

APROXIMACION PRACTICA DEL DIAGNOSTICO DISTOMATOSIS

Deewi Rowland¹

Jornadas de Buiatría. VI Uruguayas. III Latinoamericanas
7 al 10 de junio de 1978 - Paysandú, Uruguay

La fasciolosis o Distomatosis es, según creo, de gran importancia aquí en el Uruguay y si mi información es correcta entre el 50-60% de los hígados vacunos son decomisados anualmente. No conozco si el costo total de las pérdidas en la producción ha sido estimado pero en reciente estudio llevado a cabo en Inglaterra muestra que la fasciola hepática cuesta a los productores cerca del orden de 250 millones de libras esterlinas por año. Esta figura muestra no solo la mortalidad, y el decomiso de hígados sino también las pérdidas ocultas como la ineficiente conversión de alimentos, reducción del índice de crecimiento, baja producción de leche y lana y bajos índices de nacimientos.

La primera diapositiva (1) nos recordará cual puede ser el daño de la infección con *F. hepática*. Doce semanas antes que se tomara esta fotografía ambos animales pesaban lo mismo. Desde el tiempo de infección hasta que se tomó la fotografía, el animal del lado izquierdo perdió cerca del 35% del peso inicial.

Con pérdidas de esta magnitud, comunes a través de todo el mundo es pertinente cuestionarnos: Cómo podemos prevenir las?

¿ Es seguro que nuestro conocimiento en la epidemiología de la fasciolosis y en las drogas actualmente disponibles podrán permitirnos prevenir este descenso en la productividad del ganado?

La respuesta se basa en parte en nuestra inhabilidad para diagnosticar la presencia de la infección en una etapa suficientemente temprana.

Las técnicas de diagnóstico más comunes usadas hoy en día consisten en los exámenes fecales para la presencia de huevos y la comprobación clínica de anemia.

Desafortunadamente, en el tiempo que estos test puedan hacerse significativos, la mayoría, sino todos los daños han sido infringidos o al menos iniciados.

Lo que es necesario es un test específico sensitivo para detectar la presencia de formas inmaduras de manera que el control terapéutico pueda ayudar a minimizar los efectos de la infestación.

Como ayuda a este test sería necesario poseer una droga activa contra las etapas inmaduras. En 1971, nosotros en Wellcome (Cooper), desarrollamos la droga diamphenethide, el primero y hasta ahora el único fasciolicida con activi-

Dr Médico Veterinario M.S.C., Phd. Investigador de la Wellcome Foundation.

c.4/1

dad contra los estados inmaduros de *Fasciola* spp. desde tan temprano como el primer día después de la infección como podemos ver en la siguiente diapositiva (Nº 2). De hecho la droga es 100% efectiva contra toda forma juvenil como podemos ver aquí.

El descubrimiento del diamphenethide no solo nos provee un nuevo fasciolicida con ventajas prácticas obvias sino que también se presenta como una útil herramienta experimental como veremos más adelante.

Mientras tanto podemos disgregarnos un poco y echar un vistazo al desarrollo de la infestación por *Fasciola* spp.. En la próxima diapositiva, (Nº 3) vemos un modelo teórico de la infestación que podríamos esperar se desarrolle en un hato de ovinos en pasturas conocidas de ser altamente contaminadas con metacercarias. Cada semana que los ovinos permanezcan en la pastura ingerirán metacercarias infectivas.

Estas se desarrollarán en el hígado, posteriormente migran dentro de los conductos biliares y se vuelven adultas.

Por lo tanto existe una situación dinámica con el continuo suministro de metacercarias y el proceso continuo de desarrollo dentro del hígado. Esto implica que en el mismo tiempo se pueden encontrar en el hígado un amplio espectro de edades de fasciola, por ejemplo, 8 semanas después de la infección inicial las fasciolas pueden variar entre un día de edad hasta 8 semanas.

El control de la fasciolosis requiere romper con el ciclo de vida del parásito. Cuando el control se basa en la terapia antihelmíntica solamente, esto - infiere que no deberá permitirse que los huevos de fasciola lleguen a los pastos. *Fasciola hepática* comienza a producir huevos viables 9 semanas después de la infección; esta área amarilla representa el riesgo de contaminación de las pasturas como ocurre resultado de dicha infestación. En orden de prevenir esta contaminación los ovinos deberán dosificarse antes de la novena semana.- Otro requerimiento de cualquier programa de control es la habilidad de prevenir la enfermedad y la debilidad asociada. El riesgo de fasciolosis generalmente sube primero dentro de las 6-8 semanas después de la exposición a alto número de metacercarias infectivas. El aumento del riesgo de esta condición en este modelo teórico está representado por un sombreado rojo.

Para evitar la brusca irrupción de la enfermedad, la terapia fasciolicida debe administrarse antes de la sexta semana. En la próxima diapositiva (Nº 4) podemos ver el efecto sobre nuestro modelo teórico de la dosificación con diamphenethide tanto a intervalos de 8 semanas para prever la contaminación de las pasturas, área amarilla o a intervalos de 5 semanas para evitar la aparición de la enfermedad, zona o área roja.

Debido a la alta actividad de la droga contra las formas jóvenes y la consiguiente ausencia de cualquier población inmadura residual después del tratamiento posteriores contaminaciones en las pasturas, la incidencia de la enfermedad puede aparecer como consecuencia de la reinfección seguida al tratamiento.

Me disculpo de esta pequeña desviación, pero es importante apreciar la actividad del diamphenethide antes de discutir su rol como ayuda en el diagnóstico.

Nosotros en el Laboratorio de Investigaciones Wellcome hemos testado la hipótesis, que dosificaciones de rutina a intervalos de 5 semanas pueden evitar el desarrollo de la enfermedad aún en la etapa de una alta descarga de metacercarias y hemos examinado la utilidad de varios parámetros ortodoxos clínicos en detectar la presencia de la infección.

Las próximas diapositivas (Nos. 5-8) muestran algunos resultados de nuestros experimentos. Tres grupos (Nº 5) de ovinos fueron usados, dos de los cuales (representados en líneas azul y roja) fueron infectados con 150 metacercarias por semana durante 20 semanas con la esperanza de producir la enfermedad clínica. El grupo azul fue dosificado con diamphenethide 5 semanas después de la infección inicial y nuevamente a intervalos de 5 semanas como se muestra; el grupo rojo fue dejado sin tratar.

El tercer grupo (representado con línea verde) no fue tratado ni infectado, y por consiguiente actuó como absoluto control. Los resultados mostrados aquí detectan cambios en el peso corporal a través del período experimental. Durante las primeras 7 semanas, no se observaron diferencias en los grupos, pero luego el grupo sin tratamiento (rojo) mostró una marcada y progresiva pérdida

de peso hasta su muerte eventual 12 semanas después. El grupo tratado tratado (azul) no mostró dicha pérdida y permanecieron en una situación similar a los controles no infectados.

En la matanza no se encontró ninguna fasciola en ninguno de los ovinos tratados mientras que se recobró en examen post-mortem un promedio de 660 parásitos en el grupo sin tratamiento (rojo).

Se tomaron muestras de sangre de todos los ovinos a intervalos semanales durante toda la experiencia, y en las próximas tres diapositivas se muestran los resultados de hemoglobina, conteo de eritrocitos, y eritrosedimentación. El punto importante de notar es que en todos los casos los cambios marcados no comienzan hasta la séptima semana luego de la infección inicial y todos muestran un patrón similar al detectado aquí (diapositivas 6-8: -Hb, RBC, PCV).

Por consiguiente, ninguno de los parámetros clínicos ortodoxos pueden diagnosticar la presencia de la infección en las etapas lo suficientemente tempranas como para ayudar a prevenir la pérdida de peso, y el desarrollo de anemia, el síntoma más obvio de la enfermedad y se requiere un test de diagnóstico más sensitivo si tenemos una terapia preventiva.

Algunos investigadores han demostrado que los niveles plasmáticos de ciertas enzimas hepáticas del metabolismo intermediario se elevan como resultado de los daños hepáticos causados.

La más específica de estas enzimas indicando la injuria de las células del parénquima hepático, se ha demostrado que es la glutámico dehidrogenasa aquí referida como GDH.

La injuria de la célula hepática ocurre durante la migración de las formas inmaduras a través del parénquima hepático, en consecuencia este daño puede ser detectado por una elevación en el nivel de esta enzima en el plasma circulante.

Desde, como hemos visto la diamphenethide es activa contra las formas inmaduras parece razonable afirmar que si los niveles plasmáticos de GDH se elevan como resultado infligido por tales fasciolas entonces seguido a su eliminación de la droga, los niveles plasmáticos de la enzima deberán caer a un valor normal.

En la próxima diapositiva (Nº 9) vemos los cambios obtenidos en los niveles plásticos de GDH en los tres grupos de ovinos que hemos estado discutiendo. Primeramente, los controles no infectados (verde) muestran una situación algo errática, pero por lo tanto generalmente estable. Segundo, los bovinos infectados no tratados (rojo) en los cuales ocurrió una marcada elevación a las tres semanas después de la infección inicial, alcanzando un pico a las 8 semanas, y posteriormente cayendo cuando la primera ola de infección migró dentro de los conductos biliares. Los puntos significantes a anotar son que la actividad máxima fue obtenida en el tiempo que solo el primer signo de anormalidad fue exhibido en los parámetros hematológicos ortodoxos y que cuando medimos niveles de GDH la primera indicación de injuria hepática fue dada 5 semanas antes. Estos descubrimientos indican el valor de estas observaciones para la detección temprana de la injuria hepática.

Por otro lado, los cambios enzimáticos no pueden por ellos mismo determinar la etiología del daño. Es a este respecto que la diamphenethide juega su parte. Si observamos los niveles plasmáticos del GDH en el grupo tratado (azul) vemos que ocurre una elevación temprana en los niveles enzimáticos circulantes, como tuvo lugar en el grupo sin tratamiento, pero seguido al tratamiento los niveles de GDH caen rápidamente hasta cerca del valor normal al remover la población de fasciola inmadura. El aumento subsecuente en actividad resulta del daño infligido por la nueva población a actividad enzimática nuevamente cae a casi un valor normal. Este patrón de cambios es demostrado antes y después de cada dosis de diamphenethide. Estos resultados muestran que las medidas secuenciales de la actividad de GDH plasmática pueden dar una indicación temprana de la injuria hepática y que el uso de la diamphenethide agrega especificidad al test de manera que ninguna caída de la actividad enzimática puede ser esperada después de su uso a menos que se haya producido injuria infligida por fasciola.

Pareciera ser por tanto, que aquí por primera vez se han dado las bases para un test de diagnóstico razonablemente específico para la presencia de las formas inmaduras dentro del hígado en una etapa anterior que un daño serio irreparable fuera ocasionado.

Extendimos este trabajo al bovino y tenemos en primera instancia limitada nuestra atención a la consecuencia de una simple infección aislada. Nuevamente observamos los cambios de los niveles plasmáticos de GDH y en esta ocasión incluimos observaciones sobre cambios en el nivel de la enzima gamma glutamil transferasa, de aquí en adelante referida como GGT.

En el hígado esta enzima está casi enteramente asociada con el epitelio biliar y por consiguiente se pensó que actuaría como un buen marcador de la migración de formas inmaduras tardías dentro de los conductos biliares. En el primer experimento (diapositiva 10) cuatro grupos de bovinos fueron infectados con 650 metacercarias; un grupo fue dejado sin tratar, representado por estas líneas corridas en todos los casos, y los otros grupos fueron dosificados con diampfenethic a 3.5 o 7 semanas después de la infección. En este caso vemos el resultado de la dosificación a 3 semanas. Al igual que en los casos de ovinos, vemos un aumento temprano en el plasma de la actividad de GDH en ambos grupos, seguido de un pico a la 9a. semana en el grupo control no tratado, reflejando la migración de fasciola a través de un parénquima; luego la actividad enzimática decae como consecuencia del pasaje de las formas inmaduras dentro de los conductos biliares. Seguido a la dosificación a las 3 semanas la actividad enzimática decae al nivel preinfección sugiriendo la remoción de fasciola, pero otra vez se vuelve elevado y alcanza un pico a las 12 semanas, 3 semanas después de lo observado en el grupo sin tratar.

Esta elevación secundaria fue debida a la actividad de las fasciolas presentes en la cavidad peritoneal durante la dosificación y las cuales subsecuentemente penetraron en el hígado. El fenómeno de la retención de fasciolas en la cavidad peritoneal ha sido reportado antes en bovinos como ocurriendo por lo menos a las 5 semanas después de la infección. Si ahora observamos los cambios en la enzima GGT en el conducto liliar (línea negra) vemos que durante las primeras 7 semanas, cuando las fasciolas estaban en el parénquima no hubo aumento enzimático, pero después de la 7a. semana se observó un rápido aumento en el nivel enzimático circulante, asociado con el pasaje de las últimas fasciolas inmaduras un patrón similar pero exhibieron una posterior elevación que pudo ser explicado por el hecho que las fasciolas responsables del daño penetraron en el hígado después del tratamiento.

Fue observado en la autopsia una eficacia terapéutica del 63% como lo refleja el bajo pico de los valores de ambas enzimas. Sin embargo, si la hipótesis de la elevación secundaria de GDH y el posterior aumento en la actividad de GGT fueran debidas a la actividad de las fasciolas que penetraron al hígado solo después del tratamiento, entonces la eficacia de la droga fue probablemente cercana al 100% contra aquellas fasciolas que se encontraban en el hígado en el momento de la dosificación.

