bovis*)**

The efficacy of doramectin in the treatment of cattle harbouring naturally acquired infestations of first, second and third instar larvae of *Hypoderma bovis* was determined in two studies carried out in the Burgundy region of France. In the first study, cattle on six farms with a history of *H. bovis*

infestations were treated during October 1989 with either doramectin at a dose of 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  liveweight (186 animals) or with an equivalent volume of saline (157 animals). During the following March and April, all animals were examined for the presence of warbles. In the second study, cattle on four farms with warbles present in their backs were treated during March 1990, with either doramectin or saline (as before). The viability of larvae within each warble on all the animals was then assessed every 2 days for 14 days. In Study 1, no warbles were present in any of the doramectin-treated cattle at any time, whereas warbles were found in 135 saline-treated animals. In Study 2, all larvae in warbles on the backs of the doramectin-treated cattle were dead by Day 14 after treatment, whereas viable larvae were still present in warbles in the backs of all saline-treated cattle. No adverse reaction to doramectin treatment was observed in any animal at any time. It was concluded that doramectin is both safe and 100% efficacious in the treatment of first, second and third instar *H. bovis* infections of cattle.

*Traducere: Prof. dr. Vasile COZMA  
Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca*