

TITULO: PRUEBA DEL ANILLO: UN METODO RAPIDO (CON SANGRE COMPLETA; PARA EL DIAGNOSTICO DE LA PASTEURELOSIS (Pasteurella multocida) PULMONAR DEL CERDO.

AUTORES: PEREZ, G.E., MUÑOZ, R.M., TORRES, A.O., AYALA, B.G., MENDOZA, E.S. Y CIPRIAN*, C.A.

INSTITUCION: COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FES-
CUAUTITLAN, UNAM.

AREA: SANIDAD ANIMAL.

INTRODUCCION

Experimentalmente es extremadamente difícil reproducir la pasteurelosis pulmonar en cerdos sanos, debido, por un lado a la capacidad del tracto respiratorio del cerdo, en remover rápidamente a Pasteurella multocida cuando es inhalada y por el otro a que P. multocida no puede colonizar y establecerse en el pulmón, a menos que exista antes un evento inmunosupresor, que usualmente es una infección con otro agente o la combinación de infección o tensión. Una gran proporción de animales tienen las fosas nasales colonizadas con P. multocida y la están inspirando constantemente, por lo que resulta evidente que solo desarrollaran la infección aquellos animales que tuvieron afectada su inmunidad pulmonar. Por lo tanto, gran parte del problema de la neumonía crónica gira alrededor de tener una mejor comprensión de los eventos inmunosupresores, y de aquellos que inducen tensión; eventos ya descritos por Pijoan (3), Morrison, Pijoan y cols. (2) y Ciprián, Pijoan y cols. (1). Es indudable que la presencia de P. multocida en los pulmones del cerdo, presume que durante las diversas etapas de producción, los animales se infectaron, ya sea porque hubo un evento inmunosupresor, un stress en el manejo o una infección por agentes primarios, tales como serian los virus o micoplasmas.

La literatura internacional no contempla el uso de técnicas serológicas, como herramienta en el diagnóstico Pasteurelosis pulmonar del cerdo dentro de una granja. Los únicos estudios solo esta encaminados a identificar anticuerpos infectantes de vacunados en Rinitis Atrófica, mediante la prueba de ELISA competitiva utilizando como antígeno una proteína de 143 Kd, los resultados muestran poca sensibilidad.

EL grupo de la Universidad de Minnesota, dirigido por el Dr. Carlos Pijoan han intentado recientemente dilucidar algunos aspectos de la epidemiología de P. multocida en cerdos, utilizan técnicas de biología molecular denominada "fingerprints" de DNA, en donde se identifican cepas individuales de P. multocida y las siguen dentro de una piara de cerdos. Los trabajos consistieron en aislar e identificar a P. multocida de una granja finalizadora. Las cepas recuperadas de esa granja resultaron pertenecer a 4 genotipos o patrones de restricción que denominaron "a", "b", "c" y "d". Los resultados sugirieron que las cepas de P. multocida genotipos "a" y "b" fueron muy similares y representaron cerca del 95% de los aislamientos de los pulmones neumónicos de la granja, por lo que en poblaciones cerradas se mueve en bloque una sola cepa de P. multocida responsable de la neumonía (4).

El empleo de la biología molecular es de gran impacto en el diagnóstico de las enfermedades del cerdo y otras especies

animales, sin embargo, este tipo de tecnología es aun limitada y muy costosa en nuestro país.

OBJETIVO

Evaluar una prueba rápida con sangre completa denominada prueba del anillo para diagnosticar la pasteurelisis pulmonar del cerdo.

MATERIALES Y METODOS

EXPERIMENTO I. En este primer estudio se utilizaron 10 cerdos SPF y cinco se vacunaron por vía intramuscular, con una bacterina de P. multocida tipo "A" en hidróxido de aluminio; se dejaron otros cinco cerdos como controles inoculados solo con medio de cultivo. Se tomaron muestras sanguíneas cada semana, antes y después del desafío con una cepa homóloga de P. multocida.

EXPERIMENTO II. Para la prueba tamiz de emplearon suero (y sangre completa) así como sus pulmones con las lesiones para el aislamiento bacteriológico. Los sueros y los pulmones se colectaron en el rastro. De esta forma se colectaron 146 pulmones con sus respectivos sueros. Los pulmones se clasificaron de acuerdo al tipo de lesión neumónica que presentaron: consolidación gris-roja (CGR); consolidación fibrino hemorrágica (CFH) y sin cambios patológicos aparentes (SCPA).

Aislamientos: A partir de las lesiones pulmonares se sembraron en agar BHI con 5% de sangre de bovino. A los aislamientos sospechosos se les realizaron pruebas bioquímicas. Para diferenciar las cepas de P. multocida tipo A y D se utilizó la prueba de descapsulación y acriflavina respectivamente.

Los sueros colectados de rastro, fueron probados con la prueba de aglutinación en placa, empleando antígeno específico elaborado con P. multocida tipo A y D; posteriormente, los mismos sueros de los animales colectados se mezclaron con eritrocitos de cerdo (colectada en solución de Alsevers de cerdos SPF del Centro Piloto del CENID-Microbiología Veterinaria del INIFAP) en el porcentaje adecuado, no sin antes de haber lavado tres veces los glóbulos rojos con PBS a pH 7.2, para después realizar la prueba del anillo con sangre completa.

En el método serológico rápido de la prueba del anillo, la muestra sanguínea de animales infectados se observa un anillo de color azul, en tanto que la muestra sanguínea de animales no infectados e incluso lo vacunados (con bacterinas de P. multocida inactivadas) no presentan el anillo. El método para comprobar si un cerdo se encuentra infectado con P. multocida, comprende los pasos de utilizar un reactivo con la pasteurela del tipo adecuado. Los resultados se someten a un método de interpretación cualitativa, en donde en las celdas de los animales infectados se formara un anillo azul de antígeno aglutinado que se hace aparente en la orilla de la mezcla en la misma celda de forma circular. En los animales vacunados con bacterinas o sanos se observara un anillo rojizo por el acúmulo de eritrocitos en la orilla de la mezcla.

RESULTADOS Y DISCUSION

EXPERIMENTO I. La prueba resulto negativa en todos los sueros tanto de animales vacunados como los controles. Solo fueron positivos y una semana después cuando se desafiaron con P. multocida (que fueron previamente desafiados con el virus de la enfermedad de Aujeszky).

EXPERIMENTO II. El 37% (54) de los pulmones presentaron lesiones tipo consolidación gris rojiza (CGR), el 33.6% (49) de las lesiones eran de tipo fibrinohemorrágico (CFH), el 29.5% (43) sin cambio patológico aparente (SCPA). En cuanto a los aislamientos se encontró en los pulmones con lesiones CGR, CFH y SCPA, bacterias como P. multocida y A. pleuropneumoniae y otros microorganismos no identificados. En la lesión CGR se obtuvo un mayor aislamiento de P. multocida, encontrándose los serotipos A y D. Con respecto a la serología de los 146 sueros se encontró un porcentaje del 37.8 de aglutinación para el serotipo A y un 22.6 de aglutinación del serotipo D; la correlación de los resultados obtenidos con el suero fueron similares con los obtenidos con la sangre completa. Existió una relación de aglutinación con ambos serotipos en el 13.7%. Se encontró que el comportamiento serológico fue similar entre los tipos "A" y "D", en los casos donde hubo aislamientos de la pasteurela; los análisis estadísticos (χ^2) revelaron que los estudios serológicos positivos fueron dependientes del aislamiento de P. multocida, encontrándose que el tipo "A" ($\chi^2 = 55$) fue más alto que con el tipo "D" ($\chi^2 = 18$), cuando se hizo el análisis estadístico con los dos tipos de pasteurela ($\chi^2 = 68$) el resultado fue mayor. El comportamiento serológico fue completamente diferente, en los casos donde no hubo aislamientos, ya que se observa que en donde el pulmón neumónico y serología positiva a P. multocida tipo "A" los casos son sumamente bajos; mientras que en la serología de P. multocida tipo "D" los casos son muy altos, en donde el pulmón es neumónico y la serología es negativa, esto probablemente se explica por alta prevalencia de aislamientos de P. multocida tipo "A" que se encuentran en el pulmón y los de tipo "D" que se encuentran en los cornetes nasales y tonsilas, tejidos que en este trabajo no consideraron.

La sensibilidad fue relativamente buena (tipo "A": 69.6% y tipo "D": 41.8%). Se encontró que el tipo "A" fue más sensible con respecto al tipo "D"; la combinación de los dos tipos (55.7%) reveló una sensibilidad moderada (Tabla de contingencia 6). La prueba fue altamente específica (tipo "A": 91.0%; el tipo "D": 89.6% o ambos: 90.3%), por lo que puede ser utilizada como prueba de campo para determinar los problemas ocasionados por Pasteurella multocida.

REFERENCIAS

1. Ciprián, C.A., Pijoan, A.C., et al. Can. J. Vet. Res. 52; 434-438, 1988.
2. Morrison, R.B., Pijoan, C. et al. Can. J. Comp. Med. 49: 129-137, 1985.
3. Pijoan, C. Neumonía del Cerdo. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. A.M.V.E.C. 1985, p.85-99.
4. Pijoan, C., Utrera, V. y Zhao, G. XXVI Congreso Nacional A.M.V.E.C. 1991, p.202-204.