Si ahora vemos la próxima diapositiva (Nº 11) observamos los cambios seguidos a la dosificación 5 semanas después de la infección. Nuevamente la actividad GDH en el plasma, que ha demostrado un temprano aumento, muestra una marcada caída hacia los niveles de pre-infección después de la dosificación, indicando la eliminación de la población de las formas inmaduras. Se observó un subsecuente, aunque ligero aumento en actividad, probablemente debido a las actividades de la segunda "ola" de infección penetrando el hígado después del tratamiento. No ocurrió aumento en la actividad de GGT hasta 5 semanas después observada en el grupo no tratado, sugiriendo una vez más que la droga había matado aquellas fasciolas presentes en el hígado en el momento del tratamiento y que esta posterior elevación fue causada por la segunda ola de infección. En este momento fue obtenida una eficacia terapéutica de 83% sugiriendo que había en el hígado más fasciolas que en los casos donde la dosificación fue llevada a cabo de las 3 semanas. En la próxima diapositiva (Nº 12) vemos el efecto de la dosificación a las 7 semanas después de la infección. En esta ocasión la eficacia terapéutica fue del 92% en la autopsia. Luego de la caída que ocurre seguida a la dosificación hubo un pequeño aumento en la actividad de GDH y la actividad GGT permaneció cercana al nivel preinfección.

Estos factores sugieren que la vasta mayoría de las fasciolas desarrolladas a partir de la dosis infectante habían penetrado a la cápsula hepática en el momento del tratamiento y que dicho tratamiento había eliminado a la mayoría de ellas.

Además de las observaciones enzimáticas, posteriores pruebas de la retención de parte de la dosis infectante dentro de la cavidad peritoneal y su consecuente desarrollo fueron provistas por las fasciolas recobradas en la autopsia.

En el grupo control no tratado y en el grupo dosificado en la 7a. semana, - el 74% de las fasciolas recobradas medían más de 1.0 mm. de longitud, mientras que aquellas recobradas de los grupos dosificados a las 3 y 5 semanas= solo 38% y 51% respectivamente fueron mayores que 1.0 mm..

Estos resultados experimentales indican la sensibilidad de las medidas secuentes de niveles enzimáticos del plasma en determinar la presencia y curso de la infección con *Fasciola spp.*. Los resultados también sugieren que el tiempo óptimo de dosificación fue cercano a las 6 semanas después de la infección. En este período puede esperarse que la mayoría de las fasciolas hayan penetrado al hígado mientras que al mismo tiempo el hígado no ha sido expuesto a un gran daño como lo indican los estudios de las enzimas hepáticas.

Un segundo estudio fue establecido en el cual a dos grupos de bovinos les fueron administradas una única infección de 1000 metacercarias (diapositiva 13). Un grupo (línea azul) fue dosificado con diamphenethide 6 semanas después y ambos fueron comparados con un tercer grupo no infectado y no tratado (línea verde). Aquí vemos cambios en la actividad plasmática GDH mostrando la misma elevación temprana en ambos grupos infectados como se dio en experimentos anteriores. El tratamiento una vez más resultó en una marcada caída de la actividad enzimática y a pesar de que ocurrió en ligero aumento post tratamiento la actividad no excedió en ningún momento a la observada al dosificar. En forma similar (diapositiva N° 14) se puede ver que GGT muestra solo un moderado aumento en el grupo tratado a lo largo del experimento. Los animales en este estudio no fueron sacrificados pero los resultados del examen fecal (diapositiva N° 15) mostraron una buena indicación de eficacia del tratamiento. Los resultados muestran en esta diapositiva también el significativo avance de las mediciones de enzimas plasmáticas que van unidas al uso de la diafenetida representada en términos de diagnóstico. La primera indicación dada por el examen fecal fue en la 11a. semana, tiempo en el cual las fasciolas habían migrado a través del parénquima y pasado a los conductos biliares y habiendo infringido su mayor daño en este período.

Es bien conocido que los bovinos opuestamente a los ovinos son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria a *Fasciola spp.*. Esto está caracterizado por una repentina caída en la puesta de huevos por la fasciola 20 semanas después de la infección. Además, dosis infectivas subsiguientes fallan en establecerse, o si lo hacen, son frenadas en el parénquima por mucho más tiempo que el normal. Lo que no ha sido bien determinado es el estímulo exacto que inicia la respuesta y si es debido o no a la actividad de la fasciola inmadura o adulta.

Estamos actualmente trabajando para determinar el valor de este diagnóstico combinado enzimas hepáticas-diamfenetida en bovinos expuestos a repetidas reinfecciones en la esperanza que podamos traer luz a este problema y también ver si se puede llevar este test a una situación más real que la dada= solamente por una dosis infectiva.

Como técnica de diagnóstico este acercamiento parece ofrecer el más temprano y específico test para la presencia de *Fasciola spp.* y parecería ofrecer el mayor potencial en animales jóvenes no expuestos previamente a la infección. Acompañada por una terapia apropiada podría posiblemente formar la base de un accionamiento profiláctico a la distomatosis.

Aunque aún en la etapa experimental y por lo tanto de no mucho valor práctico inmediato, espero haberles dado algo "para continuar la batalla contra la fasciola y una visión de nuestras actividades actuales de investigación.